



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INULINASAS EN  
CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus* AISLADAS DE MEZCAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA DANITZA GONZÁLEZ GARDUÑO**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: RUTH EDITH MARTIN FUENTES

**VOCAL:** Profesor: FRANCISCO RUIZ TERAN

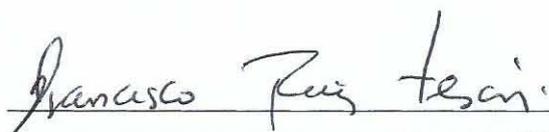
**SECRETARIO:** Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: GENARO JIMENEZ REYES

**2° SUPLENTE:** Profesor: NORMA ANGELICA CASTELLANOS CHAVEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 321, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**



**ASESOR DEL TEMA: DR. FRANCISCO RUIZ TERAN**



**SUSTENTANTE (S): MARÍA DANITZA GONZÁLEZ GARDUÑO**

## Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1. Antecedentes.....	3
1.1 Fructanos.....	3
1.2 Inulina.....	4
1.3 Inulinasas.....	6
1.4 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	8
2. Justificación.....	12
3. Hipótesis.....	12
4. Objetivos.....	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos particulares.....	13
5. Estrategia experimental.....	14
6. Metodología.....	15
6.1 Crecimiento de la cepa JG21 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> conservada en medio de cultivo YPDA bajo condiciones de refrigeración.....	15
6.1.1 Preparación de medio de cultivo y crecimiento de la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> en medio YPD y YPDA.....	15
6.2 Preinóculo de la levadura JG21 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	16
6.2.1 Cultivo nocturno de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> en medio YPD.....	16
6.3 Inoculación y crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en medio de cultivo YPD con adición de inulina.....	16
6.4 Medición de actividad enzimática de la levadura JG21, antes y después de ser adicionada la inulina de agave al medio de crecimiento.....	17
6.4.1 Ruptura celular de la cepa JG21, separación del pellet y sobrenadante.....	17
6.4.2 Actividad enzimática de la cepa JG21 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	18

6.4.3 Identificación de los productos de hidrólisis por cromatografía en capa fina (TLC).....	18
6.4.4 Identificación de los productos de hidrólisis por medio del HPLC.....	19
6.5 Cuantificación y evaluación de proteínas provenientes de la cepa JG21 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	20
6.5.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	20
6.5.2 Determinación de masa molecular de la proteína proveniente de la cepa JG21.....	20
6.5.3 Tinción de Coomasie y plata del gel de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de las bandas provenientes de la cepa JG21.....	22
6.6 Purificación de la proteína inulinasa proveniente de la cepa JG21 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	22
6.6.1 Obtención de proteína purificada por medio del FPLC.....	23
7. Resultados y discusión.....	24
7.1 Crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	24
7.2 Crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> con glucosa al 1% m/v en el medio de cultivo.....	25
7.3 Adición de la inulina al 1% m/v en el medio de crecimiento.....	27
7.4 Determinación de la masa molecular de la proteína.....	31
7.5 Determinación de la hidrólisis de la inulina por medio del HPLC.....	32
7.5.1 Degradación de inulina durante el tiempo de crecimiento debido a la actividad de la inulinasa presente en el medio.....	32
7.5.2 Hidrólisis enzimática de la inulinasa proveniente de la cepa JG21 en comparación con inulinasas comerciales.....	34
7.6 Separación y purificación de proteína por FPLC provenientes de la cepa JG21.....	35
7.7 Actividad de la fracciones obtenidas en el FPLC por medio de TLC.....	39
7.8 Determinación de la concentración final de la proteína.....	42
7.9 Identificación de los productos de hidrólisis de la inulina por medio del HPLC.....	43

7.10 Electroforesis SDS- PAGE de las proteínas purificadas.....	44
8. Conclusiones.....	46
9. Perspectivas.....	46
10. Bibliografía.....	47
Apéndice A.....	52
Apéndice B.....	55
Apéndice C.....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de la inulina (enlaces $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1) fructosil- fructosa).....	4
<b>Figura 2.</b> Células de levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> , creciendo en YPDA.....	9
<b>Figura 3.</b> Diagrama general de metodología utilizada.....	14
<b>Figura 4.</b> Tubos de fermentación #1 (izquierda) condiciones con agitación, y el #2 (derecho) condiciones sin agitación, ambos con recirculación de agua a una temperatura de 40°C.....	17
<b>Figura 5.</b> Colonias de levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> creciendo en medio YPD a 30°C por 24 horas.....	24
<b>Figura 6.</b> Gemación celular de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> , para comprobar que las células son viables a las 468 horas.....	30
<b>Figura 7.</b> Gel de electroforesis SDS-PAGE, al tiempo de crecimiento de 480 a 552 horas a las dos diferentes condiciones con agitación (1.504, 1.528, 1.552) y sin agitación (2.480, 2.504, 2.528, 2.552). En el cual se señala la banda ancha de proteína para el peso de 70 kDa.....	31
<b>Figura 8.</b> TLC de la reacción de las fracciones obtenidas en el FPLC del sobrenadante en condiciones de agitación y no agitación (SF1 y SF2) con inulina al 0.5% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 100mM pH 5 a una temperatura de 50°C al tiempo de 24 horas de hidrolisis. De izquierda a derecha se muestra el estándar de inulina (I) seguida de la glucosa (G), fructosa (F) y las fracciones obtenidas que se muestran en el cromatograma de la Gráfica 9 para la fracción 20- 22 (SF1) y la Gráfica 10 para las fracciones 8-10 y 11-16 (SF2).....	39
<b>Figura 9.</b> TLC de la reacción de las fracciones obtenidas en el FPLC del pellet en condiciones de no agitación (PF2) con inulina al 0.5% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 100mM pH 5 a una temperatura de 50°C al tiempo de 24 horas de hidrolisis. De izquierda a derecha se muestra el estándar de inulina (I) seguida de la glucosa (G), fructosa (F) y las fracciones obtenidas que se	

muestran en el cromatograma de la Gráfica 12 para la muestra de pellet sin agitación (PF2).....40

**Figura 10.** Gel de poliacrilamida de la proteína tanto intracelular como extracelular, señalado en un círculo amarillo la proteína de interés en el peso de 70 kDa y señalados por una flecha verde las bandas en un peso alrededor de 52 kDa. De izquierda a derecha se muestra el marcador molecular en kDa, seguido de las fracciones 10 (1PF2, pellet sin agitación) y 11-15 (2PF2, pellet sin agitación) del pellet en condiciones de agitación, posteriormente la 8-10 (1SF2, sobrenadante sin agitación) y 11-16 (2SF2, sobrenadante sin agitación) del sobrenadante en condiciones de no agitación.....44

## Índice de Gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en crecimiento bajo condiciones de agitación en medio YPD con 1% <sub>m/v</sub> de concentración de glucosa como sustrato. Células cuantificadas por medio de la Cámara de Neubauer.....	25
<b>Gráfica 2.</b> Crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en crecimiento bajo condiciones sin agitación en medio YPD con 1% <sub>m/v</sub> de concentración de glucosa como sustrato. Células cuantificadas por medio de la Cámara de Neubauer.....	26
<b>Gráfica 3.</b> Determinación de azúcares reductores directos en condiciones de agitación (azul) y sin agitación (roja) de <i>Kluyveromyces marxianus</i> cepa JG21 por medio de DNS. ....	27
<b>Gráfica 4.</b> Determinación de azúcares reductores por medio del método de DNS a las condiciones propuestas, con agitación (azul) y sin agitación (rojo), resultado del crecimiento en medio YPD con la inducción de 1% <sub>m/v</sub> inulina a las 168 horas.....	28
<b>Gráfica 5.</b> Incremento del número de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> durante el crecimiento en medio YPD en condiciones de agitación. Cuantificación de células por medio de la Cámara de Neubauer.....	29
<b>Gráfica 6.</b> Incremento del número de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> durante el crecimiento en medio YPD en condiciones sin agitación. Cuantificación de células por medio de la Cámara de Neubauer.....	29
<b>Gráfica 7.</b> Concentraciones de inulina durante el crecimiento en las condiciones propuestas (agitación y sin agitación) obtenidas por medio del método de HPLC, en color verde el estándar de inulina con concentración de 1.374mg/mL.....	32
<b>Gráfica 8.</b> Comparación de la disminución de la inulina (agave azul) a diferentes tiempos (0, 3, 19, 24 y 48 horas respectivamente) por medio del HPLC, de la enzima obtenida del crecimiento con agitación, sin agitación y Novozyme.....	34
<b>Gráfica 9.</b> Cromatograma del sobrenadante en condiciones de agitación (SF1), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/ min.....	36
<b>Gráfica 10.</b> Cromatograma del sobrenadante en condiciones de no agitación (SF2), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/ min.....	37

<b>Gráfica 11.</b> Cromatograma del pellet en condiciones de agitación (PF1), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/ min.....	38
<b>Gráfica 12.</b> Cromatograma del pellet en condiciones de no agitación (PF2), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/ min.....	38
<b>Gráfica 13.</b> Cromatograma en HPLC de mezcla de azúcares, a la concentración de 1mg/mL de inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, con tiempos de retención entre 6 a 7, 9 a 11, 11a 13 y de 14 a 15 respectivamente.....	52
<b>Gráfica 14</b> Cromatograma en HPLC al tiempo de 216 horas de crecimiento, en condiciones de agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.783 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar.....	52
<b>Gráfica 15.</b> Cromatograma en HPLC al tiempo de 216 horas de crecimiento, sin agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.614 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar.....	52
<b>Gráfica 16.</b> Cromatograma en HPLC al tiempo de 480 horas de crecimiento, con agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.900 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar. Se observa una clara disminución en el área del pico.....	53
<b>Gráfica 17.</b> Cromatograma en HPLC al tiempo de 480 horas de crecimiento, sin agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.900 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar. Se observa una clara disminución en el área del pico.....	53
<b>Gráfica 18.</b> Cromatograma en HPLC al tiempo final de crecimiento (648 horas), con agitación, donde se aprecia la ausencia inulina y el aumento se la señal.....	53
<b>Gráfica 19.</b> Cromatograma en HPLC al tiempo final de crecimiento (648 horas), sin agitación, donde se aprecia la ausencia inulina y el aumento de la señal.....	54
<b>Gráfica 20.</b> Cromatograma en HPLC de la hidrólisis de las diferentes fracciones obtenidas del HPLC, donde se muestra las mismas señales a tiempos de retención similares.....	54
<b>Gráfica 21.</b> Curva patrón de inulina por medio de HPLC, para el cálculo de la actividad enzimática por medio de la disminución de inulina para generar productos de hidrólisis.....	60
<b>Gráfica 22.</b> Curva patrón de fructosa para la determinación de azúcares reductores por medio del método de DNS.....	61

<b>Gráfica 23.</b> Curva patrón de proteínas determinada por el método de Bradford.....	61
---	----

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Contenido promedio de inulina en especies vegetales ( <i>Van Loo et al., 1995</i> ).....	5
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> y rendimientos en inulinasa.....	10
<b>Tabla 3.</b> Cantidades utilizadas de cada uno de los reactivos para preparar el gel de electroforesis SDS-PAGE.....	20
<b>Tabla 4.</b> Claves para identificar las muestras presentes en los geles de electroforesis SDS-PAGE.....	31
<b>Tabla 5.</b> Concentración de proteína de las diferentes fracciones obtenidas por medio del FPLC tanto para la muestra del pellet como del sobrenadante antes y después de ser liofilizada.....	42

## RESUMEN

Los fructanos provenientes del agave se basan en una estructura neo-inulina (residuos de glucosa dentro de la cadena de fructosa). Normalmente son polímeros ramificados con una estructura compleja combinada con fracciones de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6), los cuales tienen un grado de polimerización comprendido entre 3 y 29 unidades. Los fructanos se pueden clasificar en dos tipos, levana que principalmente tiene enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) y la inulina que tiene en su mayoría o exclusivamente enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) entre unidades de fructosa y en algunos casos una glucosa terminal.

La enzima capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) de la inulina en fructosa y glucosa, además de Inulo-oligosacáridos (IOS) se le denomina inulinasa. Las inulinasas se clasifican en endo-inulinasas que hidrolizan los enlaces internos de la inulina para obtener principalmente inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa; y en exo-inulinasas que hidrolizan los extremos de la inulina, obteniendo principalmente como producto final la fructosa. Las principales levaduras productoras de esta enzima son *Pichia* sp., dos cepas de *Kluyveromyces fragilis*, *Cryptococcus aureus*, y *Kluyveromyces marxianus*, las cuales tiene un alto rendimiento para la producción de la enzima inulinasa.

El presente trabajo de investigación consistió en la producción de inulinasa proveniente de la levadura *Kluyveromyces marxianus* JG21, fue inducida con inulina de agave azul en condiciones de agitación y no agitación a una temperatura constante. Durante este proceso se cuantificó proteína, azúcares reductores y las células producidas por esta levadura, las enzimas obtenidas se purificaron por medio de la Cromatografía Líquida Rápida de Proteína (FPLC) con una columna aniónica, la evaluación de los productos de la hidrólisis de la enzima purificada se hizo por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las enzimas microbianas puede tener un gran avance en materia de biotecnología, ya que permite la obtención de productos de gran interés industrial. (Vandamme y Derycke, 1983).

Dentro del estudio de la biotecnología microbiana, la industria se ha visto beneficiada debido a los proyectos que se han tenido referente a enzimas microbiológicas, lo cual ha logrado la producción de edulcorantes que satisfacen las necesidades del mercado (Casey, 1977).

En la búsqueda de nuevos procesos de generación de fructosa las inulinasas ofrecen interesantes resultados para la obtención de jarabes de fructosa con altas concentraciones, mediante la hidrólisis enzimática de inulina (Ricca et al., 2007; Vandamme y Derycke, 1983).

La inulinasa es una enzima caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura e inulooligosacaridos (IOS).

El producto de reacción, fructosa, es usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1.5 a 2 veces la sacarosa. La producción de IOS ha sido ampliamente estudiada por su capacidad prebiótica, lo que ha valido un uso amplio en varios alimentos y debido a esto les ha dado un gran valor agregado; son tres veces más dulces que la sacarosa, no son cariogénicos y no son utilizados como fuente de energía (Chacón, 2006). De ahí el interés por el estudio de la enzima para producirla, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos, siendo la levadura *Kluyveromyces marxianus* la más estudiada; un microorganismo muy factible para generar este producto son las levaduras, debido a que se obtienen los mejores rendimientos de producción de la enzima. (Ricca et al., 2007; Chi et al., 2009).

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Fructanos

Los fructanos son polímeros de carbohidratos de reserva de las plantas, con unidades repetidas de fructosa y un residuo de glucosa único. Normalmente pueden encontrarse tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, y son conocidas como inulinas, debido a que por primera vez fueron aisladas de *Inula helenium*. (Arrizon, J. et al, 2011)

Los fructanos se pueden agrupar de acuerdo a los siguientes criterios:

- Inulina: Compuesto que tiene en su mayoría o exclusivamente enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) entre unidades de fructosa, y en algunos casos una glucosa terminal. La inulina es totalmente lineal pero en algunos casos posee un grado de ramificación del 1 al 2%; aunque también existe una forma cíclica que posee 6, 7 u 8 unidades de fructosa (Kawamara et al. 1989).
- Levana: Compuesto que posee en su mayoría enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) entre sus unidades de fructosa, puede o no tener una glucosa terminal.

Existe una variedad de estructuras complejas ramificada que se deriva de las dos anteriores, con enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) en el caso de las neoserias de inulinasa, que además contiene una unidad de glucosa entre dos unidades de fructosa y  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) de las neoserias de levanas. (Muñoz- Gutierrez et al, 2009; López et al, 2012).

Los fructanos provienen de plantas o microorganismos, son una combinación de oligómeros y polímeros. Éstos se clasifican mediante el promedio y el máximo número de unidades de fructosa, conocidos como grado de polimerización promedio (DP) y máximo grado de polimerización (DP máximo) respectivamente.

Los fructanos de origen vegetal tienen pocos residuos de fructosa y no exceden las 200 unidades de la misma pero cuentan con un alto grado de ramificación a través de enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1). Las bacterias por su parte, hidrolizan fructanos de hasta 100,000 unidades y son muy ramificados.

Los fructanos del *Agave tequilana* (ATF), se basan en una estructura neo-inulina (residuos de glucosa dentro de la cadena de fructosa). Normalmente son polímeros ramificados con una estructura compleja, combinado con fracciones de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) que tienen un grado de polimerización comprendido entre 3 y 29 unidades. (Arrizon, J. et al, 2011)

## 1.2 Inulina

La inulina (Figura 1) es un polisacárido constituido de una cadena lineal de  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) con uniones de moléculas D-fructofuranosa, con terminaciones de residuos de glucosa a través de un tipo de sacarosa. (Chi, Z. et al, 2009)

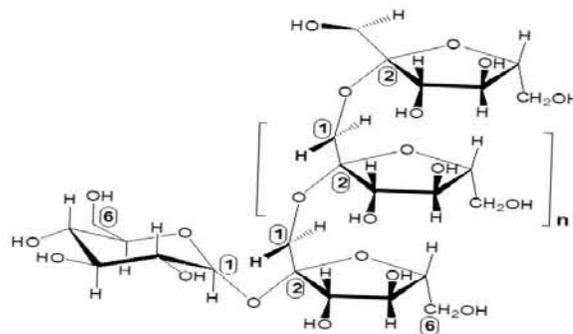


Figura 1. Estructura de la inulina (enlaces  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) fructosil-fructosa)  
(Muñoz -Gutierrez et al, 2009)

Este polisacárido se extrae comercialmente de vegetales como: la raíz de achicoria (planta herbácea) y la dalia, en el diente de león, la cebolla, el ajo, el espárrago y en diferentes tubérculos como la papa. Su principal función biológica es la reserva de energía y, dependiendo de la especie se puede distribuir en las hojas, bulbos, etc. (Ricca et al. 2007).

La inulina es un polímero poldisperso contenido en las plantas, su descubrimiento data alrededor de unos 5000 años. Fue reportada por primera vez por un médico del ejército romano llamado Pedanios Dioscoridio, quien elogiaba la achicoria por los beneficios que brinda a la salud, principalmente en el estómago, hígado y riñones. Posteriormente en el siglo XIX fue redescubierta por un científico Alemán, quien aisló una sustancia de origen vegetal de un extracto de agua hirviendo de *Inula helenium*, llamándole inulina. (Frank, 2002).

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de inulina en diferentes plantas.

**Tabla 1. Contenido promedio de inulina en especies vegetales (Van Loo et al., 1995)**

<b>Especie vegetal</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Inulina (g/100g base seca)</b>
Pataca (tubérculo)	<i>Helianthus tuberosus</i>	89
Raíz de Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	79
Raíz de Dalia	<i>Dalia spp.</i>	59
Cebolla	<i>Allium cepa L</i>	48
Ajoporro	<i>Allium porrum L.</i>	37
Ajo	<i>Allium sativum</i>	29
Yacón (tubérculo)	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	27
Espárrago	<i>Asparragus officinalis L.</i>	4
Plátano	<i>Musa cavendishii</i>	2
Centeno	<i>Secale cereale</i>	1

Para el caso del agave la inulina se encuentra en un porcentaje de 16- 25% referido a producto fresco (Moshfegh, Aj., 1999). Según lo reportado por Montañez- Soto et al, 2011, mencionan que los porcentajes de inulina en base seca de cada una de las fracciones del *Agave tequilana* Azul son las siguientes: cabeza 43.24%, bases 24.52% y puntas 2.25%.

La inulina puede emplearse como ingrediente funcional en los alimentos, pues se considera un prebiótico entre algunos otros beneficios que aporta su consumo, además si se hidroliza enzimáticamente se pueden obtener fructo-oligosacáridos que también poseen propiedades prebióticas y poseen dulzor de entre 30-50% respecto a la sacarosa. La inulina es una fuente potencial de fructosa y podrían prepararse jarabes con un porcentaje mayor al 90% de fructosa con menos pasos enzimáticos comparados con los jarabes de fructosa elaborados con almidón de maíz. Para hidrolizar la inulina hasta fructosa pueden emplearse métodos fisicoquímicos, pero las condiciones drásticas producen compuestos coloridos y de dulzor nulo. Los métodos enzimáticos no producen compuestos indeseables y se puede alcanzar alta eficiencia en la hidrólisis. (*Singh et al. 2006*)

Recientemente las fuentes de inulina son conocidas como una materia prima renovable para la producción de jarabe de fructosa, fermentación de etanol y la producción de inulo- oligosacaridasa.

### **1.3 Inulinasas**

En la industria las enzimas son utilizadas como biocatalizadores pero también pueden considerarse altamente específicos para aplicaciones en alimentos, como es el caso de la inulinasa que cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -D-(2→1)-fructosídicos en la inulina originando fructosa y glucosa.

La inulinasa es una enzima miembro de la familia de glicósido hidrolasa, la cual cataliza la hidrólisis de inulina a fructosa y a fructo-oligosacáridos (FOS). La purificación de inulinasa microbiana extracelular se realiza por métodos convencionales de centrifugación, ultrafiltración, precipitación con solventes o sales, cromatografía de intercambio iónico y permeación en gel, mientras que la inulinasa intracelular requiere disrupción celular antes de practicar los métodos antes mencionados para las enzimas extracelulares (*Kushi et al., 2000*). Chi et al. (2009) reporta que con el proceso de extracción y purificación de la inulinasa,

además de determinar el rendimiento y si la enzima es extracelular o intracelular determina otras características como su masa molecular, su modo de acción sobre la molécula de inulina, respuesta a los cambios de pH y temperatura, propiedades cinéticas y efecto de la concentración de sustrato.

Se ha determinado que las inulinasas pueden ejercer dos modos de acción diferentes sobre la molécula de inulina, una acción externa y una acción interna, correspondiendo a dos clases de inulinasas llamadas exo-inulinasas y endo-inulinasas respectivamente. Las exoinulinasas (74 KDa, pH 5.1 – 7.0) empiezan con la separación de la primera molécula de D-fructosa y va hasta el último enlace para liberar glucosa de la unidad de sacarosa, y la endo-inulinaasa (64 KDa) actúa sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacáridos (inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa) pero sin actividad invertasa.

Estas propiedades dependen del origen microbiano de la enzima, desde este punto de vista la mejor cepa sería la que tenga ambas propiedades, como el caso del *Aspergillus ficuum* (Pandey et al., 1999), dado que una mezcla de endo y exo-inulinaasa puede resultar en una mejor conversión de inulina a fructosa que solo utilizar enzimas puras aisladas, dado que las endo-inulinasas romperían las moléculas de inulina en muchos oligosacáridos, aumentando así los puntos de ataque para las exo-inulinasas, con el consecuente incremento de la velocidad de reacción de inulina a fructosa. Por tanto queda probado que las exo-inulinasas también ejercen actividad catalítica sobre la sacarosa desdoblándola en glucosa y fructosa, es decir, tienen actividad de invertasa. Se afirma que la actividad invertasa es mayor en enzimas producidas por levaduras que en aquellas obtenidas a partir de mohos (Ricca et al., 2007).

Los microorganismos son la mejor fuente para la producción comercial de inulinasas porque son fáciles de cultivar y se obtienen altos rendimientos de la enzima. Hasta ahora se han encontrado microorganismos que pueden producir altos niveles de inulinasas, entre los cuales están *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp,

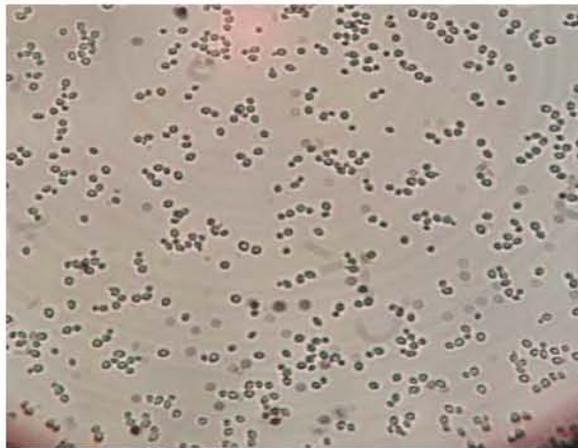
*Arthrobacter* spp, *Staphylococcus* spp, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Pseudomonas* spp, *Xanthomonas* spp, *Kluyveromyces* spp, *Cryptococcus* spp, *Pichia* spp, *Sporotrichum* spp y *Candida* spp. Las cepas de donde se obtienen mejores rendimientos para una producción aceptable comercialmente de la enzima son *Pichia* sp., dos cepas de *Kluyveromyces fragilis*, *Cryptococcus aureus* y *Kluyveromyces marxianus*. (Chi, Z. et al, 2009)

Una de las diferentes aplicaciones que puede tener la inulinasa es la producción de fructosa, dicho azúcar es importante dado que su poder edulcorante es mayor que el de la sacarosa y glucosa. La fructosa se puede obtener directamente de las frutas por inversión de la sacarosa o por isomerización de glucosa, el cual es un proceso que involucra el uso de varias enzimas lo que conlleva a una elaboración muy costosa y laboriosa. Otra opción de obtener jarabes fructosados podría ser a partir de extractos vegetales con alto contenido de inulina, por ejemplo, Byun y Nahm (1978) hidrolizaron los azúcares de la Alcachofa de Jerusalén con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*, Grootwassink y Fleming (1980) reportan que la hidrólisis enzimática presenta varias ventajas sobre la hidrólisis química, tales como, menor tiempo de reacción, mayor rendimiento y no hay desarrollo de colores ni sabores indeseables.

#### **1.4 *Kluyveromyces marxianus***

Como se mencionó anteriormente una de las levaduras con la cual se obtiene rendimientos altos de la enzima inulinasa es *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* la cual a través de los años ha sido reclasificada taxonómicamente; a principio de 50's Lodder y Kreger-van Rij la agruparon en el género *Saccharomyces* llamándola *S. fiugilis* y *S. marxianus*, las cuales producían ascosporas lunadas en contraste con las ascosporas redondas del resto de las especies clasificadas bajo el mismo género. Posteriormente, en 1970 Lodder considera la forma de las ascosporas como fundamental y las reclasifica bajo el género *Kluyveromyces*, llamándolas, *K. fiugilis* y *K. marxianus* respectivamente.

En 1984, Kreger-van Rij considerando la infertilidad en las especies *K. fragilis* y *K. marxianus* decide fusionarlas en *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (Reed y Nagodawithana, 1991). *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* es una levadura de grado alimenticio que ha sido utilizada para la producción de proteína unicelular a partir de suero de leche (Mayrath y Bayer, 1979, Reed y Nagodawithana, 1990). Además, esta levadura produce varias enzimas de interés tecnológico como la lactasa, la cual es producida a nivel industrial (Castillo, 1990), pectinasa (Phaff, 1966., Wimborne y Rickard, 1978) e inulinasa (Vandarrne y Derycke, 1983., Giraud y Galzy, 1990).



**Figura 2. Células de levadura *Kluyveromyces marxianus*, creciendo en YPDA.**

Considerando que el mayor esfuerzo está dirigido a producir inulinasa para aplicarlo en la producción de jarabe enriquecido de fructosa, como un edulcorante de bajo poder calórico, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* tienen el *status* de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) en los Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente, son preferidos para la producción de inulinasa con fines alimentarios y biotecnológicos (Lane y Morrissey, 2010).

Además de ser la inulinasa una enzima nativa de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener la

mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microbio eucarionte termotolerante, con habilidad para crecer sobre los 52°C, capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves, como la lactosa e inulina y una alta capacidad secretora de enzimas líticas, hacen de este microorganismo líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos. (Lane y Morrissey, 2010).

**Tabla 2. Cepas de *Kluyveromyces marxianus* y rendimientos en inulinasa. (Castillo-Chamy,2010)**

Microorganismo	Tipo de cultivo	Rendimiento U/mL
<i>Kluyveromyces sp.</i> Y-85	Líquido	59.5
<i>K. marxianus</i>	Líquido	43.7
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	Líquido	260
<i>K. marxianus</i> ATCC 53466	Líquido	0.418
<i>K. marxianus</i> CDBB-L-278	Líquido	82
<i>K. marxianus var. Marxianus</i> CBS 6556	Líquido	3000
<i>K. marxianus</i> UCD(FST)55-82	Líquido	212
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	Continuo	107
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Líquido	121
<i>K. marxianus var. Bulgaricus</i>	Líquido	4.1
<i>K. marxianus</i> (A1 y A2)	Líquido	32
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	3 91.9 U/g
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Líquido	8.87 U/g.h
<i>K. marxianus</i> S120	Sólido	409.8 U/g
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	24.5
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	50.2
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	463 U/g

La inulinasa de levaduras es una enzima extracelular parcialmente asociada a la pared celular y parcialmente excretada al medio de cultivo; es por esta propiedad que las inulinasas en levaduras pueden presentarse como enzimas extracelulares e intracelulares (Pandey et al., 1999).

Una investigación en la síntesis de inulinasa en levaduras demostró que la enzima es inducible y está sujeta a represión catabólica (Vijayaraghavan et al., 2009).

Se ha señalado en varias investigaciones que el pH óptimo de actividad para inulinasas purificadas de hongos y levaduras está en el rango de 4.5-6.0, mientras que la temperatura óptima se encuentra entre 50 y 60 °C. (Singh et al. (2007)

Las levaduras del genero *Kluyveromyces*, producen inulinasas principalmente del tipo exo-enzimas. El resultado de muchas investigaciones sobre el efecto activador/inhibidor que presentan algunos iones metálicos sobre las inulinasas producidas por el género *Kluyveromyces*, muestra que por lo general el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  suelen tener un efecto de activación, mientras que el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ag}^+$  generan un efecto de inhibición.

## 2 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la obtención de inulinasas a través de las levaduras se ha ido incrementando como la opción más factible para la generación de nuevas tecnologías que permitan desarrollar jarabes de alta fructosa (HFS) y jarabes de ultra alta fructosa (UHFS) utilizando la conversión enzimática de inulina (*Arrizon et al., 2010; Cruz Guerrero et al., 2006; Díaz Montaña et al., 2008; Huitron et al., 2008*). En este trabajo, el objetivo es probar la capacidad de producir enzimas con aplicaciones comerciales a través del empleo de la cepa *Kluyveromyces marxianus*, la cual se ha comprobado que produce enzimas denominadas inulinasas con un alto rendimiento en su producción, con lo cual se generan jarabes de alta fructosa por medio de procesos enzimáticos debido a la hidrólisis de la inulina proveniente de agave, generando un mayor dulzor en comparación a los jarabes provenientes del maíz obtenidos por diferentes métodos, facilitando así de manera industrial la producción de éste tipo de jarabes.

## 3 HIPÓTESIS

- Se detectará actividad de inulinasas al añadir inulina al medio de cultivo YPD durante la etapa de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*.
- Se incrementará la cantidad de inulinasas en condiciones de agitación comparado con un sistema estático y se obtendrá proteínas de tipo endo como exo-inulinasas para la hidrólisis de la inulina.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Evaluar la producción de inulinasas en la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus* obtenida de la fermentación de mezcal.

## 4.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones adecuadas (agitación, no agitación, temperatura, tiempo de crecimiento) para la producción de inulinasas empleando la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus*.
- Evaluar la actividad de inulinasa proveniente de *Kluyveromyces marxianus*.
- Identificar si es una proteína extra o intra celular así como si se trata de una endo o exo inulinasa.

## 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

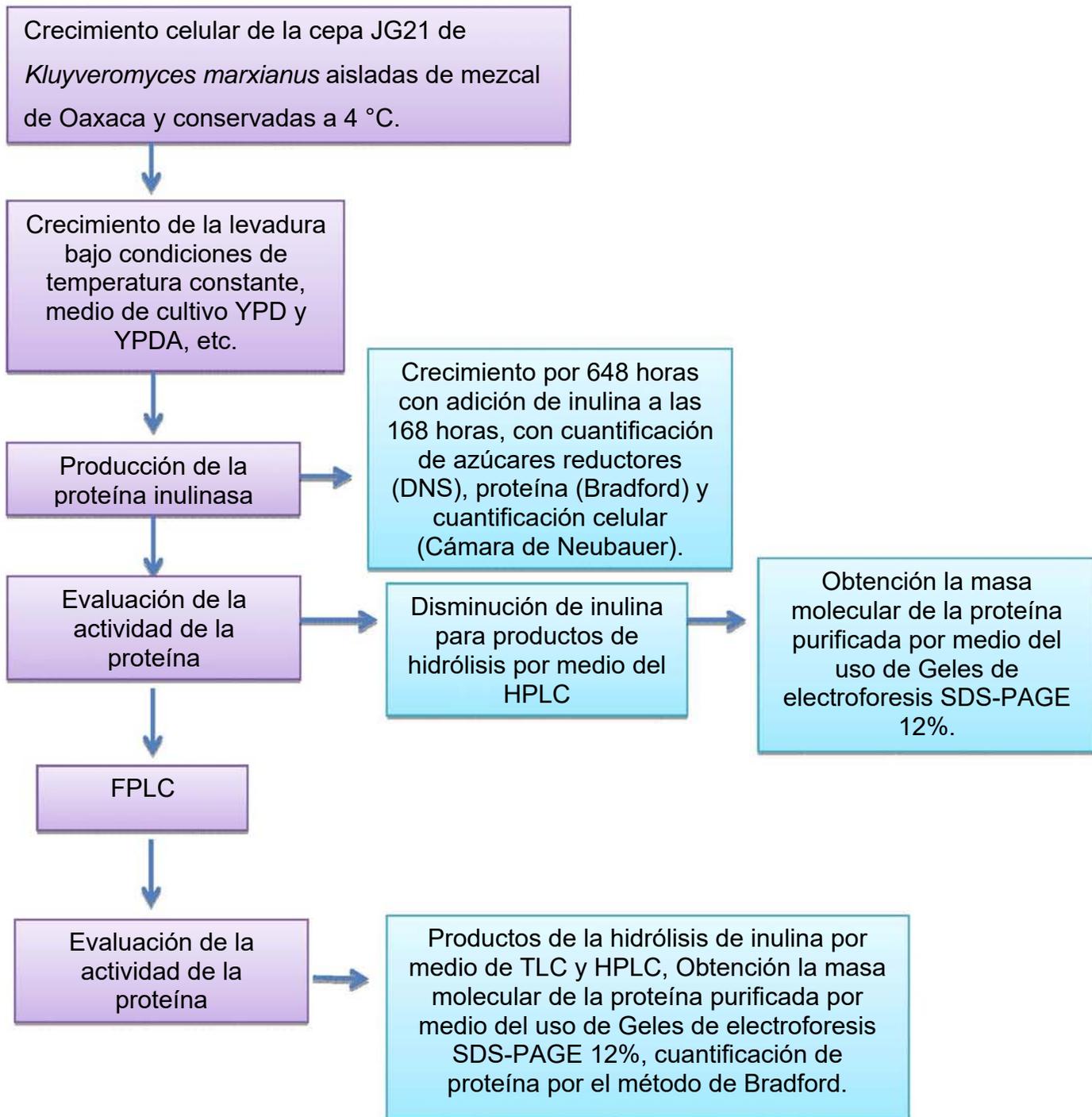


Figura 3. Diagrama general de metodología utilizada.

## **6 Metodología**

La cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus* con la cual se llevó a cabo el proyecto, se tomó de la colección de cepas existentes en el laboratorio 321 del conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM, previamente identificadas a nivel molecular, sembradas en cajas Petri con medio de cultivo YPDA como colonias aisladas y puras en refrigeración a 4 °C.

### **6.1 Crecimiento de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus* conservada en medio de cultivo YPDA bajo condiciones de refrigeración**

#### **6.1.1 Preparación de medios de cultivo y crecimiento de la cepa *Kluyveromyces marxianus* en medio YPD y YPDA**

Se preparó medio de cultivo sólido YPDA (1% m/v de extracto de levadura, 2% m/v peptona de soya, 2% m/v de dextrosa y 2% m/v de agar) y YPD (1% m/v de extracto de levadura, 2% m/v peptona de soya y 2% m/v de dextrosa), se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo los medios se mantuvieron a temperatura ambiente, se vertió el medio YPDA en cajas petri estériles, el medio YPD se vertió en tubos de vidrio (13 x 2 cm), ambos medios de cultivo se mantuvieron en incubación por 24h a 30 °C como prueba de esterilidad, se inocularon las cajas petri tomando una asada de la cepa *Kluyveromyces marxianus* JG21 previamente sembrada en medio YPDA conservada en refrigeración y se colocó en la incubadora a 30 °C durante 24 horas para su crecimiento.

Una vez desarrollado el crecimiento de la cepa JG21 en el medio YPDA, se tomó una colonia aislada y se inoculó en los tubos de vidrio de 13 x 2 cm con medio YPD líquido incubándose a 30 °C por 24 horas.

## **6.2 Preinóculo de la levadura JG21 de *Kluyveromyces marxianus***

### **6.2.1 Cultivo nocturno de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en medio YPD**

Se tomaron tres asadas de la levadura JG21 de los tubos de crecimiento del paso anterior y se inoculó un tubo con medio YPD de 13 x 2 cm, el cual se mantuvo en agitación a 70 rpm a temperatura ambiente por 24 horas.

Del cultivo nocturno se tomó 1 mL del medio YPD bajo condiciones estériles, colocándolo en un eppendorf estéril y centrifugando a 4 °C a 10000 rpm por 10 minutos, este mismo procedimiento se realizó por triplicado para obtener una mayor proporción de pellet, posteriormente se separó el sobrenadante y las células de la levadura JG21 se lavaron con agua destilada estéril centrifugándose a 4 °C a 10000 rpm por 10 minutos, se desechó el agua y se resuspendió el pellet en 1 mL de agua destilada estéril.

## **6.3 Inoculación y crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en medio de cultivo YPD con adición de inulina**

Se prepararon 400 mL de medio líquido YPD (0.5% m/v de extracto de levadura, 2% m/v peptona de soya y 1% m/v de dextrosa), sometiéndose a condiciones de esterilización a 121 °C por 15 minutos, se colocó por duplicado 200 mL de medio de cultivo YPD en un tubo enchaquetado para recirculación previamente esterilizados, etiquetándolos como número #1 el que se encontraba en condiciones de agitación y como número #2 sin agitación, los tubos fermentadores se colocaron en recirculación para mantener una temperatura de 40 °C, posteriormente inoculando en condiciones asépticas con el mililitro de las células de la levadura JG21 del cultivo nocturno, durante el tiempo de la fermentación se tomaron muestras de 5 mL cada 24 horas durante 648 horas en condiciones asépticas.

A las 168 horas después de la inoculación con la levadura se le adicionó inulina estéril al 1%  $P/V$  (Marca Preventy, Inulina Soluble suplemento alimenticio, fabricada por Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V.) respecto al volumen del medio de cultivo depositado en los fermentadores (200 mL). Para la preparación de la inulina se pesaron 8 g de inulina de agave azul soluble en 40 mL de agua destilada, se esterilizó por medio de filtración (poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ) y se le agregaron a los tubos 10 mL para obtener la concentración adecuada (1%  $m/v$ )



**Figura 4. Tubos de fermentación #1 (izquierda) condiciones con agitación, y el #2 (derecho) condiciones sin agitación, ambos con recirculación de agua a una temperatura de 40 °C**

#### **6.4 Medición de actividad enzimática de la levadura JG21, antes y después de ser adicionada la inulina de agave al medio de crecimiento**

##### **6.4.1 Ruptura celular de la cepa JG21, separación del pellet y sobrenadante**

Se tomó 1 mL de cada una de las muestras recolectadas durante el crecimiento, las cuales se centrifugaron a 4 °C por 10 min a 10000 rpm, posteriormente se separó el pellet del sobrenadante guardando éste último en congelación (-20 °C) para su posterior utilización. Una vez separado el pellet se le adicionó 1 mL de

agua destilada estéril junto con una pequeña cantidad de perlas de vidrio estériles, se colocó en el Vortex por 4 min con intervalos de 1 min colocándolas en baño de hielo, se centrifugó a 4 °C por 10 min a 10000 rpm separando las perlas de vidrio junto con los fragmentos de la célula y el sobrenadante se almacenó en congelación junto con las muestras del sobrenadante antes obtenidas.

#### **6.4.2 Evaluación de la actividad enzimática de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus***

Para la actividad enzimática e hidrólisis de la inulina se determinó por medio de la presencia de azúcares reductores en el medio de crecimiento por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS), siguiendo la siguiente metodología:

De las muestras obtenidas a los distintos tiempos de crecimiento, se tomaron 100 µL del sobrenadante de cada una de las muestras para incorporarlas a una mezcla de 1 mL de buffer de acetatos 100 mM con inulina al 1% m/v a pH de 5 colocándose en un baño a 50 °C por 15 minutos, transcurrido este tiempo se adicionó 100 µL de reactivo DNS y se colocó en un baño por 5 min a una temperatura de 92 °C, las muestras se depositaron en un baño de hielo para su posterior medición a 540 nm en un espectro de UV- visible GBC- Cintral Double Beam. (Arrizon J., 2011)

El cálculo de la medición de azúcares reductores se realizó empleando la curva patrón de fructosa. (Apéndice C).

#### **6.4.3 Identificación de los productos de hidrólisis por Cromatografía en Capa Fina (TLC)**

De las fracciones obtenidas en el FPLC tanto del pellet como de sobrenadante de las muestras de crecimiento de la levadura JG21, se tomaron 100 µL incorporándolas a 1 mL de una mezcla de Buffer de acetatos 100 mM con inulina al 0.5% m/v a pH 5 y se colocaron en un baño a 50 °C por 24 horas.

Se utilizaron cromatoplasmas TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, marca MERCK, en las cuales se le colocó cada una de las fracciones por separado junto con los estándares de inulina 0.5% m/v, fructosa 0.5% m/v y glucosa 0.5% m/v, usando como fase móvil una mezcla de Butanol:Metanol:Agua en una proporción de 15:9:6, dichas cromatoplasmas se revelaron con una solución de Ornicol (10 mg/mL) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% y etanol (100 µL/mL), aplicada con un aspersor para obtener un recubrimiento adecuado en toda la placa, se colocó la cromatoplasma en un parrilla elevando la temperatura poco a poco para evitar que la placa llegara a sufrir daño por calor excesivo, esto para facilitar la reacción y el revelado de los azúcares presentes debido a la hidrólisis de la inulina de agave.

#### **6.4.4 Identificación de los productos de hidrólisis por medio del HPLC**

De las muestras obtenidas a los diferentes tiempos de crecimiento así como de las fracciones obtenidas en el FPLC tanto del pellet como de sobrenadante de la levadura JG21, se tomaron 100 µL las cuales se incorporaron a 1 mL de una mezcla de Buffer de acetatos 100 mM con inulina al 1% m/v a pH 5 colocándose en un baño a 50 °C a diferentes tiempos para su análisis (0, 3, 18, 24 y 48 horas). Las muestras obtenidas se pasaron por un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm para almacenarlos en viales de 1.5 mL para su análisis en el HPLC (marca Waters).

Se empleó una columna Sugar Pak 1 (8.5 x 300 mm, marca Waters), para la detección de los productos de hidrólisis, inyectando 10 µL de la muestra a un flujo de 0.4 mL/min a una temperatura de 70 °C con una presión de 800 psi, el tiempo de corrida fue de 18 min, empleando como fase móvil Agua-EDTA-Ca, para los estándares se utilizaron glucosa, fructosa, inulina y sacarosa a una concentración de 1 mg/mL.

## 6.5 Cuantificación de proteínas provenientes de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus*

### 6.5.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para las muestras se tomó 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las dos condiciones de crecimiento, se agregó 1 mL del reactivo de Bradford 1x Dye Reagent y se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 min, para su posterior medición a una absorbancia a 595 nm.

Se realizó una curva patrón empleando BSA como estándar. (Apéndice C)

### 6.5.2 Determinación de masa molecular de la proteína proveniente de la cepa JG21

Para la determinación de la masa molecular de la proteína se realizó por medio de Electroforesis en Gel de Acrilamida (SDS-PAGE). La preparación del gel inferior o separador (5 mL, grosor= 0.75 mm) y para el gel superior o compactador, se mezclaron los siguientes reactivos a un porcentaje del 12%:

**Tabla 3. Cantidades utilizadas de cada uno de los reactivos para preparar el gel de electroforesis SDS-PAGE**

<b>Concentración del 12% para la preparación de geles para SDS- PAGE</b>		
<b>Componente</b>	<b>Gel Inferior (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Gel superior (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Agua desionizada</b>	1683	1500
<b>Amortiguador inferior</b>	1250	---
<b>Amortiguador superior</b>	---	630
<b>SDS</b>	50	33
<b>Acrilamida/bisacrilamida (30%<i>m/v</i>)</b>	2000	330
<b>TEMED</b>	3	2
<b>Persulfato de amonio</b>	15	10

Siguiendo la metodología del manual de laboratorio de Inmunología General de B. Lomonte 2009, se preparó el molde para el gel colocando el peine entre los vidrios realizando un marca aproximadamente a 0.5 cm por debajo del nivel del “peine” de muestras retirándolo una vez colocando la marca, se colocó la mezcla de cada una se los reactivos presentados en la Tabla 3 para el gel inferior y se vertió la solución entre los vidrios (molde) hasta la marca realizada por debajo del “peine”, sin atrapar burbujas al verter la mezcla, enseguida se le adicionó isobutanol a la mezcla para eliminar el menisco de la parte superior del gel inferior y se dejó polimerizar la mezcla por 25 a 30 min aproximadamente.

Se retiró el isobutanol sobrante la superficie del gel inferior y se preparó la solución para el gel superior. Los reactivos de preparación para el gel superior se presentan el Tabla 3, una vez realizada esta mezcla se vertió en el molde sobre el gel inferior colocando el peine sin atrapar burbujas y se dejó polimerizar por alrededor de uno 20 a 25 minutos, una vez polimerizado se retiró el peine deslizándolo suavemente por la parte superior, se lavó cada una de las ranuras con agua destilada aspirando con una jeringa evitando cualquier daño al gel.

Para la preparación de muestras se mezcló 25  $\mu$ L de la muestra por analizar con 25  $\mu$ L de amortiguador reductor, se colocó en baño de agua en ebullición por 5 min, terminando este tiempo se depositó cada una de las muestras en los pozos colocando 20  $\mu$ L de esta mezcla, llenando previamente los pozos y la cámara con amortiguador; como marcador se utilizó *Protein Biology de Thermo Scientific #26616 Lot: 00166772* a una cantidad de 5 $\mu$ L, el cual se colocó en el pozo lateral del gel.

Se llevó a cabo una electroforesis a un voltaje de 150 v durante 80 min retirando el gel del molde de vidrio colocándolo en una bandeja de plástico para su posterior tinción. (B. Lomonte, 2009)

### **6.5.3 Tinción de Coomasie y Plata del gel de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de las bandas provenientes de la cepa JG21**

Una vez colocado el gel en una bandeja de plástico se le adicionó azul de Coomasie hasta cubrir por completo el gel durante aproximadamente 1 hora con agitación suave (60 rpm), transcurrido el tiempo, se sumergió en solución desteñidora (10 mL etanol, 10 mL de ácido acético y 80 mL de agua destilada), se retiró la solución desteñidora adicionándole agua destilada y se colocó en agitación suave para su posterior observación (*Lomonte B. 2009*).

Para la tinción con plata se sumergió el gel en la solución teñidora ( $AgNO_3= 0.3\text{ g}$ ,  $Etanol= 15\text{ mL}$ ,  $Ac. Acético= 0.75\text{ mL}$  y  $H_2O= 150\text{ mL}$ ), se agitó durante 20 min a 50 rpm, una vez transcurrido el tiempo se retiró la solución lavándose el gel con 150 mL de agua manteniéndola en agitación a 50 rpm y se retiró 5 minutos después, se adicionó sal reveladora ( $NaOH= 4.5\text{ g}$ ,  $formaldehido= 0.15\text{ mL}$  y  $H_2O= 150\text{ mL}$ ) previamente calentada a  $55\text{ }^\circ\text{C}$  agitando de 5 a 10 min hasta observar las bandas formadas en el gel, se retiró la solución reveladora y se añadió la solución de paro ( $Etanol= 15\text{ mL}$ ,  $Ac. Acético= 0.75\text{ mL}$  y  $H_2O=150\text{ mL}$ ) durante 1 minuto, para después colocar el gel en agua destilada para su análisis.

### **6.6 Purificación de la proteína inulinasa proveniente de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus***

Una vez terminado el crecimiento de la cepa JG21 el medio de cultivo restante se almacenó en tubos Falcon, fueron centrifugados a 6000 rpm durante 15 min para poder realizar la separación del pellet con el sobrenadante en ambas condiciones de crecimiento (con y sin agitación), una vez terminada la centrifugación se vertió el sobrenadante a otro tubo Falcon y se mantuvo en congelación durante 6 horas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , posteriormente se realizó la liofilización durante 24 horas en una liofilizadora marca LABCONCO Freezone 4.5.

Una vez obteniendo la muestra liofilizada se resuspendió en 1.5 mL de agua destilada estéril para su posterior purificación.

### **6.6.1 Obtención de proteína purificada por medio de FPLC**

Para la determinación se utilizó una columna DEAE sepharose fast flow con un volumen de 1 mL, como fase móvil se empleó buffer bis-Tris 20 mM a un pH de 6.5, el volumen inyectado por muestra fue de 0.5 mL en un FPLC AKTA Purifier GE a un flujo de 1 mL/min, con un gradiente lineal de NaCl 1 M, las muestras fueron recolectadas en un AKTA 900.

La columna se equilibró con 5 mL/min de buffer, se inyectó descargando 1 ml/min de loop de la fase móvil con la muestra, seguido de esto se pasó por la columna 5 ml/min; al término del lavado se generó un gradiente salino lineal con el mismo buffer (bis- Tris 20 mM) de 1 M de NaCl y se hicieron pasar 10 ml/min, durante este tiempo se recolectaron las proteínas separandolas en el recolector antes mencionado en tubos de ensayo, cada fracción contiene 0.5 mL de fase móvil.

Para el análisis de la muestra se utilizó un detector de UV a una longitud de onda de 280 nm y se lavó la columna con 5ml/min del mismo buffer conteniendo 1 M de NaCl.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

Antes de evaluar la fermentación de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus* a las dos diferentes condiciones propuestas, las células se cultivaron en placas para comprobar que no existiera ningún tipo de contaminación, en las cuales los resultados fueron negativos.

En las cajas petri se observaron las siguientes características macroscópicas: forma ovoide y lisas, textura cremosa, colonias aisladas y puras, aspecto húmedo y presentaban un color crema, conforme a las colonias sembradas anteriormente e identificadas previamente a nivel molecular, almacenadas en refrigeración a 4 °C.



**Figura 5. Colonias de levadura *Kluyveromyces marxianus* creciendo en medio YPD a 30 °C por 24 horas.**

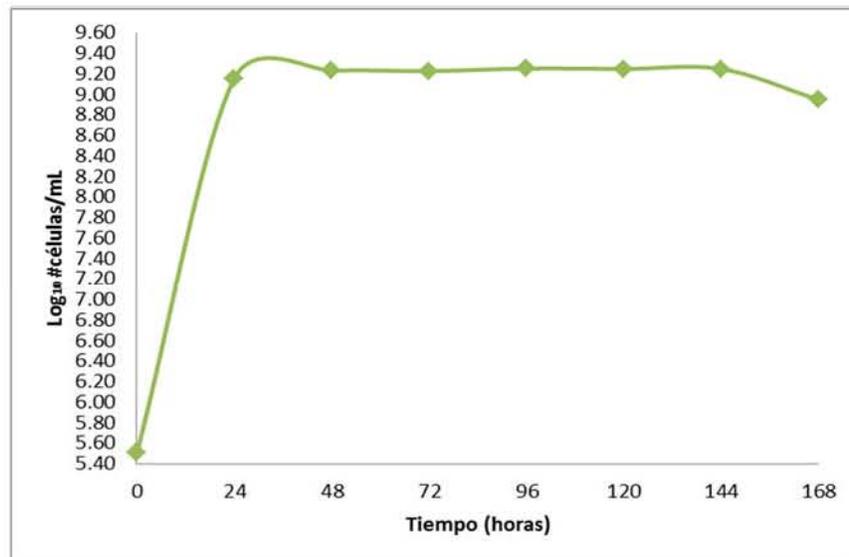
Las cuales coinciden con lo reportado por Olenka Petrenco (2005), quien menciona “que las características macroscópicas de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en medio YPDA presentan una textura cremosa, color crema-amarillo y lisas”.

## 7.2 Crecimiento de levadura *Kluyveromyces marxianus* con glucosa al 1% m/v en el medio de cultivo.

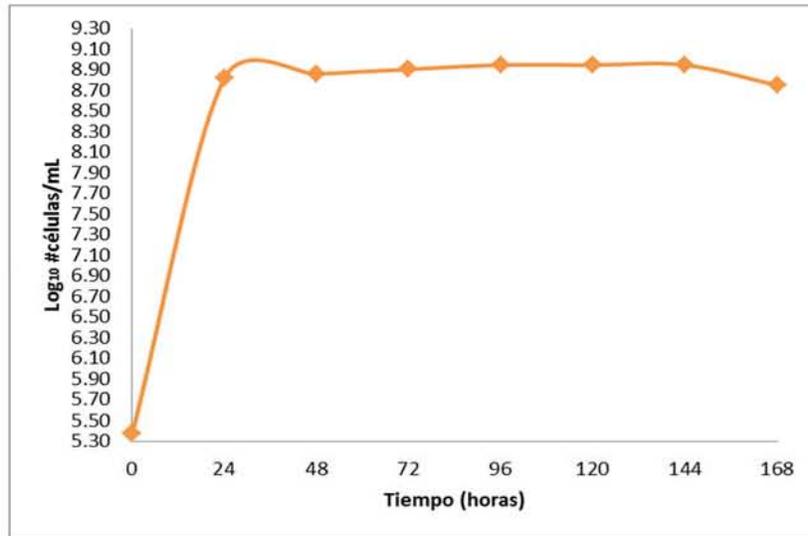
En las Gráficas 1 y 2 se muestra el crecimiento de la levadura obtenido con el sustrato en medio YPD, donde se aprecia el crecimiento logarítmico de las células durante las primeras 24 horas, tanto para la muestra en condiciones de agitación como sin agitación, esto indica que las células están ocupando el sustrato para su crecimiento y metabolismo.

En la fase estacionaria de 48 a 144 horas en ambas condiciones, la glucosa deberá estar completamente disminuida a causa de la utilización del microorganismo como su fuente de carbono (Gráfica 3), en esta etapa las células de la levadura se mantienen estables sin crecimiento.

El inicio de la fase de declinación o muerte se detectó a partir de las 168 horas en ambas condiciones, la cantidad de células se vio disminuida debido entre otros factores del medio a la falta de sustrato (Tortora J. Gerard, et al. 2007).



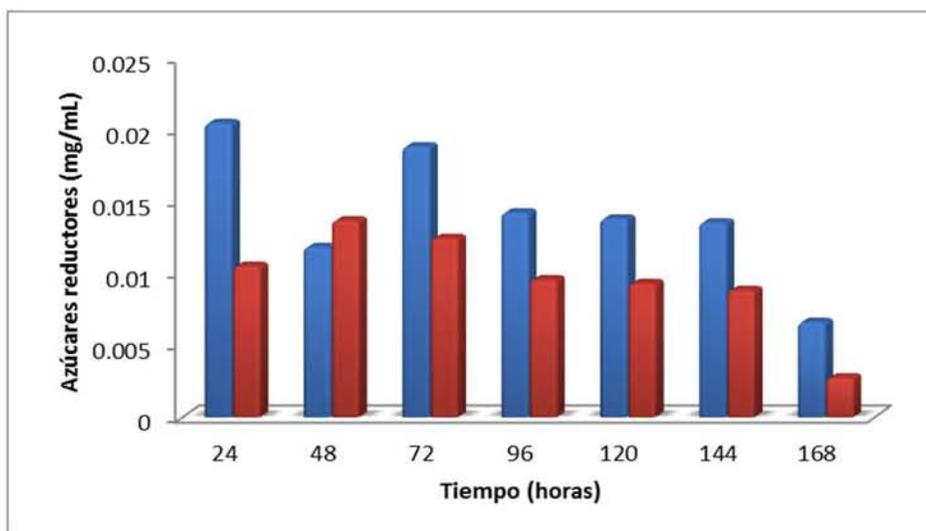
**Gráfica 1. Crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* bajo condiciones de agitación en medio YPD con 1% m/v de glucosa como sustrato. Células cuantificadas por medio de la Cámara de Neubauer.**



**Gráfica 2. Crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* bajo condiciones sin agitación en medio YPD con 1% m/v de concentración de glucosa como sustrato. Células cuantificadas por medio de la Cámara de Neubauer**

Para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford los resultados se encontraron por debajo del intervalo de sensibilidad de la curva (1  $\mu\text{g/mL}$ -1.5  $\text{mg/mL}$ ), tanto para el crecimiento con agitación así como sin agitación, lo cual indica una baja concentración de proteína en el cultivo (*García Arellano H. et al. 1998*).

Para la cuantificación de la glucosa residual en el medio, se empleó la técnica de azúcares reductores por el método de DNS. En la Gráfica 3, se observa los cambios de glucosa presente en el medio de cultivo que fue adicionada para el desarrollo de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus*, en esta gráfica a las 24 horas se aprecia la notable disminución como consecuencia del metabolismo de la levadura en ambas condiciones propuestas que va desde el 1% de glucosa (10  $\text{mg/mL}$ ) hasta aproximadamente 0.02% lo que indica que el microorganismo es un buen consumidor de esta fuente de sustrato, esto se ve reflejado en las primeras 24 horas del crecimiento celular de la levadura (Gráficas 1 y 2).



**Gráfica 3. Determinación de azúcares reductores directos en condiciones de agitación (azul) y sin agitación (roja) de *Kluyveromyces marxianus* cepa JG21 por medio de DNS.**

Como parámetro para la adición de inulina al medio, se consideró la disminución de azúcares reductores, lo que indica la falta de sustrato (glucosa) en el medio, esto se ve reflejado de en su disminución que se muestra en la Gráfica 3.

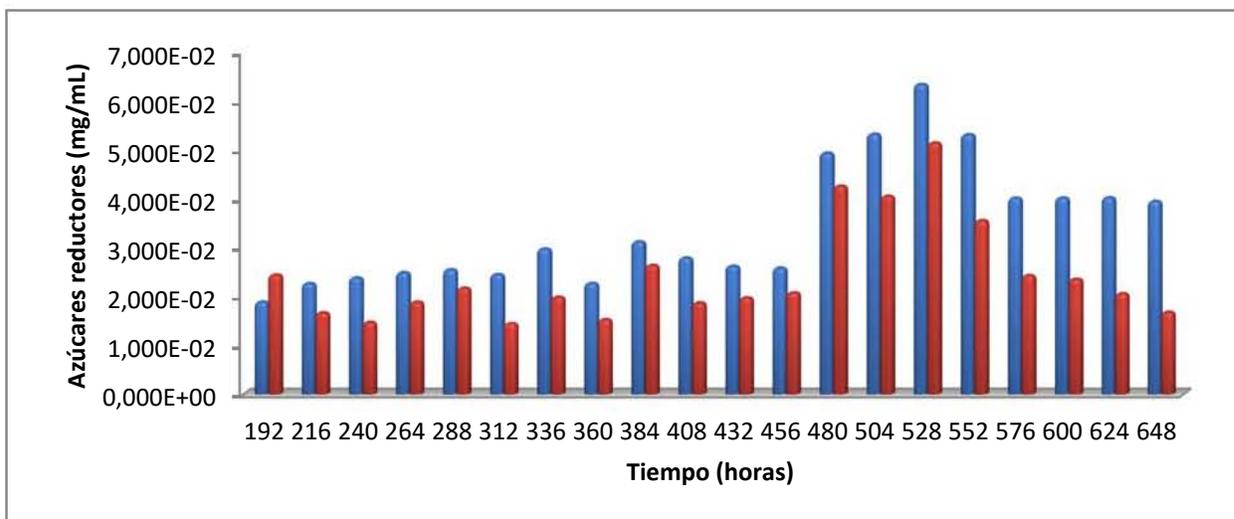
### **7.3 Adición de la inulina al 1% m/v en el medio de crecimiento**

Al adicionar la inulina al medio a las 168 horas de cultivo, los resultados de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford no se vieron modificados debido a que la concentración de proteína continúa en niveles bajos, sin embargo en los tiempos de 456, 480, 504, 528 y 552 horas se obtuvieron en el sobrenadante las concentraciones de proteína de 0.0195, 0.0324, 0.0402, 0.0352 y 0.0328 mg/mL respectivamente y para los tiempos finales de crecimiento de 624 y 628 horas fue de 0.0083 y 0.0230 mg/mL.

La poca cantidad de proteína pueda deberse al efecto catabólico represor que ejerce la glucosa que se encuentra presente en el medio sobre *Kluyveromyces marxianus* para la producción de inulinasas, el cual se puede contrarrestar por

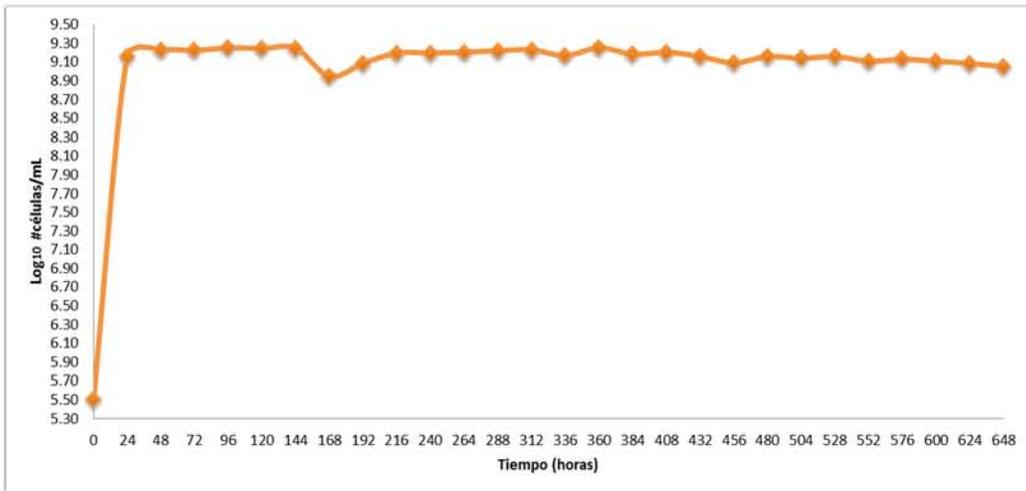
medio del uso de inulina aumentando la producción de inulinasas. (Gao J. et al. 2012)

El resultado de la adición de inulina al medio también se ve reflejado en la cuantificación de azúcares reductores (Gráfica 4), con un claro aumento en la cantidad de éstos en el tiempo de 480 a 552 horas en ambas condiciones propuestas, tomando en cuenta como tiempo cero las 168 horas, debido a la acción de la enzima inulinasa para hidrolizar la inulina adicionada al medio con la intención de producir proteína proveniente de la cepa JG21, lo cual coincide con la hidrólisis de inulina que se observará posteriormente por medio del HPLC (Gráfica 7), al aumentar la cantidad de azúcares reductores y disminuir la concentración de inulina.

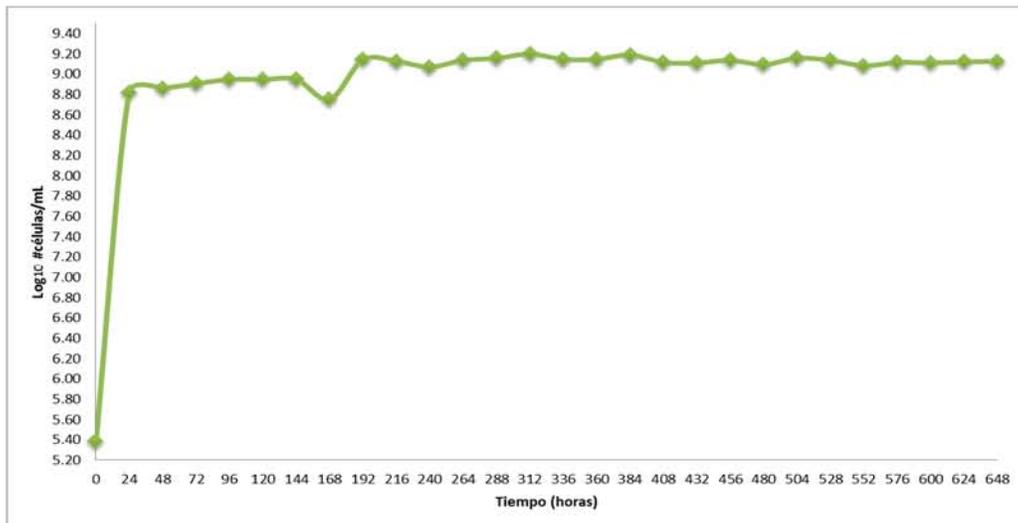


**Gráfica 4. Determinación de azúcares reductores por medio del método de DNS a las condiciones propuestas, con agitación (azul) y sin agitación (rojo), resultado del crecimiento en medio YPD con la inducción de 1% m/v inulina a las 168 horas.**

En el caso de la biomasa después de observarse una disminución a las 168 horas a causa del descenso del sustrato inicial (glucosa) al ser añadida inulina al medio de crecimiento se ve un ascenso celular debido al aumento de la fuente de carbono.



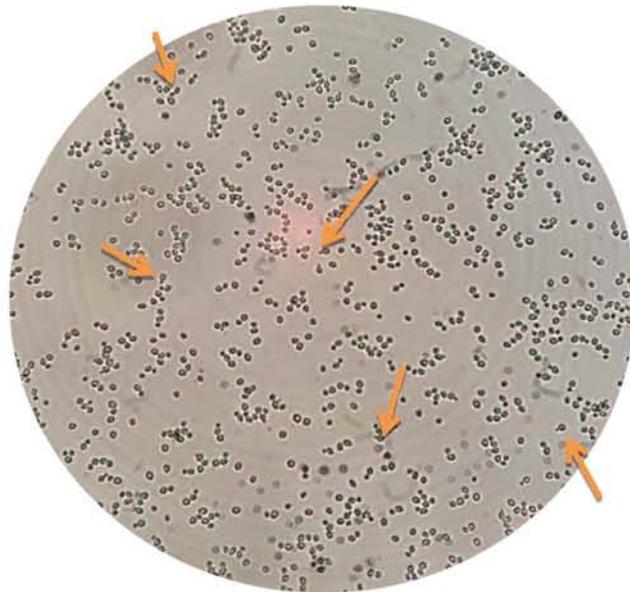
**Gráfica 5. Incremento del número de células de *Kluyveromyces marxianus* durante el crecimiento en medio YPD en condiciones de agitación. Cuantificación de células por medio de la Cámara de Neubauer.**



**Gráfica 6. Incremento del número de células de *Kluyveromyces marxianus* durante el crecimiento en medio YPD en condiciones sin agitación. Cuantificación de células por medio de la Cámara de Neubauer.**

Para garantizar que las células de levadura aún presentes en el crecimiento continuaban siendo viables se comprobó la existencia de gemación y se realizaron varias resiembras en medio YPD, Figura 6, señaladas por flechas amarillas.

En las Gráficas 5 y 6 se observa que hay un incremento de las células a las 192 horas, 24 horas después de haberle adicionado la inulina al medio de crecimiento, esto es porque las células de *Kluyveromyces marxianus* tienen una nueva fuente de sustrato (inulina) para poder llevar a cabo su metabolismo, produciendo la enzima requerida para su hidrólisis.



**Figura 6. Gemación celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, para comprobar que las células son viables a las 468 horas.**

## 7.4 Determinación de la masa molecular de la proteína

Tabla 4. Claves para identificar las muestras presentes en los geles de electroforesis SDS-PAGE

Clave	1.480	2.480	1.504	2.504	1.528	2.528	1.552	2.552
Tratamiento	C/ agitación	S/ agitación	C/ Agitación	S/ agitación	C/ agitación	S/ agitación	C/ agitación	S/ agitación
Tiempo	480 horas		504 horas		528 horas		552 horas	

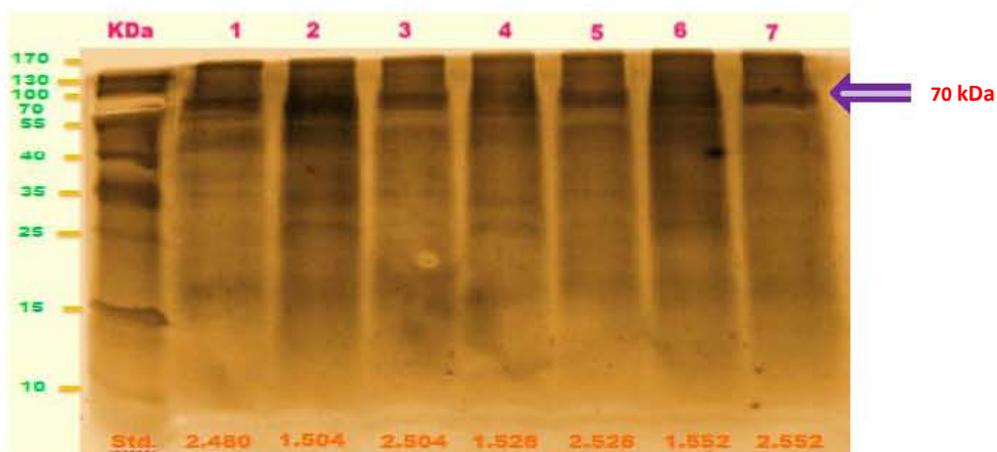


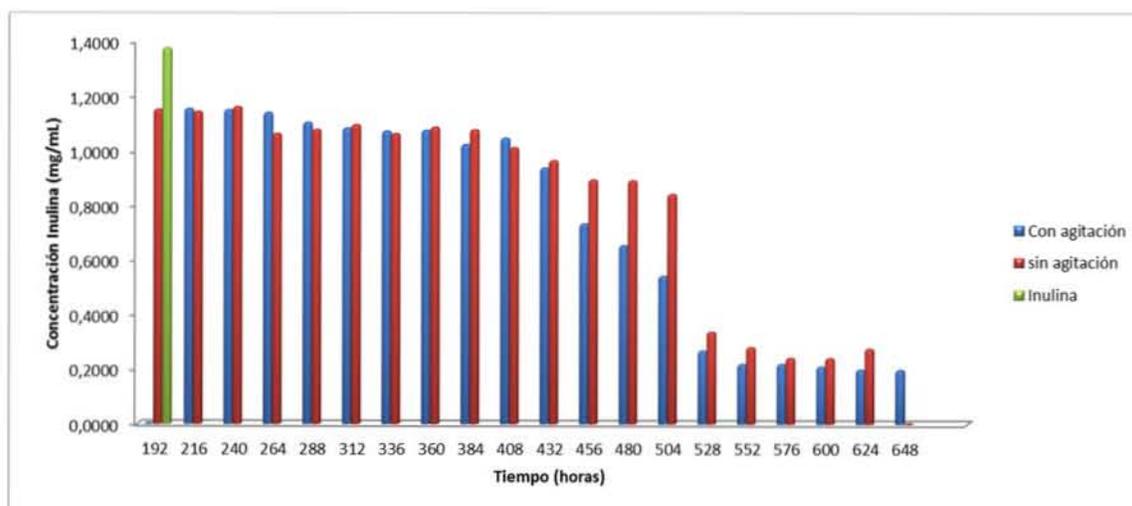
Figura 7. Gel de electroforesis SDS-PAGE, al tiempo de crecimiento de 480 a 552 horas a las dos diferentes condiciones con agitación (1.504, 1.528, 1.552) y sin agitación (2.480, 2.504, 2.528, 2.552). En el cual se señala la banda ancha de proteína para el peso de 70 kDa.

En la Figura 7 se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE donde se observan varias bandas a diferentes masas, pero al peso de 70 kDa sobresale una banda ancha a los distintos tiempos de crecimiento, de 480 hasta las 552 horas tanto en condiciones de agitación como no agitación, este peso concuerda con la masa aproximada de las exo-inulinasas que según menciona Ricca et. al. (2007): “el peso es aproximadamente de 74 kDa para las exo-inulinasas provenientes de *Kluyveromyces marxianus*, pero este puede variar dependiendo de la cepa con la cual se trabaje”, lo cual puede indicar que se trate de ésta proteína.

## 7.5 Determinación de la hidrólisis de la inulina por medio del HPLC

### 7.5.1 Degradación de inulina durante el tiempo de crecimiento debido a la actividad de la inulinasa presente en el medio

En la Gráfica 7 se observa que la concentración del estándar de inulina 1% m/v (color verde) es mayor que las diferentes muestras presentes a los diversos tiempos de crecimiento, donde disminuye la inulina conforme aumenta el tiempo de crecimiento lo cual indica que hay actividad enzimática debido a su hidrólisis.



**Gráfica 7. Concentraciones de inulina durante el crecimiento en las condiciones propuestas (agitación y sin agitación) obtenidas por medio del método de HPLC, en color verde el estándar de inulina con concentración de 1.374 mg/mL.**

A partir de las 504 horas del crecimiento se observa claramente una disminución en la cantidad de inulina presente en la muestra, esto coincide con los resultados obtenidos para la medición de azúcares reductores (Gráfica 4) donde a este tiempo se ve un aumento de éstos.

En los cromatogramas obtenidos no se observan la sacarosa, glucosa ni la fructosa a los tiempos de retención de los estándares, que pudieran ser señales

de la presencia de FOS como resultado de la degradación de la inulina, los cuales por medio de esta columna no pueden ser detectados con una mayor resolución, lo que impide ver adecuadamente las señales de los carbohidratos a analizar. Los cromatogramas obtenidos pueden observarse en el Apéndice A en las Gráficas 13- 19.

En estos cromatogramas se observa señales a diferentes tiempos de retención, aunque en menor tamaño a comparación de la inulina, que se presenta en el tiempo de retención de 6 a 7 minutos, lo que indica que se puede tratar de una enzima de tipo endo- inulinasa en presencia de una exo- inulinasa debido a que las señales dadas pueden ser azúcares intermedios de cadena larga (tiempo de crecimiento de 192- 648 horas). Otras de las posibles causas por las cuales no se observa la presencia de actividad de la exo- inulinasa, es que la inulina al ser hidrolizada por esta enzima a glucosa o fructosa el microorganismo la consume inmediatamente para su metabolismo.

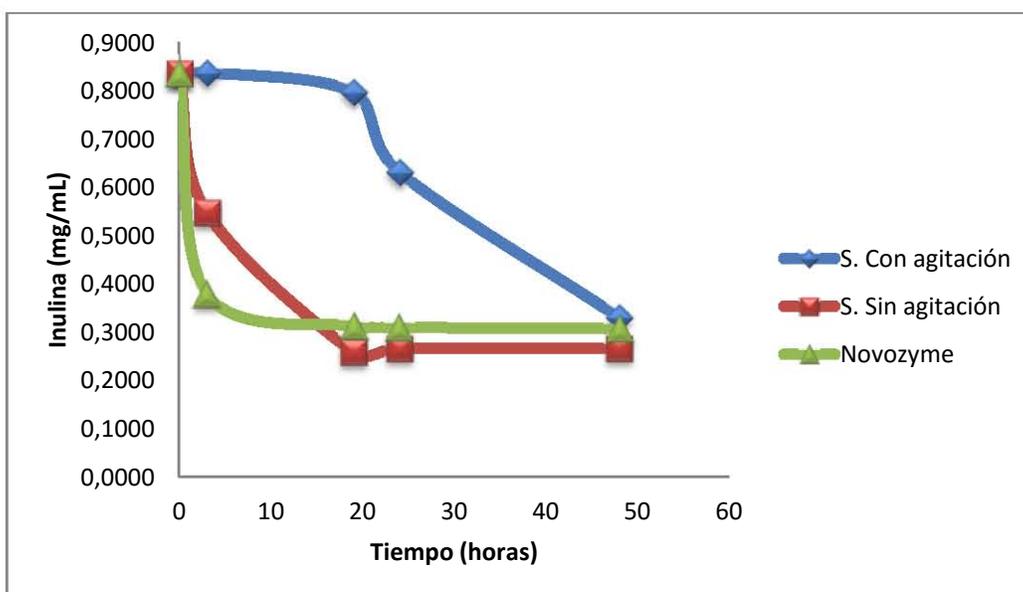
Se optó por liofilizar el medio para concentrar la proteína para mejorar las señales de el cromatograma pero los resultados de estas continuaron siendo de la misma manera, sin una buena apreciación en la aparición de los productos de hidrólisis como la sacarosa, glucosa o fructosa, únicamente se observa la disminución de la inulina, por lo cual no fue hidrolizada totalmente por la enzima lo que podría indicar como se mencionaba anteriormente que se trate de una proteína del tipo endo al no detectarse los compuestos con claridad por el tipo de columna y simplemente verse una amplia señal que va desde el tiempo de retención aproximado de 7 hasta 15- 16 minutos puede señalar que se trata de azúcares de cadenas largas como los fructo-oligosacaridos (FOS), en el caso de que exista también la inulinasa del tipo exo es posible que actué posteriormente en los azúcares producidos de cadena larga hidrolizándolos hasta fructosa y glucosa.

En los cromatogramas que se encuentran en el apéndice A se puede observar una señal probable de fructo- oligosacáridos producto de la hidrólisis de la inulina,

los cuales no pueden ser distinguidos debido a que la columna no presenta una buena sensibilidad para la separación de este tipo de azúcares de cadena larga.

### 7.5.2 Hidrólisis enzimática de la inulinasa proveniente de la cepa JG21 en comparación con inulinasas comerciales

Al no observar fructosa, glucosa ni sacarosa en los cromatogramas de cada una de las muestras, se analizó conforme a la disminución de la concentración de inulina respecto al tiempo de la hidrólisis de la enzima, la cual se comparó con otras enzimas comerciales, éstas fueron, Novozyme e Inulinasa de *Aspergillus niger* (SIGMA). Los resultados obtenidos se muestran en las Gráfica 8.



**Gráfica 8. Comparación de la disminución de la inulina (agave azul) a diferentes tiempos (0, 3, 19, 24 y 48 horas respectivamente) por medio del HPLC, de la enzima obtenida del crecimiento con agitación, sin agitación y Novozyme.**

Como se puede ver en ésta imagen, las que presenta una mayor hidrólisis enzimática de la inulina es la obtenida en el laboratorio sin agitación y Novozyme al hidrolizar con mayor rapidez la inulina.

Esto se puede deber a que el oxígeno disuelto en el medio en condiciones de agitación se encuentra por encima del nivel de oxígeno adecuado para la actividad de la inulinasa, mientras que en condiciones sin agitación el nivel de oxígeno es más factible para ésta actividad, por lo cual bajo estas condiciones existe una mayor hidrólisis de la inulina. (Gao *et al.* 2012)

En el caso de la enzima proveniente de *Aspergillus niger* no se observó ningún tipo de descenso en la concentración de inulina, lo que indica que este enzima requiere más tiempo para poder hidrolizar este tipo de inulina o por el contrario no hidroliza la inulina proveniente del agave azul.

## **7.6 Separación y purificación de proteínas por FPLC provenientes de la cepa JG21**

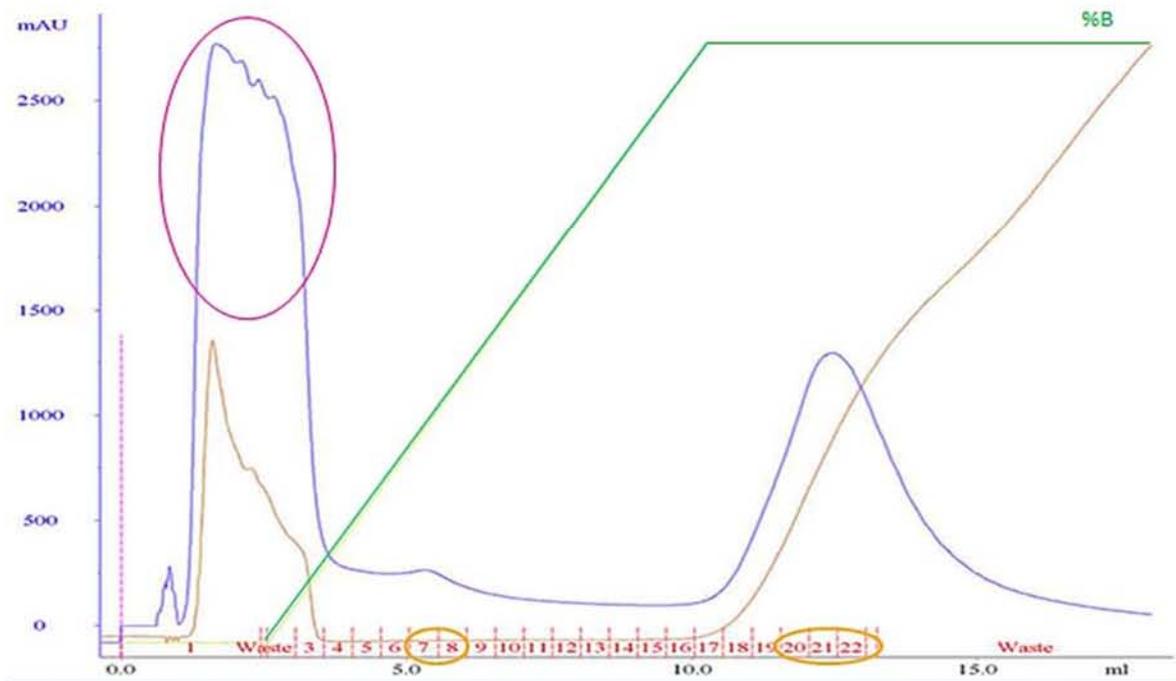
Siguiendo con el procedimiento, se realizó una liofilización del tiempo final de crecimiento (648 horas) dividiéndolo en pellet y sobrenadante, y se resuspendió en 3 mL de agua desionizada estéril, para su posterior separación y purificación en el FPLC.

Como resultado del uso del FPLC se obtuvieron 4 diferentes cromatogramas con diferentes tipos de señales y fracciones. En cada uno de los cromatogramas se señala con un círculo morado las proteínas que no se adhirieron a la columna (DEAE Sepharose fast flow) antes de comenzar la corrida con el aumento del gradiente salino (NaCl 1 M), la línea dentro del cromatogramas que corresponde al color azul indica la proteína presente junto con la fracción que corresponde, la cual se mide por UV a una absorbancia de 280 nm.

Para el caso de la Gráfica 9 se muestran dos señales una más intensa que la otra, estas indican la presencia de proteínas, fracciones señaladas en círculos de color amarillo dentro del cromatograma. Las fracciones se recolectaron de acuerdo a donde se encontraba el punto más alto de las señales obtenidas y en

un intervalo de una a dos fracciones hacia los lados, dependiendo del grosor de ésta.

Una de las señales registradas en el cromatograma se muestra en la fracción 7-8 que aparece aproximadamente al tiempo de 6 min y la segunda fracción de 20-22 a los 12 min, como anteriormente se mencionó en la metodología cada una de las fracciones correspondía a 0.5 mL, por lo cual se recuperaron 1 mL y 1.5 mL de volumen respectivamente por cada fracción recolectada.

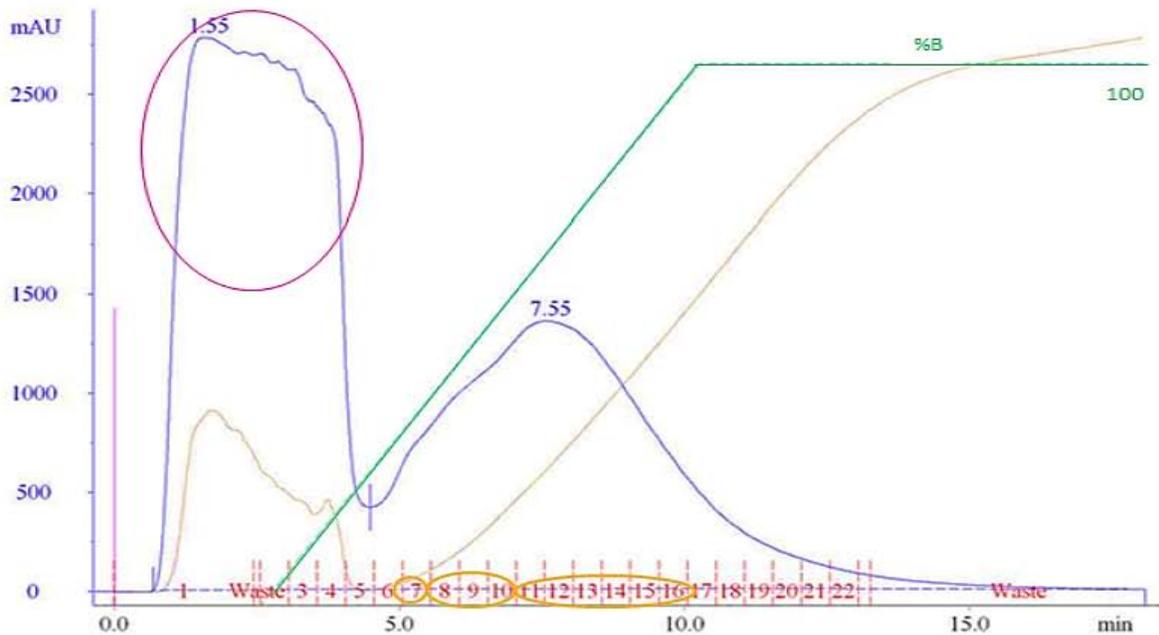


**Gráfica 9. Cromatograma del sobrenadante en condiciones de agitación (SF1), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/min**

Por otra parte se analizó la muestra del sobrenadante sin agitación (SF2) utilizando la misma metodología de la muestra anterior, Gráfica 10, en este caso las proteínas salieron dentro de una misma señal, esto se puede observar también en los otros dos cromatogramas (Gráfica 11 (PF1) y 12 (PF2)); por lo cual se separó en tres fracciones de acuerdo a los picos visibles dentro de la señal en las fracciones 7, 8-10 y 11-16 para su posterior análisis de actividad, nuevamente señalados dentro de los círculos amarillos, esta falta de separación puede ser que

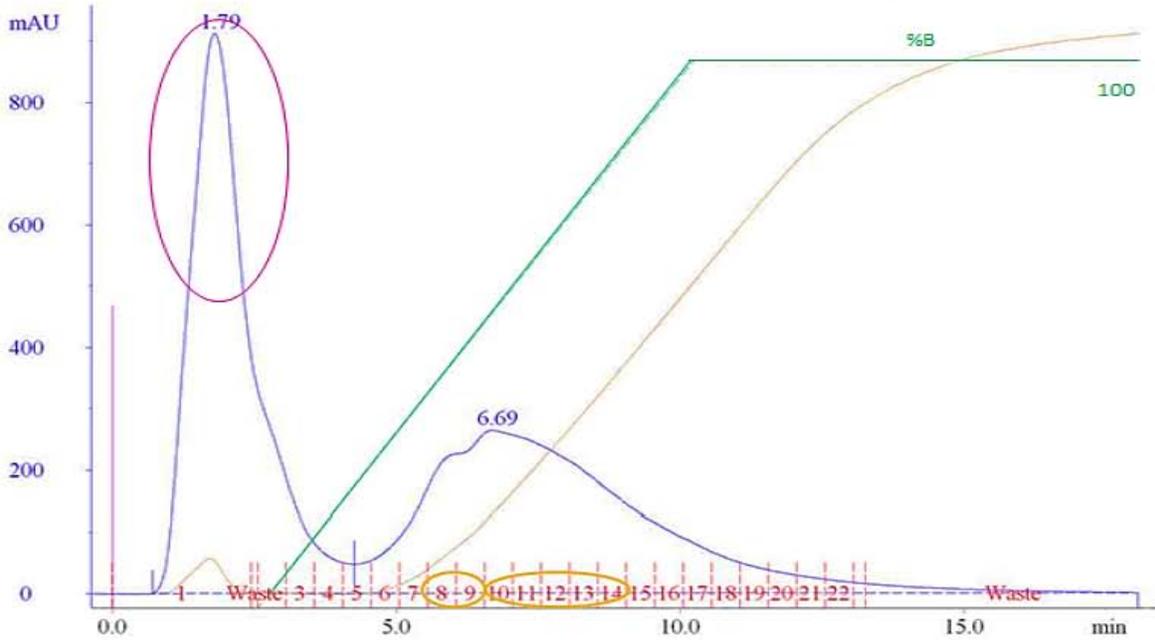
se trate de la misma proteína ya sea del tipo exo o endo o éstas mismas con diferentes isomorfos, esto se repite para los tres cromatogramas siguientes.

En este caso se obtuvo fracciones con volúmenes de 0.5 mL para el caso de la fracción 7, 1.5 mL para la fracción 8-10 y 3 mL para la fracción 11-16.

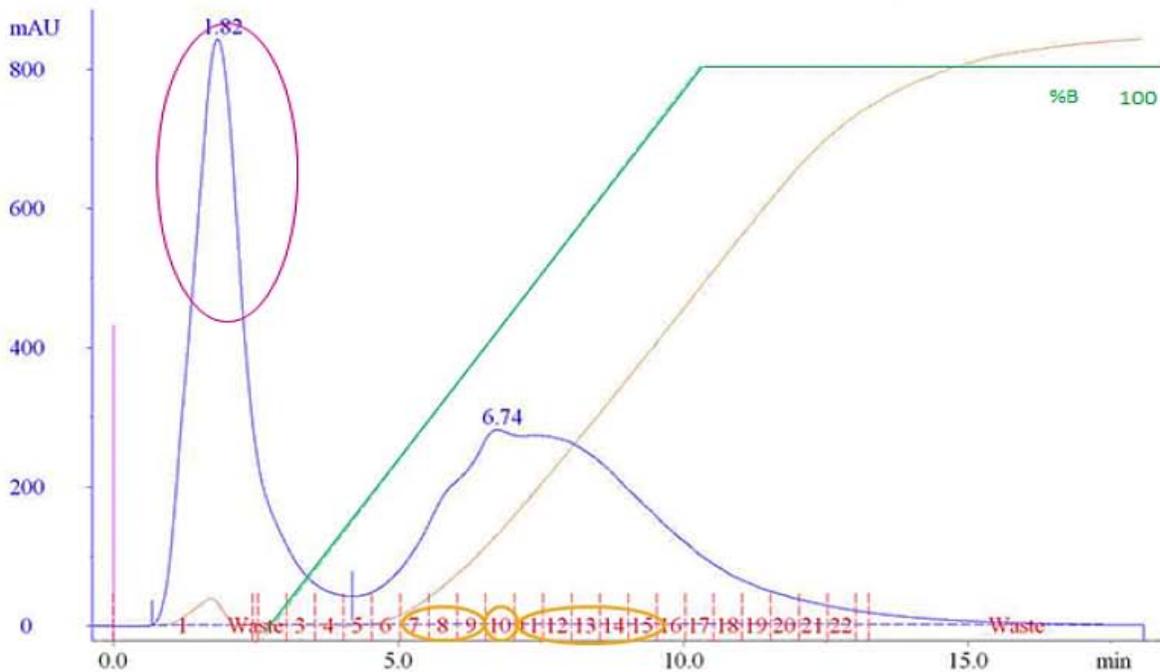


**Gráfica 10. Cromatograma del sobrenadante en condiciones de no agitación (SF2), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1M) con un flujo de 1ml/min.**

Para el caso del cromatograma proveniente del pellet para el crecimiento en agitación (PF1) Gráfica 11, se obtuvo una misma señal dividida en dos fracciones mostradas a partir del minuto 5 (5 ml/min) hasta al minuto 10 aproximadamente, éstas fueron 8-9 con 1mL y 10-14 con 2.5 mL; para el caso de la Gráfica 12 del pellet en condiciones de no agitación (PF2) se obtuvo de igual forma una señal dividida en tres picos 7-9 con 1.5 mL, 10 con 0.5 mL el cual sobresale de la señal y 11-15 con 2.5 mL, que de igual manera esta señal se muestra después del minuto 6 (6 mL/min) hasta el minuto 11 (11 mL/min) donde ésta se ve sumamente disminuida.



**Gráfica 11. Cromatograma del pellet en condiciones de agitación (PF1), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1 M) con un flujo de 1 ml/min.**

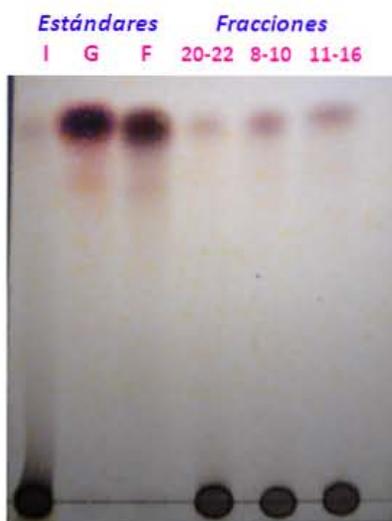


**Gráfica 12. Cromatograma del pellet en condiciones de no agitación (PF2), con un gradiente salino del 100% (NaCl 1 M) con un flujo de 1 ml/min.**

## 7.7 Actividad de las fracciones obtenidas en el FPLC por medio de TLC.

Una vez obtenidas las fracciones del FPLC, se realizaron pruebas para conocer si éstas tenían actividad inulinasa o si se trataba de otro tipo. La reacción se llevó a cabo por 24 horas con inulina de agave a una temperatura de 50 °C.

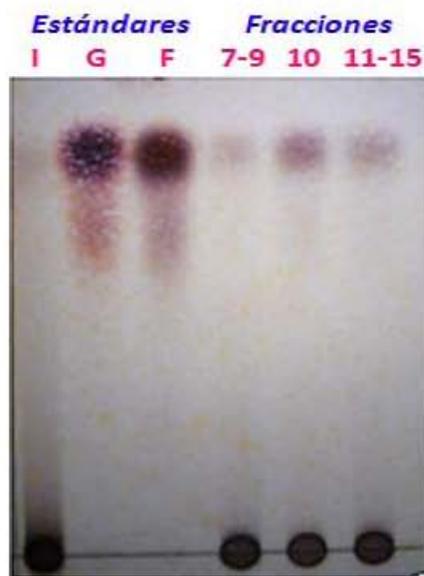
Primeramente se realizó la actividad enzimática con inulina al 1% m/v pero al observar que las bandas de hidrólisis no se apreciaban claramente en TLC, se decidió disminuir la concentración de inulina al 0.5% m/v para la obtención de bandas mejor definidas, lo cual puede indicar como reportó Gao et al (2012), que al presentarse una gran cantidad de sustrato la actividad inulinasa se ve reducida, debido a que el sustrato tiene un fuerte efecto sobre la actividad.



**Figura 8. TLC de la reacción de las fracciones obtenidas en el FPLC del sobrenadante en condiciones de agitación y no agitación (SF1 y SF2) con inulina al 0.5% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 100 mM pH 5 a una temperatura de 50 °C al tiempo de 24 horas de hidrólisis. De izquierda a derecha se muestra el estándar de inulina (I) seguida de la glucosa (G), fructosa (F) y las fracciones obtenidas que se muestran en el cromatograma de la Gráfica 9 para la fracción 20-22 (SF1) y la Gráfica 10 para las fracciones 8-10 y 11-16 (SF2)**

En la Figura 8 se muestra la placa de TLC donde se observa los productos de hidrólisis junto con los estándares de inulina, glucosa y fructosa, revelada con una

solución de Orcinol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y etanol, los resultados obtenidos muestran bandas de fructosa y glucosa a partir de la inulina de agave tanto para la fracción 20-22 del sobrenadante en agitación (SF1) como para las fracciones 8-10 y 11-16 para el sobrenadante sin agitación (SF2), esto se deduce debido a que las bandas corren a la misma distancia que ambos estándares, así también se observa el sustrato no hidrolizado por completo que se mantiene en la parte inferior de la placa, lo que indica que para una completa hidrólisis de la inulina requiere un tiempo mayor que el propuesto para esta actividad. En el caso de que hubiera la existencia de los inulo-oligosacaridos éstas bandas aparecerían por debajo de la fructosa o glucosa a lo largo de la corrida en la placa.



**Figura 9. TLC de la reacción de las fracciones obtenidas en el FPLC del pellet en condiciones de no agitación (PF2) con inulina al 0.5% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 100 mM pH 5 a una temperatura de 50 °C al tiempo de 24 horas de hidrólisis. De izquierda a derecha se muestra el estándar de inulina (I) seguida de la glucosa (G), fructosa (F) y las fracciones obtenidas que se muestran en el cromatograma de la Gráfica 12 para la muestra de pellet sin agitación (PF2).**

De la misma manera que en la Figura 8, en la Figura 9 se muestra fructosa o glucosa como productos de hidrólisis para todas las fracciones colocadas en esta

placa 7-9, 10 y 11-15 para la parte del pellet sin agitación (PF2) y unas bandas muy tenues por debajo de los productos de fructosa y glucosa indicando la posible presencia de FOS.

Las demás fracciones obtenidas como son 7-8 para el sobrenadante en agitación, 7 para el sobrenadante sin agitación, 8-9 y 10-14 para el pellet con agitación así como la fracción 7-9 del pellet con agitación (placas no mostradas), no tuvieron actividad de hidrólisis sobre la inulina de agave las cuales únicamente se mostraron igual que el estándar de la inulina.

Según los resultados obtenidos por TLC como productos de las reacciones de hidrólisis de la inulina se trata de una posible proteína del tipo exo- inulinasa, teniendo como productos de hidrólisis la fructosa y glucosa por los enlaces en los que lleva a cabo esta ruptura, obteniendo un resultado totalmente diferente a lo que se esperaba, puesto que en los análisis anteriores se tenía la hipótesis de que únicamente se trataba de una endo-inulinasa por los resultados obtenidos en el HPLC donde no se mostraba los picos característicos de glucosa o fructosa a los tiempos de retención mostrados por el estándar, esto puede ser debido a la ausencia de estos o que se pueden encontrar translapados con FOS; uno de los resultados que se mantiene constante es la hidrólisis parcial de la inulina la cual no se complementa en los tiempos dados, esto se ve reflejado en la aparición de la inulina en los cromatogramas obtenidos para el HPLC (Apéndice A) así como en los resultados de las placas de TLC.

Los resultados arrojados por el HPLC posiblemente se deban a que la concentración de la proteína era mínima y esto se ve reflejado en la cuantificación de proteínas por el método del Bradford, en el cual su rango de sensibilidad estaba por arriba de la cantidad de proteína presente en la muestra; una vez liofilizando las muestras se obtuvo una mayor concentración de enzima.

Otras posibles razones por las cuales no se logra apreciar claramente los picos de fructosa y glucosa se deba a que la muestra de inulina que se tomó como sustrato

no sea 100% inulina de agave si no que sea una mezcla de inulina con otro vehículo utilizado para secar la inulina pura, por otro lado se trate de fructo-oligosacáridos que no pueden ser detectados por el revelador empleado en las placas de TLC, los cuales estén interrumpiendo en las señales dadas por el HPLC.

## 7.8 Determinación de la concentración final de la proteína

En la Tabla 5 se muestra la cantidad de proteínas presente en cada muestra determinada mediante el método de Bradford.

**Tabla 5. Concentración de proteína de las diferentes fracciones obtenidas por medio del FPLC tanto para la muestra del pellet como del sobrenadante antes y después de ser liofilizadas.**

Tiempo (horas)	muestras		volumen (mL)	concentración de proteína (mg/mL) antes de liofilizar	muestras (fracciones)	Volumen (mL)	concentración de proteína (mg/mL) después de liofilizar
648 horas	pellet	con agitación	80	no detecable	no presentan actividad	0	0
		sin agitación		no detecable	10 PF2	0.5	falta de muestra
	sobrenadante	con agitación		no detecable	11-15 PF2	2.5	0.02020
		sin agitación		no detecable	20-22 SF1	1.5	0.02000
				0.023	8-10 SF2	1.5	0.02045
				0.023	11-16 SF2	3	0.01691

Se puede observar que la cantidad de proteína se encuentra principalmente en el sobrenadante (extracelular) antes de liofilizar así como en las fracciones obtenidas del FPLC de éste ya liofilizadas, esto concuerda con lo escrito por Pandey et al. (1999); en donde se menciona que las inulinasas son enzimas principalmente extracelulares pero que pueden estar parcialmente asociadas a la pared celular. En los resultados, se encuentra actividad del tipo inulinasa proveniente del pellet (intracelular), aunque en menor cantidad con solo dos fracciones y con poco volumen a comparación con las obtenidas del sobrenadante donde se obtuvieron tres fracciones con mayor volumen por cada una de ellas. En la primera medición es importante resaltar que los miligramos de

proteína presente pueden tratarse además de la inulinasa de la presencia de otras proteínas en el medio.

Antes de ser liofilizada y purificada la proteína, se tenía una concentración de 0.023 mg/ml= 23 µg/mL en un volumen de 80 mL únicamente del sobrenadante, posteriormente una vez liofilizada y purificada la proteína por medio del FPLC se obtuvieron tres fracciones del sobrenadante las cuales presentaron actividad inulinasa; para mejorar la concentración de la proteína se juntaron estas fracciones obteniendo una concentración de 0.05736 mg/mL= 57.36 µg/mL de proteína total en un volumen de 6mL.

En las condiciones propuestas de agitación y no agitación, la producción de la enzima proveniente de la levadura es afectada, debido a que con agitación existe una bajo concentración de inulinasa, esto posiblemente se deba al contacto que tenía la levadura con el oxígeno y éste esté afectando la producción. (*Gao et al. 2012*)

### **7.9 Identificación de los productos de hidrólisis de la inulina por medio del HPLC**

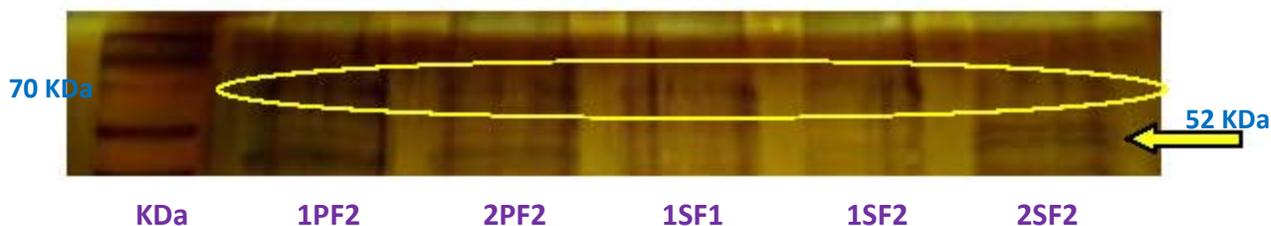
Analizando las fracciones en donde se observó actividad de la hidrólisis de la inulina de agave se optó por emplear de nuevo el método de HPLC para ver si había mejor identificación de los productos, en donde se obtuvo el mismo patrón de cromatograma para cada una de las fracciones analizadas (10 y 11-15 PF2, 20-22 SF1, 8-10 y 11-16 SF2), lo cual indica que posiblemente se trate de la misma proteína del tipo exo-inulinasa sin ninguna otra isoforma, únicamente variando el área de cada señal que indica la concentración. Lo cual se verificó posteriormente con un gel de electroforesis SDS- PAGE que mostró que cada una de las fracciones obtenidas tiene la misma masa molecular (kDa).

Los resultados de los cromatogramas muestran la presencia de inulina al tiempo de retención de 6.5 min así como la presencia de fructosa al tiempo de retención de 15 min, en la Gráfica 13 se observan los tiempos de retención de cada uno de los estándares; la señal que se mantiene constante es la que aparece después de la señal de la inulina, lo cual como se mencionaba anteriormente se trate de la señal producida por la presencia de FOS, se llega a ésta conclusión debido a que en las placas de TLC se muestran bandas características debajo de la fructosa o glucosa.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en el apéndice A en la Gráfica 20 donde se observan sobrepuestos para indicar que presentan las mismas señales a tiempos de retención muy similares.

### 7.10 Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas purificadas.

Una vez obtenidos los resultados de los cromatogramas y al ver las señales donde se obtuvo el mismo patrón se realizó un gel de electroforesis para corroborar que efectivamente se tratará de la misma proteína, donde se pretende encontrar bandas del mismo peso molecular (kDa) en todas las fracciones por analizar.



**Figura 10.** Gel de poliacrilamida de la proteína tanto intracelular como extracelular, señalado en un círculo amarillo la proteína de interés en el peso de 70 kDa y señalados por una flecha verde las bandas en un peso alrededor de 52 kDa. De izquierda a derecha se muestra el marcador molecular en kDa, seguido de las fracciones 10 (1PF2, pellet sin agitación) y 11-15 (2PF2, pellet sin agitación) del pellet en condiciones de agitación, posteriormente la 8-10 (1SF2, sobrenadante sin agitación) y 11-16 (2SF2, sobrenadante sin agitación) del sobrenadante en condiciones de no agitación.

Ricca et al. (2007) publicó que el peso aproximado para las exo- inulinasas es de 74 kDa pero este puede variar dependiendo de la cepa con la que se trabaje además menciona que el peso aproximado para las endo- inulinasas es de 54 kDa; en la Figura 10 se presenta el gel con las fracciones obtenidas del FPLC donde se obtuvieron resultados de la hidrólisis frente a la inulina de agave; todas presentaron la misma masa molecular de 70 KDa así como también se observan bandas a la masa aproximado de 52kDa lo que indica la posible presencia de exo-inulinasas y endo- inulinasas respectivamente, provenientes de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus*

Este valor es igual tanto para las fracciones obtenidas del sobrenadante (parte extracelular) como para las fracciones provenientes del pellet (intracelular) lo que indica que la proteína es parcialmente secretada al medio y parcialmente asociada a la pared, por lo cual se obtuvo hidrólisis para ambos casos propuestos, esto concuerda con lo publicado por Pandey et al., (1999) en donde menciona que las inulinasas pueden presentarse como enzimas extracelulares e intracelulares.

En cuanto a las condiciones propuestas de agitación y no agitación se muestra una mayor actividad enzimática en condiciones sin agitación dando resultados no esperados, puesto que se pretendía obtener una mayor producción de enzimas en condiciones de agitación. Estos resultados se pueden comparar con lo reportado por Gao et al (2012) donde menciona que el oxígeno afecta la actividad inulinasa pero es crucial tanto para esta como para la concentración de biomasa; el oxígeno debe estar presente en un rango moderado puesto que si se encuentra en alta o en una muy baja concentración los niveles de producción de inulinasa así como la concentración de biomasa son bajos.

## 8 Conclusiones.

- ✓ Se sugiere que la proteína del tipo inulinasa obtenida para *Kluyveromyces marxianus* cepa JG21 aislada del mezcal tiene un masa molecular de 70 KDa.
- ✓ En los extractos de proteína que se recuperaron se observa actividad del tipo endo y exo- inulinasa, observándose mayormente esta última, la cual se ve reflejada tanto en las placas de TLC como en los cromatogramas obtenidos por el HPLC.
- ✓ La exo- inulinasa se encuentra parcialmente excretada al medio así como también parcialmente asociada a la pared celular de la levadura.
- ✓ La producción enzimática se ve favorecida en condiciones de no agitación.

## 9 Perspectivas.

- ✓ Mejorar el análisis de la hidrólisis de la cepa JG21 de *Kluyveromyces marxianus* proveniente del mezcal, por medio de la utilización de otro detector o columna que permita identificar con claridad la presencia de azúcares de cadena larga (FOS) en HPLC.
- ✓ Estandarizar los tiempos de crecimiento celular y la producción de la enzima incrementando con esto la concentración de la proteína así como su actividad.

## 10 Bibliografía

- **Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler A., Monsan P., 2010.** *Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of mezcal.* **Bioresource Technology**, vol. 10, pág. 1016
- **Arrizon, J. Morel, S., Gschaedler A., Monsan P., 2011,** *Purification and substrate specificities of fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of Mezcal,* **Bioresource Technology**, vol. 102, págs. 3298- 3303
- **Byun, S., Nahm, B., 1978,** *Production of fructose from Jerusalem Artichoke by enzymatic hydrolysis.* **Journal Food Science**, vol. 43, págs.1871-1875.
- **Casey, J. P., 1977.** *High fructose corn syrup: a case history of innovation.* **Die Stärke**. Vol 29, págs. 196-204.
- **Castillo, A., Chamy, R., 2010,** *Producción de inulinasas por levaduras de Kluyveromyces marxianus,* **Scientia Agropecuaria**, vol. 1, págs. 235- 245.
- **Castillo, F., 1990,** *Lactose metabolism by yeast. En Yeast: Biotechnology and Biocatalyst.* Verachtert, H. y De Mot R. (Ed.) Marcel Dekker. Nueva York.
- **Catsimpoolas, 1976,** *Methods of Protein separation,* **New York: Dienum press.**
- **Chacón, A., 2006,** *Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS),* **Agronomía Mesoamericana**, vol. 17, págs.. 265- 286
- **Chi, Z. M., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G. L., Yue, L., 2009,** *Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases,* **Appl Microbiology Biotechnology**, vol. 82, págs.211- 220.
- **Cruz Guerrero, A. E., Garcia Peña, I., Barzana, E., García Garibay, M. Gómez- Ruíz, L., 1995.** *Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain.* J. Ferment. Bioeng. Vol. 80, págs. 159-163.
- **Cruz Guerrero, A., Olvera, J., García Garibay, M. Gómez Ruíz, L., 2006.** *Inulinase-hyperproducing strains of Kluyveromyces sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. vol. 22, págs. 115-117.

- **Díaz Montaña, D. M., 2008.** *Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice.* ***Enzyme and Microbial Technology*. Vol.42**, págs. 608-616.
- **Fernández R. Mery,** *Equipo de liofilización, 1 de Septiembre 2013.* Disponible en: <http://es.slideshare.net/meryfernandezromero/equipo-de-liofilizacion> fecha de consulta: 25 de marzo del 2015
- **Franck, A. 2002.** *Technological functionality of inulin and oligofructose.* ***NCBI***. págs. 3-9
- **Gao J., Chen L., Yuan W., 2012,** *Effects of carbon sources, oxygenation and ethanol on the production of inulinase by Kluyveromyces marxianus.* ***BioScience Biotechnology*, vol.1**, págs. 155- 160
- **García Arellano H., Vázquez Duhalt R., 1998** *Cuantificación de proteínas: una revisión*, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca Mor., **vol 3**. págs. 77-88
- **Giraldo G. G. Antonio, 2010,** *Laboratorio de Bioquímica: Una visión práctica*, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias Agroindustriales, Universidad de Quindío; disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=dAbMDrXcTHsC&pg=PA108&dq=M+etodo+de+bradford&hl=es&sa=X&ei=1L-qVJnGCYL4yQST0YLwBg&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false> Fecha de consulta 03 febrero 2015.
- **Giraud, J., Galzy, P. (1990).** *Inulin conversion by yeast. In: Yeast Biotechnology and Biocatalysis.* (Verachertert, H.), Marcel Dekker. Nueva York. Págs. 225-296.
- **G. Lopez M., A. Mancilla- Margalli N., Mendoza- Díaz G., 2003,** *Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul,* ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51**, págs. 7835- 7840
- **Graciano Fonseca G., Heinze E., Wittmann C., K. Gombert A., 2008,** *The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential,* ***Appl Microbiology Biotechnology*, vol. 79**, págs. 340- 4348

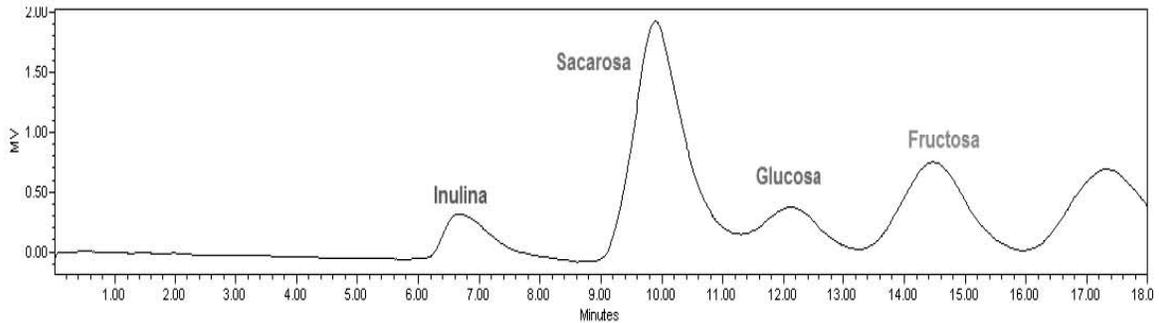
- **Grootwasmk, J. W. D., Fleming, S. E., 1980** *Enzyme Microboly. Technology.* vol. 2, págs.45-53
- **Grootwassink, J., Hewitt, G., 1983**, *Inducible and Constitutive formation of inulinase in batch and continuos cultures of Kluyveromyces fragifis.* **J. Genomic Microbiology**, vol. 129, págs. 31-41.
- **Gupta, A., Singh, D. P., Kaur, N., Singh, R., 1994**, *Production, Purification and immobilization of inulinase from Kluyveromyces fragilis*, **Journal Chemestry Technology Biotechnology.**, vol 4, págs. 377-385.
- **Harris, D., 2007**, *Análisis químico cuantitativo*, 3ª edición (6ª edición original), España, editorial Reverté, págs. 608- 615.
- **Huitron, C., 2008.** *Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes.* **Journal of Environmental Biology.** Vol.29, págs. 37-41.
- **Juárez A., Pares R., 1997.** *Bioquímica de los microorganismos*, 1a edición, España, editorial Reverté, S.A., capítulo 4, págs. 40- 46.
- **Kawamara, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K. 1989.** *Formati3n of Cyclooinulo-oligossacharide from inulin by an extracellular enzyme of Bacillus circulans OKUMZ 31B*
- **Kushi, R.; Monti, R.; Contiero, J. 2000.** *Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus.* **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol 25, págs. 63-69.
- **Lane, M.; Morrissey, J. 2010.** *Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister`s shadow.* **Fungal Biology Reviews**
- **Lappe Oliveras, P., 2008.** *Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic no distilled and distilled Agave beverages.* FEMS Yeast Res. Vol. 8, págs.. 1037-1052
- **Lomonte B. 2009**, *Inmunología General: Manual de Laboratorio*, Capítulo 3, págs. 92- 101.
- **Mayrath, J., Bayer, K., 1979**, *Biomass from whey.* En *Economic Microbiology.* vol. 4. Rose, A. (Ed.) Academic Press. Londres.
- **Mazutti Marcio A., Skrowonski A., Boni G., Leone Zabot G., Fernandes Silva M., de Olivera D., Di Luccio M., Maugeri Filho F., Rodrigues I. M., Treinchel H., 2010**, *Partial Characterization of Inulinases Obtained by Submerged and Solid. State Fermentation Using Agroindustrial Residues as*

*Substrates: A Comparative Study*, **Appl Biochem Biotechnol**, vol 160, págs. 683- 693

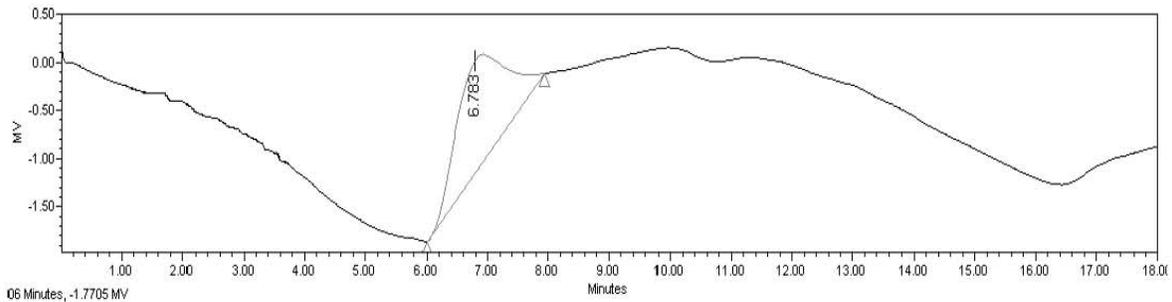
- **Montañez- Soto J., Venegas- González J., Vivar- Vera M., Ramos-Ramírez E., 2011**, *Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Azul*, **Biagro.**, vol. 23, págs. 199-206.
- **Muñoz-Gutierrez, I. Rodríguez- Alegría, M. E., López- Munguía, A., 2009**, *Kinetic Behaviour and Specificity of  $\beta$ - fructoside in the hydrolysis of plants and microbial fructans*, **Process Biochemistry**.
- **Moshfegh AJ., Friday JE, Goldman JP., Ahuja JK., 1999**, *Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans*. **Journal of Nutrition**, vol. 129, págs. 1407- 1411.
- **Nitsche Rocha S., Abrahao- Neto J., Karoly Gombert A., 2011**, *Physiological diversity within the Kluyveromyces marxianus species*. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol 100. págs 620- 628.
- **Olenka Petrenco, 2005**, *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular (Tesina)*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Carrera de Licenciatura en Farmacia, págs. 14-18
- **Pandey, A., Soccol, C., Selvakumar, P., Soccol, V., Krieger, N., Fontana, J., 1999**. *Recent developments in microbial inulinases*. **Appl. Biochem. Biotechnol. Vol 81.**, págs. 35-52.
- **Phaff, H., 1966**, *a(1-4) polygalacturonide glycanohydrolase (endopolygalacturonase) from Saccharomyces Sragifis*. **Meth. Enzymology**, vol. 8, págs. 636-641.
- **Pingoud, A., 2002**, *Biochemicals Methods*. **Weinheim: Wiley- VCH**
- **Reed, G., Nagodawithana, T., 1991**, *Yeast Technology*. 2a. ed. AVI. Nueva York.
- **Ricca, E., Calabro, V., Cursio, S., Loiro, G. 2007**. *The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis*. **NCBI**, págs. 129-145
- **Romano, P., Capece, A. y Jespersen, L., 2006**. *Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts*. En: A. Querol y G.Fleet eds. *The yeast handbook Volume 2: Yeasts in food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag, págs. 13-53

- **Singh, P., Gill, P. 2006.** *Production of inulinases: Recent Advances*, vol 44, págs. 151-162.
- **Singh, R. S., Dhaliwal, R., Puri, M., 2007.** *Partial purification and characterization of exoinulinase from Kluyveromyces marxianus YS-1 for preparation of highfructose syrup.* *J. Microbiology Biotechnology.* vol. 17., págs. 733–738.
- **Tortora J. Gerard, Funke R. Berdell, Case C. Christine, 2007,** *Introducción a la microbiología*, Editorial Medica Panamericana, España, págs. 176- 180.
- **Vandamme, E. J. y Derycke, D. G., 1983.** *Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications.* *Adv. Appl. Microbiology*, vol. 29, págs. 130-176.
- **Verachtert, H. y De Mot, R., 1990.** *Yeast, Biotechnology and Biocatalysis.* Marcel Dekker. Nueva York.
- **Vijayaraghavan, K., 2009.** *Trends in inulinase production: a review.* *Critical reviews in biotechnology.* vol.29, págs. 67-77.
- **Waterhouse, A., Chatternon, N. 1993.** *Glossary of fructanos terms, in Science an Techonology of fructanos.* *Agricultural and Food Chemistry*, págs. 2-7
- **W. McGilvery Robert, 1997,** *Biochemical Concepts*, editorial Reverté S.A., España, págs. 103-110
- **Wimborne, M., Rickard, P., 1978,** *Pectinolytic Activity of Saccharomyces fragilis.* *Cult. in Contr. Enviroment. Biotechnology. Bioenginier*, Vol. 20, págs.. 231-242.

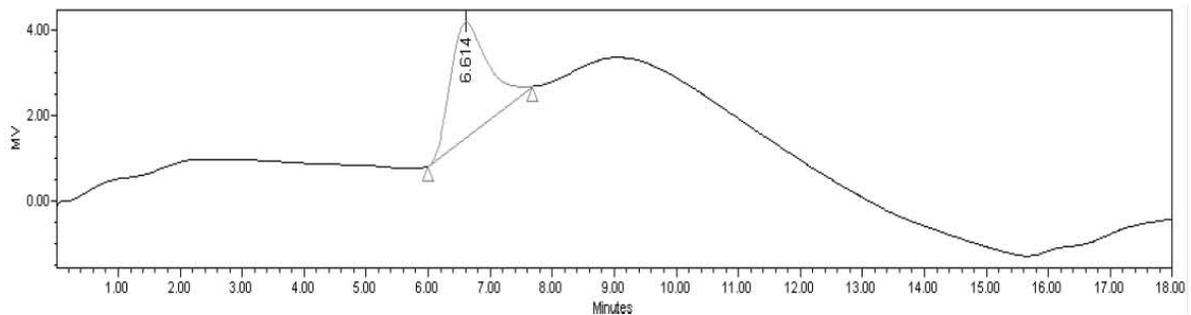
## Apéndice A



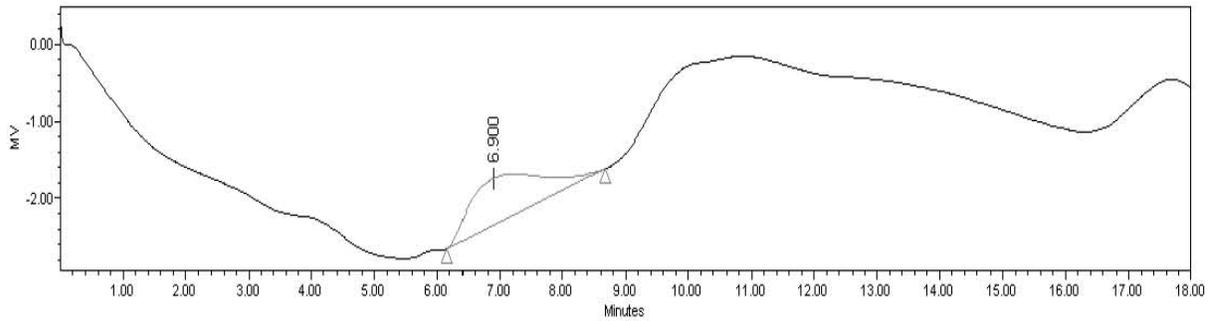
**Gráfica 13. Cromatograma en HPLC de mezcla de azúcares, a la concentración de 1mg/mL de inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, con tiempos de retención entre 6 a 7, 9 a 11, 11a 13 y de 14 a 15 respectivamente.**



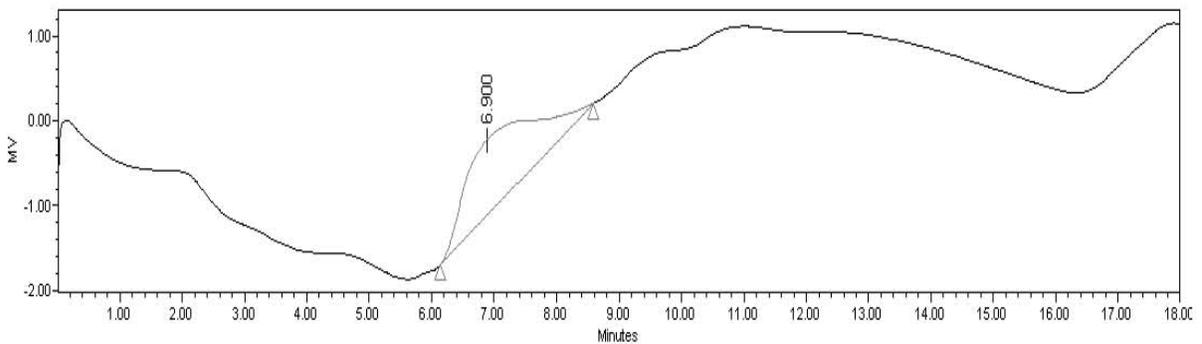
**Gráfica 14 Cromatograma en HPLC al tiempo de 216 horas de crecimiento, en condiciones de agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.783 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar.**



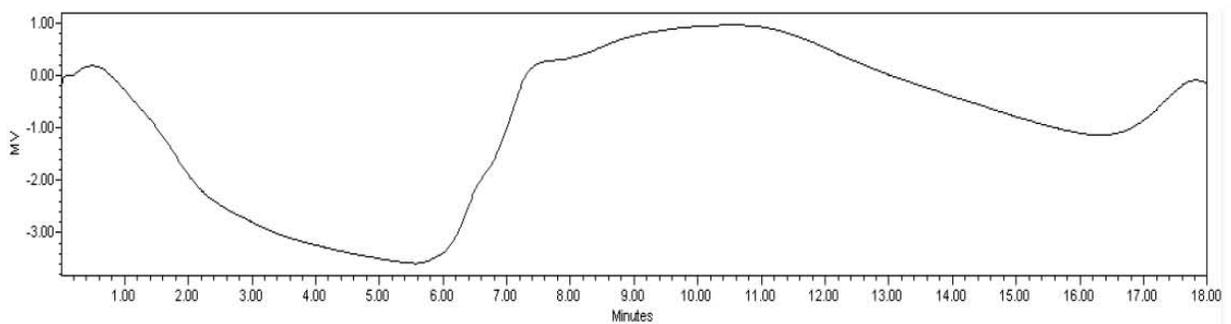
**Gráfica 15. Cromatograma en HPLC al tiempo de 216 horas de crecimiento, sin agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.614 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar.**



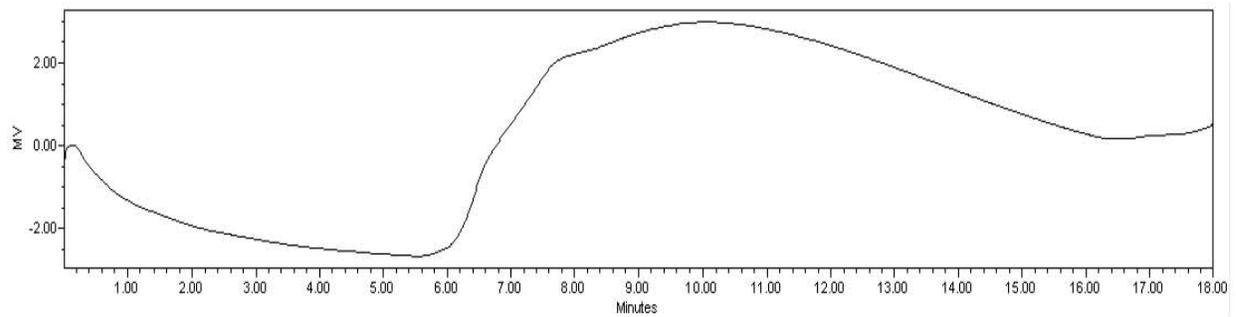
**Gráfica 16. Cromatograma en HPLC al tiempo de 480 horas de crecimiento, con agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.900 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar. Se observa una clara disminución en el área del pico.**



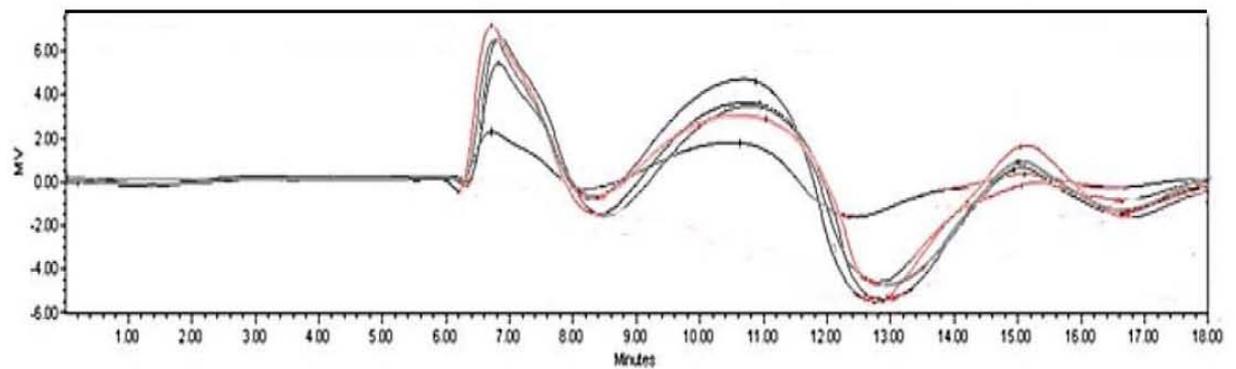
**Gráfica 17. Cromatograma en HPLC al tiempo de 480 horas de crecimiento, sin agitación, donde se aprecia la inulina al tiempo de retención de 6.900 minutos correspondiente con el tiempo de retención del estándar. Se observa una clara disminución en el área del pico.**



**Gráfica 18. Cromatograma en HPLC al tiempo final de crecimiento (648 horas), con agitación, donde se aprecia la ausencia inulina y el aumento se la señal.**



**Gráfica 19. Cromatograma en HPLC al tiempo final de crecimiento (648 horas), sin agitación, donde se aprecia la ausencia inulina y el aumento de la señal.**



**Gráfica 20. Cromatograma en HPLC de la hidrolisis de las diferentes fracciones obtenidas del HPLC, donde se muestra las mismas señales a tiempos de retención similares.**

## Apéndice B

### Métodos Cuantitativos

#### HPLC

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a pasar por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.

- Proceso cromatográfico.

La cromatografía de líquidos se hace con columnas empaquetadas; la eficiencia de la columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la columna estacionaria, el tamaño típico de las partículas en HPLC es de 3-10  $\mu\text{m}$ , lo cual al disminuir el tamaño la altura de los platos se ve reducida, incluso al trabajar con caudales altos.

Una de las razones por la cual un tamaño de partícula menor aumenta la resolución es que permite un flujo más uniforme a través de la columna. Mientras más pequeñas son las partículas, menor es la distancia en la que deben difundirse el soluto en la fase móvil.

El caudal óptimo para partículas pequeñas es mayor para partículas mayores por que los solutos se difunden a través de distancias menores.

La desventaja que tienen las partículas pequeñas es la resistencia que ofrecen al flujo del disolvente. La cromatografía analítica de alta eficiencia precisa presiones de  $\approx 7-40$  MPa (70- 400 bar) para alcanzar caudales de  $\approx 0.5-5$  mL/min.

### Eficiencia en función del diámetro de partícula

Tamaño de la partícula ( $\mu\text{m}$ )	Tiempo de retención (min)	Número de platos (N)	Presión requerida (bar)
5.0	30	25 000	19
3.0	18	42 000	87
1.5	9	83 000	700
1.0	6	125 000	2300

- La columna.

Al Calentar una columna cromatográfica, disminuye la viscosidad de un disolvente reduciéndose así la presión requerida o permitiendo un mayor caudal. Al aumentar la temperatura se acortaran los tiempos de retención y mejora la resolución, debido a que aumenta la velocidad de difusión de los solutos, sin embargo, aumentando la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y reducir la vida de la columna.

- Fase estacionaria.

El soporte más común del HPLC son unas partículas microscópicas de sílice muy pura que es permeable a disolvente y que tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por granos. La sílice por lo normal se disuelve en granos a pH superior a 8, por lo que no se puede usar por encima de ese pH. Algunas calidades de sílice son estables hasta pH 9 o 10. Para analizar por cromatografía compuestos básicos a pH entre 8 y 12, se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno. La fase estacionaria esta covalentemente unido al polímero. (C. Harris D., 2007)

## Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es el movimiento de moléculas cargadas negativa o positivamente a través de un campo eléctrico.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas lo cual brinda condiciones idóneas, como son: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La electroforesis en gel de poliacrilamida permite hacer la separación de proteínas con un peso molecular entre 15 y 200 kDa.

La poliacrilamida se forma por la polimerización de dos compuestos, la acrilamida y bisacrilamida (N',N'- metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el Persulfato de amonio. El radical Persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice.

Las diversas técnicas de electroforesis en el gel de poliacrilamida (PAGE, por las siglas en inglés "*polyacrilamide gel electrophoresis*") la más utilizada es en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) el cual se une a las proteínas produciendo una alteración en su estructura. Esta técnica separa subunidades de proteína de acuerdo únicamente a su masa molar. Para realizar una determinación de la masa molar de una proteína mediante SDS-PAGE es necesario utilizar un marcador de masa molar disponible comercialmente entre 10 y 200 kDa, el cual es una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. (Catsimpoolas 1976; Pingoud 2002; Lamonte B. 2009)

## **Método de Bradford para la determinación de proteínas**

Este método cuantifica la cantidad de proteínas totales por medio de la unión de un colorante a una proteína desconocida y se compara contra una curva patrón, a diferentes cantidades de una proteína estándar, usualmente albúmina de suero bovino (BSA). El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción de 595 nm. Está diseñado para cuantificar entre 1 y 10µg de proteína. Es un método simple, confiable, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su detección. (*Giraldo G. G. Antonio, et al, 2010*)

## **Métodos Cualitativos.**

### **Liofilización.**

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera, se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Etapas de liofilización:

- Congelación (y acondicionamiento en algunos casos) a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, generalmente a muy baja presión, habitualmente se estudia en dos etapas: primaria y secundaria de secado.
- Almacenamiento de producto seco en condiciones controladas.

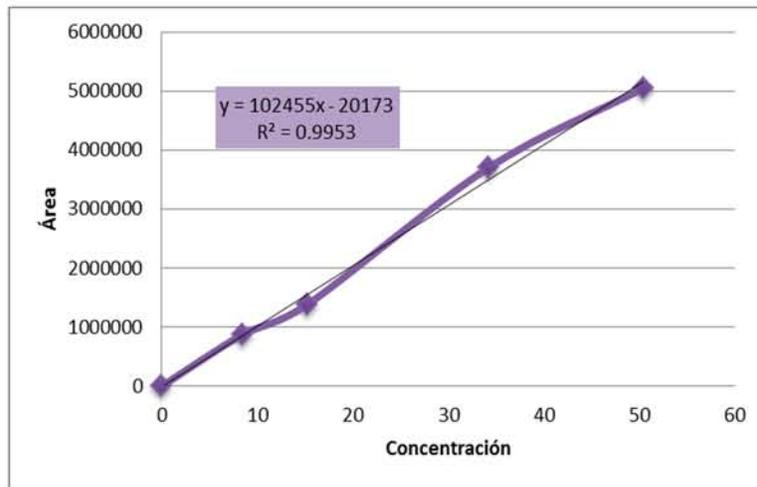
A medida que el hielo se sublima, el plano de sublimación que inicia en la superficie exterior penetra al interior dejando atrás una corteza porosa de material ya seco.

Partes generales del equipo de liofilización típico con un condensador externo tiene tres componentes principales: la cámara de secado, el condensador y el sistema de vacío. La función básica del liofilizador es crear el entorno necesario para el proceso de liofilización:

- Cámara del liofilizador: la cámara de secado sirve al proceso de liofilización mediante las siguientes funciones. (a) proporcionar un entorno limpio y a veces estéril para el proceso (b) proporcionar las temperaturas y presiones necesarias para congelar y secar el producto.
- Condensador: su principal función es eliminar los vapores condensables antes de que entren en el sistema de bombeo de vacío.
- Sistema de vacío: está conectado a la cámara del condensador y su función es proporcionar las presiones necesarias para las fases de secado primario y secundario. Los dos rasgos principales de un sistema de vacío que requieren consideración son: la tubería de comunicación con el condensador y la naturaleza de la bomba de vacío. (*Fernández R. 2013*)

## Apéndice C

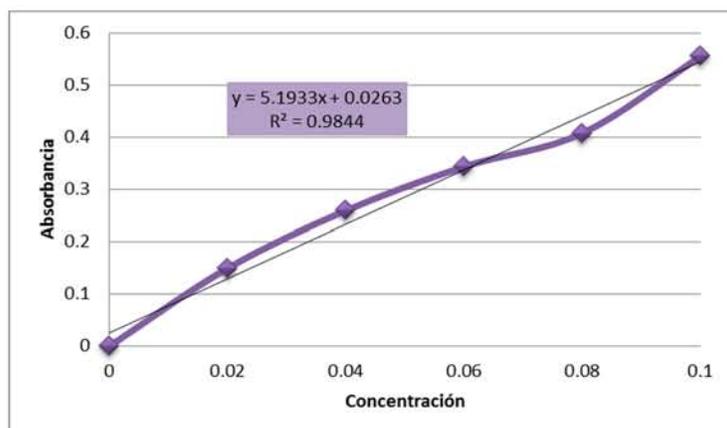
### 1. Curva patrón de inulina.



**Gráfica 21. Curva patrón de inulina por medio de HPLC, para el cálculo de la actividad enzimática por medio de la disminución de inulina para generar productos de hidrólisis.**

### 2. Curva patrón para la medición de azúcares reductores por medio del método DNS

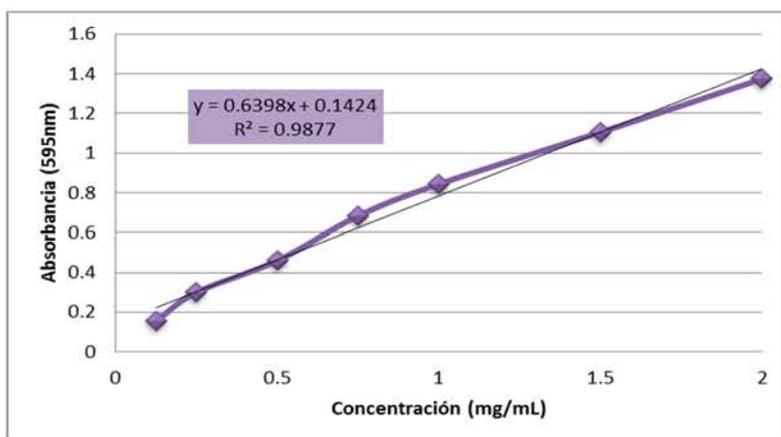
Se realizó una curva patrón a diferentes concentraciones de fructosa (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1%<sub>P/V</sub>), las cuales se colocaron en un baño a 50°C por 15 minutos, transcurrido este tiempo se adicionó 100µL de reactivo DNS y se colocó en un baño por 5min a una temperatura de 92°C, las muestras se depositaron en un baño de hielo para su posterior medición a 540 nm en un espectro de UV- visible GBC-Cintral Double Beamle .



**Gráfica 22. Curva patrón de fructosa para la determinación de azúcares reductores por medio del método de DNS**

### **3. Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford.**

Para la realización de la curva patrón se tomó del Kit Quick Start TM la proteína Globulina Gamma Bovina (por sus siglas en inglés BGG) Standard Set con muestras a diferentes concentraciones (2 mg/L, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL), de la proteína se tomó 20 µL de cada una y se le agregó 1mL del reactivo de Bradford 1x Dye Reagent, posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para que la reacción se llevara a cabo y se midió a una absorbancia a 595 nm en un espectro de UV-Visible GBC-Cintral Double Beam.



**Gráfica 23. Curva patrón de proteínas determinada por el método de Bradford.**