



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INULINOLÍTICA DE LA CEPA**

**8b DE *Kluyveromyces marxianus*.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**NIDIA AZUCENA ORTIZ CRUZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



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:** Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

**VOCAL:** Dr. Oscar Hernández Meléndez

**SECRETARIO:** Dra. Carmina Montiel Pacheco

**1er. SUPLENTE:** Dra. Carolina Peña Montes

**2do. SUPLENTE:** Dr. Francisco Antonio Aguilar Alonso

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 314, Facultad de Química, UNAM. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Carmina Montiel Pacheco**

**SUSTENTANTE:**

**Nidia Azucena Ortiz Cruz**

Agradezco el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a:

**CONACYT proyecto CB-2011/167507**

**DGAPA proyecto PAPIIT IA-204415**

## INDICE.

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | 9  |
| 1 Introducción.....                                    | 11 |
| 1.1 Fructanos.....                                     | 11 |
| 1.1.1 Estructura.....                                  | 11 |
| 1.1.2 Clasificación.....                               | 12 |
| 1.1.3 Localización en plantas.....                     | 13 |
| 1.1.4 Importancia.....                                 | 13 |
| 1.2 Inulina.....                                       | 13 |
| 1.2.1 Fuentes más importantes.....                     | 14 |
| 1.2.2 Producción de la inulina.....                    | 15 |
| 1.2.3 Propiedades.....                                 | 16 |
| 1.2.4 Aplicaciones.....                                | 17 |
| 1.2.5 Fructanos del agave.....                         | 18 |
| 1.3 Hidrólisis de la inulina.....                      | 19 |
| 1.3.1 Inulinasas.....                                  | 20 |
| 1.3.2 Producción microbiana de inulinasas.....         | 21 |
| 1.3.3 Estructura molecular de las inulinasas.....      | 23 |
| 1.3.4 Extracción enzimática.....                       | 25 |
| 1.3.5 Métodos para medir la actividad enzimática.....  | 25 |
| 1.4 Productos de hidrólisis y su importancia.....      | 26 |
| 1.4.1 Fructosa.....                                    | 26 |
| 1.4.2 Fructoligosacáridos.....                         | 26 |
| 1.4.3 Métodos para la identificación de productos..... | 26 |
| 1.4.4 Producción alternativa.....                      | 27 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.5    | El agave.....  | 27 |
| 1.5.1  | Composición del agave.....   | 28 |
| 1.5.2  | Productos del agave.....   | 28 |
| 1.5.3  | Residuos agroindustriales.....   | 29 |
| 2      | Justificación del estudio.....   | 30 |
| 3      | Hipótesis.....   | 31 |
| 4      | Objetivos.....   | 31 |
| 4.1    | Objetivos particulares.....  | 31 |
| 5      | Materiales y métodos.....  | 32 |
| 5.1    | Reactivos.....   | 32 |
| 5.2    | Acondicionamiento de la cepa 8b para la producción de enzimas<br>inulinolíticas.....   | 33 |
| 5.3    | Extracción enzimática.....   | 34 |
| 5.4    | Liofilización de extractos enzimáticos.....  | 35 |
| 5.5    | Determinación de proteína.....   | 35 |
| 5.6    | Actividad enzimática.....  | 35 |
| 5.7    | Determinación de las mejores condiciones de reacción.....  | 36 |
| 5.7.1  | Temperatura.....   | 36 |
| 5.7.2  | pH.....  | 37 |
| 5.8    | Termoestabilidad.....  | 37 |
| 5.9    | Determinación de la reacción sobre enlaces $\beta$ -(2-1) y $\beta$ -(2-6).....  | 38 |
| 5.10   | Avance de la reacción.....   | 38 |
| 5.11   | Análisis de productos.....   | 39 |
| 5.11.1 | Cromatografía de capa fina.....  | 39 |
| 5.11.2 | Cromatografía de líquidos de alta resolución.....  | 39 |
| 5.12   | Determinación del peso molecular por electroforesis, de las enzimas con<br>actividad inulinolítica presentes en los extractos..... | 40 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.12.1 | Filtración y ultrafiltración de los extractos enzimáticos.....                   | 40 |
| 5.12.2 | Geles SDS-PAGE. ....   | 40 |
| 5.12.3 | Zimograma. ....  | 41 |
| 6      | Resultados y discusión. ....   | 41 |
| 6.1    | Extractos enzimáticos con actividad inulinolítica. ....                          | 42 |
| 6.2    | Concentración de proteína de los extractos enzimáticos. ....                     | 45 |
| 6.3    | Caracterización de la actividad inulinolítica de los extractos enzimáticos. .... | 46 |
| 6.3.1  | Temperatura de reacción.....   | 46 |
| 6.3.2  | pH de reacción.....  | 49 |
| 6.3.3  | Termoestabilidad enzimática. ....  | 51 |
| 6.3.4  | Acción sobre los enlaces $\beta$ -(2-1) y $\beta$ -(2-6). ....                   | 53 |
| 6.3.5  | Seguimiento en el tiempo de la formación de productos. ....                      | 55 |
| 6.4    | Peso molecular de las enzimas inulinolítica en los extractos. ....               | 59 |
| 7      | Conclusiones. ....   | 61 |
| 8      | Perspectivas. ....   | 62 |
|        | Referencias. ....  | 62 |

## INDICE DE FIGURAS.

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Estructura típica de un fructano tipo inulina adaptada de (Kango 2011)           | 14 |
| Figura 2. | Procesos de obtención industrial de la inulina y derivados (Madrigal 2007). .... | 16 |
| Figura 3. | Estructura de la agavina (Lopez 2003). ....                                      | 19 |
| Figura 4. | Acción de las enzimas exo y endoinulinasas sobre la inulina (Kango 2011). ....   | 21 |
| Figura 5. | Estructura cristalina de la exoinulinasas de <i>A. awamori</i> (Nagem 2004)...   | 24 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 6. Estructura cristalina de la endoinulinasa de <i>A. ficuum</i> con su sitio activo en el cuadro rojo (Pouyez 2012). .....   | 25 |
| Figura 7. Ecuación para calcular la actividad específica. ....   | 36 |
| Figura 8. Ecuación para calcular la concentración % de los FOS. ....   | 38 |
| Figura 9. Observación microscópica de la cepa 8b de <i>K. marxianus</i> pura. ....   | 42 |
| Figura 10. TLC del consumo de la agavina por la cepa 8b en el medio de cultivo, incubado a 35°C. ....  | 43 |
| Figura 11. TLC de los productos formados con los extractos enzimáticos obtenidos de la cepa 8b. ....   | 44 |
| Figura 12. Curva patrón de albumina sérica bovina (BSA) para la determinación de proteína por el método de Bradford. ....  | 45 |
| Figura 13. Concentración de proteína en el extracto celular y el sobrenadante liofilizados, calculada por el método de Bradford, n=7. ....   | 46 |
| Figura 14. Curva patrón de Fructosa para la cuantificación de la concentración porcentual de azúcares reductores por el método de DNS. ....  | 47 |
| Figura 15. Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto Celular a diferentes temperaturas (U/mg proteína), reacción a pH 5, durante 14h, n=2. ....                           | 48 |
| Figura 16. Actividad específica de las enzimas presentes en el Sobrenadante a diferentes temperaturas (U/mg proteína), reacción a pH 5, durante 14h, n=2. ....                               | 48 |
| Figura 17 Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto celular, a diferentes pH (U/mg proteína), reacción a 35°C, durante 18h, n=2. ....                                     | 50 |
| Figura 18. Actividad específica de las enzimas presentes en el sobrenadante, a diferentes pH (U/mg proteína), reacción a 45°C, durante 18h, n=2. ....  | 50 |
| Figura 19. Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto celular, después de diferentes tratamientos térmicos (U/mg proteína), reacción a 35°C, a pH 5, durante 2h, n=2. .... | 52 |
| Figura 20. Actividad específica de las enzimas presentes en el Sobrenadante, después de diferentes tratamientos térmicos (U/mg proteína), reacción a 45°C, a pH 5, durante 2h, n=2. ....     | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 21. TLC de los productos obtenidos en la reacción de los extractos enzimáticos de la cepa 8b con los sustratos; agavina, inulina de achicoria y levana, reacción a temperatura 35°C, a pH 5, durante 19h. .... | 53 |
| Figura 22. Actividad específica de los extractos enzimáticos con diferentes fructanos (U/mg proteína), reacción a temperatura 35°C, a pH 5, durante 19h, n=2. ....  | 55 |
| Figura 23. Perfil cromatográfico de la reacción de hidrólisis del extracto celular y la agavina a distintos tiempos, a 35°C y pH 5. ....  | 57 |
| Figura 24. Variación de la concentración de agavina, fructosa y FOS con respecto al tiempo de reacción enzimática del extracto celular, a 35°C y pH 5. ....   | 57 |
| Figura 25. Perfil cromatográfico de la reacción de hidrólisis del sobrenadante y la agavina a distintos tiempos, a 45°C y pH 5. ....  | 58 |
| Figura 26. Variación de la concentración de agavina, fructosa y FOS con respecto al tiempo de reacción enzimática del sobrenadante, a 45°C y pH 5. ....   | 58 |
| Figura 27. Proteínas con actividad inulinolítica, presentes en los extractos enzimáticos. ....  | 60 |

## **INDICE DE TABLAS.**

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales (Madrigal 2007). .... | 15 |
| Tabla 2. Microorganismos productores de inulinasa (Kango 2011). ....                          | 22 |
| Tabla 3. Composición del medio de cultivo empleado. ....                                      | 34 |
| Tabla 4. Reactivos y cantidades a añadir para realizar un ensayo de reacción enzimática. .... | 37 |
| Tabla 5 Reactivos y cantidades a añadir para preparar geles SDS-PAGE. ....                    | 40 |

## Resumen.

La inulina es un fructano polidisperso que consiste principalmente en enlaces  $\beta$ -(2-1)-D-fructosil-fructosa terminadas por un residuo de sacarosa. Sirve como polisacárido de almacenamiento en muchas plantas y se acumula en las raíces y tubérculos. Las enzimas que hidrolizan la inulina en fructooligosacáridos (FOS) y fructosa pura con algo de glucosa se denominan inulinasas que son  $\beta$ -fructosidasas no específicas y son producidas por una amplia gama de organismos, incluyendo plantas, bacterias, mohos y levaduras.

La reacción general de hidrólisis implica principalmente la acción de dos enzimas: exoinulinasa (EC 3.8.1.80) que divide las unidades de fructosa terminales de inulina y endoinulinasa (CE 3.2.1.7) que descompone la inulina en inulo-oligosacáridos (IOS).

En respuesta a la creciente demanda de alimentos más saludables y bajos en calorías, se está explorando la producción eficiente de fructosa, que es un edulcorante bajo en calorías, alternativo a la sacarosa y FOS ya que se ha reportado para la mejora de población de bifidobacterias en el intestino, que tienen el potencial de contribuir a la prevención de muchas enfermedades y mantenimiento de la salud en general, así como buenas propiedades funcionales y nutricionales tales como bajos en calorías, fuente de fibra dietética y prebióticos.

En este proyecto se busca extraer y caracterizar los extractos enzimáticos de la cepa 8b de *Kluyveromyces marxianus*, previamente aislada del bagazo del agave, para así conocer la actividad inulinolítica que tienen sobre la inulina de agave, que presenta una estructura diferente a la inulina convencional, y así evaluar la producción de fructosa y fructooligosacáridos.

Para extraer las enzimas inulinolíticas, se hará crecer a la cepa en un medio de cultivo con agavina como única fuente de carbohidratos, para fomentar la producción de estas enzimas y así extraerlas por centrifugación y lisis celular. La caracterización consistirá en evaluar la actividad de las enzimas en cuestión,

determinando las mejores condiciones de temperatura y pH de reacción, la estabilidad térmica, la acción sobre enlaces  $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6), el peso molecular de las enzimas con esta actividad mediante geles SDS-PAGE y zimogramas. Y finalmente para evaluar la producción de fructosa y fructooligosacáridos se hará mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de líquidos a alta resolución (HPLC).

## **1 Introducción.**

Diversos oligosacáridos, provenientes de los fructanos (carbohidratos presentes principalmente en plantas), se han estudiado para la producción de alimentos funcionales, con la finalidad de mejorar la salud de los consumidores ya que éstos contribuyen en la prevención de enfermedades por su capacidad prebiótica, fuente de fibra dietética y bajos en calorías (Kango 2011). Hoy en día, estos oligosacáridos, son ampliamente utilizados en alimentos, tales como en productos de confitería, chocolate, y productos lácteos (Mahadevan 2011).

### **1.1 Fructanos.**

En el reino vegetal, la mayoría de los carbohidratos se encuentran como polisacáridos de elevado peso molecular; algunos como constituyentes estructurales y otros como almacén de energía y carbono.

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes que se encuentran en una amplia gama de plantas. (Kango 2011)

Las especies vegetales que contienen fructanos se encuentran distribuidas en algunas familias de mono- y dicotiledóneas tales como *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae*, *Compositae* y *Agavaceae*, existiendo diferencias estructurales entre los fructanos de dichas familias de plantas. Las especies de dicotiledóneas almacenan fructanos tipo inulina, mientras que en monocotiledóneas se pueden encontrar fructanos más complejos y de tipo ramificado (Urías 2008). Además, los fructanos también se encuentran almacenados en algunos hongos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*), algas (*Acetabularia*) y en varios taxa bacterianos (*Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Aceobacter*, *Streptococcus* y *Actynomices*). (Mancilla 2006)

#### **1.1.1 Estructura.**

Los fructanos son polisacáridos de reserva constituidos por unidades de fructosa con o sin una unidad de glucosa terminal o interna, unidas por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$ -(2-1) y/o  $\beta$ -(2-6). Pueden ser cadenas poliméricas lineales o bien de diferentes grados de ramificación (SAGARPA 2015) y (Perrin 2001).

El peso molecular de los fructanos es muy variable, pues depende principalmente de la fuente, pero en términos generales oscila entre 1,000 y 4,500 Da. Generalmente en la naturaleza el grado de polimerización varía entre 2 y 70 unidades, pero el grado de polimerización más común es de 10 unidades (Perrin 2001).

Dependiendo de su origen (vegetal o microbiano), los fructanos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y suelen definirse en términos de grado de polimerización (GP). En los de origen vegetal, el GP no excede de 200 y en los de origen bacteriano puede ser de hasta 100,000 (Madrigal 2007).

### 1.1.2 Clasificación.

Los fructanos se clasifican de acuerdo con las unidades estructurales que conforman su molécula, en los tipos siguientes:

- I. Inulina, polímero lineal de unidades de fructosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(2-1) y una molécula de glucosa terminal. Este fructano se encuentra principalmente en dicotiledóneas y ha sido más estudiado en *Asteraceae* como achicoria (*Cichorium intybus*), alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*), alcachofa (*Cynara scolymus*), diente de león (*Taraxacum officinale*), dalia (*Dahlia variabilis*) y yacon (*Polymnia sonchifolia*).
- II. Levano, polímero lineal similar a la inulina pero con enlaces  $\beta$ -(2-6). Se encuentra en pastos como *Phleum pratense* y *Dactylis glomerata*. En general, las bacterias productoras de fructanos presentan este tipo de estructura, con pocas excepciones como *Streptococcus mutans* que produce inulinas.
- III. Graminano, están compuestos tanto de enlaces  $\beta$ -(2-1) como  $\beta$ -(2-6) y una molécula de glucosa terminal. Generalmente son estructuras ramificadas. Se encuentra en algunas *Poaceae* como trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*).
- IV. Inulina neoserie, contienen unidades de fructosa con enlaces  $\beta$ -(2-1) unidas tanto al carbono 1 como al 6 de la molécula de glucosa. Esto resulta en un polímero de fructanos con una cadena de inulina en ambos extremos de la

molécula de glucosa. Las *Asparagaceae* como esparrago (*Asparagus officinalis*) y cebolla (*Allium cepa*) son algunos ejemplos de estos.

- V. Levano neoserie, polímero similar a la inulina neoserie pero sus enlaces son de tipo  $\beta$ -(2-6). Este es el fructano menos común, se presenta en pocas especies de *Poales* como avena (*Avena sativa*) y *Lolium spp.* (Mancilla 2006) y (Urías 2008).

### **1.1.3 Localización en plantas.**

Los fructanos como carbohidratos de reserva a largo plazo, son localizados en órganos de almacén como tubérculos (alcachofa de Jerusalem y dalia), raíces (achicoria y diente de león), bulbos (cebolla, ajo, tulipán), discos florales (alcachofa) y tallos (agave); en gramíneas se almacenan en los internodos de tejidos vegetativos, en semillas y principalmente en las vainas de las hojas maduras (Mancilla 2006).

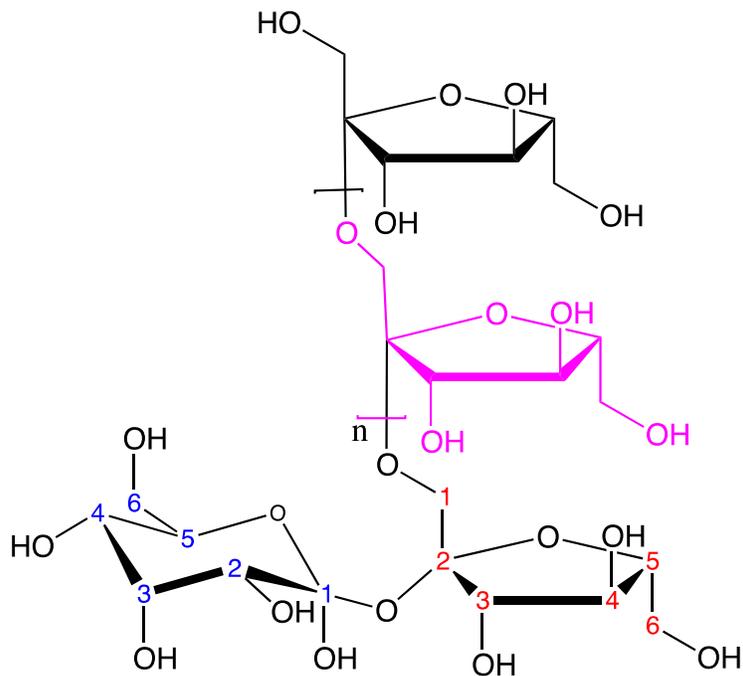
### **1.1.4 Importancia.**

Las investigaciones de las últimas décadas destacan a los fructanos como ingredientes funcionales, es decir, ingredientes que además de aportar un valor nutricional a los alimentos, mejoran la salud del consumidor. Dada su estructura química, los fructanos resisten la hidrólisis de enzimas digestivas pasando intactos al colón donde son sustrato específico para bacterias benéficas, principalmente del género *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Enterococcus* (Mancilla 2006).

Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina y los fructooligosacáridos o FOS, que se caracterizan por sus enlaces de tipo  $\beta$ -(2-1) entre las unidades de fructosa, con un grado de polimerización que varía entre 2 y 60 unidades, y se les considera carbohidratos de cadena corta o de bajo nivel de polimerización (Madriral 2007).

## **1.2 Inulina.**

La inulina es un polímero formado por fructanos unidos por enlaces  $\beta$ -(2-1)-fructosil-fructosa y una glucosa terminal con enlace  $\alpha$ -(1-2)-(D-glucopiranosil), como se observa en la Figura 1.



**Figura 1. Estructura típica de un fructano tipo inulina adaptada de (Kango 2011)**

En la inulina, las unidades de fructosas enlazadas a la glucosa terminal pueden variar desde algunas pocas unidades hasta 60 unidades, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un polifrufructano con GP mayor a 30 unidades (Huerta 2014).

### **1.2.1 Fuentes más importantes.**

La inulina está presente en más de 36,000 plantas pertenecientes a 10 familias y es almacenada tanto en las partes aéreas como subterráneas. La extracción de inulina de la parte aérea de las plantas (por ejemplo en la familia *Gramineae*) no es recomendada debido a sus bajos rendimientos de extracción a nivel industrial. Por lo anterior, las partes subterráneas son las más utilizadas para la producción industrial (Huerta 2014). En la Tabla 1. se presenta el contenido aproximado de inulina en algunas plantas comestibles.

**Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales (Madrigal 2007).**

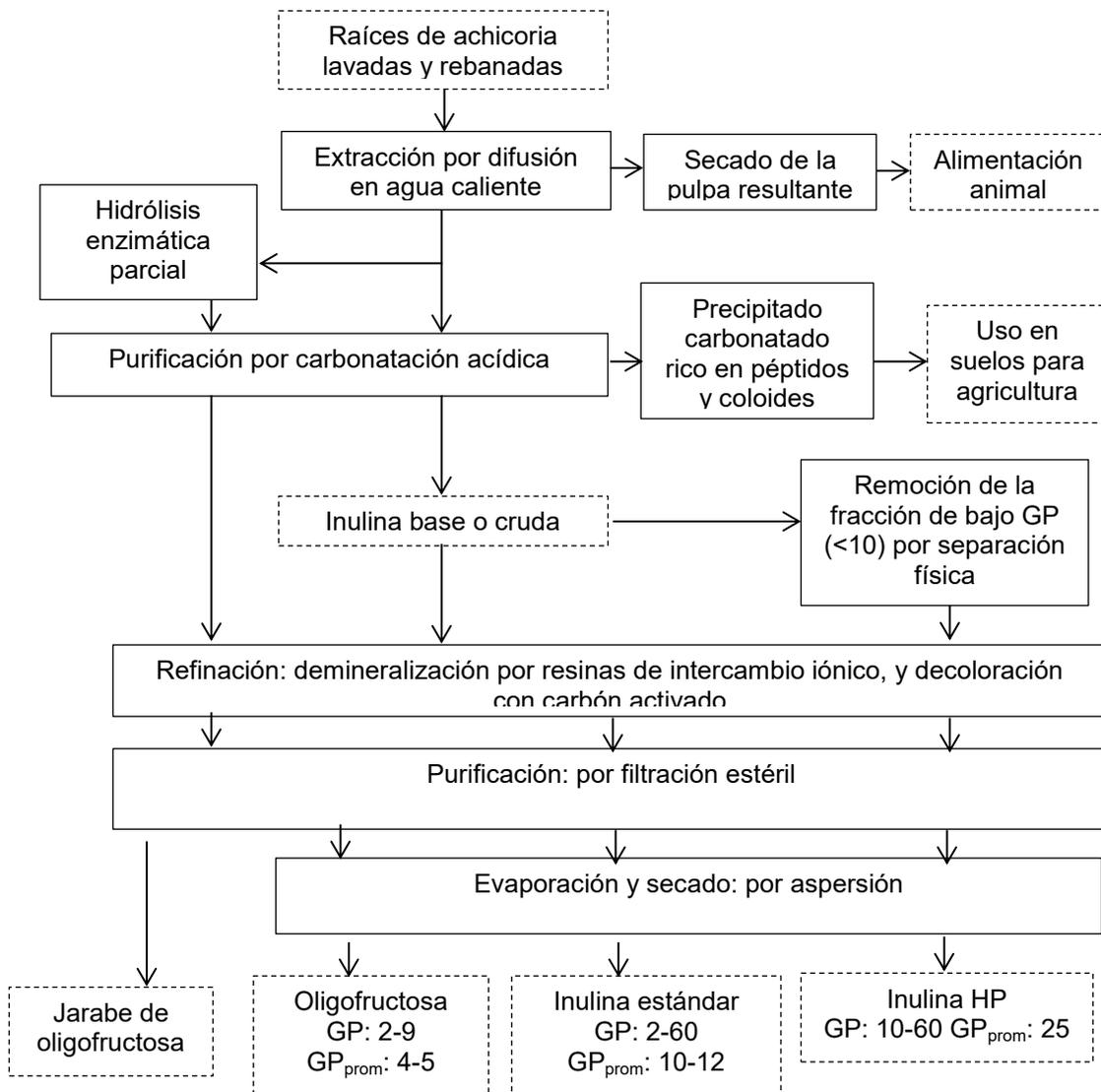
| <b>Especie vegetal</b>                              | <b>Inulina<br/>(g/100g base seca)</b> |
|---|---------------------------------------|
| <b>Pataca (<i>Helianthus tuberosus</i>)</b>         | 89                                    |
| <b>Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)</b>         | 79    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

La producción industrial de la inulina y sus derivados se obtiene principalmente de la raíz de la achicoria. La achicoria se encuentra geográficamente distribuida en muchas regiones del mundo: Europa central y del norte, Liberia, Turquía, Afganistán, China norte y central, Sudamérica, Sudáfrica, Etiopía, Madagascar, India, Australia y Nueva Zelanda. (Madrigal 2007).

La producción mundial de inulina se estima actualmente en cerca de 350.000 toneladas. Los principales productores son Bélgica, Francia, Holanda y Chile (Kango 2011).

### **1.2.2 Producción de la inulina.**

Como ya se ha mencionado, la producción industrial de la inulina y sus derivados se obtiene principalmente de la raíz de la achicoria. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** se muestra un esquema de la producción de la inulina y de algunos de sus derivados.



**Figura 2. Procesos de obtención industrial de la inulina y derivados (Madrigal 2007).**

### 1.2.3 Propiedades.

A nivel industrial, la inulina se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual. La inulina nativa, a diferencia de la inulina HP o de alta pureza, contiene azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), lo que le confiere cierto dulzor (10% del dulzor de la sacarosa). La inulina HP presenta

menor solubilidad que la inulina nativa, debido a la casi total ausencia de azúcares libres.

A pH menor a 4, los enlaces tipo  $\beta$  de las unidades de fructosa en la inulina se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa. Por esta razón, estos compuestos no pueden ser usados en alimentos muy ácidos.

La Inulina por su configuración química no puede ser hidrolizada por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colón). De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como prebióticos. Los fructanos aportan un valor calórico reducido (1,5 kcal/g) si se comparan con los carbohidratos digeribles (4 kcal/g) (Madrigal 2007).

#### **1.2.4 Aplicaciones.**

La inulina y sus derivados se usan en una amplia variedad de productos alimenticios como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante, depresor del punto de congelación. Este compuesto mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa en diversos productos alimenticios (helados, salsas, untables, postres cremosos, etc.). Se observa una sinergia entre la inulina y otros agentes gelantes como la gelatina, alginatos, carraginos, gomas y maltodextrinas (Madrigal 2007).

El uso de la inulina para cumplir funciones tecnológicas, simultáneamente aporta beneficios a la salud, el primero de ellos es su función de fibra dietética, la inulina es una fibra soluble que el cuerpo no es capaz de digerir y por tanto promueve los movimientos intestinales, favoreciendo la eliminación de toxinas; es un potente estimulador del crecimiento de la microbiota intestinal benéfica, ayuda en la correcta asimilación de nutrientes como calcio y magnesio, mantiene los niveles de colesterol bajos y evita la acumulación de triglicéridos, su aporte de energía y nutrientes es mínimo, y es por esta particularidad que es recomendable en las dietas (Huerta 2014).

La inulina es procesada por la industria de los alimentos para producir fructanos de cadena corta, denominados fructooligosacáridos (GP 2 a 10; promedio de 5), fructosa y glucosa, como resultado de hidrólisis parcial o total, estos productos tienen un gran interés debido a sus propiedades.

La inulina y sus derivados también se están usando en la alimentación animal, para disminuir malos olores en las heces fecales de animales domésticos como perros y gatos). También se ha ensayado utilizando los oligosacáridos de la inulina en la sustitución del uso de antibióticos profilácticos en pollos, conejos y cochinos. La inulina y derivados se están usando en la industria farmacéutica como material excipiente en tabletas, coadyuvante en vacunas y también como ingrediente estructurante en detergentes. Adicionalmente, en la industria química y de procesamiento se usa la inulina y la carboximetil inulina (CMI), como agente quelante y anti-incrustante de tuberías, contenedores, cámaras de reacción y separación y demás equipos. También la inulina y derivados han sido calificados como materiales bioactivos que pueden ser incorporadas en los empaques de los alimentos para dar origen a “empaques bioactivos” (Madrigal 2007).

### **1.2.5 Fructanos del agave.**

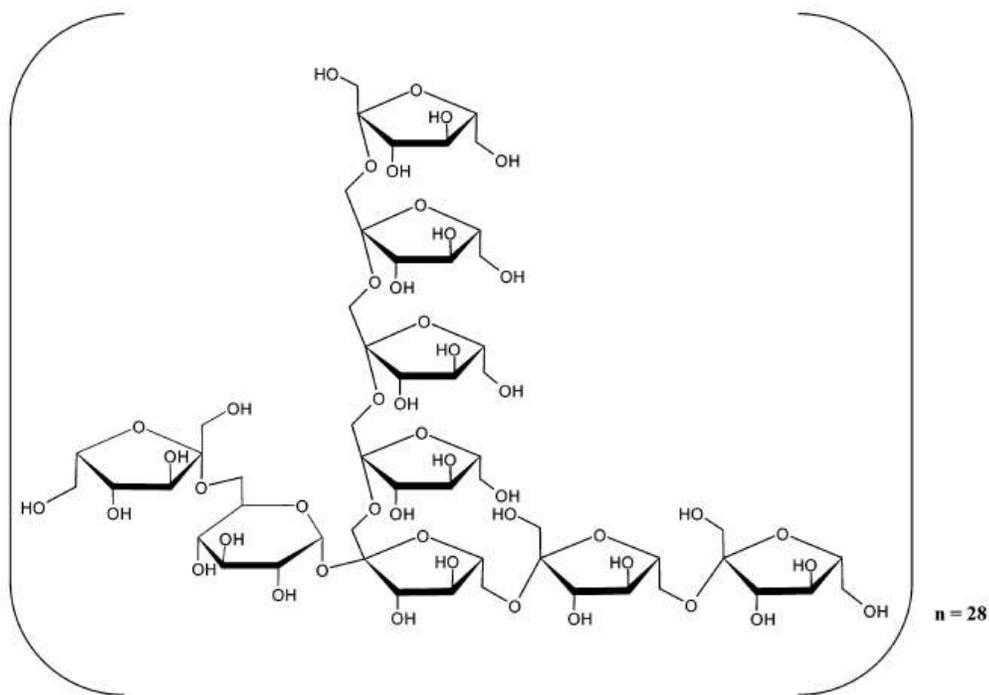
Los agaves, son monocotiledóneas endémicas del continente Americano y aproximadamente 200 especies se encuentran solo en México con una distribución de aproximadamente del 75% del territorio. El *Agave tequilana* (Azul Weber) contiene de 20 a 25% de inulina dependiendo de las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la planta (Vargas 2015).

La inulina de agave puede extraerse de la parte aérea (piñas) de plantas de *Agave spp.*, principalmente de *A. tequilana Weber* var. Azul. En las piñas los fructanos se almacenan hasta en un 80% de su peso seco (Mancilla 2006). Esta inulina presenta diferencias estructurales a los fructanos anteriormente descritos, es por esta razón que se les denomina como, agavinas.

#### **1.2.5.1 Estructura.**

La agavina contiene una estructura diferente a los demás fructanos, donde los residuos de glucosa están en el interior de la cadena ramificada, combinando los

dos tipos de enlaces  $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6) y teniendo un grado de polimerización que va desde los 3 a los 29 monómeros, como se muestra en la Figura 3. Estos factores van cambiando en función de la edad de la planta (Huerta 2014).



**Figura 3. Estructura de la agavina (Lopez 2003).**

### 1.3 Hidrólisis de la inulina.

La inulina puede ser hidrolizada de dos maneras: mediante hidrólisis química e hidrólisis enzimática. La hidrólisis química se lleva a cabo por el proceso de hidrólisis ácida, en condiciones de pH que van de 2 a 3 y temperaturas de 70 a 100°C, sin embargo, este método produce sustancias de color no deseado debido a la formación de difructosa anhidra, que carece de propiedades edulcorantes, al igual que compuestos tóxicos, estos compuestos requieren ser eliminados al final del proceso, disminuyendo la productividad del método de hidrólisis (Ruano 2012). Por otra parte, la hidrólisis enzimática, se lleva a cabo en condiciones más suaves que en la hidrólisis química, por medio de la utilización de enzimas con capacidad inulinolítica (inulinasas), este método tiene un rendimiento de hasta 95% de fructosa pura y una producción libre de compuestos no deseados (Huerta 2014).

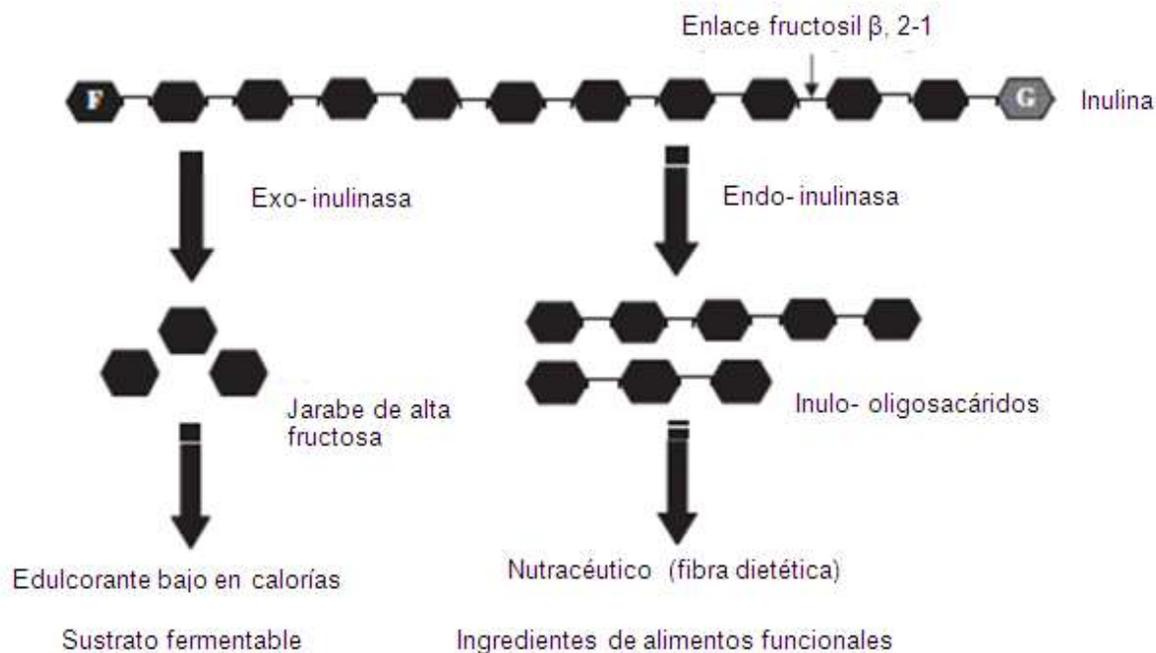
### **1.3.1 Inulinasas.**

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -D-(2-1)- fructosídicos en la inulina originando fructosa y glucosa se les denominan inulasas o  $\beta$ -D-(2-1)-fructano fructohidrolasas, pertenecientes al grupo de clasificación de enzimas hidrolasas glicosidasas de la familia GH32 (Castillo 2010)

La reacción general implica principalmente la acción de dos enzimas: exoinulinasas (E.C. 3.8.1.80) y endoinulinasas (E.C. 3.2.1.7), esta acción enzimática se ilustra en la Figura 44.

Las exoinulinasas (74 KDa, pH 5.1 – 7.0) catalizan la separación de unidades de fructosa desde el inicio hasta el final de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa. Estas pueden ser utilizadas para la producción de jarabe de alta fructosa a partir de inulinas naturales (sacarificación).

Las endoinulinasas (64 KDa) catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la molécula de inulina, originando inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa, pero no tienen la actividad invertasa para hidrolizar el residuo de sacarosa. Estas pueden ser utilizadas para la producción de inulooligosacáridos de diferentes longitudes (Kango 2011)y (Castillo 2010).



**Figura 4. Acción de las enzimas exo y endoinulinasas sobre la inulina (Kango 2011).**

### 1.3.2 Producción microbiana de inulinasas.

Las inulinasas pueden ser obtenidas a partir de especies vegetales y de muchos microorganismos, siendo éstos últimos capaces de producir suficiente enzima para su aplicación industrial. Por esta razón en estas tres últimas décadas se han realizado esfuerzos significativos por encontrar u obtener la mejor fuente microbiana para la producción de inulinasas (Castillo 2010).

La selección de un microorganismo adecuado es un aspecto importante para la producción de enzimas. El microorganismo debe ser capaz de crecer, preferentemente, en abundancia y estar reconocido generalmente como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) y ser aceptado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica.

Cepas de hongos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasas, varias de ellas han sido cultivadas con éxito y se ha logrado extraer las enzimas, concentrarlas y purificarlas. Los microorganismos más comúnmente utilizados

para la producción de inulinasas son las cepas de hongos de *Aspergillus* spp. y levaduras de *Kluyveromyces* spp. (Huerta 2014).

A continuación en la Tabla 2. se observan algunos microorganismos productores de inulinasas y dos de los factores fisicoquímicos más importantes (pH y temperatura) optimizados en cada caso.

**Tabla 2. Microorganismos productores de inulina (Kango 2011).**

| Microrganismos                 | Actividad U/mL | pH  | T °C |
|--------------------------------|----------------|-----|------|
| <b>Hongos :</b>                |                |     |      |
| <i>Aspergillus niger</i> SL 09 | 118            | 6.0 | 30   |
| <i>Penicillium</i> sp. TN      | 88             | 9.9 | 30   |
| <i>Trichoderma viride</i>      | 0.94           | 6.0 | 25   |
| <i>Rhizoctonia solani</i>      | 2.9            | 4.0 | 40   |
| <b>Levaduras :</b>             |                |     |      |
| <i>K. marxianus</i> YS-1       | 50.2           | 6.5 | 30   |
| <i>K. bulgaricus</i>           | 8.6–11.6       | 6.8 | 30   |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 212            | 5.0 | 28   |
| <i>Pichia guilliermondii</i>   | 60             | 8.0 | 28   |
| <i>Cryptococcus aureus</i>     | 85             | 5.0 | 28   |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>   | 52.53          | 5.0 | 28   |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>     | 52.38          | 5.0 | 28   |
| <b>Bacterias:</b>              |                |     |      |
| <i>Xanthomonas</i> sp.         | 15             | 7.0 | 37   |
| <i>Bacillus smithi</i> T7      | 135.2          | 7.0 | 50   |
| <i>Streptomyces</i> sp. GNDU-1 | 0.552          | 7.5 | 46   |

### 1.3.2.1 *Kluyveromyces marxianus*.

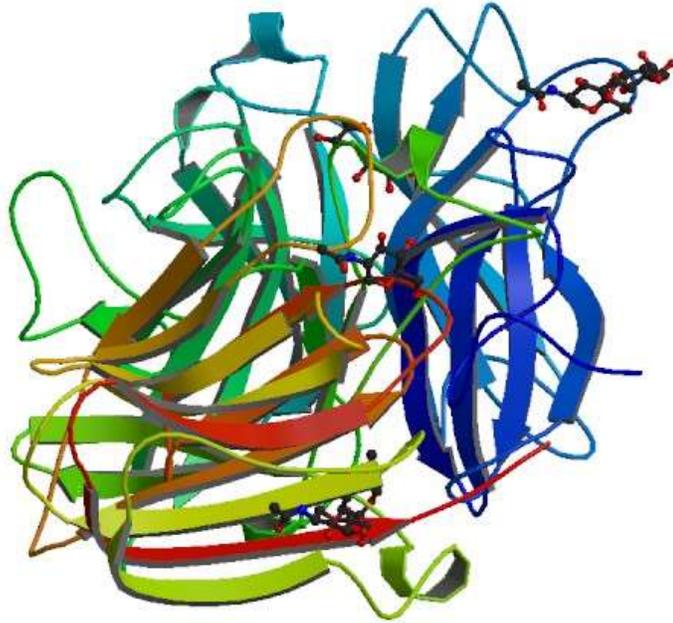
Las cepas de *K. marxianus* tienen el status de cepas reconocidas como GRAS por lo que son preferidas para la producción de inulinasas con fines alimentarios y biotecnológicos. Además es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener un alta velocidad de crecimiento, termotolerancia, habilidad para crecer sobre los 52 °C, capacidad de asimilar un amplio intervalo de azúcares claves (como la inulina) y una alta capacidad secretoria de enzimas líticas (Jain 2012). La levadura *K. marxianus* ha sido aislada de una gran variedad de ambientes, que

van desde productos lácteos, bebidas fermentadas, material vegetal en descomposición, efluentes residuales diversos, hasta tejidos humanos infectados. Esto nos hace suponer que para sobrevivir en estos ambientes debe darse la producción de enzimas tales como  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas, inulinasa y poligalacturonasas por mencionar algunas (Huerta 2014).

### **1.3.3 Estructura molecular de las inulinasas.**

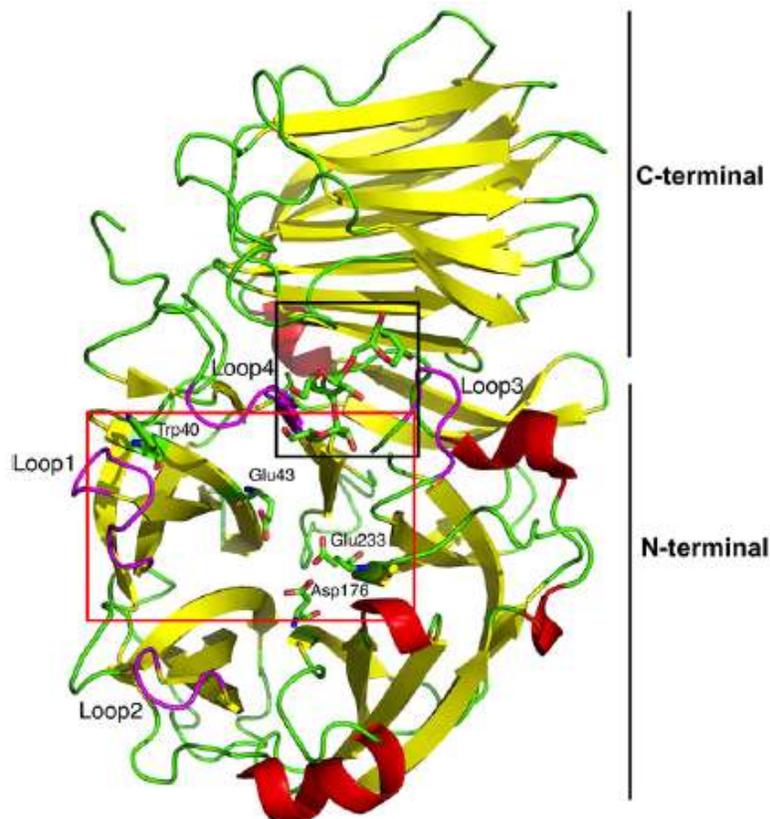
Existen pocos reportes sobre la estructura de las glicósido hidrolasas. En uno de ellos se ha desarrollado un modelo de la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* por cristalografía de Rayos-X de alta resolución (Figura 5). La estructura terciaria de esta enzima reveló que la proteína está compuesta por dos dominios: el dominio catalítico amino-terminal, de mayor tamaño y compuesto por un plegamiento inusual de 5 hojas beta en forma de propela y el dominio carboxilo-terminal, plegado en forma de beta sándwich.

Su estructura es similar a la invertasa ( $\beta$ -fructosidasa) de *Thermotoga marítima* perteneciente a la familia de las glicósido hidrolasas. La exo-inulinasa es una glicoproteína que contiene cinco oligosacáridos N-enlazados. La estructura de rayos X del complejo enzima: fructosa, revela dos residuos catalíticamente importantes: Asp41 y Glu241, un nucleófilo y un ácido / base, respectivamente. Y Asp189, que es parte del motivo Arg-Asp-Pro, proporciona enlaces de hidrógeno importante para el reconocimiento del sustrato (Nagem 2004).



**Figura 5. Estructura cristalina de la exoinulinasa de *A. awamori* (Nagem 2004).**

Para la endoinulinasa, la primera y única estructura cristalizada, fue la de *Aspergillus ficuum*. Se resolvió por reemplazamiento molecular con la estructura de exoinulinasa como modelo de búsqueda. La estructura 3D presenta una disposición bimodular comunes a otras enzimas GH32 (Figura 6). El análisis estructural y la comparación con otras enzimas GH32 revelan la presencia de un bolsillo adicional en el sitio catalítico. Esta cavidad explicaría la actividad endo de la enzima, el papel crítico de Trp40 (Pouyez 2012).



**Figura 6. Estructura cristalina de la endoinulinasa de *A. ficuum* con su sitio activo en el cuadro rojo (Pouyez 2012).**

### 1.3.4 Extracción enzimática.

La extracción y purificación de inulinasas microbianas extracelulares se lleva a cabo por métodos convencionales de centrifugación, ultrafiltración, precipitación con solventes o sales, cromatografía de intercambio iónico y de permeación en gel, mientras que las inulinasas intracelular requieren disrupción celular antes de practicar los métodos reportados para las enzimas extracelulares (Castillo 2010).

### 1.3.5 Métodos para medir la actividad enzimática.

El ensayo más común para calcular la actividad de una inulinasa, implica la incubación de la muestra de enzima con una solución de inulina comercial, seguido de la cuantificación de la reducción de azúcar, por espectrofotometría. Sin embargo este estudio posee la limitación de que los compuestos provenientes de

la hidrólisis de la inulina, son subestimados. Por lo general, la hidrólisis de 1% (w / v) de una solución de inulina se lleva a cabo a pH 5,0 y 50°C (Mancilla 2006).

#### **1.4 Productos de hidrólisis y su importancia.**

##### **1.4.1 Fructosa.**

La fructosa es un edulcorante seguro y saludable, por su poder de dulzor que de 1.5 a 2 veces mayor al de la sacarosa, que causa problemas relacionados a la corpulencia, cariogenicidad, la aterosclerosis y la diabetes. La fructosa también se utiliza en la producción de etanol, acetona y butanol, ácido glucónico, sorbitol y FOS etc. (Castillo 2010).

##### **1.4.2 Fructooligosacáridos.**

Los fructooligosacáridos (FOS) producidos a partir de inulina se han reportado para mejorar población de bifidobacterias en el intestino (bifidogénico). El mantenimiento de bifidobacterias en el intestino grueso tiene el potencial de contribuir a la prevención de muchas enfermedades y mantenimiento de la salud en general.

Los beneficios de la ingesta de FOS también se indican en la hiperglucemia, en ratas Wistar machos reveló disminución de los triglicéridos séricos (TAG), suprime marcadores preneoplásicos de adenomas y carcinomas de colon, son de interés creciente como suplementos nutracéuticos para su uso como prebióticos. Hay mucho interés en la adición de FOS a los productos lácteos debido a que estos prebióticos mejoran la absorción de calcio y magnesio, ayudan en la síntesis de vitaminas B y la absorción de ciertos iones. El uso de ingredientes prebióticos en combinación con probióticos ofrece una posibilidad considerable para mejorar los beneficios a la salud (Kango 2011).

##### **1.4.3 Métodos para la identificación de productos.**

El análisis cualitativo y cuantitativo de los productos finales de la hidrólisis de inulina se realiza mediante diversos métodos. Las estructuras de fructanos se han elucidado con técnicas analíticas que separan y/o identifican los diferentes

isómeros. La cromatografía en papel y en capa fina (TLC), fueron las primeras técnicas usadas en la identificación de fructanos. Dependiendo de la fase estacionaria (generalmente sílica gel) y el sistema de eluyentes, pueden resolverse FOS hasta de 14 unidades. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) también ha sido utilizada con columnas de sílica aminada y de fase reversa C8 y C18 usando agua para eluir los carbohidratos.

También el pKa de los OH en los carbohidratos, oscilante entre 12 y 13, esta característica se aprovecha en la separación de fructanos en soluciones alcalinas, a través de la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado generalmente, a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) (Mancilla 2006).

#### **1.4.4 Producción alternativa.**

La producción convencional de fructosa, se obtiene a partir del almidón, necesitando al menos tres etapas enzimáticas:  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa y la isómeras de la glucosa, produciendo sólo 45 % del almidón en fructosa, en contraste a la hidrólisis completa de inulina por un solo paso, utilizando inulinasas, da un rendimiento de aproximadamente 90-95% de fructosa (Huerta 2014).

Alternativamente, los oligosacaridos de fructosa se puede sintetizar a partir de la sacarosa, la cual es sometida a transfructosilación por acción de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa, sin embargo estas cadenas son más pequeñas que las producidas por hidrólisis enzimática (Madrigal 2007).

#### **1.5 El agave.**

Las plantas de *Agave spp.*, también conocidos como magueyes, han sido aprovechados por el hombre durante miles de años. Su cultivo y aprovechamiento data desde la época precolombina. México es el área con mayor diversidad de plantas de *Agave spp.*, en todo el mundo, con 159 de un total de 210 especies, de las cuales 119 son endémicas. Las plantas de maguey se encuentran en planicies, montañas, acantilados, dunas costeras o en los picos montañosos, preferentemente entre los mil y dos mil metros de altitud. El género *Agave* se

encuentra en la familia *Agavaceae* e incluye especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez.

Tienen forma característica de roseta y poseen raíces ramificadas, cutícula gruesa, hojas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM (Metabolismo Ácido Crasuláceo) (Huerta 2014).

El agave es un ejemplo de plantas que almacenan fructanos; sin embargo, a pesar de ser uno de los pocos cultivos cuyos fructanos son utilizados industrialmente, su relevancia bioquímica y fisiológica ha sido escasamente estudiada (Mancilla 2006)

### **1.5.1 Composición del agave.**

La composición general de la planta de agave es: humedad 60 %, carbohidratos 25 %, fibra y médula 10 %, sales minerales 2.5 % y 2.5 % de otros componentes como proteínas. Cabe destacar que el polisacárido predominante en esta planta es la inulina, que representa entre un 85 y 90 % de los carbohidratos (Huerta 2014).

### **1.5.2 Productos del agave.**

Las plantas de agave han tenido una gran variedad de usos a través del tiempo, en la producción de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal, en la producción de alimentos como aguamiel, jugo dulce, jarabes, vinagre, atole, guisos, saborizantes y forraje.

La fibra de las plantas de *Agave spp.*, también puede ser utilizada en la fabricación de hilos, cordeles, tejido para costales, bolsas, mantas, tapetes, morrales, sandalias, cinchos, hamacas y petates, entre otros.

Actualmente, su principal uso es la producción de bebidas alcohólicas destiladas. Toda la planta de Agave puede ser aprovechada de manera integral. Sin embargo, y aún en la industria de las bebidas alcohólicas, la fibra vegetal de desecho puede ser reutilizada (Huerta 2014).

### 1.5.3 Residuos agroindustriales.

Los residuos de las plantas de *Agave spp.*, se acumulan en diferentes etapas de la producción de las bebidas alcohólicas; durante el proceso de “jimado”, donde se remueven las hojas del tallo, y después del cocimiento de las piñas donde los bagazos son desechados después de la fermentación. Aproximadamente un millón de toneladas de plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul son procesadas anualmente por la industria tequilera mexicana, generando residuos agrícolas, y la industria del mezcal también genera de 15 a 20 kg de bagazo por litro. Si estos residuos no son reciclados o procesados apropiadamente se genera contaminación.

Los subproductos generalmente son quemados o vertidos en basureros. Esto último plantea problemas debido a la liberación de CO<sub>2</sub>, contaminación por presencia de olores, proliferación de ratas, moscas y otros insectos. Algunos de estos materiales son susceptibles de ser reutilizados por su alto contenido de azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina, entre otros compuestos.

De esta forma, se conocen ejemplos de su utilización en la preparación de alimentos, remedios de salud, construcción, forrajes, fertilizantes, y como combustibles, todos ellos ejemplos de utilización directa de baja tecnología. Finalmente, estos residuos se han tratado de utilizar como sustratos para la aplicación de enzimas inulinasas de microorganismos como *Aspergillus niger* CH-A-2010 y CH-A-2016. Esto aumenta el valor de los subproductos de *Agave spp.*, y hacen más rentable, y por lo tanto atractiva, su aplicación en la elaboración de enzimas, proteína unicelular, pigmentos y antibióticos. (Huerta 2014).

## 2 Justificación del estudio.

En Estados Unidos, en el año 2004, 158 millones de personas consumieron alimentos funcionales, y el gasto en el área de suplementos alimenticios alcanzó los 20.500 millones de dólares. Esto es un índice del interés que existe por mejorar la nutrición y la salud en el ámbito popular y comercial (Madrigal 2007).

Debido a los beneficios a la salud, y a la importancia que están tomando los productos provenientes de los oligofruktanos, es necesaria la optimización de la producción de estas enzimas ya que éstas siguen siendo el cuello de botella en su aplicación a gran escala.

Buscar productores nuevos de inulinasas y la optimización de los parámetros del proceso de producción, mediante el estudio de las actividades enzimática son algunas de las metas que se están probando actualmente. (Kango, 2011).

Los desechos de la industria del Agave poseen características de composición que permiten su utilización como fuentes de carbono para microorganismos productores de inulinasas y una fuente alternativa de inulina.

La levadura *K. marxianus*, reconocida como GRAS, ha demostrado ser un microorganismo de alta resistencia a condiciones de proceso y capacidad metabólica para utilizar productos naturales de inulina para la optimización y reducción de los costos de producción de estas enzimas. Debido a la complejidad de los sustratos utilizados (la agavina), es necesario realizar más investigaciones tanto para la búsqueda de nuevas cepas productoras de inulinasas, como para optimizar la actividad de estas enzimas, con el fin de poder incidir efectivamente en el aprovechamiento de toda la cadena productiva del agave. (Huerta 2014).

### 3 Hipótesis.

Si la cepa 8b de *K. marxianus*, que ha sido aislada y caracterizada del bagazo del agave, puede crecer y utilizar como única fuente de carbono la inulina de agave, denominada agavina, entonces se espera que al extraer las enzimas de esta cepa, éstas tengan capacidad inulinolítica sobre la agavina y produzcan oligosacáridos funcionales y monosacáridos de interés en la industria alimentaria.

### 4 Objetivos.

Estudiar la actividad inulinolítica que tienen las enzimas de la cepa 8b de *Kluyveromyces marxianus* sobre la agavina, para así evaluar la posible producción de oligosacáridos funcionales y fructosa.

#### 4.1 Objetivos particulares.

- Explorar la producción de enzimas con capacidad inulinolítica, a partir del crecimiento de la cepa 8b de *Kluyveromyces marxianus* en medio de cultivo con agavina.
- Estudiar la actividad inulinolítica de las fracciones enzimáticas (enzimas extracelulares e intracelulares), determinando:
  - Las mejores condiciones de temperatura y pH donde se obtiene una mayor actividad.
  - La termoestabilidad de las enzimas
  - La acción que se tiene sobre los enlaces  $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6)
  - El avance de la reacción a través del tiempo
- Analizar los productos formados en la reacción de hidrólisis de la agavina, por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Conocer las proteínas que están presentes en cada fracción, para determinar el peso molecular de las enzimas con capacidad inulinolítica, mediante geles SDS-PAGE y Zimograma.

## 5 Materiales y métodos.

### 5.1 Reactivos.

- Se utilizó la cepa 8b de *K. marxianus*, previamente aislada de residuos agrícolas de agave y congelada en glicerol, obtenida en el laboratorio donde se realizó la investigación, en el trabajo de tesis de “Caracterización e identificación de cepas degradadoras de agavina” (Vargas 2015).
- Agavina (Metlin)
- Agavina pura donada amablemente por el Dr. Francisco Ruíz Terán
- Inulina de Achicoria donada amablemente por la empresa danesa Beneo-Orafti.
- Levana donada amablemente por el Dr. Agustín López Munguía Canales
- Fructosa (Sigma-Aldrich)
- Glucosa (Sigma-Aldrich)
- Extracto de levadura (Sigma-Aldrich)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Droguería Cosmopolita)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (J.T. Braker)
- KCl (J.T. Braker)
- $\text{MgSO}_4$  (Mallinc Krodtt)
- Safranina (Sigma-Aldrich)
- Buffers de fosfatos 50mM pH 7 y pH 8:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich) y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J.T. Braker)
- Buffers de acetatos 50mM pH 4, pH 5 y pH 6: Ácido acético glacial (Reproquifin) y Acetato de sodio (J.T. Braker)
- Reactivo de Bradford: Bio-Rad protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO RAD)
- Albumina bovina (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de DNS: Ácido 3,5 dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich) 1.06g, Hidróxido de sodio (Alyt) 1.98g, Agua destilada 141.6 mL, Trartrato (Sigma-Aldrich) 30.6mL, Fenol (Sigma-Aldrich) 0.76mL y Sulfito de sodio (Sigma-Aldrich) 0.83g
- Soluciones para TLC

- Eluyente: Etanol (Alvi): Butanol (Sigma-Aldrich): Agua 15:9:6 respectivamente
- Revelador: Orcinol (Aldrich)10mg/mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Meyer) 5% y Etanol 100μL/mL
- Agua Milli Q (Agua destilada tratada en el Sistema Simplicity UV Millipore)
- Soluciones para la electroforesis de geles SDS-PAGE
  - Solución de acrilamida / bisacrilamida: 30% de Acrilamida (Sigma-Aldrich) y 0.8% de Bisacrilamida (Sigma-Aldrich)
  - Buffer de separación pH 8.8: Tris (Sigma-Aldrich) 1.5M
  - Buffer de apilamiento pH 6.8: Tris 0.5M
  - SDS (Sigma-Aldrich) 10%
  - Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich) 10%
  - TEMED (Sigma-Aldrich)
  - Isopropanol anhidro (Sigma-Aldrich)
  - Buffer de corrida pH 8.8: Tris 0.025M, Glicina (Sigma-Aldrich) 0.192M y SDS 0.1%
  - Glicerol (J.T. Braker)
  - Solución teñidora: Azul de Coomasie R-250(J.T. Braker) 0.125%, Metanol (J.T. Braker) 50% y Ácido acético 10%
  - Solución desteñidora: Ácido acético: Agua: Etanol 1:5:5 respectivamente
- Marcador de peso molecular Color Burst Electrophoresis Marker mol wt 8000-200000 Da (Sigma-Aldrich)
- Enzima comercial Novozym 960 (Novozymes)
- Solución de TTC: 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma-Aldrich) 0.2% y Hidróxido de sodio 100mM

## **5.2 Acondicionamiento de la cepa 8b para la producción de enzimas inulinolíticas.**

Con la finalidad de crecer al microorganismo se hizo un preinóculo tomando 0.5 mL de la cepa 8b de *K. marxianus*, y agregándolo a un matraz con 30 mL de medio de cultivo con 0.5% de agavina, como única fuente de carbono (composición en Tabla 3), para la producción de enzimas inulinolíticas, el medio

fue esterilizado previamente en una autoclave- Hirayama y después de la inoculación se incubó en una Wise Cube – Wisd, a 35°C con agitación constante durante 24h. Posteriormente se colocó todo el preinóculo en un matraz con 500 mL del mismo medio y se incubó en las mismas condiciones durante 48h y se observó al microscopio (BX40 – Olympus) para corroborar que la cepa estuviera pura. Mediante TLC (se explicará más adelante esta técnica) se verificó que la agavina se hubiera consumido en su totalidad para la posterior extracción enzimática.

**Tabla 3. Composición del medio de cultivo empleado.**

| <b>Sustrato</b>                                   | <b>Composición %</b> |
|---|----------------------|
| <b>Agavina</b>                                    | 0.5                  |
| <b>Extracto de levadura</b>                       | 0.1                  |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | 0.1                  |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>              | 0.1                  |
| <b>KCl</b>  | 0.05                 |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>                           | 0.05                 |

(Sin ajuste de pH)

### **5.3 Extracción enzimática.**

Para la extracción enzimática se centrifugó el cultivo crecido a 6000 rpm durante 10min a 4°C, en una centrifuga Allegra 64R Beckman Coulter y se recolectó el sobrenadante (enzimas extracelulares), el paquete celular se enjuagó dos veces con agua destilada, y se centrifugó durante 5 min cada vez, para desechar el sobrenadante obtenido. Para la extracción de las enzimas intracelulares se resuspendió el paquete celular en un buffer de acetatos 50 mM pH 5 y se colocó en un baño de hielo, para posteriormente lisar las células con un Vibre cell - Sonics, este procedimiento se hizo durante 6min a 21% de amplitud. Después se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante (enzimas intracelulares) y el paquete floculado (enzimas asociadas a membrana).

#### **5.4 Liofilización de extractos enzimáticos.**

Con el objetivo de evitar la acción de proteasas y conservar los extractos enzimáticos, se llevó a cabo la liofilización de los extractos. Así mismo esta técnica permitió concentrarlos y manejarlos fácilmente. Los extractos se congelaron previamente a -80°C en un ultracongelador Revco- Legaci Refrigeration System y se liofilizaron en una CT 60e- Heto ID1.0.

#### **5.5 Determinación de proteína.**

La concentración de proteína de los dos extractos recolectados se determinó mediante la técnica de Bradford (Sánchez 2013). Este método consiste en formar un compuesto colorido entre las proteínas y el reactivo de Bradford. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina, con la finalidad de conocer la cantidad de proteína en las muestras. La longitud de onda empleada para leer la absorbancia tanto de la curva patrón como de las muestras problema fue de 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 105 UV-Vis Thermo scientific.

#### **5.6 Actividad enzimática.**

Las determinaciones de la actividad enzimática, se realizaron, primero, calculando el contenido de azúcares reductores producidos en la hidrólisis de la agavina con los extractos enzimáticos, empleando la técnica de determinación de azúcares reductores mediante la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Ortiz 2014). En tubos de ensayo de 10 mL se agregaron 100 µL de muestra, 200 µL de buffer de acetato 100mM pH 5.5 buffer de acetatos y 600 µL de reactivo DNS. Se calentaron a 80°C por 5 minutos y se enfriaron con hielo para detener la reacción. Finalmente, se agregaron 4 mL de agua y se midió su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 105 UV-Vis Thermo scientific. Para medir los azucares reductores producidos en la reacción se realizó una curva patrón de fructosa.

Posteriormente se calculó la actividad enzimática específica, utilizando la siguiente ecuación (Figura 7):

$$\left( \text{Conc Fructosa} \left( \frac{\text{g}}{100\text{ml}} \right) \right) + \left( \text{PM fructosa}^{-1} \left( \frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) \right) + \left( \frac{1000\mu\text{mol}}{1\text{mol}} \right) + \left( \frac{1}{\text{Tiempo de incubación (h)}} \right) + \left( \frac{1}{60\text{min}} \right) + \left( \text{Conc. proteína} \left( \frac{100\text{ml}}{\text{mg}} \right) \right) = \text{Actividad esp. } (\mu\text{mol}/\text{min mgproteína})$$

**Figura 7. Ecuación para calcular la actividad específica.**

## **5.7 Determinación de las mejores condiciones de reacción.**

### **5.7.1 Temperatura.**

Para realizar las determinaciones de la mejor temperatura de la reacción de hidrólisis de la agavina, se montó un ensayo de reacción enzimática, como se muestra en la Tabla 4, la reacción se realizó en un volumen total de 1mL; se colocaron en tubos eppendorf, 0.5 mL una solución 0.02mg proteína/mL de extracto enzimático liofilizado en buffer de acetatos 50 mM pH 5 y 0.5mL de buffer de acetatos 50 mM pH 5 con 1% de agavina, la reacción se llevó a cabo a diferentes temperaturas (35, 40, 45, 50, 55 y 60°C).

Estas determinaciones se realizaron por duplicado y se colocaron dos controles para cada temperatura, uno de ellos sólo con el buffer y la agavina y el otro sólo los extractos enzimáticos en el buffer, los tubos se incubaron durante 14 h con 400rpm en un Thermo MixerC- Eppendorf. Una vez terminada la reacción, se determinaron las actividades específicas, para así evaluar a que temperatura se obtiene una mayor actividad.

**Tabla 4. Reactivos y cantidades a añadir para realizar un ensayo de reacción enzimática.**

| Reacción                          | Solución de extracto enzimático (mL) | Buffer con agavina al 1% (mL) | Buffer (mL) |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Control de agavina                | 0                                    | 0.5                           | 0.5         |
| Control de extracto enzimático    | 0.5                                  | 0                             | 0.5         |
| Reacción de hidrólisis enzimática | 0.5                                  | 0.5                           | 0           |

### 5.7.2 pH.

Para realizar las determinaciones del mejor pH de reacción, se prepararon los siguientes buffers a concentración de 50 mM: acetatos pH 4, acetatos pH 5, acetatos pH 6, fosfatos pH 7 y fosfatos pH 8, también se prepararon estos mismos buffers, pero esta vez, agregando 1% de agavina. Posteriormente se montó un ensayo de reacción enzimática, como se muestra en la Tabla 4, utilizando los buffers con diferente pH. Estas determinaciones se realizaron, al igual que las de temperatura, por duplicado y para cada pH se colocaron los debidos controles, se incubaron durante 18 h con 400rpm en un Thermo MixerC- Eppendorf a la mejor temperatura obtenida en la determinación anterior para cada extracto enzimático. Una vez terminada la reacción, se determinaron las actividades específicas, para así evaluar a que pH se obtiene una mayor actividad.

### 5.8 Termoestabilidad.

En el estudio de termoestabilidad, se partió de una solución con una concentración de proteína de 0.02mg proteína/mL en buffer de acetatos pH 5, para cada extracto enzimático, esta solución se repartió en 5 tubos para aplicarles diferentes tratamientos térmicos, durante 2 horas se colocaron los tubos en un baño en agua a diferentes temperaturas: 25, 40, 50, 60 y 70 ° C. Transcurrido este tiempo se montó un ensayo enzimático, como se muestra en la Tabla 4, utilizando los extractos sometidos a cada tratamiento térmico en el buffer con pH donde se obtuvo mejor actividad. Se incubaron las reacciones durante 2 horas y a la mejor

temperatura obtenida anteriormente, después de este tiempo se procedió a calcular la actividad específica, para así, observar cómo es que afecta el tratamiento térmico a la actividad enzimática.

### 5.9 Determinación de la reacción sobre enlaces $\beta$ -(2-1) y $\beta$ -(2-6).

Para la determinación de la especificidad de reacción de hidrólisis enzimática de los extractos sobre los enlaces  $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6), se realizaron ensayos de reacción pero ahora poniendo a reaccionar los extractos enzimáticos, a una concentración de proteína de 0.02mg/mL, con dos diferentes sustratos, la inulina de achicoria; conformada principalmente por enlaces  $\beta$ -(2-1) y la levana; conformada principalmente por enlaces  $\beta$ -(2-6). La efectividad de la reacción y los productos obtenidos fueron analizados y comparados por TLC y DNS.

### 5.10 Avance de la reacción.

Para el estudio del avance de la reacción de hidrólisis se llevó a cabo el ensayo enzimático como se muestra en la Tabla 4, utilizando los extractos con una concentración de proteína de 0.02mg/mL en el buffer con pH donde se obtuvo mejor actividad. Se incubaron a la mejor temperatura obtenida anteriormente, la reacción se siguió por 21h, y se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempos (0.2, 0.5, 1, 2, 4 y 21 h) la reacción se detuvo mediante un choque térmico de 100°C durante 2 minutos y después se congelaron las reacciones hasta que se procedió a analizarlas. La concentración de la fructosa formada se calculó utilizando HPLC mediante la una curva patrón de fructosa, así como la disminución de la agavina como sustrato, usando una curva patrón de agavina pura y mediante la ecuación de la Figura 8 se determinó la concentración de los FOS producidos a través del tiempo.

$$(C_0Agavina + C_0Fructosa) - (C_iAgavina + C_iFructosa) = C_iFOS$$

**Figura 8. Ecuación para calcular la concentración % de los FOS.**

$C_0$  = Concentración % en el tiempo 0,  $C_i$  = Concentración % en el tiempo de incubación de interés

## **5.11 Análisis de productos.**

### **5.11.1 Cromatografía de capa fina.**

El análisis cualitativo de los productos formados en la hidrólisis de la agavina mediante la acción enzimática, se llevó a cabo por cromatografía en capa fina o TLC (Thin Layer Chromatography). Se empleó una placa de silica gel (Millipore) y una fase móvil, compuesta por etanol, butanol y agua en una proporción de 5:9:6 respectivamente. Las muestras a evaluar, se colocaron en uno de los extremos de la placa, a 0.5 cm del borde, con ayuda de un capilar se puso 2.5 µL de la muestra y posteriormente esta placa se puso en una cámara de elución junto con la fase móvil, procurando que ésta no rebasara la altura donde se colocaron las muestras, la fase móvil se dejó eluir hasta 0.5 cm antes del extremo superior de la placa. Llegando a este punto la placa se secó a temperatura ambiente y se reveló esparciendo en toda la placa, una solución de orcinol (10mg/mL), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5%) y EtOH (100µL/mL) y calentando paulatinamente sobre una parrilla a 100°C (Cimarec – Termo scientific).

### **5.11.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.**

Para el análisis cuantitativo de los productos formados en la hidrólisis enzimática de la agavina; FOS, fructosa y glucosa, se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con un cromatógrafo Agilent Technologies. Se usó una columna aminada Aminex HPX-42A, 300mm x 7.8mm. La fase móvil usada fue de agua, con un flujo de 0.6mL/min a 80°C. El volumen de inyección de muestras fue de 20µL. Se usó un detector de índice de refracción (RID) a 35°C (Hewlett Packard). Mediante curvas patrón de agavina y fructosa se calculó la concentración de estos en las muestras de los ensayos enzimáticos.

## 5.12 Determinación del peso molecular por electroforesis, de las enzimas con actividad inulinolítica presentes en los extractos.

### 5.12.1 Filtración y ultrafiltración de los extractos enzimáticos.

Los extractos enzimáticos liofilizados, se resuspendieron en un buffer de acetatos 50 mM pH5, estas soluciones se filtraron en membranas de 0.45 y 0.22 $\mu$ m (Millipore) consecutivamente y finalmente se ultrafiltraron a 6000 rpm en centrífugas de 30 kDa (Millipore) con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sales y concentrar las enzimas de interés.

### 5.12.2 Geles SDS-PAGE.

Se prepararon dos geles SDS-PAGE con 10% de poliacrilamida de 1.5mm de espesor. Para preparar cada uno, se agregaron los reactivos que se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5 Reactivos y cantidades a añadir para preparar geles SDS-PAGE.**

| Reactivos                            | Gel de separación (mL) | Gel de apilación (mL) |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Solución de acrilamida/bisacrilamida | 3.33                   | 0.67                  |
| Buffer de separación                 | 2.50                   | -                     |
| Buffer de apilamiento                | -                      | 1.25                  |
| SDS 10%                              | 0.10                   | 50                    |
| Agua                                 | 4.00                   | 3.00                  |
| Persulfato de amonio 10%             | 0.01                   | 0.01                  |
| TEMED                                | 0.013                  | 0.013                 |

Las muestras a analizar por electroforesis, se prepararon para introducir 40  $\mu$ L con aproximadamente 40 $\mu$ g de proteína/mL y con un 10% de glicerol. Estas muestras se sometieron, junto con el marcador de peso molecular, a electroforesis con el buffer de corrida, durante aproximadamente 1h a 100 V, en un Mini-PROTEAN Tetra cell (BIO-RAD)

Una vez terminada la electroforesis, uno de los geles se utilizó para hacer el zimograma, y al otro se le agregó la solución de metanol-agua (50:50), para fijar

las proteínas, durante 20min. Posterior a este tiempo el gel se enjuago con agua y se agregó la solución teñidora con azul de Coomasie durante 20 min, transcurrido éste tiempo, nuevamente se agregó la solución desteñidora hasta observar las bandas de proteína.

### **5.12.3 Zimograma.**

Con el objetivo de saber qué peso molecular tenían las proteínas con actividad inulinolítica se realizó un zimograma del gel, agregando el buffer de acetatos 50 mM a pH 5 al gel después de la electroforesis, para renaturalizar las enzimas contenidas en éste, se dejó actuar el buffer por 20min y se retiró. Se procedió a incubar el gel durante 18h a 45°C con el buffer de acetatos 50mM a pH 5 y 8% de agavina.

Para revela las enzimas con actividad inulinolítica, se lavó el gel con agua destilada y se agregó una solución de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) 0.2% m/v en 100 mM de NaOH calentando a 100°C hasta observar la tinción del gel.

## **6 Resultados y discusión.**

Para este estudio se empleó una cepa 8b, previamente aislada de residuos agrícolas de Agave en el grupo de investigación donde se realizó el estudio. A parte de aislar a la cepa, también se identificó mediante la técnica molecular de ITS. La técnica consiste en extraer el ADN genómico y amplificar la región ribosomal ITS. Posteriormente se envió a secuenciar a Laragen Inc. (Laragen, Inc. 10601, Virginia Avenue, Culver City, California), empresa que devolvió la siguiente secuencia de nucleótidos:

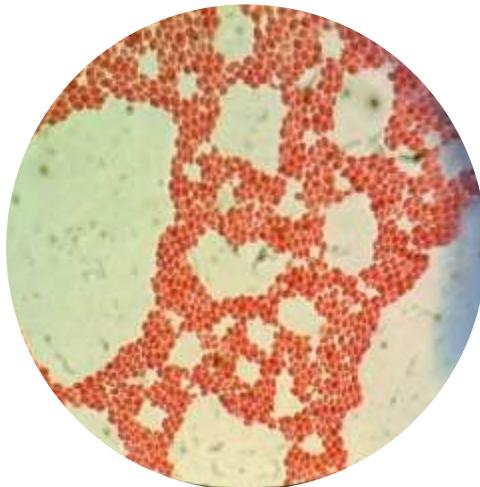
```
CNNGATTTGAGGTCACCTTTGAGAGTTTTGGTTAAAGCCGTATGCCTCAAGGA
GACAAACACCAGCGAGTCTTTATAACACCTATGAGTCTCTATGACCCAAGCTT
ACCACGAATTGGCGCAAACCTAAGACGTAGATGTGCAAGAGTCGAGTCCATA
GACTTGACACGCAGCCCTGCTCACGCAGATGGCAACGGCTAGCCACTTTCAA
GTTAACCCGAGACGAGTATCACTCACTACCAAACCCAAAGGTTTGAGAGAGAA
ATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCATAGGGCGCAATGTGCGT
```

TCAAAGATTTGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCACAATACATATCGCAATTC  
GCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGA  
ATATTAATTTTATAGTATAATAGTTTTTCATAATACAAAATATTGTTTGTGTTTA  
TGTCCTACTGGAGAGACGAGCTCTCCAGGGAAGTAGTTCATAGAGAAAAAACT  
CCATTGTGTTTAGGATGAGAAATANAAAACCTGATAGCANAGAATCAAGAACTG  
GCCGCGCAATTAAGCGCAGGCCTTGTTTCAGACGATTCCCCCAGTAATCTATTC  
ATTCATAATCTTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGA

Esta secuencia se comparó en el algoritmo BLAST de NCBI, para la determinación del género y la especie, mostrando un 99% de identidad con *Kluyveromyces marxianus* y un valor de expectancia de 0.0 (Vargas 2015).

### 6.1 Extractos enzimáticos con actividad inulinolítica.

En este proyecto, a partir del trabajo de investigación anterior, se logró hacer crecer a la cepa 8b de *K. marxianus* en el medio de cultivo preparado, se hizo una observación al microscopio, como se puede ver en la Figura 9, la morfología observada es levaduriforme y se corroboró que el cultivo estuviera puro.

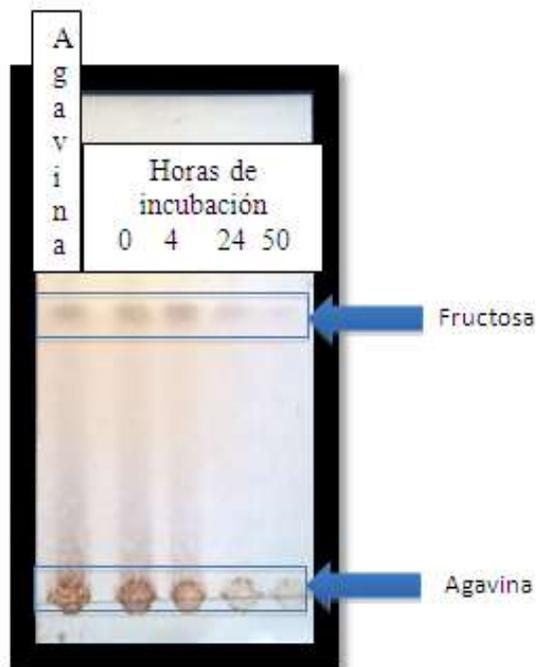


**Figura 9. Observación microscópica de la cepa 8b de *K. marxianus* pura.**

**Aumento: 100x, Morfología: levaduriforme, Tinción: simple (safranina)**

Para confirmar la producción de enzimas inulinolíticas en la cepa 8b y el consumo de toda la agavina presente en el medio de cultivo, se tomaron varias muestras del

medio de cultivo a diferentes tiempos de incubación y éstas se analizaron mediante TLC. En la Figura 10, se puede observar que conforme el tiempo avanza, la mancha de agavina se va desvaneciendo y la mancha de fructosa va aumenta de intensidad hasta las 4 horas, confirmando así la presencia de enzimas inulinolíticas. Sin embargo, después de este tiempo, la mancha de fructosa empieza a desaparecer, esto debido a que la cepa empieza a hidrolizar al polímero de la agavina y libera los monómeros de fructosa, al mismo tiempo que empieza a consumir la fructosa liberada como fuente de carbono para su metabolismo.



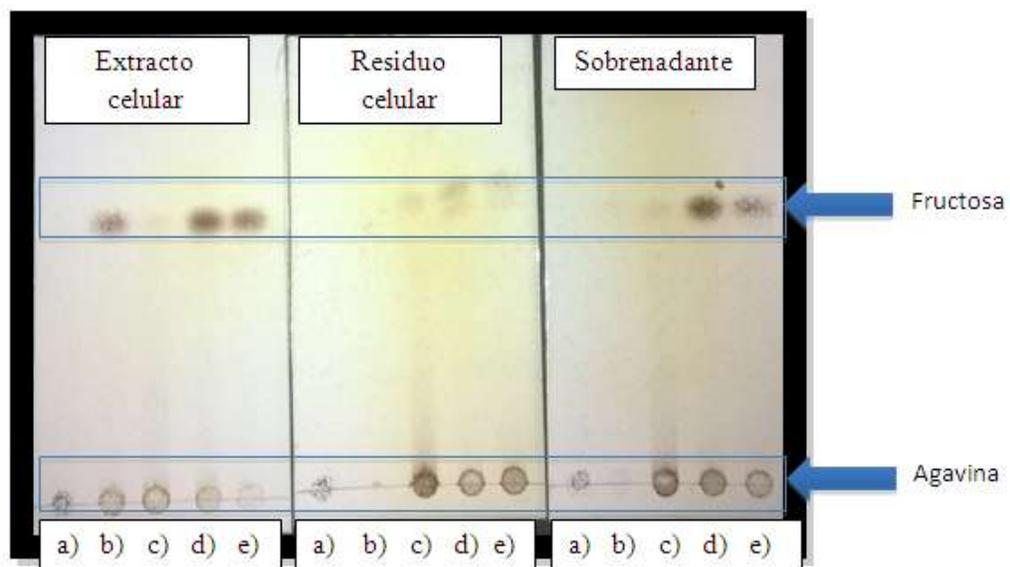
**Figura 10. TLC del consumo de la agavina por la cepa 8b en el medio de cultivo, incubado a 35°C.**

Al hacer la extracción enzimática, se obtuvieron 3 extractos; el sobrenadante (enzimas extracelulares), el extracto celular (enzimas intracelulares) y los residuos celulares de las células lisadas (enzimas asociadas a la membrana). Estos extractos junto con el buffer con agavina se pusieron a incubar por 14 h a 40°C y los productos obtenidos se analizaron por TLC.

En la Figura 11 se puede observar que la hidrólisis de la agavina se llevó a cabo en el extracto celular y en el sobrenadante, ya que la mancha de ésta desapareció casi por completo y hubo una intensificación de la mancha de fructosa como

producto, indicando así, actividad en las enzimas de estos extractos. Sin embargo, en el residuo celular la producción de fructosa fue muy poca, apenas se pudo observar una leve intensificación de la mancha de ésta, por lo que se consideró que el contenido de enzimas residuales en la membrana de las células es muy poco y por eso se descartó. En las placas cromatograficas, sólo se observa la producción de fructosa, lo que es un indicativo de la presencia de, solamente, enzimas tipo exoinulinasas, que cortan los extremos de las cadenas de la agavina, en un estudio parecido donde se hizo reaccionar las enzimas de un extracto de *K. marxianus* MTCC 3995 con la inulina de un tubérculo llamado Dahalia durante 30min a 50°C, también se observó, por TLC, solo la producción de fructosa (Jain, 2012).

Hasta el momento no se podría decir que la cepa 8b produce endo-inulinasa ya que no se observaron señales de FOS. Cabe mencionar que estas señales se esperarían que estuvieran entre las del monosacárido y el polisacárido de agavina.

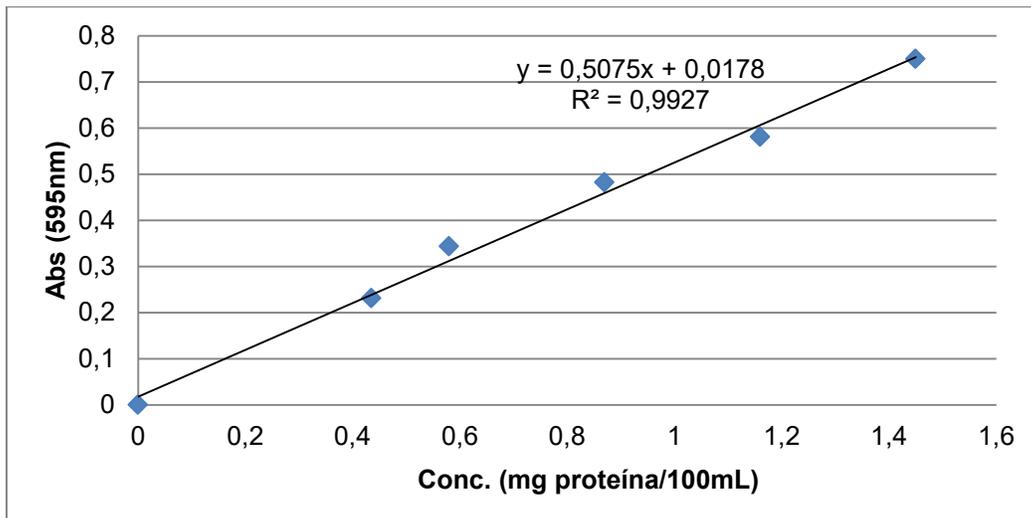


**Figura 11. TLC de los productos formados con los extractos enzimáticos obtenidos de la cepa 8b.**

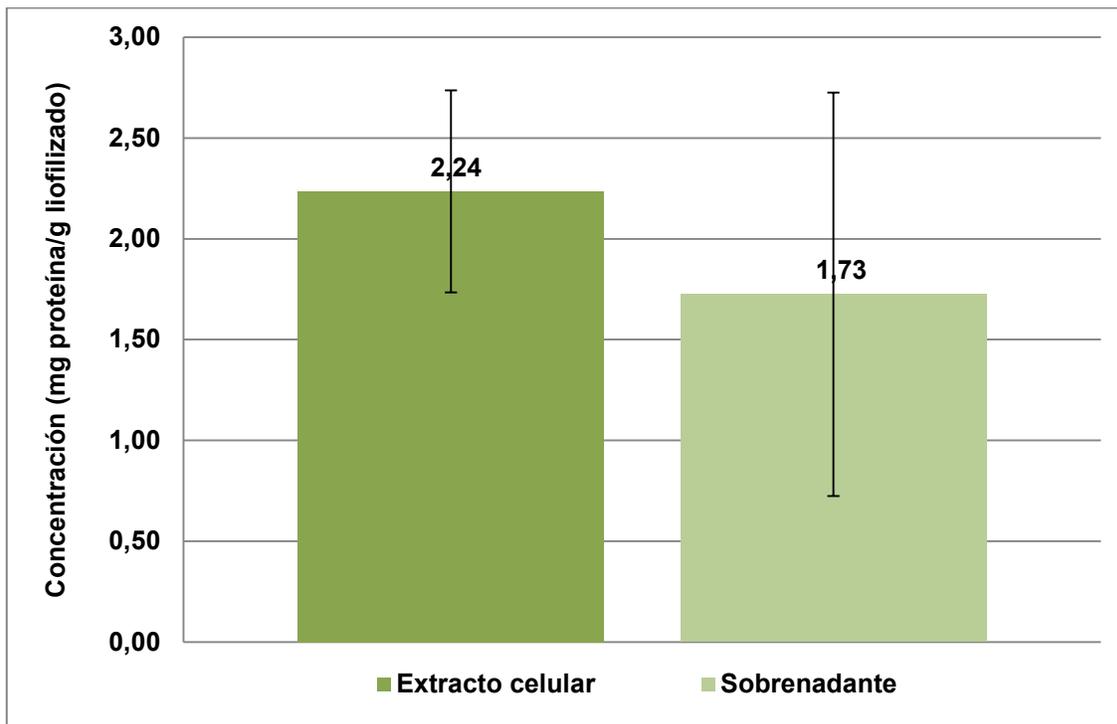
a) Agavina pura, b) Buffer con el extracto celular, Residuo celular o sobrenadante, c) Buffer con agavina, d) y e) Reacción enzimática. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de agavina a 40°C por 14 h.

## 6.2 Concentración de proteína de los extractos enzimáticos.

Después de liofilizar el sobrenadante y el extracto celular, se realizó la determinación de proteína por el método de Bradford. Para esto se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (Figura 12) con la finalidad de poder calcular el contenido aproximado de proteína en cada extracto, los resultados se muestran en la Figura 13 y se observó que hay una mayor cantidad de proteína en el extracto celular que en el sobrenadante.



**Figura 12. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación de proteína por el método de Bradford.**

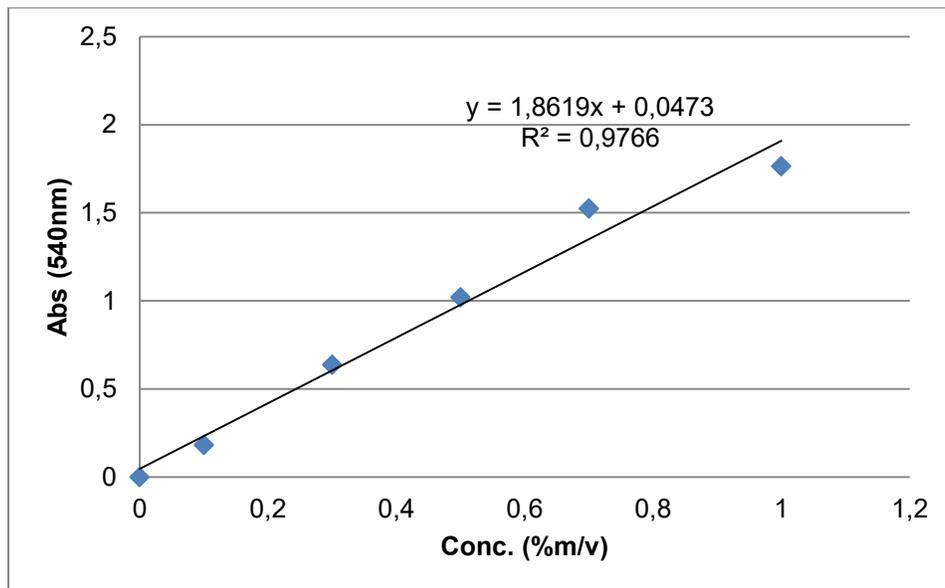


**Figura 13. Concentración de proteína en el extracto celular y el sobrenadante liofilizados, calculada por el método de Bradford, n=7.**

### **6.3 Caracterización de la actividad inulinolítica de los extractos enzimáticos.**

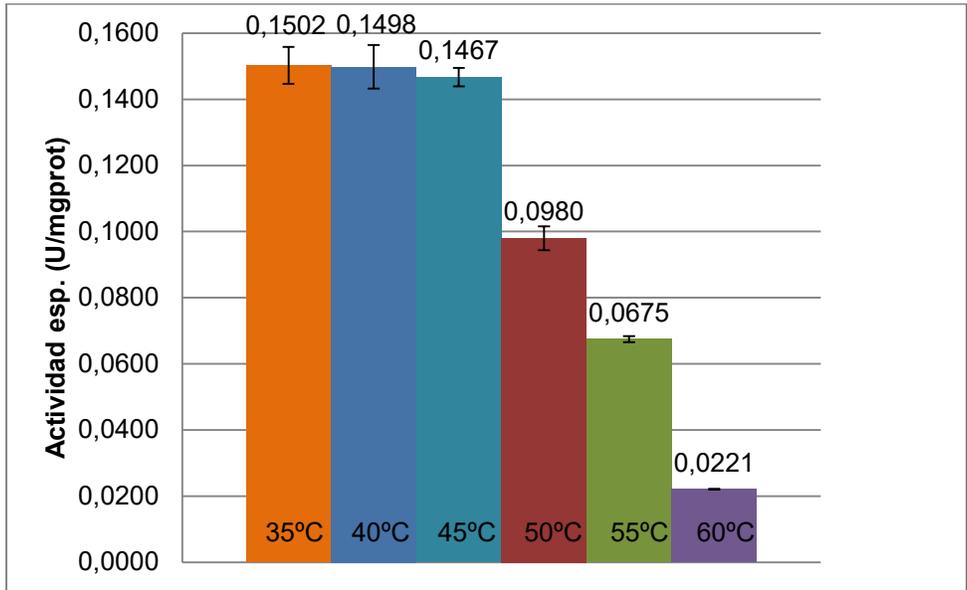
#### **6.3.1 Temperatura de reacción.**

Con el objetivo de determinar la mejor temperatura de reacción para el sistema enzimático, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis de agavina con el sobrenadante y el extracto celular a diferentes temperaturas (35 40, 45, 50, 55 60°C). Los azúcares reductores, producto de la reacción (% m/v), se cuantificaron por el método de DNS, usando una curva patrón de fructosa (Figura 14), para, así, calcular la actividad específica de cada muestra.

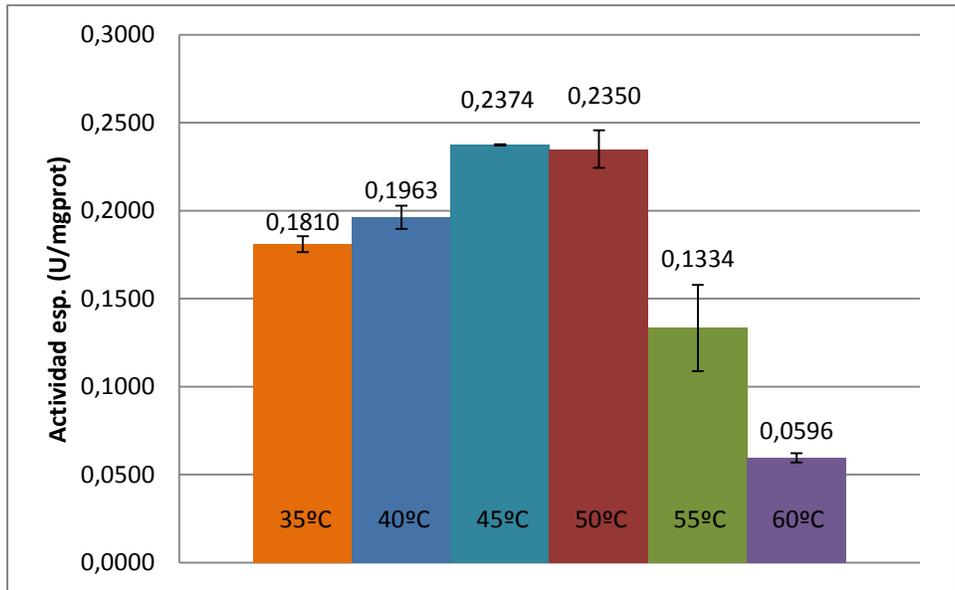


**Figura 14. Curva patrón de Fructosa para la cuantificación de la concentración porcentual de azúcares reductores por el método de DNS.**

En la Figura 15 y la Figura 16 se muestra la actividad enzimática de las enzimas contenidas en los dos extractos a diferentes temperaturas. Al analizar los resultados se observó que para el extracto celular, la temperatura donde se obtuvo una mayor actividad fue de 35°C y para el sobrenadante, la temperatura fue de 45°C. En estudios parecidos se usaron las enzimas de *K. marxianus* Y-85 y las mejores temperaturas fueron 50°C para la inulinasa libre y 55°C para la inmovilizada. También en otro estudio se reportaron temperaturas óptimas de 55°C y 60°C para la inulinasa libre de *K. marxianus* var. *bulgaricus* (Abdullah 2003).



**Figura 15. Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto Celular a diferentes temperaturas (U/mg proteína), reacción a pH 5, durante 14h, n=2.**



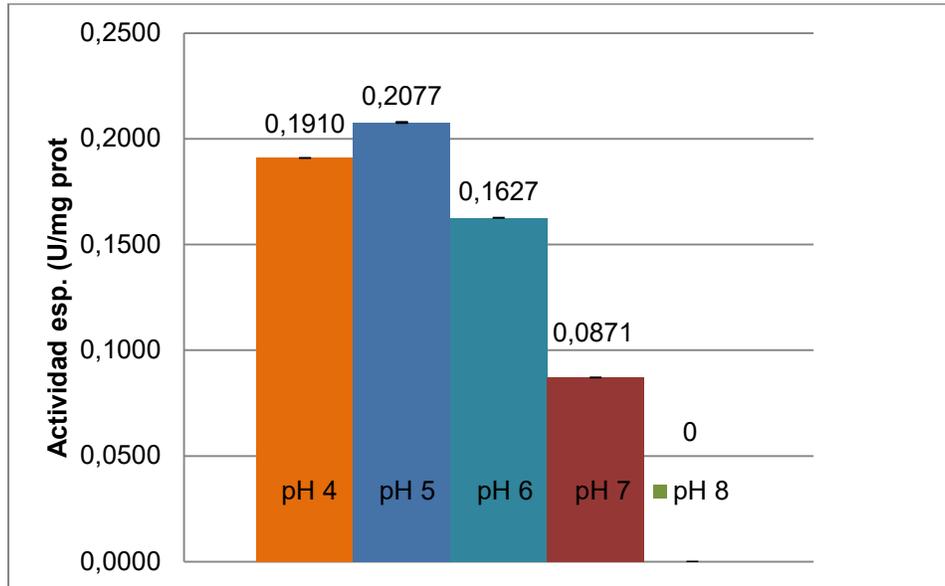
**Figura 16. Actividad específica de las enzimas presentes en el Sobrenadante a diferentes temperaturas (U/mg proteína), reacción a pH 5, durante 14h, n=2.**

### 6.3.2 pH de reacción.

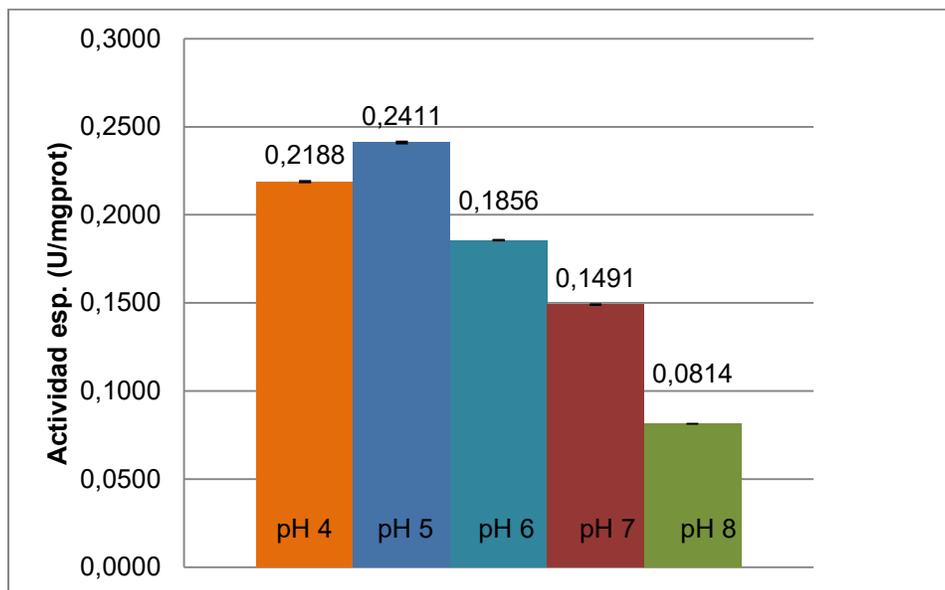
Una vez determinada la mejor temperatura de reacción (35 y 45°C), se evaluó a esas temperaturas el mejor valor de pH, para lo cual se llevó a cabo la reacción de los extractos con agavina a diferentes valores de pH y los productos de reacción nuevamente se midieron mediante la técnica de DNS.

En las gráficas de la Figura 17 y la Figura 18 se muestra la actividad enzimática de las enzimas para los dos extractos y al analizar los resultados se observó que para el extracto celular, el pH para obtener una mayor actividad es de 5, al igual que para el sobrenadante. Castillo y colaboradores (Castillo 2010) refieren que generalmente para las levaduras el pH óptimo es de 4.4 a 6.5, sin embargo estos parámetros dependen del origen microbiano de cada especie. También reporta que la exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 exhibió considerable actividad a un valor de pH óptimo de 5.5 en donde mantuvo estable su actividad catalítica al 100% durante 3 h a la temperatura óptima de 50 °C. Y en un caldo crudo exento de células conteniendo inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 presento un pH óptimo de 3.5 a 55°C.

Las actividades específicas obtenidas con las mejores condiciones reacción, para el extracto celular fue de 0.21 U/mg de proteína y para el sobrenadante de 0.24 U/mg de proteína. Se han reportado actividades de inulinasas producidas por diferentes especies de *K. marxianus*, que van desde 0.41U/mL hasta actividades de 3000U/mL con inulina de tipo lineal (Castillo 2010), sin embargo la actividad enzimática depende del origen de las cepas, la complejidad estructural del sustrato, o la pureza de las enzimas utilizadas.



**Figura 17** Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto celular, a diferentes pH (U/mg proteína), reacción a 35°C, durante 18h, n=2.

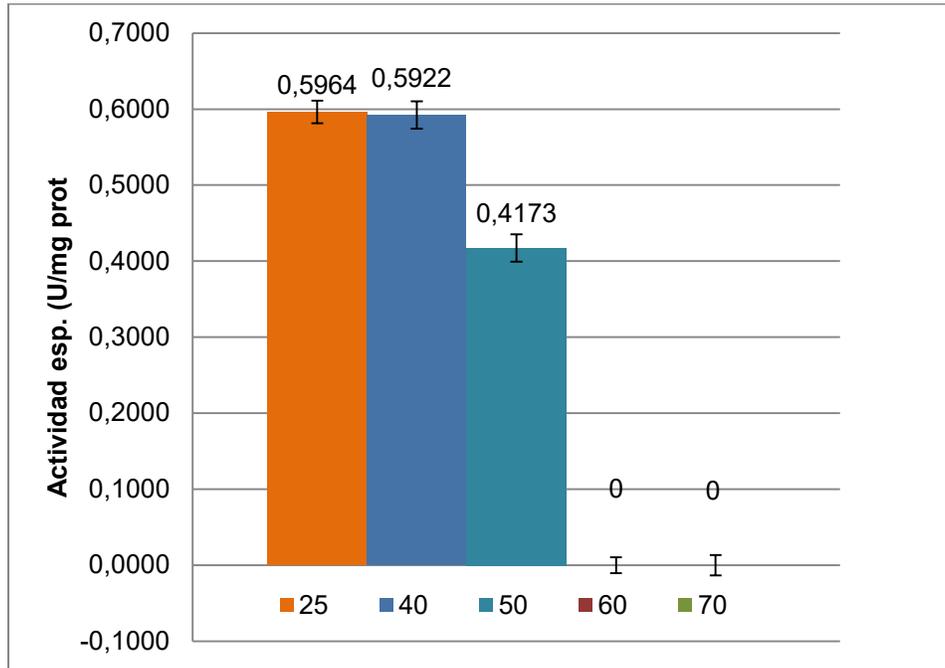


**Figura 18.** Actividad específica de las enzimas presentes en el sobrenadante, a diferentes pH (U/mg proteína), reacción a 45°C, durante 18h, n=2.

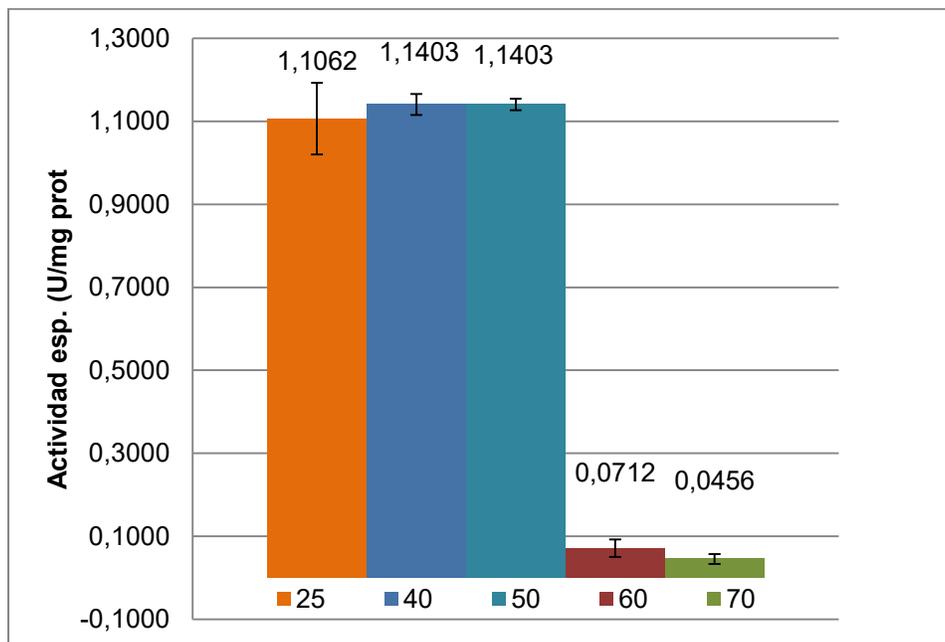
### **6.3.3 Termoestabilidad enzimática.**

Para conocer la estabilidad térmica que tienen las enzimas contenidas en los extractos, se les aplicó tratamientos térmicos durante 2h a diferentes temperaturas (25, 40, 50, 60, 70°C), antes de llevar a cabo la reacción. Después de incubar las reacciones de hidrólisis se determinó la concentración porcentual de azúcares reductores por el método de DNS y con estos resultados se calculó la actividad específica de cada muestra.

En las gráficas de la Figura 19 y la Figura 20, se puede observar que la actividad inulinolítica, en el extracto celular, es disminuida a un 30% aproximadamente, al aplicar un tratamiento térmico de 50°C y a tratamientos mayores a ésta temperatura, su actividad se pierde completamente. En el sobrenadante después de aplicar tratamientos térmicos mayores a 50°C su actividad es disminuida hasta en un 94%. En la literatura se encontró que las enzimas semi purificadas de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 por precipitación en etanol, conservaron su actividad en un 100% durante 3h a una temperatura de 50°C (Singh 2007)



**Figura 19. Actividad específica de las enzimas presentes en el Extracto celular, después de diferentes tratamientos térmicos (U/mg proteína), reacción a 35°C, a pH 5, durante 2h, n=2.**



**Figura 20. Actividad específica de las enzimas presentes en el Sobrenadante, después de diferentes tratamientos térmicos (U/mg proteína), reacción a 45°C, a pH 5, durante 2h, n=2.**

#### 6.3.4 Acción sobre los enlaces $\beta$ -(2-1) y $\beta$ -(2-6).

Para caracterizar la especificidad que tienen las enzimas de los extractos obtenidos de la cepa 8b sobre los diferentes enlaces contenidos en la agavina, se llevaron a cabo reacciones con ambos extractos pero ahora con diferentes sustratos, por un lado la Inulina de achicoria, que se sabe está conformada, en su mayoría, por enlaces  $\beta$ -(2-1) y por otro lado la levana, que está conformada por enlaces  $\beta$  (2-6). Después de incubar estas reacciones de hidrólisis, los productos formados fueron analizados por TLC, como se puede observar en la Figura 21, las enzimas presentes en el extracto celular y el sobrenadante tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -(2-1) de la Inulina y  $\beta$ -(2-6) de la levana, aunque en menor proporción, esto se observa debido a la intensidad de la mancha de fructosa, que es el producto de la hidrólisis de estas reacciones.

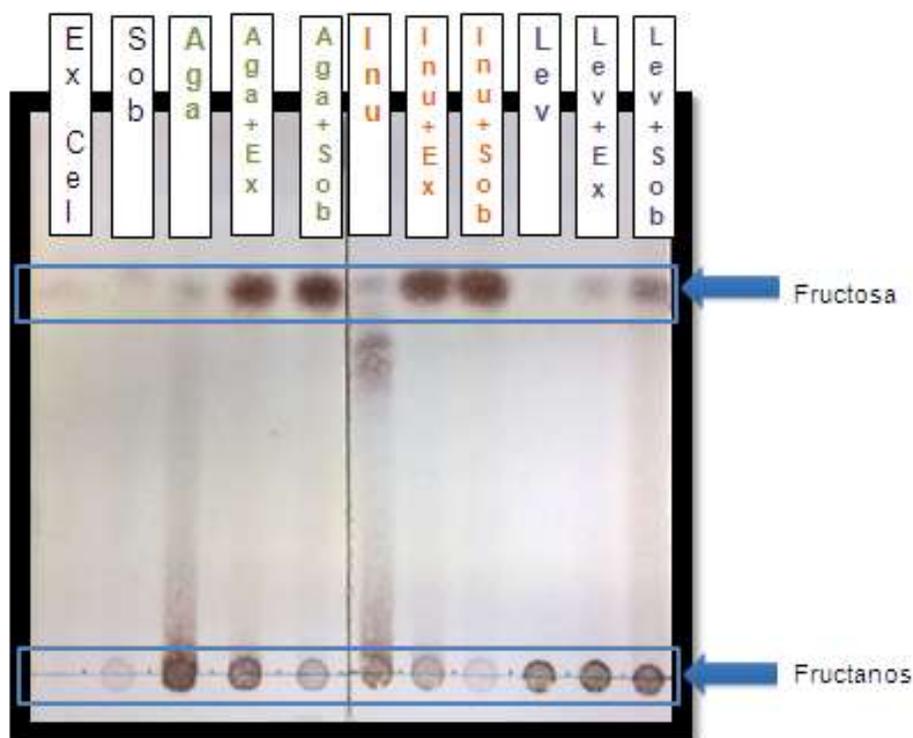
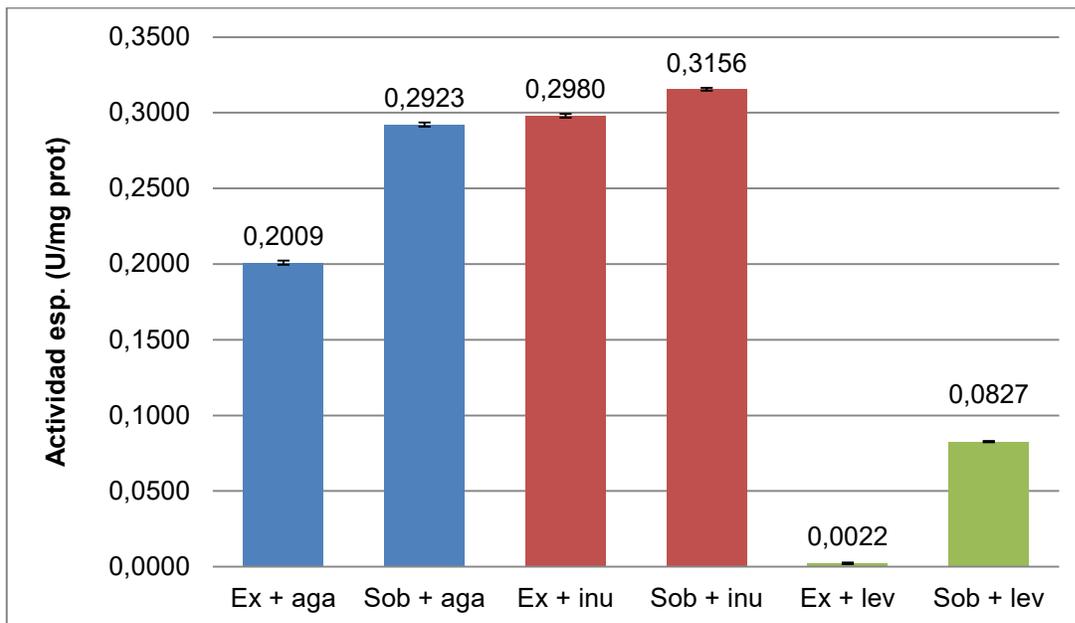


Figura 21. TLC de los productos obtenidos en la reacción de los extractos enzimáticos de la cepa 8b con los sustratos; agavina, inulina de achicoria y levana, reacción a temperatura 35°C, a pH 5, durante 19h.

También se midió, por el método de DNS, la producción de azúcares reductores para calcular la actividad específica en cada muestra, obteniendo así los resultados que se muestran en la Figura 22. Como se puede ver la actividad específica sobre el enlace  $\beta$ -(2-1) de la Inulina es mayor que la actividad sobre los enlaces  $\beta$ -(2-6) de la levana, en una proporción del 74% mayor, para el sobrenadante y del 99% para el extracto celular.

Esta capacidad de hidrolizar ambos enlaces puede ser dado por una sola enzima o el conjunto de varias enzimas presentes en los extractos enzimáticos ya que se ha observado que la levadura *K. marxianus* ha podido ser aislada de una gran variedad de ambientes, que van desde productos lácteos, bebidas fermentadas, material vegetal en descomposición, efluentes residuales diversos, hasta tejidos humanos infectados. Esto nos hace suponer que para sobrevivir en estos ambientes debe darse la producción de enzimas tales como  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas, inulinasa, levanasas y poligalacturonasas por mencionar algunas (Huerta 2014), se trató de identificar el peso molecular de las enzimas con actividad levanasa, mediante un zimograma, sin embargo sólo se pudo incubar el gel con un buffer al 0.5% de levana, por su baja solubilidad y al revelar el gel con TTC, no se pudo observar ninguna señal de actividad.



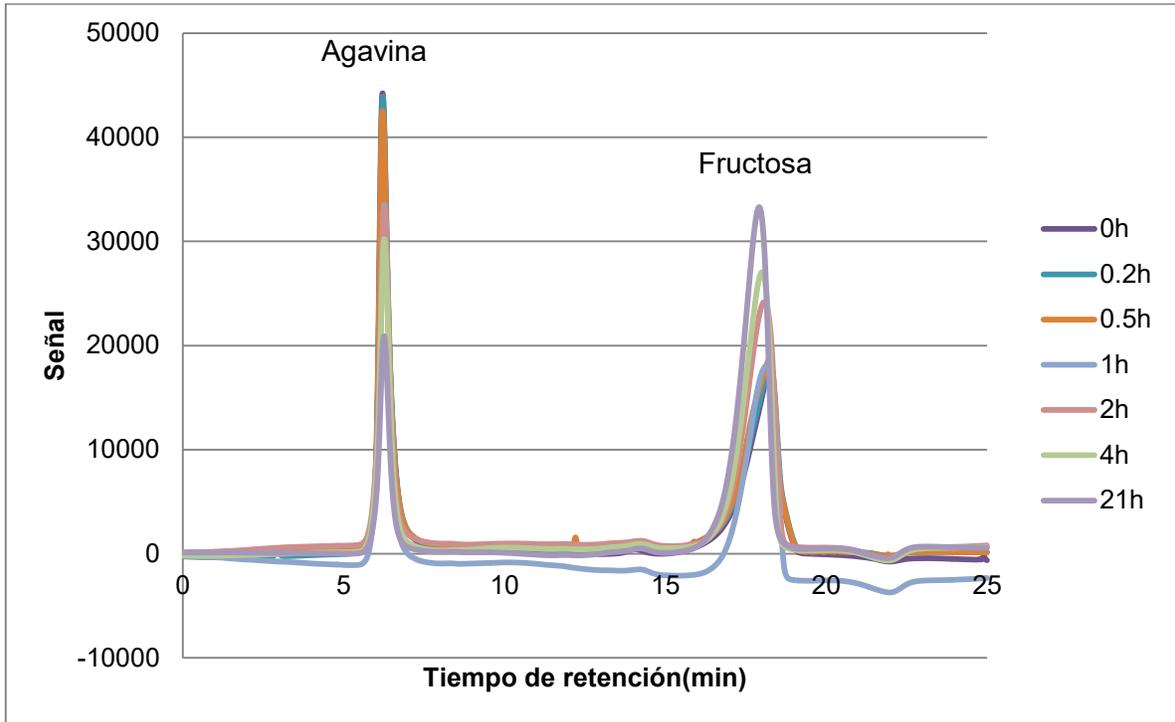
**Figura 22. Actividad específica de los extractos enzimáticos con diferentes fructanos (U/mg proteína), reacción a temperatura 35°C, a pH 5, durante 19h, n=2.**

### 6.3.5 Seguimiento en el tiempo de la formación de productos.

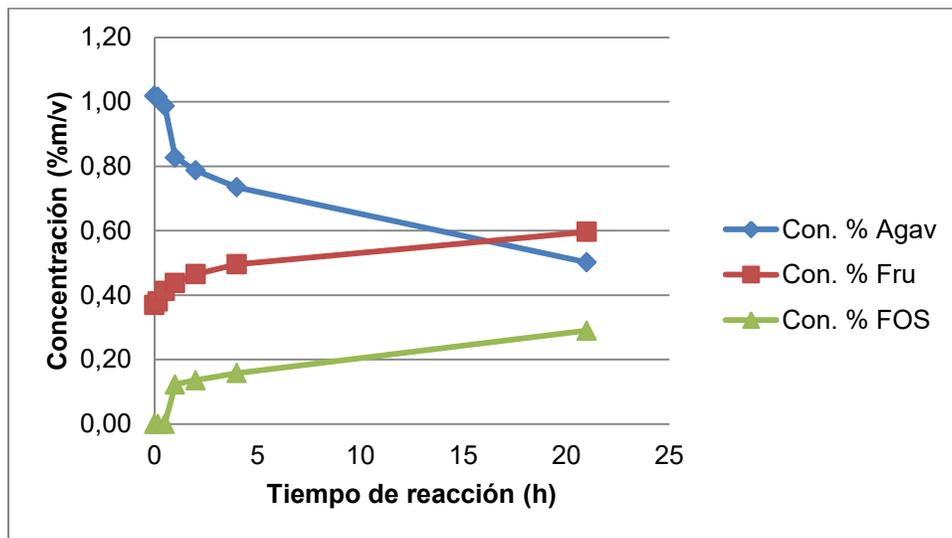
En este ensayo enzimático, donde se pusieron a reaccionar los extractos enzimáticos con la agavina a diferentes tiempos, se analizó la formación de los productos mediante HPLC con un detector de RID, obteniendo así los perfiles cromatográficos de cada extracto a diferentes tiempos, como se observan en la Figura 23 para el extracto celular y en la Figura 25 para el sobrenadante. Previamente se inyectaron al cromatógrafo referencias de agavina, glucosa y fructosa, obteniendo así tiempos de retención de 6, 16 y 18 minutos respectivamente, por lo que, en los perfiles se puede ver que el tamaño de la señal de la fructosa aumenta, conforme el tiempo de incubación avanza y el tamaño de la señal de la agavina va disminuyendo. Sin embargo no se logra ver algún pico definido para la glucosa, ni alguno que pudiera pertenecer a los FOS, para así calcular sus concentraciones.

Para conocer la concentración de fructosa y agavina en las reacciones de hidrólisis de los extractos, se realizaron curvas patrón de fructosa y agavina, para obtener el área de las señales. Estas se integraron, correlacionando así el área de

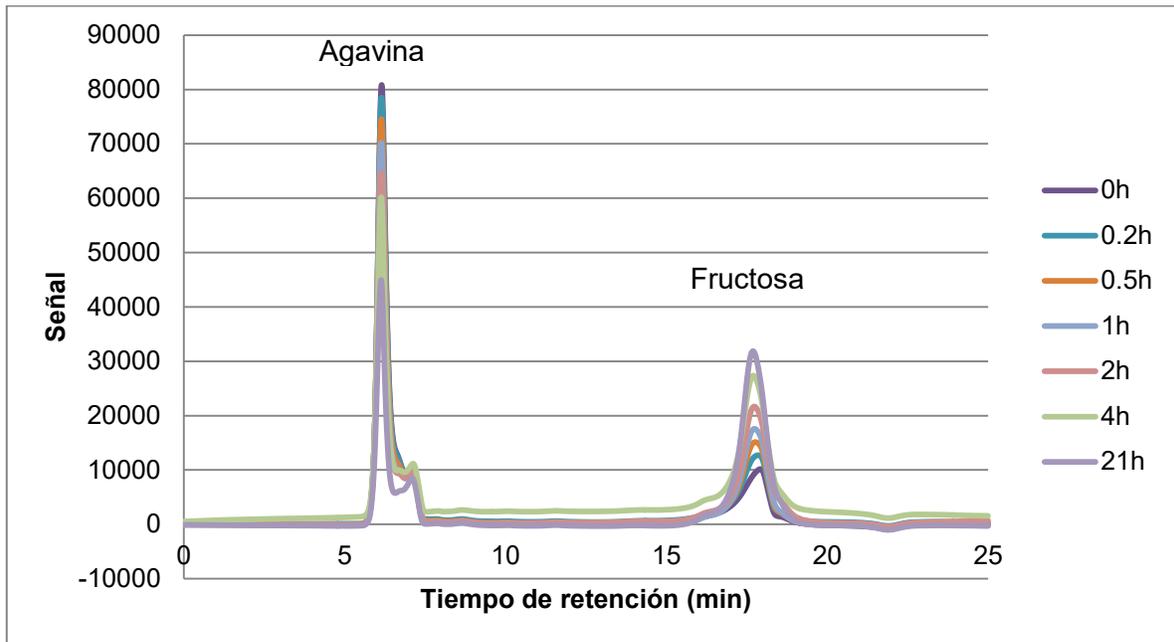
los picos con su concentración. Utilizando la ecuación de la Figura 8 se pudo calcular la concentración de los FOS conforme la reacción avanzaba. Estos valores de concentración de los productos y el sustrato se encuentran en la Figura 24 para el extracto y en la Figura 26 para el sobrenadante. La concentración de los FOS está sobre estimada, ya que estos valores incluyen la concentración de glucosa liberada y oligosacáridos de diferentes pesos moleculares, sin embargo da un valor aproximado. Debido a la baja concentración de los FOS encontradas en estos ensayos, se podría decir que las enzimas contenidas en los extractos solo poseen actividad de exoinulinasa.



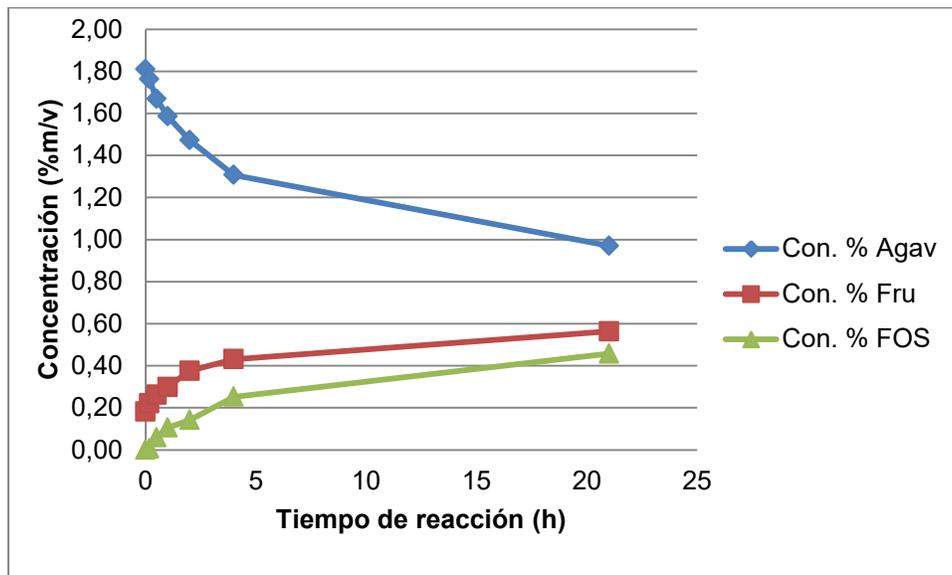
**Figura 23. Perfil cromatográfico de la reacción de hidrólisis del extracto celular y la agavina a distintos tiempos, a 35°C y pH 5.**



**Figura 24. Variación de la concentración de agavina, fructosa y FOS con respecto al tiempo de reacción enzimática del extracto celular, a 35°C y pH 5.**



**Figura 25. Perfil cromatográfico de la reacción de hidrólisis del sobrenadante y la agavina a distintos tiempos, a 45°C y pH 5.**



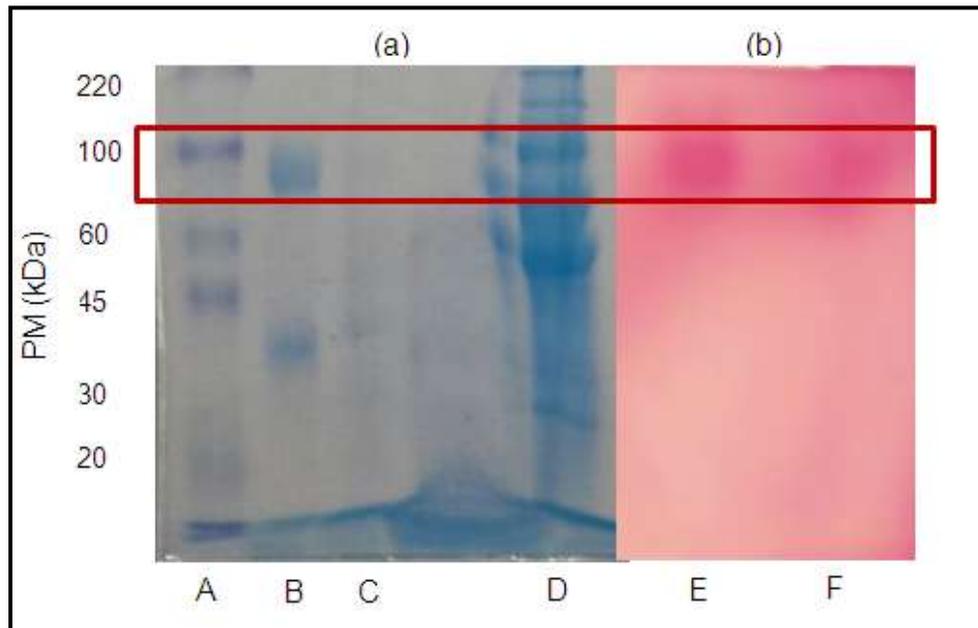
**Figura 26. Variación de la concentración de agavina, fructosa y FOS con respecto al tiempo de reacción enzimática del sobrenadante, a 45°C y pH 5.**

#### **6.4 Peso molecular de las enzimas inulinolítica en los extractos.**

Para conocer el peso molecular de las enzimas con actividad inulinolítica se realizó un gel SDS-PAGE y se colocó un marcador de peso molecular para comparar los pesos obtenidos. Después de llevar a cabo la electroforesis se tiñó el gel con azul de coomasie para observar las bandas de proteínas, teñidas de azul, contenidas en cada extracto. Posteriormente se realizó un gel desnaturizante y de igual manera se realizó la electroforesis, al finalizar se renaturalizaron las enzimas y se incubó para llevar a cabo la reacción con agavina. El gel se reveló con TTC, para observar las bandas de proteínas con actividad inulinolítica teñidas de rojo.

Los gels se observan en la Figura 27 y como puede verse, el peso molecular de las enzimas con actividad inulinolítica para el extracto celular y el sobrenadante es de aproximadamente 85-90 kDa. Aparte de las bandas proteicas con actividad se pueden observar otras proteínas en los extractos enzimáticos de menor peso molecular aproximadamente de 40 kDa estas corresponderían a proteínas con diferente actividad a las inulinasas. Sin embargo, no dejan de tener importancia ya que éstas podrían estar contribuyendo a la actividad de hidrólisis e incluso podrían estar inhibiéndola. También puede observarse que las bandas de proteínas obtenidas en la inulinasa comercial, presenta bandas de proteínas ligeramente más pesadas que la de los extractos del estudio, indicando una posible similitud en las estructuras de las inulinasas.

Se han reportado diferentes valores de peso molecular dependiendo de la fuente de microorganismo y del método de determinación, así por ejemplo para la cepa de *K. marxianus* var. *bulgáricus* varía de 57 a 77 KDa y para *K. marxianus* CBS 6556 se determinó un valor de 64 KDa (Castillo 2010).



**Figura 27. Proteínas con actividad inulinolítica, presentes en los extractos enzimáticos.**

(a) Gel SDS-PAGE, teñido con azul de coomasie y (b) Zimograma, teñido con TTC.

A: Marcador de peso molecular, B: Proteínas del sobrenadante 40 $\mu$ g/mL, C: Proteínas del extracto celular 40 $\mu$ g/mL, D: Inulina comercial (Novozym 960), E: Zimograma del sobrenadante 40 $\mu$ g/mL, F: Zimograma del extracto celular 40 $\mu$ g/mL.

## 7 Conclusiones.

Se logró producir extractos enzimáticos a partir del acondicionamiento de la cepa 8b de *Kluyveromyces marxianus* en un medio de cultivo con agavina, estos extractos presentaron actividad inulinolítica en la agavina.

Se caracterizó la actividad inulinolítica de cada sustrato, determinando las mejores condiciones de temperatura y pH para la reacción, obteniendo así, una temperatura de 35°C y pH de 5 para las enzimas intracelulares y para la enzimas extracelulares, una temperatura de 45°C y pH de 5, las actividades específicas obtenidas a estas condiciones, fueron de 0.21 y de 0.24 U/mg de proteína respectivamente.

Los extractos presentaron estabilidad a temperaturas de hasta 50°C durante 2h, las enzimas extracelulares conservaron su actividad al 100%, pero en las intracelulares se observó una disminución de la actividad del 30%.

Ambos extractos tuvieron acción sobre enlaces  $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6), aunque la actividad enzimática sobre el primer enlace fue mayor que en el segundo, en un 74% y 99%, para las enzimas extra e intracelulares, respectivamente.

El peso molecular de las enzimas con capacidad de hidrolizar la agavina, presentes en los extractos enzimáticos fue de 85-90 kDa.

Al analizar los productos formados por HPLC y TLC en las reacciones, sólo se pudo observar la producción de fructosa en ambos extractos, indicando así la acción de una exoinulinasa.

Por lo tanto, según los resultados obtenidos en este trabajo, la enzimas producidas por la cepa 8b de *K. marxianus* podrían ser utilizadas para la producción de fructosa usando como sustrato a la inulina de agave.

## 8 Perspectivas.

Es necesario la continuación de estos estudios, ya que estos resultados solo sirven como preámbulo para conocer la actividad inulinolítica que presentan las enzimas de la cepa 8b de *Kluyveromyces marxianus* sobre la agavina. Lograr la purificar las enzimas contenidas en los extractos, la determinación de parámetros cinéticos, el estudio de la actividad con la enzima inmovilizada y en medios no convencionales e incluso la ingeniería molecular de la cepa 8b, implicaría el uso de estas enzimas para el aprovechamiento de toda la cadena productiva del agave para la producción de fructosa y posiblemente de fructooligosacáridos.

## Referencias.

- Abdullah, N.,. "Studies on possible activation of microbial inulinase production using gamma radiation under solid state fermentation." *B.Sc. of Pharmaceutical Sciences, Cairo University*, 2003.
- Castillo, A., Chamy Rolando. "Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*." *Scientia Agropecuaria* Vol 1, 235 – 245 (2010).
- Huerta, S., Larralde, C., Narváez J. "Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas." *Bio Ciencias* Vol 3, Art 1, 4 (2014).
- Jain, S., Jain, P., Kango, N. "Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract." *Brazilian Journal of Microbiology* 62-69 (2012).
- Kango, N. y Jain, S. "Production and properties of microbial inulinases: recent advances." *Food Biotechnology* Vol. 25, Art 3, 165-212 (2011).
- Lopez, M., Mancilla, N., Mendoza, G. "Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul." *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, Art. 27, 7835–7840 (2003).

- Madrigal, L. Sangronis, E.,. "La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales." *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* Vol. 57, Art. 4, 387-396. (2007).
- Mahadevan, D., Manivasagam, R., Natarajan, R. "Optimization of media component in inulinase production using garlic by *Penicillium Rugulosum*." *Journal of Advanced Scientific Research* Vol. 2, Art.1, 24-33. (2011).
- Mancilla, N. "Caracterización molecular de fructanos en *Agave* y *Dasyilirion* spp., identificación de fructosiltransferasas y su expresión en *Pichia pastoris*." *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*. 40-43, 60, 71-73 (2006).
- Nagem, R., Rojas, A., Golubev, A., Korneeva, O., Eneyskaya, E., Kulminskaya, A., Neustroev, K., Polikarpov, I. "Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori*: ten enzyme fold and structural determinants of substrate recognition." *J. Mol. Biol.* Vol. 344, 471-480 (2004).
- Ortiz, M., Navarro, A., Munguia, A. "Manual de prácticas de laboratorio de tecnología enzimática." *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*, 2014.
- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J., Schneider, F. "Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi synthetic medium." *Journal of Applied Microbiology* Vol.90, Art 6, 859-865 (2001).
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A., Roussel, G., Perpète, E., Wouters, J., Housen, I., M. «First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity.» *Biochimie* Vol. 94, 2423-2430 (2012).
- Ruano, E.,. "Propiedades catalíticas de la enzima Novo 960 (inulinasa) inmovilizada por atrapamiento." *Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química*, 2012.

- SAGARPA. "PROY-NOM-002-SAGARPA-2015, relativa a las características de sanidad, calidad, inocuidad, trazabilidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave." 2015.
- Sánchez, S. "Manual de prácticas de bioquímica experimental (0141)." Edited by Editora Dra. Nahieli Greaves Fernández. *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*, 2013.
- Singh, R., Dhaliwal, R., Puri, M. "Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup." *Journal of microbiology and biotechnology* Vol. 17, Art. 5, 733-738. (2007).
- Urías, S.,. "Efecto prebiótico de los fructanos de agaves y dasyilirion y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos en ratones." *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*. 23-32, 35. (2008).
- Vargas, D.,. "Caracterización e identificación de cepas degradadoras de agavina." *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*, 2015.