



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA INULINASA
PROVENIENTE DE “*Bacillus amylolicuefaciens*”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

GONZÁLEZ CASTILLO BELÉN



CIUDAD DE MÉXICO.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Euclides Avila Chávez

VOCAL: Profesora: Carmina Montiel Pacheco

SECRETARIO: Profesor: Oscar Hernández Meléndez

1er. SUPLENTE: Profesora: Verónica Garrocho Villegas

2° SUPLENTE: Profesora: Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO “E”, FACULTAD DE QUÍMICA, CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. Jonathan Trapala Reyna.

SUSTENTANTE:

Belén González Castillo.

A la UNAM por el financiamiento de los proyectos
DGAPA (PAPIIT IA 204415 RA-204118) y al
CONACyT (proyecto CB-167507)
Facultad de Química PAIP (5000-9153).

Índice.

1. RESUMEN.	9
2. INTRODUCCIÓN.	10
3. MARCO TEÓRICO.	11
3.1 AGAVE	11
3.2. ORÍGENES.	12
3.3. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO.	12
3.4. <i>AGAVE TEQUILANA</i> WEBER VAR. AZUL.	13
3.5. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL AGAVE.	15
3.6. FRUCTANOS.	16
3.6.1. CLASIFICACIÓN	16
3.6.2. APLICACIONES.	18
3.6.3. PRODUCCIÓN DE FRUCTANOS.	18
3.7. ENZIMAS.	19
3.7.1. PRODUCCIÓN DE INULINASAS.	21
3.7.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	23
3.7.2.1. Métodos de purificación.	23
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	25
5. HIPÓTESIS.	26
6. OBJETIVOS.	27
6.1. OBJETIVO GENERAL.	27
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	27
7. METODOLOGÍA.	25
7.1. CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> (GEP12).	29
7.1.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.	29
7.1.2. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LA CEPA CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.	30
7.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENZIMÁTICAS.	30
7.3. CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES ENZIMÁTICAS.	30
7.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	30
7.4.1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS REDUCTORES POR EL MÉTODO DNS (ÁCIDO 3,5 DI NITRO SALICÍLICO).	31
7.4.2. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF).	32
7.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA.	32
7.5. PURIFICACIÓN DE LA INULINASA EXTRACELULAR.	32
7.5.1. CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> PARA LA PURIFICACIÓN DE LA INULINASA EXTRACELULAR.	33

7.5.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ENZIMÁTICA EXTRACELULAR.	33
7.5.3. CONCENTRACIÓN DE LA INULINASA Y PRIMER PASO DE LA PURIFICACIÓN.	33
7.6. PURIFICACIÓN DE LA INULINASA EXTRACELULAR POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO Y CROMATOGRAFÍA POR FILTRACIÓN EN GEL.	34
7.7. CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO Y CROMATOGRAFÍA POR FILTRACIÓN EN GEL.	35
7.8. SEPARACIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.	35
7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	37
8.1. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA FRACCIÓN EXTRACELULAR DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> .	37
8.2. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO Y DEL SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INULINASAS DE <i>B.AMYLOLICUEFACIENS</i> .	39
8.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN INTRACELULAR DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> .	43
8.4. PURIFICACIÓN DE LA INULINASA PRESENTE EN LA FRACCIÓN EXTRACELULAR DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> .	45
8.4.1. AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE LA INULINASA DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> .	45
8.4.2. PURIFICACIÓN DE LA INULINASA DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.	46
8.4.3. PURIFICACIÓN DE LA INULINASA DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (EXCLUSIÓN MOLECULAR).	51
8.5. BIOPELÍCULA	56
9. CONCLUSIONES.	58
10. PERSPECTIVAS.	59
11. BIBLIOGRAFÍA.	60

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución del género <i>Agave</i> en México.	11
Figura 2. Estructura de fructanos. a). Inulina enlaces β -(2,1); b). Agavina enlaces β -(2,1) y enlaces β -(2,6); c) Gramínea (Ritsema <i>et al</i> , 2003).	17
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso experimental.	26
Los datos de la actividad enzimática se expresaron como el promedio \pm DE (desviación estándar). La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por la prueba de t de Student. Un valor $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.	36
Figura 4. Curva patrón de BSA (albúmina bovina sérica) para determinación de la concentración de proteína llevada a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes.	37
Figura 5. Curva patrón de fructosa para la determinación del contenido de azúcares reductores por el método de DNS. Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes.	39
Figura 6. Hidrólisis de la agavina y la inulina de achicoria (1% m/v) catalizada por la inulinasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> , crecida en diferentes fuentes de carbono. La reacción se llevó a cabo por 20 min a 37°C, pH=8. (FOS: fructosiloligosacáridos, Fru: fructosa, I.achicoria: Inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. $P < 0.05$ para los sustratos.	40
Figura 7. Hidrólisis de la agavina, la inulina de achicoria y la levana (1% m/v) catalizada por la inulinasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> , crecida en diferentes fuentes de carbono. La reacción se llevó a cabo por 6 h a 37°C, pH=8. (FOS: fructosiloligosacáridos, Fru: fructosa, I.achicoria: Inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. $P < 0.05$ para los sustratos.	41
Figura 8. Identificación de los productos de la reacción de hidrólisis de la inulina de achicoria catalizada por la inulinasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> . La reacción se llevó a cabo a una concentración de sustrato de 5% (m/v) a 37°C, pH=8, durante 20 min. (Control del sustrato (C1): Inulina de achicoria; Control de enzima (C2,1): medio con agavina; Control de enzima (C2,1): medio con sacarosa; Control de enzima (C2,2): medio con glucosa; Control de enzima (C2,3): medio con FOS; Control de enzima (C2,4): medio con fructosa. Reacción medio con agavina + sustrato (Rx1); Reacción medio con sacarosa + sustrato (Rx2); Reacción medio con glucosa + sustrato (Rx3); Reacción medio con FOS + sustrato (Rx4); Reacción medio con fructosa + sustrato (Rx5)).	42
Figura 9. Control de posibles productos que podrían formarse después de la hidrólisis enzimática de la inulina de achicoria. A: fructosa, B: inulina de achicoria, C: sacarosa, D: fructosiloligosacáridos(FOS).	43
Figura 10. Hidrólisis de la agavina, la inulina de achicoria y la levana (1% m/v) catalizada por la inulinasa intracelular de <i>B. amyloliquefaciens</i> . La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (I. achicoria: inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de dos experimentos independientes.* $P < 0.05$ vs inulina de achicoria	44

- Figura 11.** Cromatograma de la purificación por intercambio iónico. (— UV; gradiente lineal salino de NaCl de 0 a 2M; ---- Fracciones). 47
- Figura 12.** Actividad enzimática de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico, de la fracción extracelular de *B.amyloliquefaciens*. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (F.4.: Fracción 4, F.7. Fracción 7, F.23. Fracción 23, F.27: Fracción 27). 48
- Figura 13.** Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del crecimiento de la cepa *B.amyloliquefaciens*, donde A: marcador del peso molecular (ColorBurst Electrophoresis MArker M.W. 8,000-220,000 Da, SIGMA), B: Fracción extracelular, “C” Fracciones proteicas parcialmente purificadas por cromatografía por intercambio iónico. 48
- Figura 14.** Identificación de los productos de la reacción de hidrólisis de la inulina de achicoria catalizada por la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* purificada por intercambio iónico. (Control del sustrato (C1): Inulina de achicoria; reacción de la fracción 4 (4): Fracción 4 + sustrato; reacción de la fracción 7 (7): Fracción 7 + sustrato; reacción de la fracción 23 (23): Fracción 23 + sustrato;) reacción de la fracción 27 (27): fracción 27 + sustrato). 50
- Figura 15.** Cromatograma de purificación por cromatografía de filtración en gel. (— UV; - ---- Fracciones; - - - - Inyección de la muestra). 51
- Figura 16.** Curva de calibración de la columna Superdex 200. 53
- Figura 17.** Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del crecimiento de la cepa *B.amyloliquefaciens*, donde A: marcador del peso molecular (ColorBurst Electrophoresis MArker M.W. 8,000-220,000 Da, SIGMA), B: Fracción extracelular, “C” Fracciones proteicas purificadas por cromatografía por filtración en gel (fracción 18). 54
- Figura 18.** Concentración de fructosa obtenida después de la reacción de hidrólisis con las diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en filtración en gel, de la fracción extracelular de *B.amyloliquefaciens*. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (F.17.: Fracción 17, F.18. Fracción 18, F.19. Fracción 19, F.20: Fracción 20, F.21. Fracción 21, F.22. Fracción 22). 55
- Figura 19.** Biopelícula formada durante el crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens*. 56
- Figura 20.** Observación al microscopio de biopelícula. 56
- Figura 21.** Contenido de biopelícula obtenida después del crecimiento de *B.amyloliquefaciens* con diferentes fuentes de carbono (agavina, inulina de achicoria, sacarosa, glucosa y fructosa); el crecimiento del microorganismo se realizó a 37°C por 48 h. (I agave: Inulina de agave, I achicoria: inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio ± DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes 57

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición química de las diferentes fracciones de <i>A. tequilana azul</i> . (% en base húmeda).	14 14
Tabla 2. Integración de los azúcares reductores totales contenidos en las fracciones de la planta <i>Agave tequilana azul</i> . (% en base seca); ARD: azúcares reductores directos, FOS: fructosiloligosacáridos, ART: azúcares reductores totales.	14
Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas. Tomado de Lehninger <i>et al</i> , 2005.	20
Tabla 4. Microorganismos empleados para la producción de inulinasas. Tomado de Pandey Ashok <i>et al</i> , (2006).	21 21
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de microorganismos productores de inulinasas. Tomado de Brenda enzymes (2018).	22
Tabla 6. Composición de los diferentes medios de cultivo mínimos. Tomado de Robert R, (2013). (FOS: fructosiloligosacáridos).	29
Tabla 7. Preparación del gel de poliacrilamida al 10% (m/v).	36
Tabla 8. Concentración de proteína en la fracción extracelular proveniente de <i>Bacillus amylicuefaciens</i> crecida con diferente fuente de carbono después de 48 h de incubación. *FOS (fructosiloligosacáridos).	38 38
Tabla 9. Tabla de purificación por intercambio iónico de la inulinasa proveniente de la fracción extracelular de <i>Bacillus amylicuefaciens</i> . (U= μmol de fructosa/min).	49
Tabla 10. Valores de elución y K_a (coeficiente de retención) de estándares para la columna por filtración en gel.	52
Tabla 11. Tabla de purificación por filtración en gel de la inulinasa proveniente de la fracción extracelular de <i>B. amylicuefaciens</i> . (U= μmol de fructosa/min)	55

1.RESUMEN.

En los últimos años se han obtenido inulinasas a partir de nuevas fuentes; así como se han clonado y caracterizado distintos genes que codifican inulinasas de diferentes microorganismos. Esto con el fin de desarrollar procesos novedosos para la producción de exoinulinasas y endoinulinasas (Zhenming ,2009). Este interés ha surgido debido a que las inulinasas son capaces de generar productos de valor agregado para la industria alimentaria a partir de inulina como sustrato; como la fructosa para la producción de jarabes de alta fructosa, así como los fructooligosacáridos (FOS) por sus propiedades prebióticas.

Es por ello que en este trabajo se estudió a las inulinasas provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens*, microorganismo que anteriormente se aisló de residuos de agave (bagazo) de la industria tequilera; la cual fue caracterizada en trabajos previos en nuestro grupo de trabajo.

Para extraer a las inulinasas se buscó el mejor sustrato para la producción de las enzimas con actividad inulinolítica; es por ello que se realizaron ensayos proporcionando al microorganismo diferentes fuentes de carbono, siendo la inulina de agave la mejor fuente para el crecimiento y la obtención de inulinasas.

Posteriormente se examinó el mejor método para poder purificar la enzima; por lo que se realizó una purificación parcial por cromatografía de intercambio aniónico en una columna DEAE Sepharose Fast Flow, así como una purificación por cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex 200, obteniendo una enzima con un peso molecular de 32 kDa.

2. INTRODUCCIÓN.

Durante la segunda mitad del siglo XX han sido de gran importancia para la industria alimentaria los jarabes de fructosa y algunos derivados funcionales, los cuales se utilizan en una gran variedad de productos alimenticios, de estos destacan compuestos constituidos por largas cadenas de moléculas de fructosa denominadas fructanos. Los fructanos sirven como reserva energética en una gran variedad de plantas; dentro de estos destacan las levanas, que son fructanos lineales constituidos por unidades de fructofuranosa unidas por enlaces β -(2,6) e inulinas (fructanos lineales) las cuales están conformadas por unidades de fructofuranosa unidas por enlaces β -(2,1). Un derivado de la hidrólisis de los fructanos son los fructooligosacáridos (FOS) que están constituidos de 2 a 10 unidades de residuos de fructosa principalmente, pero pueden tener una molécula de glucopiranososa en su estructura. Tanto la inulina como los FOS son de gran importancia en la alimentación humana dado su carácter soluble; las inulinas funcionan como fibra soluble mientras que los FOS funcionan como prebióticos al ser asimilados de manera selectiva por la microbiota intestinal. La inulina está relacionada con una de las industrias más importantes y de gran tradición en nuestro país, la tequilera; ya que se ha identificado que en las piñas maduras del agave contienen alrededor del 75 % de carbohidratos de los cuales destaca la inulina. Para la producción de tequila los carbohidratos del agave se hidrolizan por un proceso térmico dando varias moléculas de azúcares libres como la fructosa y alrededor del 20% de sacarosa. Después de dicho proceso se genera un residuo (bagazo) del cual se aisló la cepa *Bacillus amyloliquefaciens*, que se caracterizó morfológicamente, tanto colonial como microscópicamente observándose estreptobacilos Gram positivos, con movilidad tipo “swarming”. Esta cepa puede utilizar a la inulina de agave como única fuente de carbono, lo que nos lleva a suponer que produce enzimas capaces de hidrolizarla.

3.2. Orígenes.

El agave es considerado de gran importancia en nuestro país, esto debido a que es un recurso trascendente tanto económico como cultural, ya que ha sido aprovechado durante siglos como alimento, medicina, combustible y abono, entre otros.

El agave fue una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica desde hace unos 7 mil años. Al aprovechar estas plantas, los pobladores hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, pues los escogían por sus fibras, el aguamiel o las altas cantidades de azúcares que les proporcionaban (García, 2007).

En la actualidad el agave es de gran relevancia debido a su importancia biológica, ecológica y económica del país debido a que muchas especies son utilizadas como alimento, para la obtención de fibras en la elaboración de textiles y principalmente para la elaboración de bebidas alcohólicas.

3.3. Morfología y metabolismo.

El agave es una planta xerófita, adaptada a vivir en condiciones climáticas desfavorables, es decir largos periodos de sequía y altas temperaturas. Las características morfológicas a las condiciones adversas consisten en modificaciones en la estructura básica de una planta como respuesta a las adversidades del ambiente. El agave posee mecanismos para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos; así como con fuertes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos especializados.

Una de las características morfológicas favorables en el agave se encuentra en las raíces, las cuales están en la superficie, lo que facilita la absorción de agua de lluvia; esto debido a la escases de lluvia por lo que sólo humedece la superficie del suelo; reduciendo así las posibilidades de supervivencia de la planta durante las sequías, por lo que la planta depende del almacenamiento del volumen de agua y carbohidratos.

El agua que es almacenada por la planta ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de carbono (CO₂), aun en condiciones de sequía. La asimilación de carbono se lleva a cabo durante la noche, en donde se fija el carbono de los ácidos orgánicos, principalmente del ácido málico que se acumula en las vacuolas. Durante el día el ácido málico es descarboxilado obteniendo así carbono con una pérdida mínima de agua; el carbono es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos; este proceso es denominado metabolismo ácido crasuláceo (CAM) y es característico de plantas que crecen en zonas en altas temperaturas y baja humedad como el *A.tequilana* (García, 2007).

3.4. *Agave tequilana weber var. Azul.*

El *Agave tequilana* Weber var azul es de gran importancia económica en nuestro país debido a que se utiliza principalmente para la elaboración del tequila; esta importancia se debe no solo porque es una la materia prima para la elaboración de una de las principales bebidas alcohólicas en nuestro país; si no también por los productos de valor agregado (FOS) que se generan; siendo así beneficiosos para la salud.

Análisis realizados indican que el *Agave tequilana weber var azul* contiene en la piña alrededor de 20-24% en base húmeda de fructanos en comparación con otras variedades (*Agave agustifolia*, *Agave salmiana*, *Agave rhodacantha*, etc) (Bautista-Justo M **et al**, 2001).

En la tabla 1 se muestra la composición química de las diferentes fracciones del *Agave Tequilana* Weber var. azul; así como el contenido de azúcares totales (tabla 2) (Montañez-Soto, 2011).

Tabla 1. Composición química de las diferentes fracciones de *A. tequilana azul*. (% en base húmeda).

FRACCIÓN	Humedad	Cenizas	Lípidos	Proteína	Fibra cruda	Carbohidratos
PUNTA DE LA HOJA	81.13	2.68	0.26	0.96	9.86	5.11
BASE DE LA HOJA	79.41	1.76	0.12	0.64	6.24	11.83
CABEZA	71.10	1.16	0.10	0.62	4.00	23.02

Tabla 2. Integración de los azúcares reductores totales contenidos en las fracciones de la planta *Agave tequilana azul*. (% en base seca); ARD: azúcares reductores directos, FOS: fructosiloligosacáridos, ART: azúcares reductores totales.

FRACCIÓN	ARD	FOS	Inulina	ART
PUNTA DE LA HOJA	17.81	6.24	2.25	26.30
BASE DE LA HOJA	18.18	13.66	24.52	56.36
CABEZA	12.00	24.96	43.24	80.20

El *Agave tequilana* Weber var. Azul, es una de las especies mexicanas más importantes, no sólo por ser la única planta permitida para la producción del tequila, sino porque también es una potencial fuente de prebióticos.

3.5. Residuos agroindustriales del agave.

Los residuos de las plantas de *Agave* spp., se generan durante diferentes etapas de la producción de las bebidas alcohólicas. En el caso del tequila y el mezcal, durante el proceso de “jimado” se cortan las hojas del tallo siendo un producto de desecho; mientras que después del cocimiento de las piñas se genera un residuo denominado bagazo, el cual también es desechado 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 alrededor de 300 mil toneladas. (Huitrón **et al**, 2008).

Si estos residuos no son reciclados o procesados apropiadamente se genera contaminación; ya que estos subproductos generalmente son quemados o vertidos en basureros, generando así problemas debido a la liberación de CO₂, 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. Es por ello que se han buscado distintas formas de poder utilizarlos; ya sea en la preparación de alimentos, remedios de salud, construcción forrajes, fertilizantes, y como combustibles (Barragán-Huerta **et al**, 2008). A su vez en los últimos años, estos residuos se han utilizado para la obtención de enzimas mediante el aislamiento de microorganismos que se encuentran en estos; tal es el caso de *Aspergillus niger* CH-A-2010 y CH-A-2016 el cual se aisló para poder producir enzimas, que fueron extraídas y caracterizadas obteniendo una actividad inulinolítica de 1.18 U/mL CH-A-2010 y de 0.40 U/mL CH-A-2016 (Huitrón **et al**, 2008).

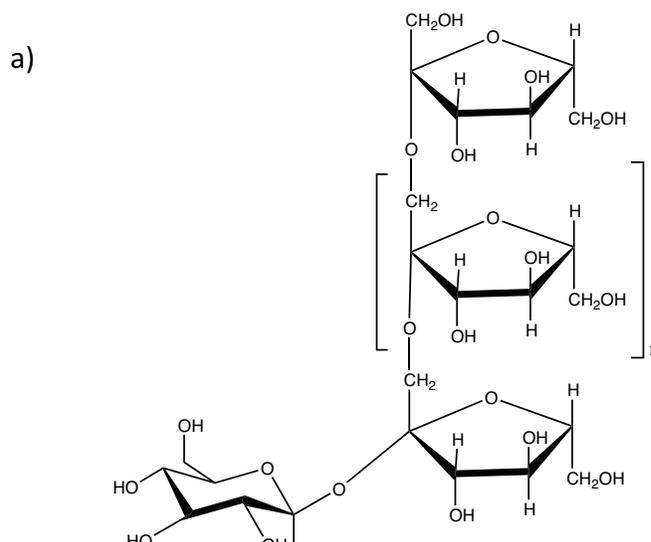
3.6. Fructanos.

Los fructanos son polímeros que están constituidos por largas cadenas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos. El grado de polimerización y/o naturaleza de los enlaces presentes hace que los fructanos posean diferentes propiedades como espesante, prebiótico y gelificante entre otras.

3.6.1. Clasificación.

Se le puede denominar fructano a un polisacárido con más de 10 moléculas de fructosa en su cadena; mientras que cuando contiene de 2 a 10 moléculas de fructosa se les denomina oligosacáridos o fructooligosacáridos (FOS) (Olvera, 2007).

Otra manera en que se clasifican los fructanos es de acuerdo a su tipo de enlace, dentro de esta clasificación están las levanas, que son fructanos lineales constituidos por unidades de fructofuranosa unidas por enlaces β -(2,6) e inulinas (fructanos lineales) las cuales están conformadas por unidades de fructofuranosa unidas por enlaces β -(2,1). Además, existen fructanos que se construyen a partir de sacarosa, en donde unidades de fructosa se unen haciendo crecer la cadena tanto del lado de la glucosa como de la fructosa; a éstas se les conoce como neo-series que pueden ser tanto de inulina como de levana dependiendo del tipo de enlace de esta segunda cadena (figura 2) (Cuevas, 2016).



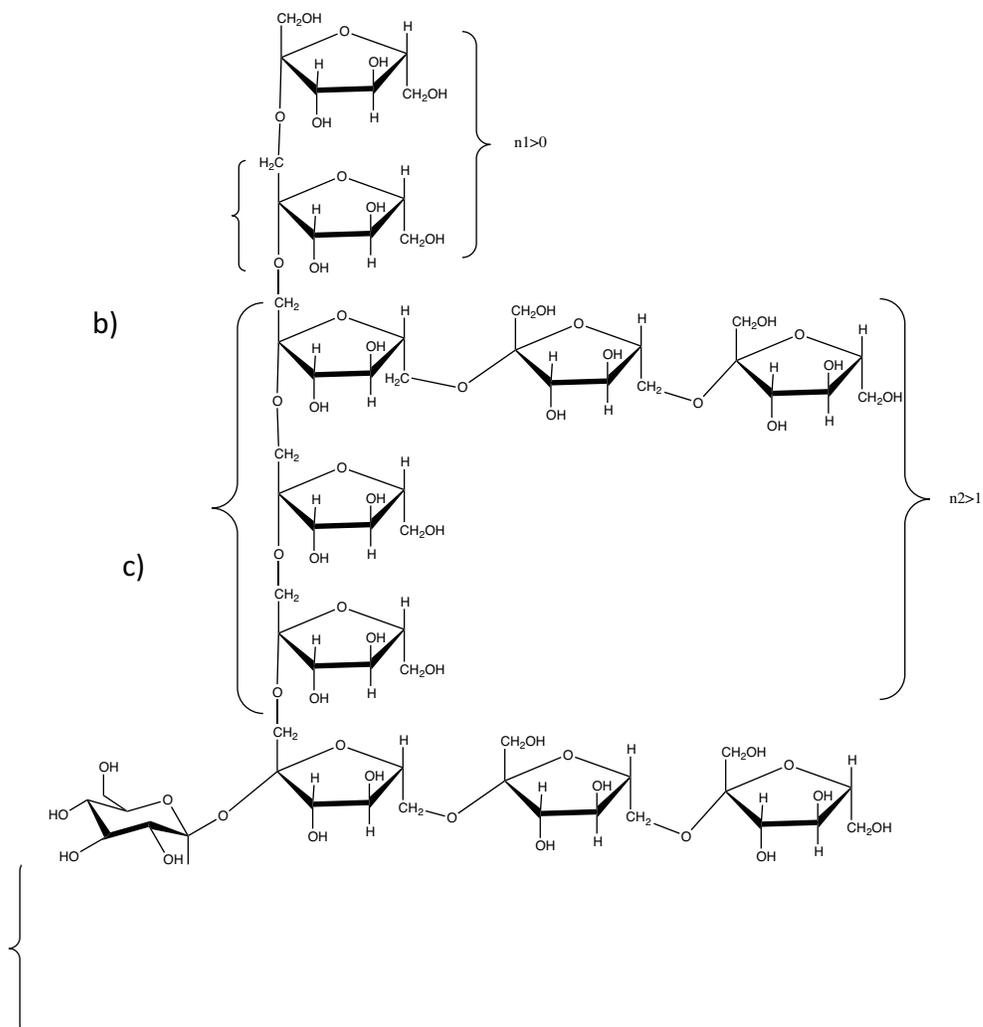


Figura 2. Estructura de fructanos. a). Inulina enlaces β -(2,1); b). Agavina enlaces β -(2,1) y enlaces β -(2,6); c) Graminea (Ritsema **et al**, 2003).

3.6.2. Aplicaciones.

El empleo de estos polímeros de fructosa es de gran interés para la industria alimentaria; debido a que estos compuestos pueden ser utilizados en distintos productos gracias a las propiedades que poseen; ya sean por sus características tecnológicas como aditivo (gelificante, espesantes y sustituto de grasa) o como ventaja nutricional (fibra soluble); cabe señalar que la fibra soluble es una sustancia no digerible por los humanos. Tal es el caso de los FOS los cuales presentan importantes características fisicoquímicas que se traducen en un beneficio para la salud. Estos compuestos estimulan de manera selectiva el crecimiento de bacterias benéficas (lactobacilos) en el intestino grueso (Roberfroid, 2007).

3.6.3. Producción de fructanos.

Los fructanos son compuestos que son producidos principalmente por microorganismos y plantas. Las plantas sintetizan los fructanos para utilizarlos como reserva energética, a su vez funcionan como protección en condiciones de sequía o temperaturas extremas (Vijn y Smeekens, 1999). Tal es el caso del *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual contiene alrededor del 13 al 17% de fructanos (inulina) los cuales presentan un grado de polimerización entre 3 y 29, presentando estructuras ramificadas (López **et al**, 2003). Dichos fructanos ramificados (agavinas) (figura 2) pueden ser empleados por algunas cepas microbianas como principal fuente de carbono e inducir la producción de enzimas de interés (Pérez, 2016).

A su vez también algunos microorganismos como algunas bacterias gram positivas y gram negativas producen fructanos, como levanas, mientras que la síntesis de inulina sólo se ha reportado en especies gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* y *Leuconostoc citreum* (Ulloa, 2010). La levana e inulina producidas por bacterias, son los fructanos más largos de la

naturaleza, con un grado de polimerización de 104 a 106. Las especies de hongos que producen fructanos están incluidas básicamente en los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, y *Phytophthora*. Los fructanos sintetizados por hongos consisten en una cadena lineal, cuyo tamaño puede variar entre especies en el mismo género (Bautista-Justo M et al, **2001**).

3.7. Enzimas.

Desde sus inicios el hombre ha usado las transformaciones biológicas de manera instintiva y práctica, siendo las industrias productoras de cerveza, quesos y similares, la base de la biotecnología enzimática, ya que por ellas se descubrió que los procesos biológicos se realizan por moléculas de naturaleza proteica conocidas como enzimas.

Las enzimas son proteínas con función catalítica, es decir, que pueden acelerar la velocidad a la que ocurren las reacciones químicas al transferir electrones, átomos o grupos funcionales.

Es por ello que poseen gran potencial ya que:

1. Son específicas.
2. La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
3. Las condiciones de reacción, temperatura y presión son relativamente bajas, hace que su uso sea poco costoso (Quintero, 1981).

Las enzimas pueden clasificarse de acuerdo a la reacción bioquímica que catalicen (tabla 3); cabe señalar que toda enzima posee un código numérico, denominado “EC number” (Enzyme Commission number), el cual contiene una serie de números (cuatro dígitos) que indican que tipo de reacción catalizan. Todas las enzimas pertenecen a uno u otro grupo de los seis principales. El primer dígito denota la clase principal, el segundo la subclase en función del tipo de sustrato, el tercero la sub-subclase de acuerdo con el requerimiento por coenzima y finalmente el cuarto número hace referencia a la reacción que cataliza (García-Garibay, 2004).

Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas. Tomado de Lehninger *et al*, 2005.

GRUPO	TIPO DE REACCIÓN CATALIZADA
EC 1 (OXIDOREDUCTASAS)	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
EC 2 (TRANSFERASAS)	Transferencia de grupos funcionales (metilo, acilo, amino, fosfato)
EC 3 (HIDROLASAS)	Hidrólisis (transferencia de grupos funcionales hacia el agua)
EC 4 (LIASAS)	Adición de grupos funcionales a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por remoción de algún grupo funcional.
EC 5 (ISOMERASAS)	Transferencia de grupos funcionales entre una misma molécula
EC 6 (LIGASAS)	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O o C-N por reacciones de condensación asociadas a la hidrólisis del ATP.

3.7.1. Producción de Inulinasas.

Las inulinasas son fructofuranosilhidrolasas (E.2.1.80) producidas por una gran variedad de organismos, incluyendo plantas, bacterias, hongos y levaduras. La hidrólisis de inulina puede llevarse a cabo por la acción de dos enzimas; la endo y/o exo-inulinasas. Las exo-inulinasas actúan en los extremos de la inulina, hidrolizando enlaces β -(2,1) produciendo unidades de fructofuranosa. Por otro lado, las endo-inulinasas actúan sobre los enlaces β -(2,1) internos de la inulina, produciendo FOS de diversos tamaños. Los productos obtenidos por la hidrólisis de inulina pueden ser aplicados para la producción de jarabes de alta fructosa o de FOS de diversos tamaños (Kango y Jain, 2011).

Se ha observado que muchas cepas de bacterias y hongos filamentosos (tabla 4) producen inulinasas que pueden ser fácilmente utilizadas para hidrolizar inulina para la obtención de fructooligosacáridos (Chi, 2011).

Tabla 4. Microorganismos empleados para la producción de inulinasas.
Tomado de Pandey Ashok *et al*, (2006).

Microorganismo	Tipo de enzima
Hongos	
<i>Aspergillus aureus</i>	Extracelular
<i>Aspergillus awamori</i>	Extracelular
<i>Aspergillus ficuum</i>	Extracelular
<i>Aspergillus fischeri</i>	Extracelular
<i>Fusarium sp.</i>	Extracelular
<i>Fusarium oxysporum</i>	Extracelular, intracelular
<i>Penicillium sp.</i>	Extracelular
<i>P.purpurogenum</i>	Extracelular
<i>Rhizopus sp.</i>	Extracelular
<i>Streptomyces sp.</i>	Extracelular

Bacterias	
<i>Acetobacter sp.</i>	Extracelular
<i>Arthobacter sp</i>	Extracelular
<i>Bacillus sp.</i>	Extracelular, intracelular
<i>Escherichia coli.</i>	Intracelular
<i>Flavobacterium mulivorum</i>	Intracelular
<i>Staphylococcus sp.</i>	Intracelular
Levaduras	
<i>Candida sp.</i>	Extracelular
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Extracelular

Para la producción de fructosa, la inulina es hidrolizada por exo-inulinasas, este método, incluye fuentes microbianas que secretan grandes cantidades de inulinasas y pueden producir fructosa a partir de inulina en una reacción catalítica de un solo paso y con rendimientos mayores del 95%, o bien, cuando éstas actúan sinérgicamente con las endo-inulinasas se puede observar un mayor rendimiento, debido a que las endo-inulinasas hidrolizan a la inulina en varios oligosacáridos incrementando los sitios de ataque para las exo-inulinasas (Chi, 2011).

Las inulinasas tienen diferentes propiedades fisicoquímicas (peso molecular, pH y temperatura óptimos, punto isoeléctrico), dependiendo de su procedencia. En la tabla 5 se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de microorganismos productores de inulinasas.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de microorganismos productores de inulinasas. Tomado de Brenda enzymes (2018).

<i>Microorganismo</i>	<i>pH óptimo</i>	<i>Temperatura óptima (°C)</i>	<i>Peso molecular de la inulinasas (Da)</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	4 - 5	55	250000	4.6
<i>Streptococcus salivarius</i>	7	50	83000 - 85000	-
<i>Penicillium janczewskii</i>	4 - 5.5	55	73924	4.9
<i>Bacillus sp.</i>	6.5 - 7	65	150000 -20000	-

3.7.2. Purificación de proteínas.

La purificación de proteínas es un proceso mediante el cual se separa una proteína a partir de una mezcla compleja. Para llevar a cabo una purificación se deben tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas para poder elegir las mejores condiciones y métodos de purificación.

3.7.2.1. Métodos de purificación.

Algunos de los métodos mediante los cuales se puede purificar una proteína es la precipitación salina; en este método se precipita una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio.

Se agregan diferentes porcentajes de saturación de una sal a una solución de proteínas, esto disminuye la interacción proteína-H₂O porque elimina la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas lo que permite usar esta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas.

Otras técnicas de separación de proteínas son los métodos cromatográficos los cuales pueden clasificarse en función del mecanismo de separación de los componentes entre sus fases, así como en la retención selectiva por medio de las propiedades fisicoquímicas de los componentes, permitiendo separar los distintos componentes de la mezcla para hacer su identificación y determinación.

Tal es el caso de la cromatografía por intercambio iónico la cual permite la separación de las moléculas con base en su carga neta o punto isoeléctrico. El fundamento de esta técnica es la atracción iónica que establece en primera instancia la fase estacionaria (retención) y después la fase móvil (elución) sobre los solutos de naturaleza iónica. Cuanto más cargas positivas o negativas posea la muestra más retenida estará por la fase estacionaria (Guillén, 2015). Es preciso que la fase estacionaria contenga iones de carga contraria a los iones que se desean separar. Existen dos tipos de resinas de intercambio iónico: aniónico y catiónico.

En la cromatografía por intercambio aniónico los solutos son aniones y la fase estacionaria posee grupos catiónicos capaces de retener los aniones; mientras que en la cromatografía por intercambio catiónico los solutos son cationes y la fase estacionaria posee grupos aniónicos que retienen a los cationes (Rouessac, 2003). Sin embargo, para eluir las proteínas que se encuentran unidas fuertemente al intercambiador es necesario aumentar la fuerza iónica del medio, esto se logra mediante el aumento progresivo de la concentración de sales (contra-ión) como el NaCl.

De igual manera se encuentra la cromatografía de exclusión molecular; esta es una técnica que permite la separación de moléculas en función de su tamaño; en donde la fase estacionaria está conformada por un gel, el cual se encuentra constituido por partículas esféricas que tienen poros de un determinado tamaño. Dichos geles pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) están constituidos por gránulos (partículas) de un

material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.

Al introducir una muestra por la columna, ésta se separará dependiendo de la afinidad relativa que tenga por ambas fases; es decir, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas del gel pasaran a través de la fase estacionaria (gel) sin ser retenidas (eluyen primero). En cambio, aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retenidas por la fase estacionaria, ya que las moléculas de menor tamaño se difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna.

La cromatografía de exclusión molecular es utilizada para separación de sustancias de distintos pesos moleculares, así como para la determinación de pesos moleculares de proteínas, entre otros.

4. Planteamiento del problema.

La industria tequilera utiliza el Agave Tequilana Weber var. Azul para la obtención de azúcares que son utilizados en el proceso de fermentación para la producción de etanol. Actualmente se busca aprovechar de manera integral a toda la planta; es por ello que se encontró y aisló a *B. amylicuefaciens* GeP12 del bagazo generado por la industria tequilera. Esta bacteria es capaz de producir enzimas de interés biotecnológico, entre las que se encuentran las inulinasas; dichas enzimas podrían ser potencialmente útiles para la elaboración de productos de interés biotecnológico con un valor agregado. En este trabajo se evaluó y mejoro la producción de inulinasas, ya que se pueden utilizar para la producción de fructooligosacáridos, los cuales tienen un efecto prebiótico; así como también para

generar azúcares fermentables para la obtención de etanol y la producción de jarabes.

5. HIPÓTESIS.

Al purificar las fracciones enzimáticas obtenidas de una cepa aislada de residuos de agave, dichas fracciones presentarán actividad hidrolítica sobre inulina.

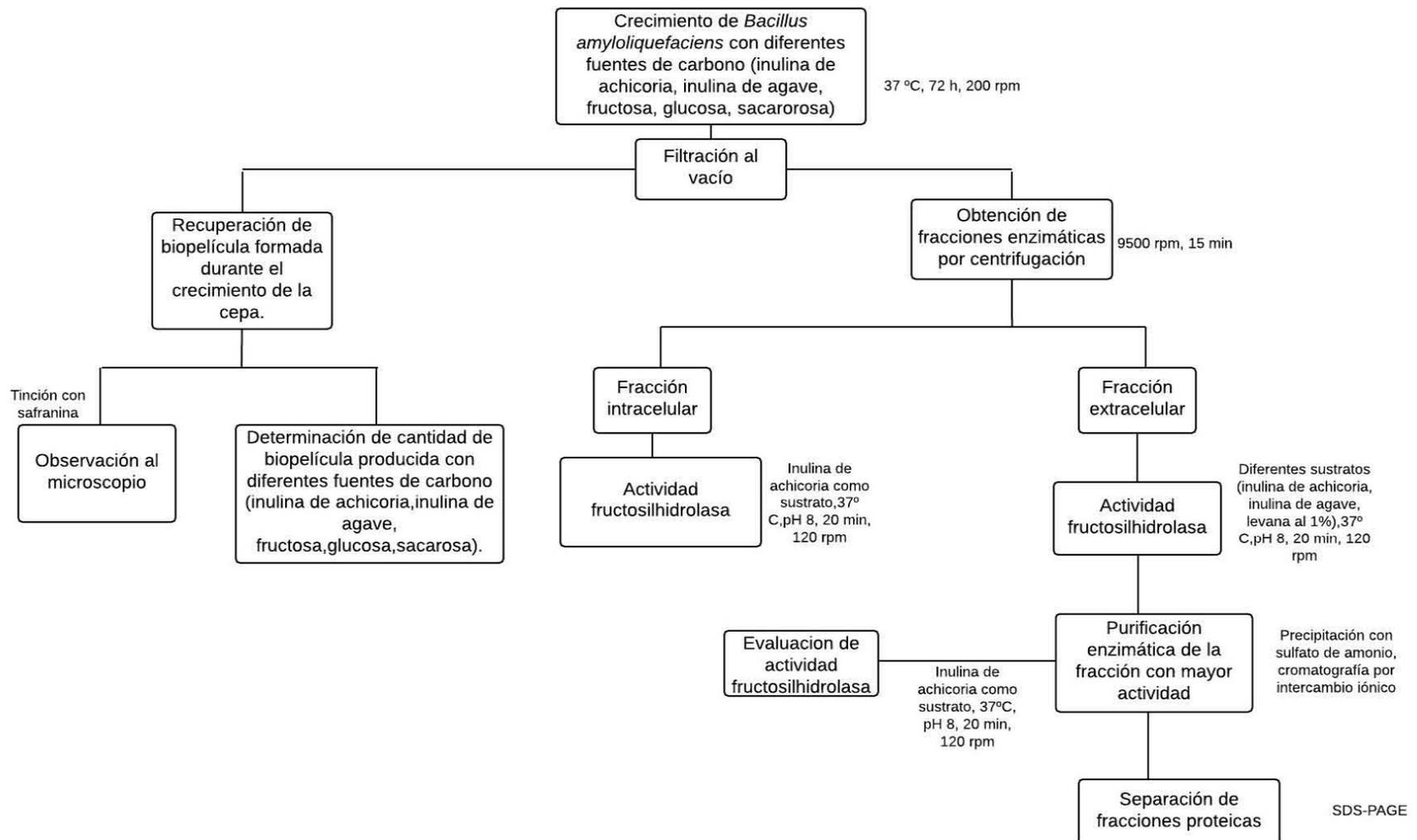
6. OBJETIVOS.

6.1. Objetivo general.

Obtener las mejores condiciones de producción de la inulinasa y su purificación parcial para su caracterización.

6.2. Objetivos particulares.

- ❖ Obtener y aislar fracciones enzimáticas intra y extracelulares de una cepa aislada de residuos de agave.
- ❖ Purificar y caracterizar la fracción extracelular obtenida, para evaluar la actividad inulinolítica.
- ❖ Identificar la biopelícula formada durante el crecimiento de la cepa aislada de los residuos de agave.



7. METODOLOGÍA.

Figura 3. Diagrama de flujo del proceso experimental.

7.1. Crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* (GeP12).

Se realizó el crecimiento de la cepa aislada (GeP12) de residuos de agave, conservada en glicerol a -80°C en un ultra congelador. Para la activación de la cepa se realizó un pre-inóculo de 5 mL, el cual se incubo a 37°C, 120 rpm por 24 h.

7.1.1. Preparación del medio de cultivo.

Se llevó a cabo la preparación de los distintos medios de cultivo (tabla 6) para el crecimiento de *B. amylicuefaciens* GeP12. Los medios de cultivo con distintas fuentes de carbono se distribuyeron en matraces erlenmeyer de 200 mL para su posterior esterilización e inoculación.

Tabla 6. Composición de los diferentes medios de cultivo mínimos. Tomado de Robert R, (2013). (FOS: fructosiloligosacáridos).

	SUSTRATOS						Concentración % (m/V)
	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5	Medio 6	
Fuente de carbono	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Inulina de agave	Inulina de achicoria	FOS	0.5
Fuente de nitrógeno			Extracto de levadura				0.5
Amortiguador			Fosfato dipotásico				0.1
			Sulfato de magnesio				0.05
Sales			Cloruro de potasio				0.05
			Sulfato de amonio				0.1

Una vez preparado el medio y distribuido, se esterilizó el medio a 121 °C y 15 psi durante 15 min en una autoclave.

7.1.2. Inoculación e incubación de la cepa con diferentes fuentes de carbono.

Se realizó la activación de la cepa conservada en glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; para ello se tomó $100\text{ }\mu\text{L}$ de la cepa que se inocularon en 5 mL en los distintos medios de cultivo los cuales contenían distintas fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, inulina de agave, Inulina de achicoria, FOS), estos se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h a 120 rpm (Vargas G, 2015); después de obtener el pre-inóculo de cada medio se tomaron 5 mL y se inocularon los medios en un volumen de 100 mL , incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h a 120 rpm .

7.2. Obtención de fracciones enzimáticas.

Una vez crecida la cepa en los diferentes medios de cultivo, estos se filtraron al vacío para separar la biopelícula formada en cada uno de los matraces; después se centrifugaron cada uno de los medios a 9000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min (Centrifuga PrO-Research by Centurion scientific Lid). Se obtuvo una fracción enzimática extracelular (sobrenadante) y un pellet que se resuspendió para extraer la fracción intracelular mediante un proceso de sonicación (35% de amplitud, 1 KHz por 20 min). La fracción obtenida de este proceso se centrifugó a 9000 rpm a 4°C por 15 min (Centrifuga PrO-Research by Centurion scientific Lid).

7.3. Concentración de fracciones enzimáticas.

Cada fracción obtenida se concentró mediante liofilización ya que en trabajos previos (Pérez, 2016) se determinó que liofilizando la muestra se concentra y conserva su actividad.

7.4. Determinación de actividad enzimática.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad enzimática se consideraron las condiciones que se establecieron en trabajos previos (Pérez, 2016) se determinaron las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción enzimática ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min , la reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM , $\text{pH}=8$), las cuales se utilizaron para llevar a cabo las reacciones enzimáticas probando diferentes sustratos como agavina, inulina de achicoria, y levana al 1% .

Para ello se colocó en microtubos 500 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM pH7 y 500 μ L del sustrato con el que se llevaría a cabo la reacción (agavina, achicoria, levana al 1%) esto como controles negativos, a su vez se colocó otro control negativo para la enzima para el cual se colocó en un microtubo 500 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM pH7 y 500 μ L de la enzima (inulinasa).

Para la muestra se colocaron 500 μ L de muestra y 500 μ L del sustrato (agavina, achicoria, levana al 1%). La reacción enzimática se realizó en un termomixer (AG 22331) a 37°C por 20 min.

7.4.1. Determinación de carbohidratos reductores por el método DNS (ácido 3,5 di nitro salicílico).

La evaluación de la actividad enzimática de cada una de las fracciones se llevó a cabo mediante la determinación de azúcares reductores por el método de DNS (ácido 3,5 di nitro salicílico); (Miller, G, L ,1959); para ello se tomaron 100 μ L de muestra, 200 μ L de amortiguador de acetatos (20 mM, pH 5.5) y 600 μ L de reactivo de DNS, y se sometió a calentamiento de 90°C durante 5 min en un baño de glicerina (RCT basic safety control, IKA; ETS-D4 fuzzy, IKA), sometiendo así a la reacción, logrando que se observara un cambio de color. Trascurrido el tiempo de reacción se colocaron las muestras en hielo para detener la reacción.

Para determinar cuantitativamente se realizó la medición de la muestra a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s Uv-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific) frente a un blanco de reactivos. Los azúcares reductores se determinaron interpolando los valores obtenidos de absorbancia en una curva patrón preparada con fructosa.

7.4.2. Determinación de carbohidratos por cromatografía de capa fina (CCF).

Para determinar los productos de reacción de manera cualitativa se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (Peña C **et al**, 2015). Para ello se colocaron 3 μL de muestra en una placa cromatográfica (CCF silica gel 60 F₂₅₄, Millipore). Una vez seca la placa se introdujo en una cámara de elución con una fase móvil de etanol-butanol-agua (15:9:6). Una vez que la placa estuvo seca se llevó a cabo el revelado con una solución de H₂SO₄ al 5% y 10 mg/mL de orcinol), la cual fue dispersada sobre la placa para posteriormente calentar la placa en una parrilla a 90°C hasta revelarse.

7.4.3. Determinación del contenido de proteína.

El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se tomaron 100 μL de solución de la muestra, 800 μL de agua destilada y 200 μL de reactivo de Bradford; la reacción homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se llevó a cabo la medición de la muestra a una absorbancia de 595 nm frente a un blanco de reactivos en un espectrofotómetro (Genesys 10s Uv-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific). La cuantificación de proteínas de cada una de las muestras se realizó mediante la interpolación de los datos obtenidos de absorbancia en una curva patrón de BSA (albúmina bovina sérica por sus siglas en inglés).

7.5. Purificación de la inulinasa extracelular.

Al observar los resultados de la evaluación de actividad y determinar cual es el mejor medio de crecimiento, así como el mejor sustrato para llevar a cabo la reacción, se decidió crecer el microorganismo en un medio de cultivo mínimo con inulina de agave como fuente de carbono para realizar la purificación de la inulinasa extracelular.

7.5.1. Crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* para la purificación de la inulinasa extracelular.

Para realizar la purificación de la inulinasa se llevó a cabo el crecimiento de *B. amyloliquefaciens* en un volumen mayor, para ello se inocularon 100 μ L de la cepa conservada en glicerol a -80°C en un pre-inóculo de 15 mL de medio mínimo incubando a 37°C durante 24 h a 120 rpm; después de obtener el pre-inóculo se tomaron 10 mL y se inoculó en un medio con volumen de 1000 mL, incubando a 37°C durante 48 h a 120 rpm.

7.5.2. Obtención de la fracción enzimática extracelular.

El medio de cultivo con crecimiento de la cepa se centrifugó a 9000 rpm a 4°C por 15 min, obteniendo así la fracción extracelular.

7.5.3. Concentración de la inulinasa y primer paso de la purificación.

La proteína en el sobrenadante obtenido se concentró mediante la saturación a 80% de sulfato de amonio (561 g/L) en un baño de hielo; una vez disueltas las sales en el sobrenadante, se centrifugó a 9500 rpm a 4°C por 20 min obteniendo así la fracción proteica en el pellet. EL pellet se disolvió en 15 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.

Se realizó una diálisis en donde se adicionaron los 15 mL de muestra a una membrana previamente lavada; la diálisis se llevó a cabo durante 48 h a 4°C en agitación realizando cambios continuos de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8 para la eliminación de sales. La muestra obtenida se concentró mediante la liofilización de la muestra. Al liofilizado se le realizó una prueba de actividad utilizando como sustrato inulina de achicoria al 1% bajo las condiciones previamente descritas.

7.6. Purificación de la inulinasa extracelular por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por filtración en gel.

La muestra dializada se introdujo en una columna de intercambio aniónico DEAE Sepharose Fast Flow de 1 mL utilizando como fase móvil amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8. Se inyectó 0.5 mL de muestra previamente filtrada (Millex. Syringe.driven Frilter unit 0.45 μ m) a un flujo de 0.5 mL/min en un FPLC ÄKTA Purifier G.E. La columna se equilibró con 3 volúmenes de amortiguador de fosfatos 50 mM pH8. Para la separación se inyectó 2.5 volúmenes del loop de la fase móvil con la muestra; durante este proceso se mantuvo un flujo constante de fase móvil. Al terminar este lavado se generó un gradiente lineal salino de 0 a 2 M de NaCl; de manera que pudieran ser recolectadas las fracciones que fueron desprendidas de la columna en un recolector ÄKTA 900. Cada fracción recolectada contenía 0.5 mL de la fase móvil. Para el análisis de la muestra se utilizó un detector de UV a una longitud de onda de 280 nm. Para finalizar se lavó la columna con 3 volúmenes de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8. Se guardó la columna en etanol al 20% para su posterior uso.

Para llevar a cabo la purificación por filtración en gel se inyectaron 0.5 mL de la muestra de enzima dializada en una columna Superdex 200 de 24 mL de volumen; la purificación de la enzima se realizó bajo las siguientes condiciones: flujo 0.5 mL/min; con una fase móvil de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2 y NaCl 500 mM; esta técnica no solo permitió purificar a la enzima, además se pudo determinar el peso molecular de la enzima.

7.7. Caracterización de fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por filtración en gel.

Con cada una de las fracciones obtenidas de los dos métodos cromatográficos se realizaron pruebas de actividad enzimática bajo las condiciones descritas previamente por Pérez (Pérez, 2016) (37 °C, 20 min en amortiguador de fosfatos 0.05 mM, pH=8) utilizando inulina de achicoria al 1% como sustrato; la evaluación de actividad de cada una de las fracciones se llevó a cabo mediante la determinación de azúcares reductores por el método de DNS (ácido 3,5 di nitro salicílico); (Miller G. L., 1959), así como por cromatografía en capa fina (CCF) (Abbott D. y Andrews R. S, 1970). El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

7.8. Separación de fracciones proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por separación en un campo eléctrico. Esta técnica se utilizó para determinar la pureza de la proteína en el sobrenadante y en las fracciones obtenidas de la columna de intercambio y filtración en gel; para ello se realizó una electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se llevó a cabo utilizando geles al 10% de poliacrilamida, siguiendo la metodología reportada por Laemmli (tabla 7) (Laemmli, 1970). Los geles fueron preparados con 1.5 mm de espesor como se muestra en la tabla 7, utilizando un kit para electroforesis vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell System, BIO-RAD). Una vez preparados los geles se cargó un volumen de 25 µL de muestra la cual contenía 30 µL de la dilución de la muestra liofilizada y 30 µL de amortiguador de corrida; la cual fue sometida a calentamiento 95 °C para desnaturalizar a las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 volts. Una vez terminada la electroforesis se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 al 0.1% en 50% de metanol y 10% de ácido acético durante 1 h a temperatura ambiente. El gel fue desteñado con una solución de metanol: ácido acético: agua (5:5:1). El peso molecular fue estimado comparando con un

marcador de peso molecular (ColorBurst Electrophoresis Marker M.W. 8,000-220,000. SIGMA).

Tabla 7. Preparación del gel de poliacrilamida al 10% (m/v).

Reactivos	Gel concentrador	Gel separador
<i>Acrilamida (30%)+bis acrilamida (0.8%)</i>	2.04 mL	5 mL
<i>Amortiguador 4x (Tris 0.5 M pH6.8)</i>	3.75 mL	3.9 mL
<i>H₂O desionizada</i>	9.12 mL	6.02 mL
<i>Persulfato de amonio (10%)</i>	50 µL	50 µL
<i>TEMED</i>	20 µL	20 µL

La actividad inulinolítica específica se definió como los µmol de fructosa producidos por la hidrólisis enzimática por mg de proteína, por minuto (µmolfru/mgprot*min). La actividad enzimática se calculó de la siguiente manera:

$$\left(\frac{"X"mg\ de\ Fru}{mL}\right)\left(\frac{1mL}{"Y"mg\ de\ fracción\ celular\ liofilizada}\right)\left(\frac{mg\ de\ fracción\ liofilizada}{"Z"mg\ de\ proteína}\right)\left(\frac{1}{20min}\right)$$

$$\left(\frac{1mmol\ de\ Fru}{180.16\ mg\ de\ Fru}\right)\left(\frac{1000\mu mol}{mmol}\right) = \frac{\mu mol\ de\ Fru}{mg\ de\ proteína \cdot min} = \frac{U}{mg\ de\ proteína}$$

7.9. Análisis estadístico.

Los datos de la actividad enzimática se expresaron como el promedio ± DE (desviación estándar). La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por la prueba de t de Student. Un valor P ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de proteína en la fracción extracelular de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La cepa de trabajo para la obtención de las fracciones celulares, fue previamente identificada y caracterizada por Pérez en el 2016. Esta cepa se identificó con un 99.9% de identidad como *Bacillus amyloliquefaciens* GeP12. Así mismo Pérez estableció las mejores condiciones de reacción de los extractos celulares (Pérez, 2016).

En este trabajo se estudió el efecto que tienen las diferentes fuentes de carbono (agavina, inulina de achicoria, glucosa, FOS, fructosa y sacarosa) sobre la actividad enzimática de las inulinasas producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* GeP12. A la fracción extracelular se le determinó el contenido de proteína, por lo que se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (figura 4). En la tabla 8 se muestra la concentración de proteína para cada una de las muestras, en donde se puede observar que el contenido de proteína para cada una es similar; para aseverar esto se realizó una prueba t de Student, después de la cual se concluyó que no existe diferencia significativa entre la cantidad de proteína de cada una de las muestras con diferentes fuentes de carbono; por lo que se puede decir que el tipo de fuente de carbono no influye en el contenido de proteína, pero podría influir en la actividad enzimática.

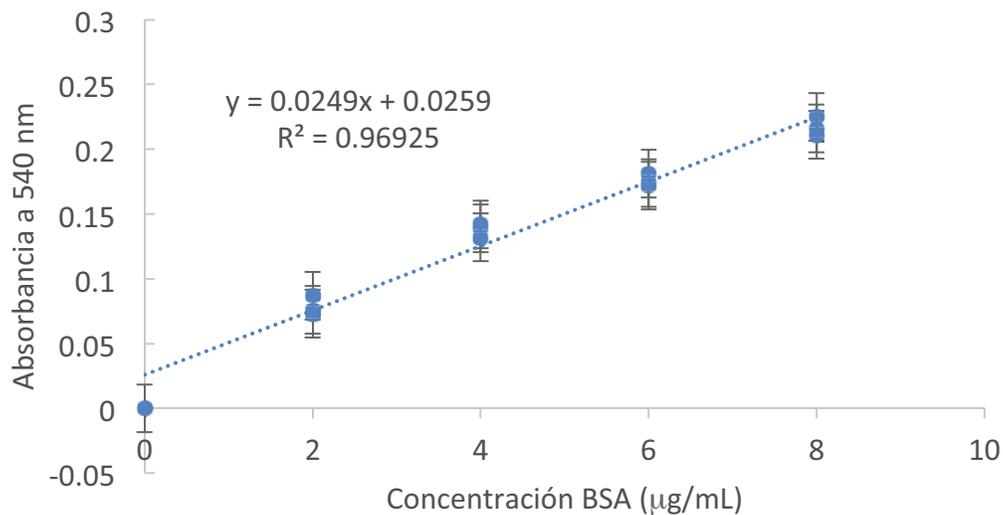


Figura 4. Curva patrón de BSA (albúmina bovina sérica) para determinación de la concentración de proteína llevada a cabo por el método de Bradford (Bradford,1976). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

Tabla 8. Concentración de proteína en la fracción extracelular proveniente de *Bacillus amylolicuefaciens* crecida con diferente fuente de carbono después de 48h de incubación.

*FOS (fructosiloligosacáridos).

Sobrenadante	Absorbancia	Concentración de proteína (mg prot/mL)	Desviación estándar (+/-)
<i>Glucosa</i>	0.245	8.7992	0.227
<i>Fructosa</i>	0.264	9.5622	0.312
<i>Sacarosa</i>	0.241	8.6386	0.199
<i>Inulina de agave</i>	0.262	9.4819	0.085
<i>Inulina de achicoria</i>	0.245	8.7992	0.341
<i>FOS *</i>	0.253	9.1205	0.312

8.2. Efecto de la fuente de carbono y del sustrato sobre la actividad enzimática de la inulinasas de *B.amylolicuefaciens*.

Posteriormente se evaluó la actividad hidrolítica de los extractos celulares obtenidos de los medios con diferentes fuentes de carbono. La actividad de los extractos se determinó empleando diferentes sustratos al 1% m/v (agavina, inulina de achicoria y levana). La reacción se llevó a cabo a dos diferentes tiempos 20 min y 6 h, esto con la finalidad de observar un consumo total del sustrato (figuras 6 y 7). La cantidad de azúcares reductores productos de la reacción, que presumiblemente es fructosa, se cuantificó mediante el método de DNS, para lo cual se elaboró una curva patrón de fructosa (figura 5). Así mismo se evaluó mediante la técnica de cromatografía de capa fina la presencia de fructosa u oligosacáridos productos de la reacción.

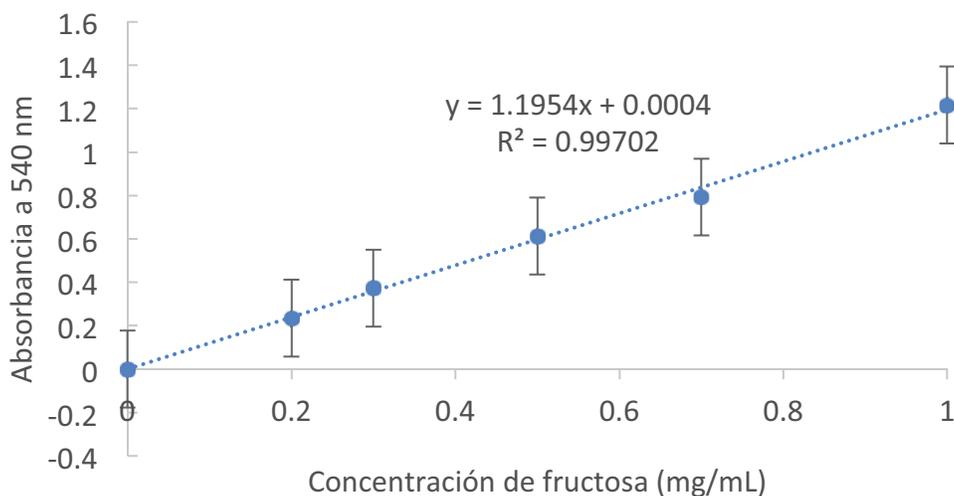


Figura 5. Curva patrón de fructosa para la det

erminación del contenido de azúcares reductores por el método de DNS. Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

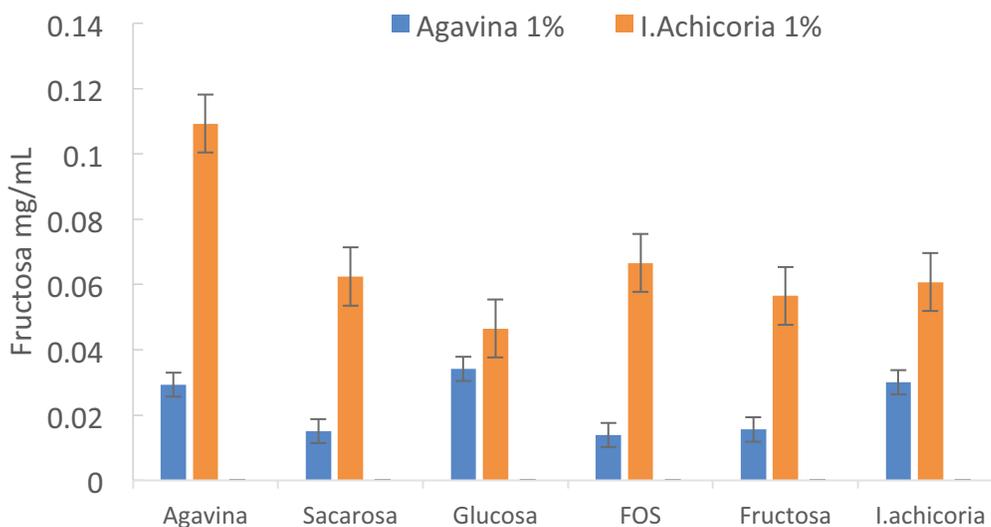


Figura 6. Hidrólisis de la agavina y la inulina de achicoria (1% m/v) catalizada por la inulinasa de *B. amyloliquefaciens*, crecida en diferentes fuentes de carbono. La reacción se llevó a cabo por 20 min a 37°C, pH=8. (FOS: fructosiloligosacáridos, Fru: fructosa, I.achicoria: Inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. $P < 0.05$ para los sustratos.

En la figura 6 se pueden observar los resultados obtenidos del contenido de azúcares reductores generados al llevar a cabo la hidrólisis de los diferentes sustratos (agavina, inulina de achicoria y levana); observando que la agavina e inulina de achicoria son los sustratos en los cuales se presenta actividad fructosilhidrolasa, mientras que no se detectó actividad alguna al utilizar levana como sustrato durante la reacción de 20 min.

Así mismo se observa que el extracto celular proveniente del medio con agavina presenta mayor actividad con la inulina de achicoria como sustrato frente a los demás extractos celulares; para aseverar esto se realizó una prueba t de Student, después de la cual se concluyó que existe diferencia significativa entre la actividad enzimática determinada con inulina de achicoria y la actividad determinada con agavina. Es por ello que es importante notar que el mejor sustrato es la inulina de achicoria, ya que está presenta una estructura lineal con enlaces β -(2-1) mientras que la inulina de agave presenta enlaces β -(2-1) y β -(2-6) con una estructura ramificada (López y Mancilla, 2007).

A las 6 h de reacción, como era de esperarse, se observa un incremento en el contenido de fructosa producido por la reacción (figura 7). Además, es importante notar que los extractos provenientes de los medios con glucosa, FOS e Inulina de achicoria, presentan actividad hidrolítica sobre la levana. Esto nos lleva a suponer que la enzima predominante en el extracto es una exoinulinasa ya que tiene preferencia por hidrolizar los enlaces β -(2-1) de la inulina que son los que conforman a la inulina de achicoria. Sin embargo, a este tiempo de reacción la actividad levanasasa (hidrólisis de los enlaces β -(2-6)) se hace presente.

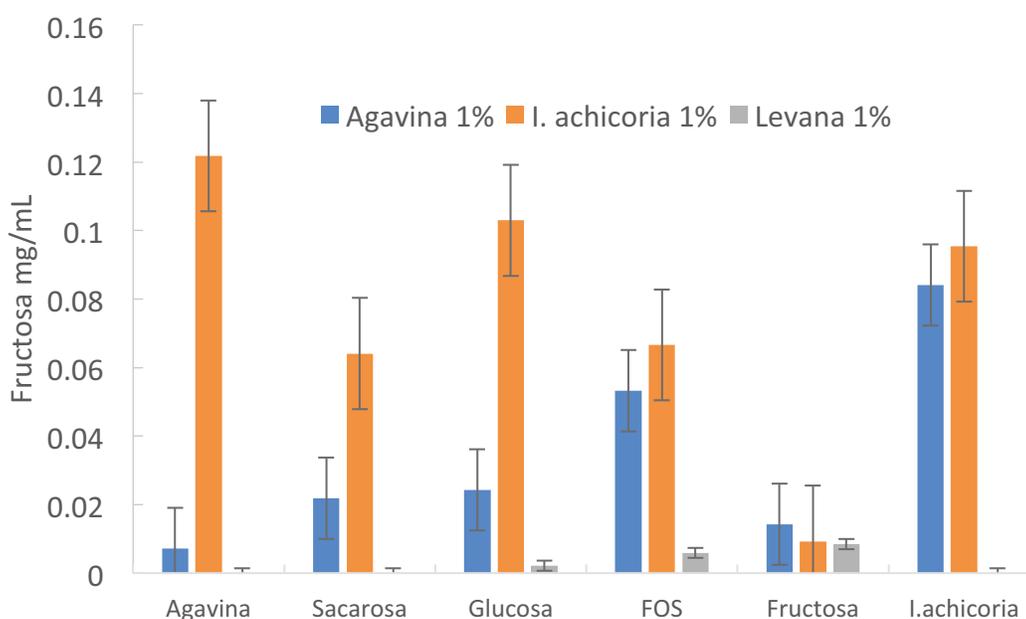


Figura 7. Hidrólisis de la agavina, la inulina de achicoria y la levana (1% m/v) catalizada por la inulinasa de *B. amyloliquefaciens*, crecida en diferentes fuentes de carbono. La reacción se llevó a cabo por 6 h a 37°C, pH=8. (FOS: fructosiloligosacáridos, Fru: fructosa, I.achicoria: Inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. $P < 0.05$ para los sustratos.

Para identificar los productos de la hidrólisis enzimática se realizó una CCF (figura 8), la reacción se llevó a cabo por 20 minutos en presencia de inulina de achicoria, que fue el sustrato con el que se observó una mayor actividad en cada uno de los diferentes extractos celulares. Como se puede observar en la cromatoplaca, las reacciones con los extractos provenientes de los diferentes medios de cultivo,

presentaron actividad, observándose señales de fructosa y probablemente disacáridos; en la figura 9 se muestran los controles de los posibles productos.

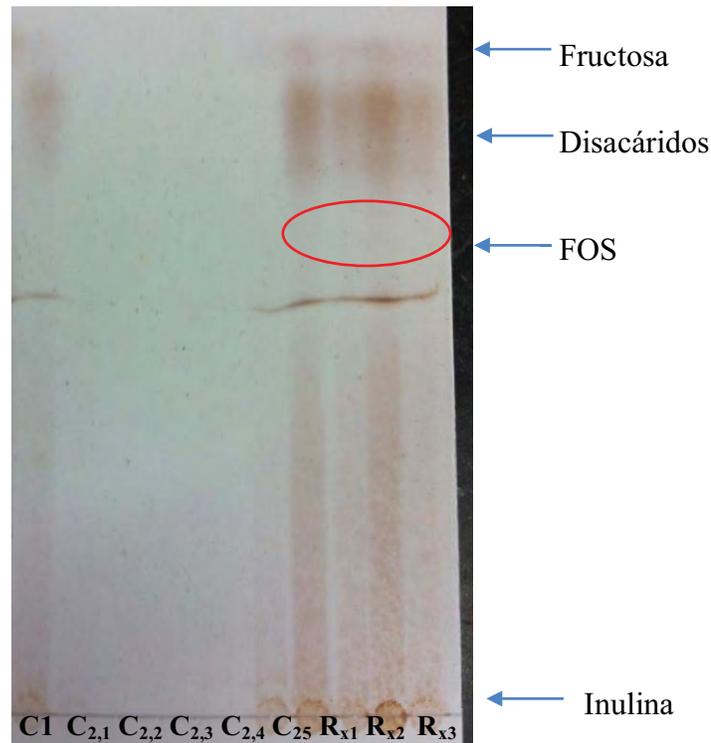


Figura 8. Identificación de los productos de la reacción de hidrólisis de la inulina de achicoria catalizada por la inulinasa de *B. amyloliquefaciens*. La reacción se llevó a cabo a una concentración de sustrato de 5% (m/v) a 37°C, pH=8, durante 20 min. (Control del sustrato (C1): Inulina de achicoria; Control de enzima (C2,1): medio con agavina; Control de enzima (C2,2): medio con sacarosa; Control de enzima (C2,3): medio con glucosa; Control de enzima (C2,4): medio con FOS; Control de enzima (C2,5): medio con fructosa. Reacción medio con agavina + sustrato (Rx1); Reacción medio con sacarosa + sustrato (Rx2); Reacción medio con glucosa + sustrato (Rx3); Reacción medio con FOS + sustrato (Rx4); Reacción medio con fructosa + sustrato (Rx5)).

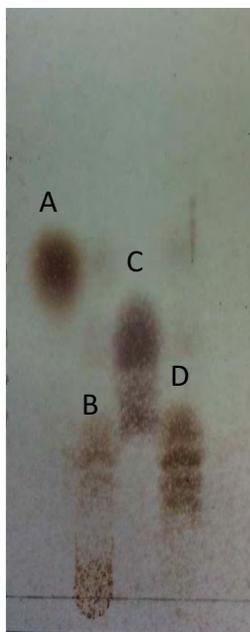


Figura 9. Control de posibles productos que podrían formarse después de la hidrólisis enzimática de la inulina de achicoria. A: fructosa, B: inulina de achicoria, C: sacarosa, D: fructosiloligosacáridos (FOS).

8.3. Determinación de la actividad enzimática de la fracción intracelular de *B. amyloliquefaciens*.

Una vez realizado el estudio de la actividad enzimática de la fracción extracelular de *Bacillus amyloliquefaciens*, se analizó si la fracción intracelular de este microorganismo mostraba actividad frente a los diferentes sustratos (agavina, inulina de achicoria y levana). Para llevar a cabo este estudio, al igual que el anterior, se utilizó para el crecimiento de la cepa a la agavina como fuente de carbono. El contenido de proteína fue determinado por el método de Bradford, obteniendo una concentración de proteína en la fracción intracelular de 12.253 mg proteína/mL.

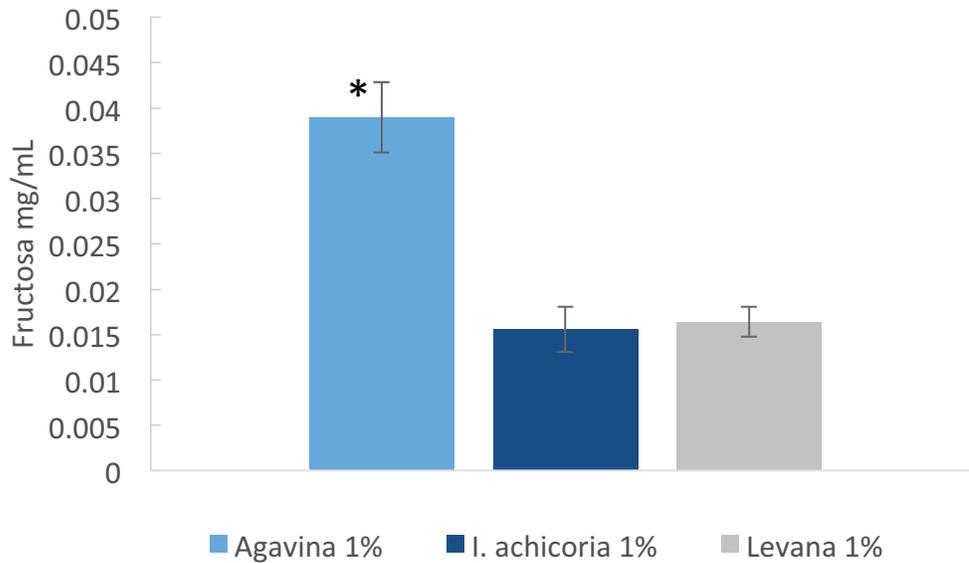


Figura 10. Hidrólisis de la agavina, la inulina de achicoria y la levana (1% m/v) catalizada por la inulinasa intracelular de *B. amyloliquefaciens*. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (I. achicoria: inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de dos experimentos independientes.* $p < 0.05$ vs inulina de achicoria.

Después de llevar a cabo la reacción por 20 minutos se observa que la fracción intracelular también presenta actividad (figura 10), siendo la agavina el sustrato en el cual se presenta la mayor actividad. De igual manera podemos ver que también muestra actividad, aunque en menor proporción con levana. En los resultados mostrados anteriormente se observó que de las dos fracciones enzimáticas obtenidas (fracción extra e intracelular provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens*) la fracción extracelular es la fracción que muestra mayor actividad (1 orden de magnitud, esto se puede observar al comparar las figuras 7 y 10).

8.4. Purificación de la inulinasa presente en la fracción extracelular de *B. amyloliquefaciens*.

8.4.1. Aislamiento y concentración de la inulinasa de *B. amyloliquefaciens*.

Para realizar la purificación de la proteína se llevó a cabo el crecimiento de *B. Amyloliquefaciens* GeP12 en un medio mínimo utilizando a la inulina de agave como fuente de carbono. Para concentrar a la proteína anteriormente se liofilizaba la muestra, pero debido al volumen que se manejó, se decidió realizar la precipitación con sulfato de amonio (saturación al 80%). Para ello se realizaron pruebas con dos concentraciones diferentes (50 y 80% de sulfato de amonio) para determinar a qué concentración las proteínas precipitaban y estas conservaban su actividad, obteniendo una actividad del 1.357 U/mg con el 50% y de 5.178 U/mg al 80% de concentración de sulfato de amonio.

Se obtuvo un concentrado de proteínas extracelulares después de la precipitación con sales; a esta fracción obtenida (pellet) después de centrifugar la muestra se le realizó una prueba de actividad a las condiciones previamente establecidas (37°C, 20 min, 120 rpm, amortiguador de fosfatos 50 mM pH=8, inulina de achicoria 1%) con una concentración de proteína 10 µg/mL. Al precipitar a las proteínas con sulfato de amonio no solo nos permitió concentrarlas, sino que, además nos permitió realizar un primer paso para poder purificar a la proteína de interés.

8.4.2. Purificación de la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* por cromatografía de intercambio aniónico.

Posterior a la precipitación con sulfato de amonio y a la diálisis de la muestra; se inició un proceso de purificación de alta resolución empleando cromatografía de intercambio iónico. Se introdujeron 0.5 mL de muestra en una columna con una fase estacionaria de intercambio aniónico puesto que se desconoce el punto isoeléctrico de la inulinasa, en la literatura se ha reportado que, por ejemplo, la inulinasa proveniente de *Kluyveromyces marxianus* tiene un punto isoeléctrico de 4.60 (Campos **et al**, 1992) y ha sido purificada por intercambio aniónico.

En la figura 11 se puede observar el cromatograma obtenido durante la purificación de la enzima; en este se muestran tres señales a las que se denominaron fracciones 4, 7, 23 y 27, la fracción 4 y 7 tienen las señales más altas con respecto a las demás, y presentan actividad hidrolítica frente a la inulina de achicoria (figura 12); de igual forma se observa que la fracción 4 obtenida es la que muestra mayor concentración de azúcares reductores y por tanto es la que posee mayor actividad. Las señales de las fracciones 4 y 7 corresponden a las fracciones de proteínas que no se unieron a la matriz; por lo que se puede decir que la cromatografía por intercambio catiónico podría ser la mejor técnica a utilizar para purificar a la proteína, esto nos lleva a pensar que el punto isoeléctrico de esta enzima es diferente al reportado para la inulinasa de *K. marxianus*. Además, es importante notar que la o las proteínas presentes en la fracción 7 eluyen casi al mismo tiempo que la proteína de interés, lo que nos lleva a tener una mezcla de proteínas en lugar de la inulinasa. Esto se puede corroborar en el gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 13), donde observamos que logramos purificar parcialmente a la proteína eliminando proteínas de bajo y alto peso molecular (menores a 20 y mayores a 50 kDa).

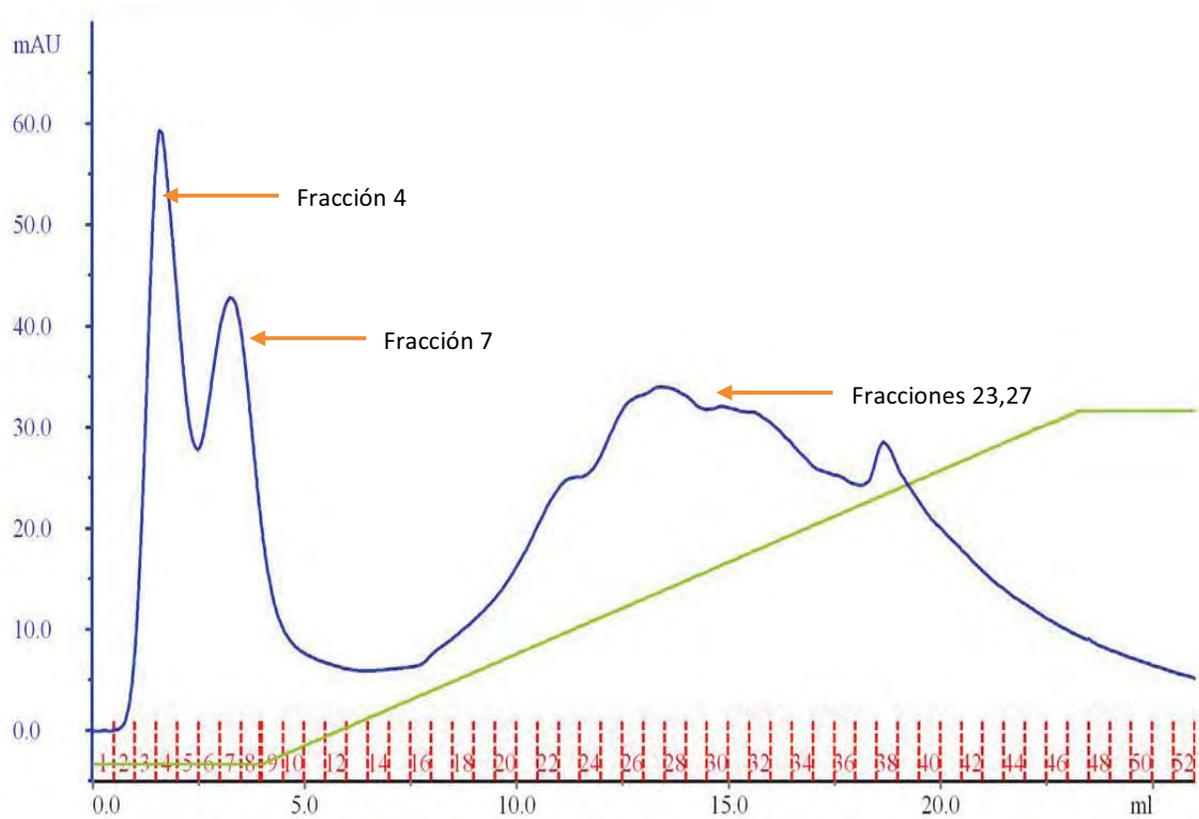


Figura 11. Cromatograma de la purificación por intercambio iónico. (— UV; — gradiente lineal salino de NaCl de 0 a 2M; - - - Fracciones).

En la figura 12 podemos observar la actividad enzimática de las diferentes fracciones obtenidas que se quedaron retenidas en la columna y que se eluyeron con un gradiente de concentración de NaCl (0 M a 2 M).

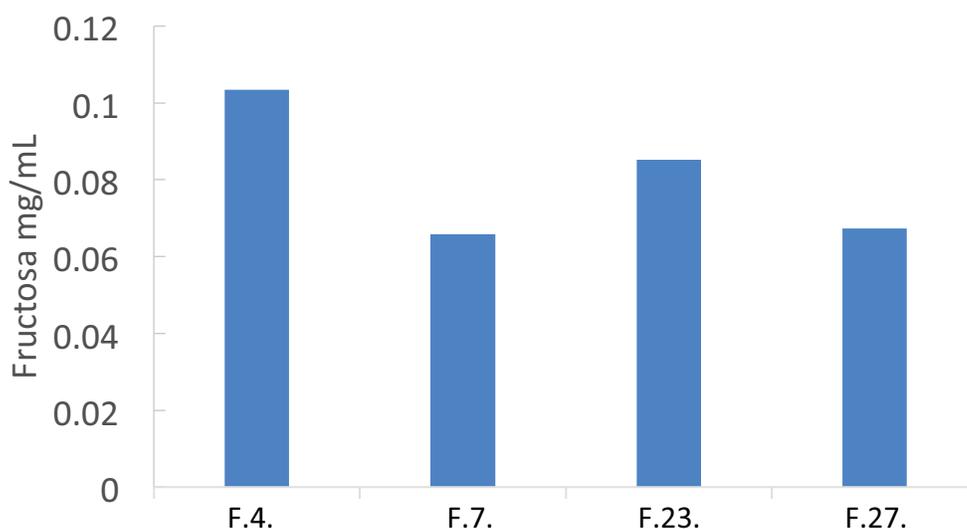


Figura 12. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico, de la fracción extracelular de *B.amyloliquefaciens*. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (F.4.: Fracción 4, F.7. Fracción 7, F.23. Fracción 23, F.27: Fracción 27).

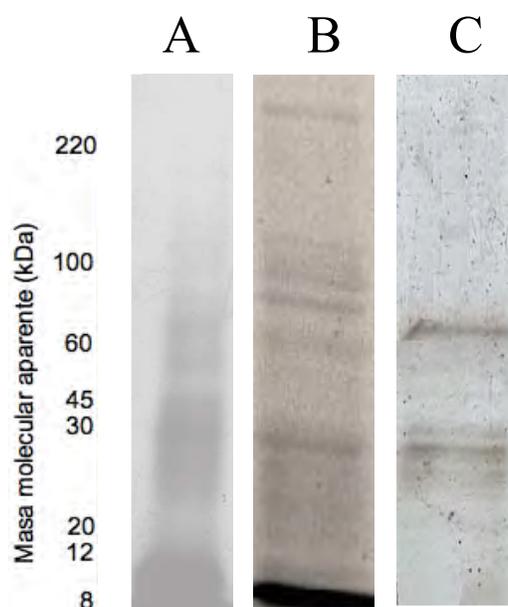


Figura 13. Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del crecimiento de la cepa *B.amyloliquefaciens*, donde A: marcador del peso molecular (ColorBurst Electrophoresis MArker M.W. 8,000-220,000 Da, SIGMA), B: Fracción extracelular, “C” Fracciones proteicas parcialmente purificadas por cromatografía por intercambio iónico.

Con el fin de analizar cada uno de los pasos que se llevaron a cabo durante la purificación se construyó una tabla de purificación (tabla 9), en esta tabla se muestra que la actividad inulinolítica específica fue de 7.061 U/mg; que en comparación con la reportada en trabajos anteriores (Pérez, 2016) en donde se obtuvo una actividad específica máxima del extracto celular de 7.14 U/mg, nos indica que no se logró incrementar la actividad específica en esta purificación de la proteína y que este paso no es el adecuado.

Tabla 9. Tabla de purificación por intercambio iónico de la inulinasa proveniente de la fracción extracelular de *Bacillus amylolicufaciens*. (U= μmol de fructosa/min).

<i>Paso de purificación</i>	<i>Volumen (mL)</i>	<i>Proteína (mg/mL)</i>	<i>Actividad Volumétrica (U/mL)</i>	<i>Actividad total (U)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Actividad específica total (U/mgprot)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Grado de pureza</i>
<i>Extracto crudo</i>	1000.000	0.010	0.066	66.446	9.904	6.709	100.000	1.000
<i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	15.000	0.021	0.101	1.509	0.310	4.862	2.270	0.725
<i>Cromatografía de intercambio aniónico</i>	0.500	0.007	0.051	0.026	0.004	7.061	0.039	1.052

Para observar los productos de reacción de la hidrólisis de la inulina de achicoria de cada una de las fracciones obtenidas del intercambio iónico, se realizó una CCF (figura 14). En la cromatoplaqueta se puede notar que todas presentaron actividad observándose señales de fructosa y probablemente disacáridos; pero no se observa la presencia de FOS por lo que se puede decir que la enzima no presenta actividad endoinulinasa.

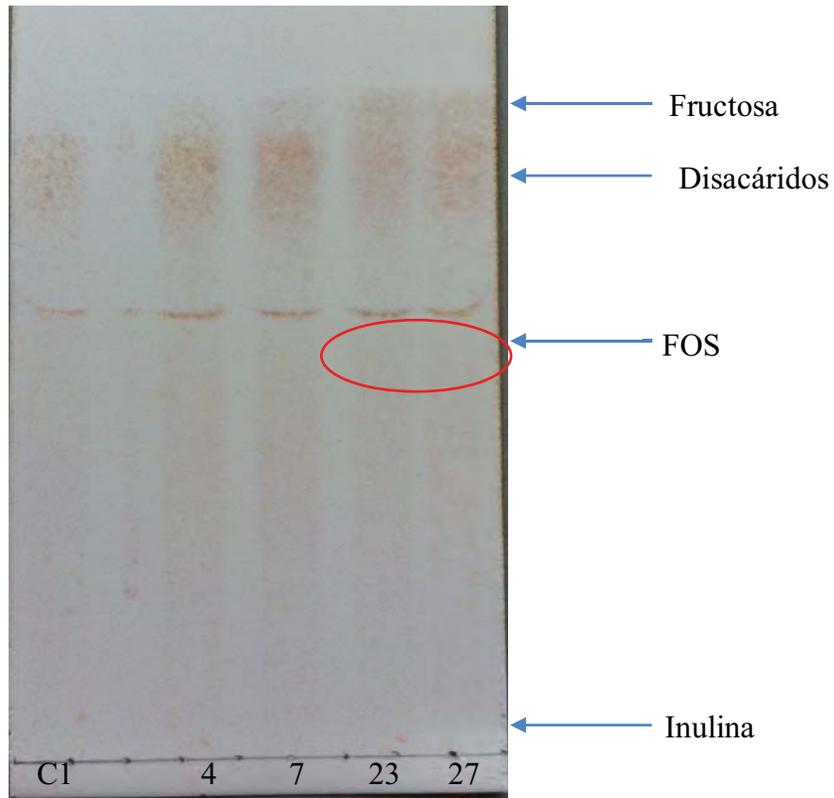


Figura 14. Identificación de los productos de la reacción de hidrólisis de la inulina de achicoria catalizada por la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* purificada por intercambio iónico. (Control del sustrato (C1): Inulina de achicoria; reacción de la fracción 4 (4): Fracción 4 + sustrato; reacción de la fracción 7 (7): Fracción 7 + sustrato; reacción de la fracción 23 (23): Fracción 23 + sustrato;) reacción de la fracción 27 (27): fracción 27 + sustrato).

8.4.3. Purificación de la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* por cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular).

Debido a que, al purificar la enzima por cromatografía de intercambio iónico, esta no se obtuvo pura, y a que se desconoce su punto isoeléctrico, se decidió aprovechar la propiedad de la masa molecular de la enzima, que se determinó por SDS-PAGE, para esto se realizó una cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna Superdex 200 para separar a la proteína de interés.

Al realizar la purificación se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 15, en el cual se muestra una señal (fracción 18) en la que se encontró a la inulinasa (figura 18). A su vez, con la información representada en este (volumen de elución eje X) y con ayuda de una curva patrón se determinó el peso molecular de la enzima de una manera cuantitativa.

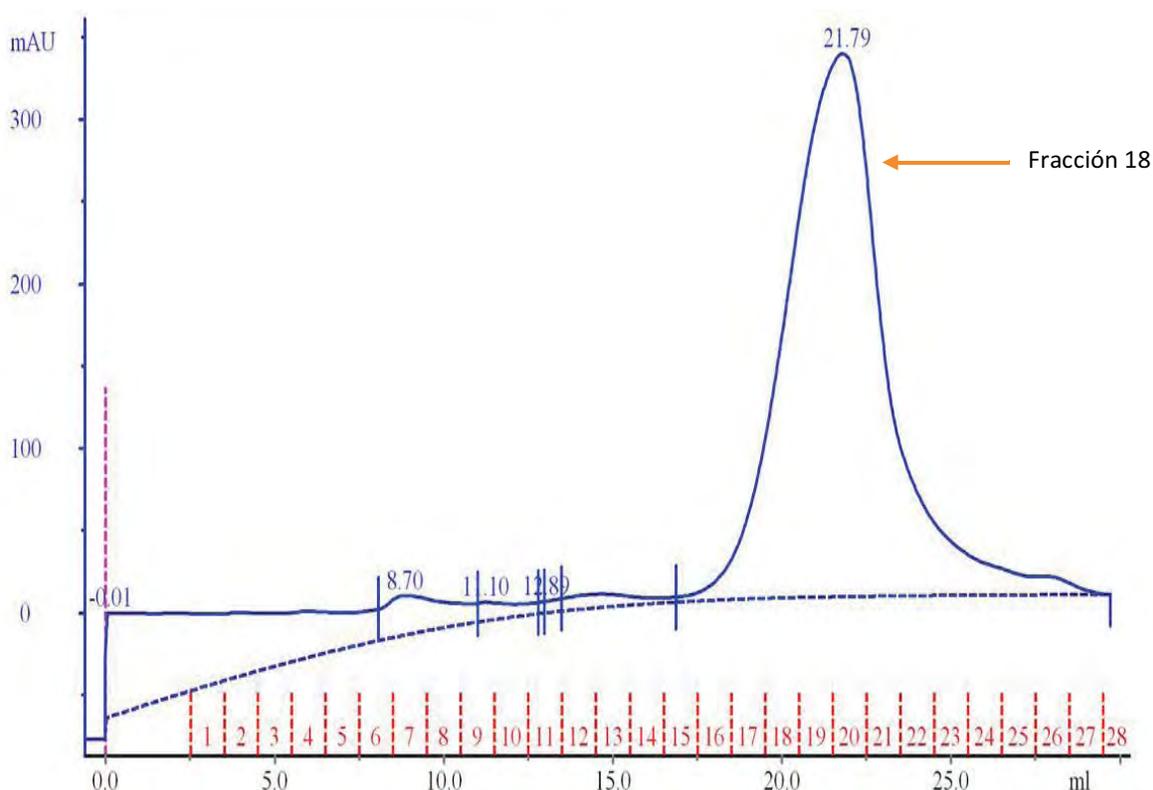


Figura 15. Cromatograma de purificación por cromatografía de filtración en gel. (— UV; --- Fracciones; - - - Inyección de la muestra).

Para determinar el peso molecular de la inulinasa se calibró la columna Superdex 200 con un kit de proteínas; dicha mezcla de proteínas, se solubilizaron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2 y se inyectó al cromatógrafo. Para calcular el valor de Ka (coeficiente de retención de la muestra en la columna), se utilizaron los volúmenes de elución y la siguiente fórmula.

$$\text{Coeficiente de retención (Ka)} = \frac{(\text{volumen muestra} - \text{volumen muerto})}{(\text{volumen total} - \text{volumen muerto})}$$

En donde:

Volumen muerto: volumen de elución del azul de dextrana.

Volumen total: volumen total de la columna (24 mL).

En la tabla 10 se muestran los valores de elución de cada estándar; así como el peso molecular de cada uno.

Tabla 10. Valores de elución y Ka (coeficiente de retención) de estándares para la columna por filtración en gel.

<i>Kit Biorad 151-1901 + azul de dextrana</i>			
<i>Muestras</i>	Peso molecular (kDa)	Volumen de elución (mL)	Ka
<i>Tiroglobulina (bovina)</i>	670	10.33	0.25
<i>gama-globulina (bovina)</i>	158	13.53	0.42
<i>Ovoalbimina (gallina)</i>	44	16.66	0.59
<i>Mioglobina (caballo)</i>	17	19.03	0.73
<i>Vitamina B12</i>	1.35	22.75	0.93
<i>Azul de dextrana</i>	2000	9.69	

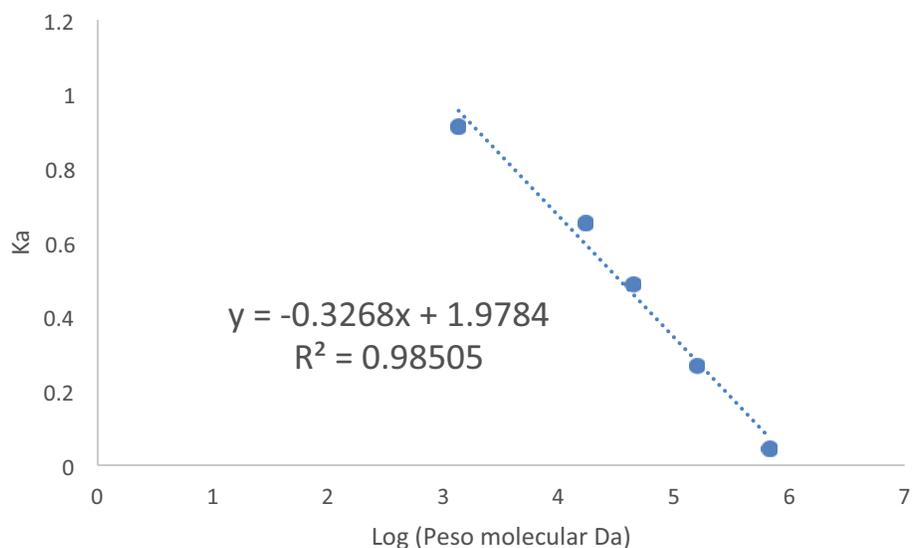


Figura 16. Curva de calibración de la columna Superdex 200.

Para determinar el peso molecular de la enzima de interés y con ayuda de los valores de la regresión lineal de la curva de calibración (figura 16) así como el volumen de elución de la muestra (21.79 mL), se calculó el peso molecular de la inulinasa, obteniéndose un valor de 32 kDa, el cual se puede comparar con el gel de poliacrilamida (figura 17), en el cual muestra que el monómero de la proteína pura tiene un peso molecular de alrededor de 30 kDa. Estos datos nos sugieren que contamos con una enzima monomérica. En el caso de inulasas provenientes de bacterias como *Streptococcus salivarius* su peso molecular es de alrededor de 85 kDa; mientras que para *Bacillus sp* el peso molecular es de 150 kDa (Brenda enzymes, 2018).

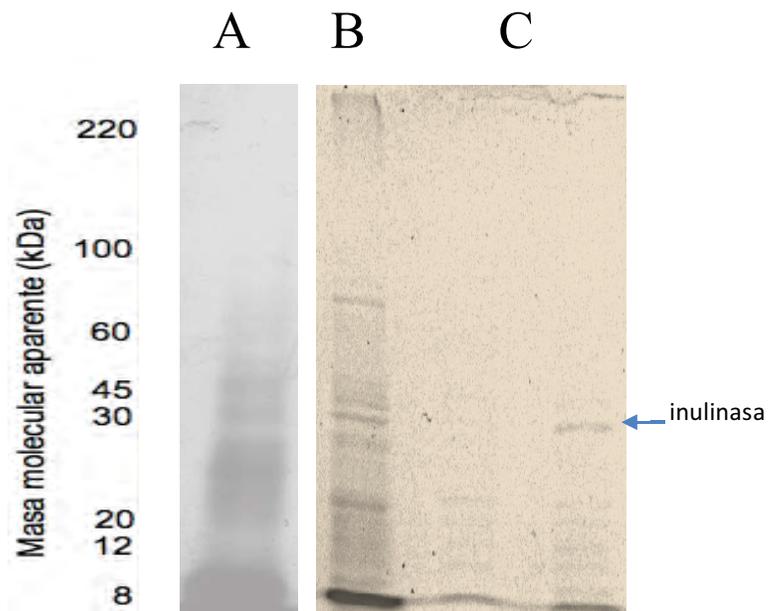


Figura 17. Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del crecimiento de la cepa *B.amyloliquefaciens*; donde A: marcador del peso molecular (ColorBurst Electrophoresis MArker M.W. 8,000-220,000 Da, SIGMA), B: Fracción extracelular, "C" Fracciones proteicas purificadas por cromatografía por filtración en gel (fracción 18).

De la señal que se muestra en el cromatograma (figura 15) se obtuvieron 6 distintas fracciones (17,18,19,20 y 21), de las cuales, la fracción 18 es la que mostró mayor actividad para producir azúcares reductores (figura 18), siendo esta fracción donde se encontró la proteína de interés.

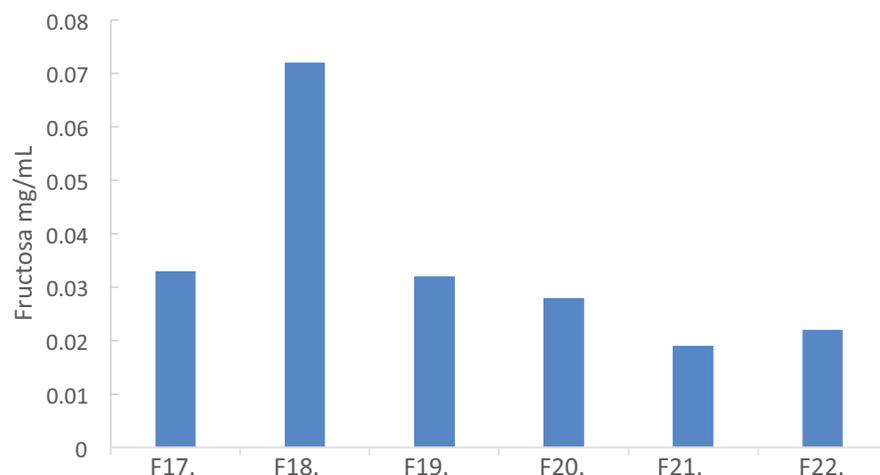


Figura 18. Concentración de fructosa obtenida después de la reacción de hidrólisis con las diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en filtración en gel, de la fracción extracelular de *B.amylolicuefaciens*. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, pH=8 por 20 min. (F.17.: fracción 17, F.18. fracción 18, F.19. fracción 19, F.20: fracción 20, F.21. fracción 21, F.22. fracción 22).

En la tabla 11 se muestra la tabla de purificación donde la actividad inulinolítica específica fue de 9.927 U/mg, esta actividad es mayor a la reportada en trabajos previos; por lo que se puede decir que la purificación usando filtración en gel es el mejor proceso para la purificación de la proteína, Sin embargo, la masa de la enzima de interés obtenida es muy poca (0.004 mg).

Tabla 11. Tabla de purificación por filtración en gel de la inulinasa proveniente de la fracción extracelular de *B. amylolicufaciens*. (U= μ mol de fructosa/min).

<i>Paso de purificación</i>	<i>Volumen (mL)</i>	<i>Proteína (mg/mL)</i>	<i>Actividad Volumétrica (U/mL)</i>	<i>Actividad total (U)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Actividad específica total (U/mgprot)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Grado de pureza</i>
<i>Extracto crudo</i>	1000.000	0.143	0.079	79.215	142.714	0.555	100.000	1.000
<i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	10.000	0.118	0.065	0.653	1.176	0.555	0.824	1.000
<i>Cromatografía por filtración en gel</i>	0.400	0.010	0.100	0.040	0.004	9.927	0.050	17.884

8.5. Biopelícula

Durante el crecimiento de *Bacillus amylolicuefaciens* se pudo observar la formación de una biopelícula (figura 19), por lo que se buscó determinar lo que era, así que se realizó una tinción con safranina y se observó al microscopio (figura 20), en donde se observó que se trataba de un material fibroso; debido a sus características se planteó la posibilidad de que fueran levanas, por lo que se realizó una reacción enzimática esperando ver actividad hidrolítica de la biopelícula, la cual resulto negativa.



Figura 19. Biopelícula formada durante el crecimiento de *Bacillus amylolicuefaciens*.



Figura 20. Observación al microscopio de

A su vez se planteó la posibilidad de saber si la fuente de carbono afectaba la producción de la biopelícula por lo que ésta se recuperó después del crecimiento de *B. amylolicuefaciens*. En la figura 21 se observa que, al utilizar inulina de agave como fuente de carbono, el contenido de biopelícula formada es mayor en comparación con sacarosa, glucosa o fructosa debido a que la inulina de agave es el medio en el cual el microorganismo fue extraído. De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 21 nos hace suponer que este compuesto se produce como un mecanismo de defensa del microorganismo a un estrés por sustrato. En un futuro es necesario caracterizar este biofilm, ya que la composición de este nos dará una idea de una posible aplicación.

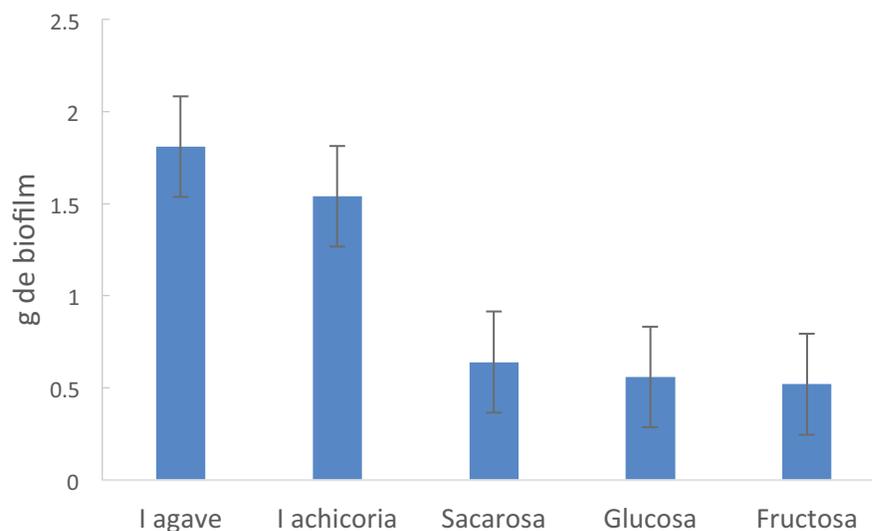


Figura 21. Contenido de biopelícula obtenida después del crecimiento de *B. amylolicuefaciens* con diferentes fuentes de carbono (agavina, inulina de achicoria, sacarosa, glucosa y fructosa); el crecimiento del microorganismo se realizó a 37°C por 48 h. (I agave: Inulina de agave, I achicoria: inulina de achicoria). Los resultados representan el promedio \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes

9. CONCLUSIONES.

La mejor fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo en estudio (*Bacillus amylolicuefaciens*), en donde se obtuvo una mejor actividad inulinolítica es la inulina de agave.

Se determinó que el mejor sustrato para realizar la actividad inulinolítica es inulina de achicoria debido que contiene unidades poliméricas menos complejas que la Inulina de agave, obteniendo como productos de reacción fructosa y dímeros.

Al purificar la fracción extracelular mediante diversas metodologías se logró obtener una purificación parcial de la proteína por intercambio iónico obteniendo con ello una actividad inulinolítica de 7.061 U/mg.

Por ello se realizó una purificación por filtración en gel resultando una actividad de 9.92 U/mg, y un peso molecular de 32 kDa.

De igual manera los productos obtenidos de las fracciones purificadas después de llevar a cabo la reacción fueron fructosa y posiblemente disacáridos, lo que indica que la enzima que se encuentra en la fracción extracelular es una exo-inulinasa (fructosilhidrolasa), ya que no se observa la formación de FOS como producto de la reacción.

Además, se realizó un pre- análisis de la biopelícula que se formó durante el crecimiento de *Bacillus amylolicuefaciens*, y se estableció que se trataba de un material fibroso; a su vez se puede concluir que la inulina de agave es el mejor sustrato para producir un alto contenido de biopelícula.

10. PERSPECTIVAS.

Determinación del punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque.

Caracterización cinética a la enzima (constante catalítica (Kcat), constante de Michaelis-Menten (Km), Velocidad máxima (Vmax)). Con la finalidad de conocer la afinidad que tiene por diferentes sustratos (agavina, inulina de achicoria, sacarosa y levana) y determinar qué tipo de hidrolasa es.

Evaluar la actividad hidrolítica de la inulinasa sobre la inulina de distintas especies de agave, para considerar un posible campo de aplicación ya que las diferentes especies de agave del país presentan patrones diversos de inulinas.

Caracterizar y determinar la composición química del biofilm producido durante el crecimiento de *B. amyloliquefaciens*.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Abott D. Andrews R.S. (1970). *Introducción a la cromatografía*, 3ª Edición; Alhambra, Madrid.

Bautista-Justo M., L. García-Oropeza, R. Salcedo-Hernández y L. A. (2001). *Azúcares en agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato*. Acta universitaria 11:1: 33-38

Barragán-Huerta, B.E., Téllez Díaz, Y.A. y Laguna Trinidad, A. (2008). *Utilización de residuos agroindustriales*. Revista Sistemas Ambientales 2: 44-50.

Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brenda enzymes. [En línea]

Disponible en:

<http://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.80&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=#MOLECULAR%20WEIGHT>. [Último acceso el 16 de febrero de 2018].

Campos D., Rikir R., y Thonart P. (1992). *Diferentes técnicas de purificación de la inulinasa extracelular de un mutante de Kluyveromyces marxianus*. Biotecnología Aplicada. 3:246-258.

Chi, Z.M. **et al.** (2011). *Biotechnological potential of inulin for bioprocesses*. Bioresource Technology. 102:4295-4303.

Cuevas J.E. (2016). *Estudio de las actividades enzimáticas y del mecanismo de degradación de la inulina y agavina por Bifidobacterium longum subsp.infantis ATCC15697*. Facultad de química.

García, A. (2007). *Los agaves de México*. Ciencias, 87:14–23.

García Garibay M., R. Quintero, A. López – Munguía. (2004). *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa Noriega pp. 105 – 109.

Guillén Becerril Amayelli. (2015). *Extracción y purificación de enzimas degradadoras de inulina (inulinas)*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de alimentos y biotecnología, Ciudad de México.

Huazano G;A;&López,M.G. (2013). *Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faces of mice after supplementation of diets with agave fructans*. En R V. Baez, *Lipid metabolism* (págs. 163-182). Rijeka: InTech.

Huitron C., R. Perez, A. E. Sanchez, P. Lappe, L. Rocha. (2008). *Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes*. *Journal Environ Biology* 29:1:37-41

Kango, N; y Jain, S.C. (2011). *Production and properties of microbial inulinases: recent advances*. *Food Biotechnology*, 25(3),165-212.

Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227:680–685.

Lehninger, A.L., Nelson,D.L. & Cox, M.M. (2005). *Principles of Biochemistry* (4th ed). Portland:WH. Freeman and Company.

López, M,Mancilla-Margalli,N. Y Mendoza,G. (2003). *Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var.azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7835-7840.

López, M.G., N.A.,& Mancilla M.,N.A., (2007). *The nature of fructooligosaccharides in agave plants*. En S. Norio, NB. Noureddine, & O.Shuichi, *Recent Advances in Fructooligosaccharides Reserarch* (págs. 47-67). Kerala: Research Signpost.

Miller, G, L. (1959). *Determination of reducing sugar by DNS method*. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Montañez-Soto José, Venegas-González José, Vivar-Vera María y Ramos-Ramírez. (2011). *Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber AZUL*. Bioagro 23(3): 199-206.

Olvera C., E. Castillo, A. López-Munguía. (2007). *Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa*. Biotecnología 14:327-345.

Pandey Ashok, **et al.** (2006). *Enzyme Technology*. Editorial Springer. Asiatech publishers New Delhi. 347-353.

Peña C. A., Rodríguez A.M.E., Olvera C., López M.A. (2015). *Synthesis of Fructooligosaccharides by IsIA4, a truncated inulosucrase from Leuconostoc citreum*. BMC Biotechnology 15:2.

Pérez, R.G. (2016). *Extracción y caracterización de una exo-inulinasa procedente de Bacillus amyloliquefaciens con actividad sobre fructanos de Agave tequilana Weber var azul (agavinas)*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de alimentos y biotecnología, Ciudad de México.

Quintero Ramírez R. (1981). *Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones*. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Editorial ALHAMBRA, S.A.

Ritsema, T. Y Smeeckens, S. (2003). *Fructans: beneficial for plants and humans*. Current Opinion in Plant Biology 6:223-230.

Robert R; J.M. (2013). *Obtención de inulinasas. Identificación y caracterización de cepas que emplean inulina ramificada como única fuente de carbono*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de alimentos y biotecnología, Ciudad de México.

Roberfroid, M. (2007). *Prebiotics: the concept revisited*. The Journal of Nutrition, 137,830S-837S.

Roussac,F; Rouessac, A. (2003). *Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas*. España: McGraw-Hill Interamericana de España.

Ulloa José Armando, Andrews Hugo Espinosa. (2010). *Los fructanos y su papel en la promoción de la salud*; Universidad Autónoma de Nayarit; Revista Fuente Año 2, No. 5.

Vargas G.,D. (2015). *Caracterización e identificación de cepas degradadoras de Agavina*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de alimentos y biotecnología, Ciudad de México.

Vijn, I. Y Smeekens, S. (1999). *Fructan: More than a reserve carbohydrate?*. Plant Physiology 120:351-359.

