



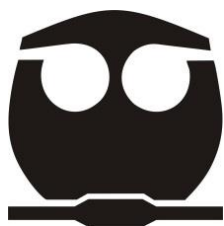
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA DE
Kluyveromyces marxianus AZ8.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA
MARCO ANTONIO GUERRERO CORONA



Ciudad Universitaria, CD. MX

AÑO 2019



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:	Eduardo Bárzana García
VOCAL:	Aurora Lara Núñez
SECRETARIO:	Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE:	Nuria Victoria Sánchez Puig
2do. SUPLETE:	Javier Axosco Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Guerrero Corona Marco Antonio

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA PAPIIT IA204118, Facultad de Química PAIP5000-9153

Indice

Resumen.....	1
1. Antecedentes.....	2
1.1 El agave.....	2
1.2 Fructanos de agave e Inulina.....	5
1.3 Hidrólisis de fructanos de agave.....	7
1.4 Inulinasas.....	8
1.5 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	11
1.6 Purificación y caracterización enzimática.....	13
2. Justificación.....	15
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivos.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Crecimiento de la cepa.....	17
5.2 Verificación de pureza del medio.....	18
5.3 Purificación de la inulinasa.....	19
5.4 Evaluación de la pureza de la enzima y estimación del peso molecular.....	19
5.5 Tinción de Coomasie del gel de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de las bandas.....	21
5.6 Determinación de peso molecular.....	21
5.7 Tinción de Schiff (Glicosilaciones en la enzima).....	21
5.8 Diálisis.....	22
5.9 Caracterización de la enzima.....	22
5.10 Cromatografía en capa fina.....	22
5.12 Velocidades iniciales.....	22
5.13 Determinación de temperatura óptima y ensayos de estabilidad térmica.....	23
5.14 Determinación de pH óptimo.....	23
5.15 Cinética enzimática.....	23
6. Resultados y discusión.....	24
6.1 Reactivación y comprobación de pureza de la cepa AZ8 de <i>K. marxianus</i>	24
6.2 Purificación de la inulinasa.....	25
6.3 Evaluación de otras formulaciones.....	27
6.4 Verificación de la purificación.....	28
6.5 Peso molecular.....	30

6.5	Tinción de Schiff (Glicosilaciones en la enzima).....	31
6.6	Velocidades iniciales.....	32
6.8	Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica de la inulinasa.....	33
6.7	Efecto de pH sobre la actividad enzimática.....	36
6.8	Afinidad por otros sustratos.....	37
6.9	Parámetros cinéticos de la inulinasa ACH1.....	38
7.	Conclusiones.....	39
8.	Perspectivas.....	39
9.	Referencias.....	40
	Apéndice A.....	46
	Apéndice B.....	50

Índice de figuras.

Figura 1. Partes de una planta de agave (*Agave abisaii*).

Figura 2. Tipos de estructuras para algunos fructanos ramificados de *Agave spp.*

Figura 3. Reacción general catalizada por enzimas del clan GH-J a través de un mecanismo de doble desplazamiento que involucra un intermediario covalente.

Figura 4. Enfoque generalizado utilizado para purificar una proteína.

Figura 5. Estrategia experimental seguida durante la investigación

Figura 6. Observación microscópica de la cepa AZ8 de *K. marxianus*.

Figura 7. Cromatografía en placa fina de la actividad inulinolítica

Figura 8. Cromatograma obtenido por exclusión molecular.

Figura 9. Electroforesis (SDS-PAGE) del sobrenadante de medio de cultivo (S) y de enzima purificada (EP) junto con un marcador de peso molecular (MP).

Figura 10. Tinción de Schiff. Gel de acrilamida 30% teñido con reactivo de Schiff.

Figura 11. Determinación de velocidad inicial de la inulinasa de *K. marxianus* utilizando como sustrato inulina de Agave Azul.

Figura 12. Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática.

Figura 13. Cromatografía en capa fina sobre el efecto de temperatura.

Figura 14. Estabilidad de la inulinasa después de ser incubada a 30, 40, 50 y 60 °C.

Figura 15. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

Figura 16. Cromatografía en capa fina sobre el efecto del pH.

Figura 17 Actividad enzimática de la inulinasa con diferentes sustratos.

Figura 18. Gráfico de Michaelis-Menten para la determinación de la cinética enzimática de la inulinasa de *K. marxianus* empleando como sustrato inulina de agave.

Índice de tablas.

Tabla 1. Azúcares contenidos en diferentes fracciones de la penca de *A. tequilana*. Azul (Soto José Luis *et. al.* 2011).

Tabla 2. Microorganismos productores de inulinasas. (Neagu, C. Bahrim, G. 2011.)

Tabla 3. Cepas de *Kluyveromyces marxianus* y rendimientos en inulinasa

Tabla 4. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.

Tabla 5. Tabla de purificación durante cada etapa realizada para la obtención de la inulinasa ACH1

Tabla 6. Cantidad de enzima obtenida al evaluar diferentes medios de cultivo con mayor fuente de carbono y nitrógeno

Tabla 7. Estándares empleados para la calibración de la columna de exclusión molecular.

Tabla 8. Parámetros cinéticos para inulinasas provenientes de *Kluyveromyces marxianus* en la hidrólisis de agavina.

Resumen.

En la actualidad, la producción de tequila en México se ha ido incrementando año con año. Hasta el 2018 se produjeron alrededor de 309 millones de litros, lo que representa un consumo de agave azul de 1, 138, 880 ton/año. Sin embargo, esta industria genera cerca de 450, 000 ton de residuos compuestos por hojas o pencas de agave. Estas hojas contienen aproximadamente 24% base seca de inulina.

La inulina de agave (agavina) es un polímero constituido por moléculas de fructosa con enlaces β - (2-1) y β -(2-6). A diferencia de las inulinas comerciales (lineales, p.e chicoria) esta inulina es altamente ramificada y las enzimas comerciales que hidrolizan a la inulina lineal presentan muy poca o nula actividad frente a la inulina ramificada. En nuestro grupo de trabajo contamos con microorganismos aislados de residuos de agave capaces de utilizar a la inulina ramificada como única fuente de carbono. Entre los microorganismos destaca *Kluyveromyces marxianus* AZ8, cuya inulinasa es capaz de hidrolizar a la agavina hasta fructosa.

En el presente trabajo, a partir de la cepa mencionada aislada de bagazo de agave mezcalero, se indujo la inulinasa extracelular empleando inulina de agave azul en el medio de cultivo en condiciones de agitación. Se observó que aumentando la inulina al 1% (m/v) y extracto de levadura al 1% en el medio de cultivo hay una mayor producción de enzima respecto a un medio establecido previamente con 0.5% de inulina y 0.2% de extracto de levadura.

Por otra parte, se purificó la inulinasa extracelular producida por la levadura mediante Cromatografía Líquida Rápida de Proteína (FPLC) en una columna de exclusión molecular Cal Superdex 2000 obteniendo un rendimiento del 97.08 %.

Se determinó que la inulinasa producida es una exoinulinasa la cual tiene un peso molecular de 274.17 kDa y es una enzima glicosilada. Tiene una actividad óptima a los 50 °C y a un pH óptimo de 5.0. Cinéticamente tiene una Km de 4 ± 1.085 mM y una Vmax de 600 ± 85 U/mg a dichas condiciones y utilizando inulina de agave azul como sustrato.

1. Antecedentes

1.1 El agave

El agave es la materia prima para la elaboración de tequila, mezcal y otras bebidas alcohólicas destiladas. México posee la denominación de origen del tequila y el mezcal los cuales son bebidas alcohólicas altamente apreciadas en el mercado internacional. En el año 2016 la producción de agave representó un 1.25% del PIB agrícola nacional y en ese mismo año se produjo cerca de 1.88 millones de toneladas de agave tan solo para la producción de estas bebidas. Dentro de los principales estados productores de agave se encuentra: Jalisco, Oaxaca, Durango, Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Nayarit, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas. Se estima que para el 2030 la producción de agave tequilero y mezcalero sea de 2.12 millones de toneladas (SAGARPA, 2017).

Por otra parte, la creciente agroindustria del agave, ya sea por producción de tequila, mezcal u otras bebidas alcohólicas, genera residuos líquidos (vinazas) y sólidos (bagazo y pencas u hojas) cuya producción aumenta de manera paralela al crecimiento de esta industria. En 2018, de acuerdo al Consejo Regulador del Tequila, se produjeron alrededor de 800 mil toneladas de estos residuos sólidos.

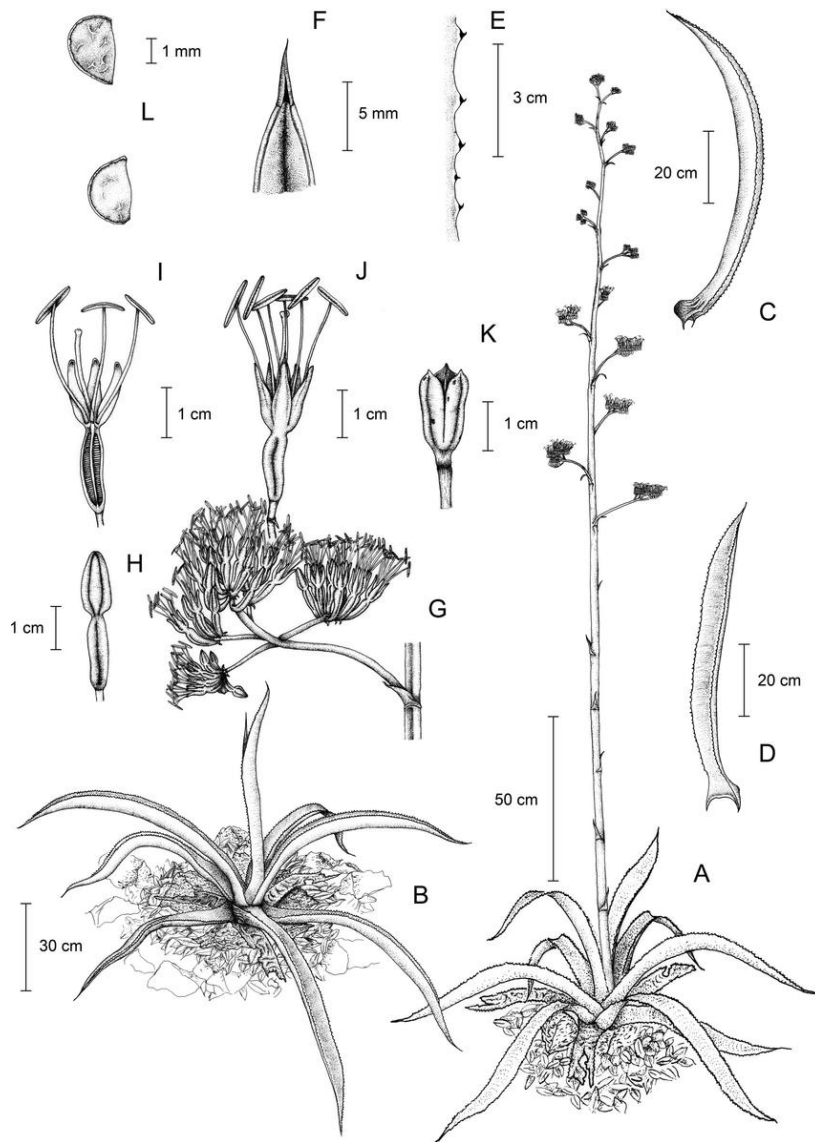
En el presente trabajo se hace énfasis en el potencial de aprovechamiento de las pencas u hojas debido a que las pencas son uno de los primeros residuos sólidos que se generan en la producción de destilados de agave. Estas permanecen en el campo durante el crecimiento y la cosecha de las piñas o cabezas (Íñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Actualmente estas hojas del agave no se usan en ningún proceso industrial y cada año se producen aproximadamente 443.800 toneladas como residuo de la industria tequilera (Caro Bermúdez *et al.*, 2001).

Anatómicamente, y en particular el *Agave tequilana* Weber azul es una planta suculenta que crece de manera radial hasta 1.2 ± 1.8 m de altura con tallos cortos y gruesos de 30 ± 50 cm de altura en la madurez. Presenta una panícula de 5 ± 6 m de altura (comúnmente llamado jiole), grande y muy ramificada con 20 ± 25 umbelas grandes y variadas de flores verdes con estambres rosados. Flores de 68 ± 75 mm de largo sobre pedicelos pequeños de bracteolato de 3 ± 8 mm de

largo. La parte comercialmente importante de *A. tequilana* Weber azul para la producción de tequila es el tallo y las bases de las hojas, comúnmente denominadas "cabeza" o "piña" porque se parece a una fruta de piña. (Gentry, 1982). En la Figura 1 se muestra el esquema general de una planta de agave.

Las pencas se cortan cerca de sus bases periódicamente, hasta el momento en que se cosechan las piñas, aproximadamente 7-9 años después de la siembra. Para poder llevar a cabo esta cosecha, primero debe aparecer la inflorescencia de la planta.

Las hojas de *Agave tequilana* Weber azul son de 90 ± 120 cm de largo, 8 ± 12 cm de ancho, lanceoladas, acuminadas, fibrosas firmes, en su mayoría rígidamente extendidas, cóncavas, ascienden hacia la horizontal, más anchas a través del medio, estrechadas y engrosadas hacia la base, color azuladas a grises verde, a veces con zonas cruzadas; dientes regulares en tamaño y espaciado raramente irregulares, en su mayoría de 3 ± 6 mm de largo a través de la cuchilla media (Gentry, 1982).



- **Figura 1.** Partes de una planta de agave (*Agave abisaii*). A. Hábito con panícula. B. Hábito. C y D. Hojas. E. Dientes de hoja. F. Espina. G. Flores en una rama. H. Brote de flor. I. Sección longitudinal de una flor en la antesis. J. Flor en la antesis. K. Cápsulas. L. Semillas. (Vázquez-García *et al.*, 2013)

En lo que respecta a la composición química de las pencas, esta varía de acuerdo a la especie y las condiciones de cultivo. Se menciona la composición en cuanto a inulina y otros azúcares a lo largo de las pencas de *Agave tequilana*. Weber azul (Tabla 1) debido a que es una de las más producidas y estudiadas por su importancia en la industria del tequila así como la cantidad de agave que de esta especie que se cultiva.

Tabla 1. Azúcares contenidos en diferentes fracciones de la penca de *A. tequilana*. Azul (Soto *et. al.*, 2011).

Fracción	Componente (%Base seca)		
	ARD	FOS	Inulina
Punta de penca	17,81	6,24	26,30
Base de penca	18,18	13,66	24,52

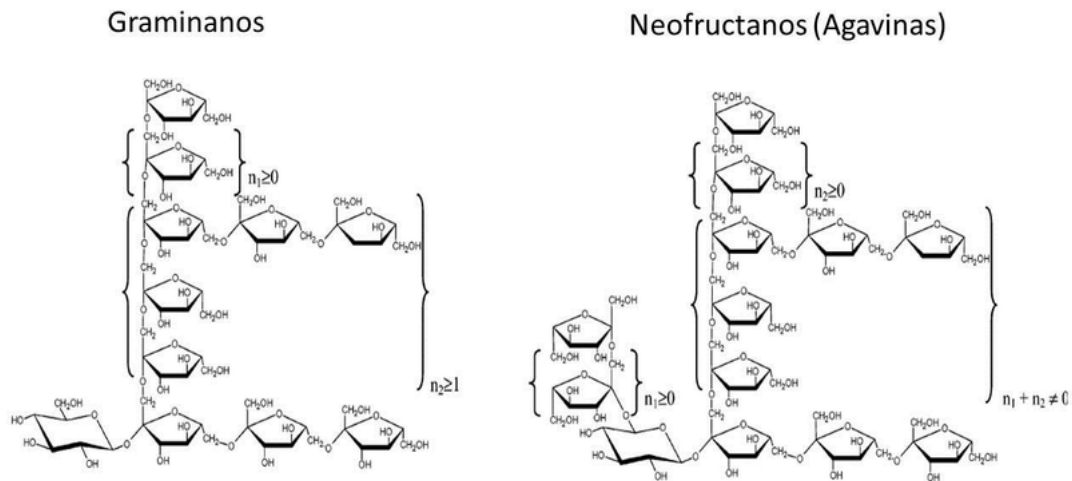
ARD: azúcares reductores directos, FOS: fructooligosacáridos.

En el presente trabajo el compuesto de interés es principalmente la inulina cuyo contenido de esta sustancia varía a lo largo de la penca. El mayor contenido de inulina se encuentra en la base de la hoja con alrededor de un 25% (base seca) en el estado de madurez óptimo de la planta. Además de la inulina existen otros componentes de aplicación biotecnológica sobre los cuales se realizan estudios como son la utilización de sus fibras para producir papel (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001), extracción de compuestos bioactivos como las sapogeninas obtención de fructooligosacáridos (FOS), azúcares no hidrolizables y otros azúcares fermentables para producción de biocombustibles, (Alonso y Rigal 1997).

1.2 Fructanos de agave e Inulina

Las plantas del género *Agave* almacenan fructanos como principal carbohidrato de reserva. El término genérico de fructanos se emplea para los oligosacáridos y polisacáridos que contienen enlaces glicosídicos con fructosa en su estructura (Benkeblia, 2013). En las plantas, los fructanos se sintetizan a partir de una molécula aceptora de sacarosa. La fructosa puede unirse tanto a la glucosa, como a la fructosa generando una gran diversidad de fructanos.

En la industria alimentaria la fuente de fructanos más utilizada hasta el momento es la inulina. Sin embargo, existe un amplio potencial para los fructanos de agave, los cuales son una mezcla de isómeros de fructosa que incluye inulinas y se distinguen por la presencia de agavinas, estructuras ramificadas con potencial para aportar propiedades funcionales biológicas y tecnológicas de gran interés a la industria de alimentos (Figura 2).



- **Figura 2.** Tipos de estructuras para algunos fructanos ramificados de *Agave spp.* Donde n = moléculas de fructosa. (Mancilla-Margalli y López, 2006).

Químicamente la inulina es un polímero lineal presente como carbohidrato de almacenamiento en más de 30,000 especies de plantas. Se compone por 10-60 unidades de fructosa con una molécula de glucosa terminal. El término inulina es el nombre genérico que cubre todos los fructanos lineales unidos por enlaces β -(2,1). En la mayoría de los casos la inulina se encuentra como una mezcla de cadenas de fructosa con cierta longitud (grado de polimerización), lo cual depende de la fuente, el momento de cosecha, la especie de planta, etc. (Meyer & Blaauwhoed, 2009).

A diferencia de la inulina comercialmente usada que proviene de la achicoria la cual es lineal, el agave, además de inulina, posee polímeros altamente ramificados que presentan una mezcla de enlaces β -(2,1) y β -(2,6). Este es el caso de los fructanos del *A. tequilana* Azul debido a su alto grado de ramificación han sido denominados agavinas.

En cuanto al uso y aplicaciones de la inulina, ésta es ampliamente utilizada en la industria alimentaria como modificador de textura, para reemplazar la grasa o como un edulcorante de bajo aporte calórico. Adicionalmente tiene diversas aplicaciones en otros campos como la farmacéutica. Otras aplicaciones de relevancia relacionadas con la hidrólisis y tratamiento de la inulina son la producción de jarabes de alta fructosa, obtención de fructosa cristalina, obtención de fructooligosacáridos, biocombustibles y ácidos orgánicos entre

otros (Mensink *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de fructanos de agave como un ingrediente potencial de alimentos funcionales, ya sea por sus propiedades tecnológicas o nutracéuticas. Muchas de sus aplicaciones dependen de su longitud de cadena, ya que ésta determina sus características fisicoquímicas. De forma general se asocia que los fructanos de cadena larga presentan gran interés de aplicación por sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, mientras que los de cadena corta por sus propiedades funcionales como prebiótico (Velázquez-Martínez *et al.*, 2014).

1.3 Hidrólisis de fructanos de agave.

Uno de los métodos más utilizados para obtener fructosa a partir de los fructanos de agave es la hidrólisis por medio de calor y adición de ácidos (Ávila-Fernández *et al.*, 2011). Después de la cocción de las piñas se obtiene un jugo crudo por presión o lixiviado al cual se le disminuye el pH a un valor de 3.0 aproximadamente y se lleva a una temperatura de 80 °C. Para la disminución del pH se emplea ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, también se pueden emplear resinas de intercambio catiónico. La hidrólisis ácido-térmica es muy eficiente y rápida lográndose rendimientos del 100% de los carbohidratos presentes en el jugo en tiempos de alrededor de cuatro horas. Una de las desventajas en los tratamientos químicos o térmicos es la generación de compuestos inhibidores de la fermentación como el hidroximetilfurfural. Para la optimización de la hidrólisis de fructanos de agave, se han realizado algunos estudios que desarrollan procesos enzimáticos para reducir el consumo de energía y aumentar la recuperación de azúcares (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009).

Dado que se prefiere reducir el uso de ácidos en los procesos para disminuir riesgos a la salud, una opción para evitar la hidrólisis ácida es la hidrólisis enzimática. Esta ha sido estudiada y reportada por numerosos autores. Sin embargo, no es muy utilizada a nivel industrial debido al alto costo de las enzimas (Ávila-Fernández *et al.*, 2009). El empleo de enzimas a nivel industrial también supone ventajas económicas ya que puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas de reacción (50-60°C) y a valores de pH a los que normalmente se obtiene el jugo de agave (4.7- 5.5). Por otro lado, los tiempos de reacción suelen ser cortos, dependiendo de la actividad de la enzima empleada. El coctel

comercial más utilizado en hidrólisis enzimática de fructanos de agave es Fructozyme L (Novozymes, Novo Nordisk), coctel que contiene principalmente dos actividades enzimáticas provenientes de *Aspergillus niger* (exoinulinasas y endoinulinasas).

Por otra parte, se ha reportado que no existen diferencias sensoriales importantes entre tequilas producidos por hidrólisis enzimática y aquellos obtenidos por hidrólisis ácida (Waleckx *et. al.*, 2011).

1.4 Inulinasas

Las inulinasas forman parte de la familia de las Glucosil Hidrolasas 32 (GH32) que comprende a un gran grupo de enzimas como: las endo y exo-inulinasas fúngicas y bacterianas, levanasas, exohidrolasas de fructanos vegetales (FEH) y enzimas biosintéticas de fructanos vegetales (FBE), también nombradas fructosiltransferasas. Sobre la base de su acción sobre la inulina, las inulinasas se clasifican como exoinulinasas (β -d-fructano fructonohidrolasa; EC 3.2.1.80) y endoinulinasas (1- β -d-fructano fructanohidrolasa; EC 3.2.1.7). Las exoinulinasas hidrolizan los enlaces terminales presentes en la inulina produciendo fructosa por su parte las endoinulinasas actúan aleatoriamente sobre los enlaces glicosídicos β -2,1 internos de la inulina y producen fructooligosacáridos, los cuales poseen bajo peso molecular y grado de polimerización menor a 10 unidades de fructosa.

En lo que concierne a la fuente de las inulinasas, se han reportado de plantas, animales y microorganismos como sus fuentes. Se encuentran presentes en mucha menor cantidad en plantas y animales, lo que restringe su explotación e investigación para aplicaciones industriales. Por su parte, las inulinasas microbianas (Tabla 2) son una fuente importante de enzimas industriales conocidas por su elevada capacidad de hidrolizar la inulina en fructosa o fructooligosacáridos.

Tabla 2. Microorganismos productores de inulinasas. (Neagu, C. Bahrim, G. 2011).

Microorganismo	Actividad máxima	Referencia
Hongos		
<i>Aspergillus Niger</i>	1.75 U/mL	Gern et al., 2001

	100 U/mL	Ge and Zhag, 2005
	52.5 IU/mL	Kumar et al., 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	No disponible	Gill et al., 2006
<i>Aspergillus awamori</i>	No disponible	Nagem et al., 2004
<i>Aspergillus ochraceus</i>	108 Total U	Guimaraes et al., 2007
<i>Aspergillus ficuum</i>	193.6 U/gds	Chen et al., 2011
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2.9 U/mL	Ertan et al., 2003
<i>Geotrichum candidum</i>	45.65 IU/mL	Mughal et al., 2003
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.792 U/mL	Ertan et al., 2003
<i>Chrysosporium pannorum</i>	115 U/mL	Xiao et al., 1988
Bacterias		
<i>Paenibacillus spp.</i>	2.48 g/L	Gern et al., 2001
<i>Streptomyces spp.</i>	524 IU/L	Sharma et al., 2006
	89 U/gds	Dilipkumar et al., 2011
<i>Bacillus spp.</i>	42.36 U/mL	Zherebtsov et al., 2002
<i>Pseudomonas spp.</i>	No disponible	Kim et al., 1997
<i>Arthrobacter spp.</i>	No disponible	Kang et al., 1998
Levaduras		
<i>Pichia guilliermondii</i>	39.56 U/mL	Gao et al., 2007
	61.5 U/mL	Chi et al., 2009
	130.38 U/mL	Yu et al., 2009
	60.1 U/mL	Gong et al., 2007
<i>Cryptococcus aureus</i>	52.37 U/mL	Gao et al., 2007
	85 U/mL	Chi et al., 2009
	436.2 U/gds	Chi et al., 2009
<i>Yarrowia lipolitica</i>	62.85 U/mL	Gao et al., 2007
	22.5 U/mg	Liu et al., 2010
<i>Debaryomyces hansenii</i>	52.52 U/mL	Gao et al., 2007
<i>Candida kefyr</i>	40 U/mL	Pessoa and Vitolo, 1998
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	194.1 U/mL	Kalil et al.,
	127 U/mL	Kalil et al., 2001
	176 IU/mL	Santisteban et al., 2005
	208 IU/mL	Santisteban et al., 2009
	262.9 U/mg	Golunski et al., 2011
	1294 U/mL	Treichel et al., 2009
	18743 U/mL	Kushi et al., 2000
	50.2 IU/mL	Singh and Bhermi, 2008
	47.1 IU/mL	Singh et al., 2006
	250 U/gds	Mazutti et al., 2007
	47.2 U/mL	Mazutti et al., 2010
	1317 U/mL	Treichel et al., 2009
	1139 U/mL	Squarezi et al., 2009

*U, IU- Actividad expresada como unidades de actividad internacional

**gds- gramos de sustrato seco

Respecto al mecanismo de reacción, las enzimas GH32 presentan retención general de la configuración en el átomo de carbono anomérico del sustrato. La hidrólisis se realiza mediante una catálisis ácida general que requiere dos residuos catalíticos: un donante de protones y un nucleófilo (McCarter & Stephen Withers, 1994). Las enzimas del clan GH-J al cual pertenecen las GH32, comparten un dominio N-terminal β propela formado por cinco hojas- β , dispuestas alrededor de una cavidad central que acomoda el sitio activo (dominio catalítico). Dentro del sitio catalítico hay tres residuos clave de aminoácidos ácidos que están rodeados de secuencias conservadas en la familia GH32. NDPNG (Asp (D) que actúa como nucleófilo), RDP (Asp (D) que actúa como estabilizador del estado transitorio) y EC (Glu (E) actuando como el catalizador ácido base) (Figura 3). Estos aminoácidos son esenciales en la unión al sustrato y la hidrólisis. Otro dominio que caracteriza a este grupo de enzimas es la presencia del grupo β -sandwich, el cual no se presenta en la familia GH68 (Álvaro-Benito et al., 2012).

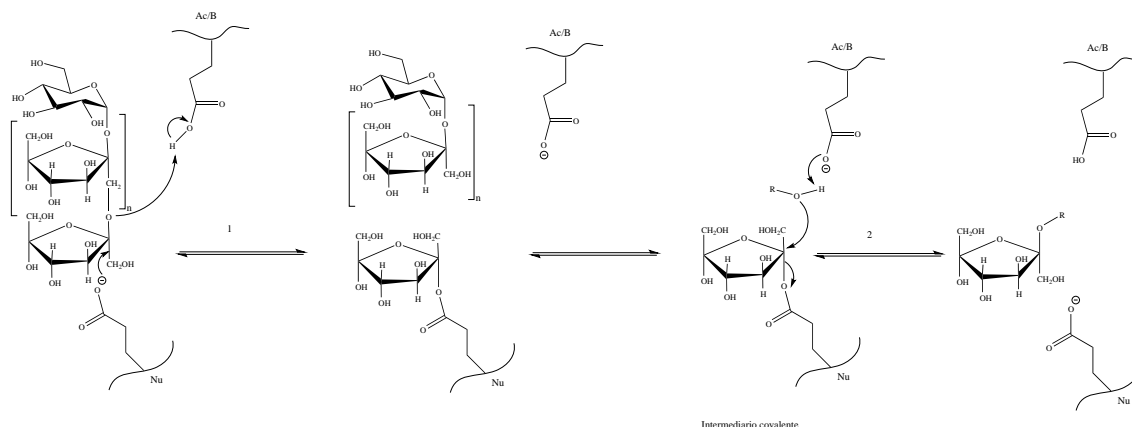


Figura 3. Reacción general catalizada por enzimas del clan GH-J a través de un mecanismo de doble desplazamiento que involucra un intermediario covalente (Álvaro-Benito et al., 2012).

Para el caso específico del agave se recomienda utilizar algún coctel que contenga la actividad endo y exo, puesto que se ha reportado que cuando se emplean únicamente enzimas del tipo endoinulinasa la hidrólisis de los fructanos de agave no es factible. Ésto es debido a que las endoinulinasas no son capaces de hidrolizar fructanos ramificados como los del agave por problemas de impedimento estérico ante las ramificaciones (Alvarado, et. al. 2014). Ante la baja preferencia de las inulinasas por hidrolizar fructanos de agave, se ha

incursionado en la búsqueda de enzimas con preferencia por estos sustratos. Así, hay reportes sobre enzimas producidas por la levadura *Kluyveromyces marxianus* muy eficaces en la obtención de fructosa a partir de fructanos de agave comparadas con los cocteles comerciales Fructozyme® y Novozyme 960® (Arrizon *et. al.*, 2011).

1.5 Kluyveromyces marxianus.

Algunas levaduras se han utilizado ampliamente en la fabricación de alimentos para humanos; como *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. utilis* las cuales cuentan con el estado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para consumo humano por parte de la FDA de los EE. UU y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) otorgado por la Unión Europea. *K. marxianus* y sus especies relacionadas se usan ampliamente debido a su capacidad para asimilar la lactosa. Los carbohidratos presentes en el suero de queso, pero también pueden crecer con inulina y otros azúcares simples como la glucosa, la fructosa y la sacarosa; Por eso, a veces, también se cultiva en melaza. Dado que puede crecer a temperaturas de hasta 45 ° C, se ha utilizado para producir biomasa en áreas tropicales (García-Garibay, *et. al.*, 2003).

Kluyveromyces marxianus es una levadura hemiascomicetosa, está relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae* y es hermana de la especie más conocida, *Kluyveromyces lactis* (Lachance, 1998; Llorente *et al.*, 2000). La principal característica común de *K. lactis* y *K. marxianus* es la capacidad de asimilar lactosa y utilizar este azúcar como fuente de carbono (Lane y Morrissey, 2010).

Referente a la producción de enzimas inulinolíticas, algunos de los microorganismos productores de inulinasas de mayor rendimiento son: *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Bacillus spp*, *Clostridium spp*, *Pseudomonas spp*, *Arthrobacter spp*, *Staphylococcus spp*, *Xanthomonas spp*, *Kluyveromyces spp*, *Cryptococcus spp*, *Pichia spp*, *Sporotrichum spp*, y *Candida spp*. En algunos trabajos se prefiere *Kluyveromyces spp.*, debido a su estado GRAS, además de su capacidad de una velocidad de crecimiento rápido, un amplio espectro de sustratos que ayuden a su desarrollo, su termotolerancia, ya que tiene la capacidad de crecer sobre los 52°C, y una alta capacidad secretora de enzimas líticas (Singh *et al.*, 2006). En la Tabla 3. Se mencionan distintas inulinasas de algunas cepas de *K.marxianus* estudiadas.

Tabla 3. Cepas de *Kluyveromyces marxianus* y rendimientos en inulinasa (Castillo y Chamy, 2010).

Microorganismo	Tipo de cultivo	Actividad (U/mL)
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	Líquido	59.5
<i>K. marxianus</i>	Líquido	43.7
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	Líquido	260
<i>K. marxianus</i> ATCC53466	Líquido	0.418
<i>K. marxianus</i> CDBB-L-278	Líquido	82
<i>K. marxianus</i> var. <i>Marxianus</i> CBS 6556	Líquido	3000
<i>K. marxianus</i> UCD(FST) 55-82	Líquido	212
<i>K. marxianus</i> var. <i>Bulgaricus</i>	Continuo	107
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Líquido	121
<i>K. marxianus</i> var. <i>Bulgaricus</i>	Líquido	4.1
<i>K. marxianus</i> (A1 y A2)	Líquido	32
<i>K. marxianus</i> NRRL-Y7571	Sólido	391.9 U/g
<i>K. marxianus</i> NRRL-Y7571	Líquido	8.87 U/g.h
<i>K. marxianus</i> S120	Sólido	24.5
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	50.2
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	463 U/g
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	

En el presente trabajo se utilizó la cepa AZ8 de *Kluyveromyces marxianus* aislada previamente por el grupo de trabajo a partir de bagazo de agave mezcalero. La inulinasa en cuestión se eligió debido a su elevada actividad hidrolítica.

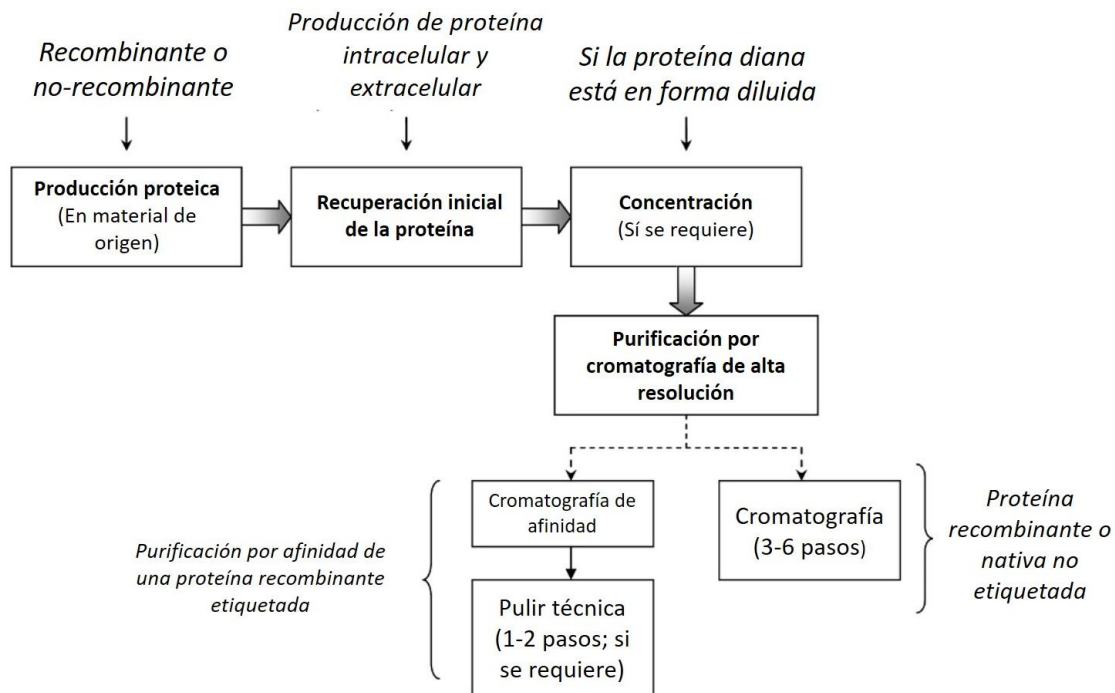
1.6 Purificación y caracterización enzimática.

La purificación y caracterización de las enzimas es de gran importancia en cuanto a la obtención de la información estructural y funcional, así como la predicción de sus aplicaciones.

A pesar de tal diversidad de origen, las proteínas (tanto nativas como recombinantes) derivadas de cualquier fuente, generalmente se purifican utilizando un enfoque general y técnicas similares. Los detalles exactos del esquema de purificación para cualquier proteína dependerán de varios factores, entre ellos:

- Nivel de expresión de la proteína en estudio.
- El material de origen elegido y la ubicación de la proteína objetivo (extracelular o intracelular).
- Características fisicoquímicas de la proteína
- Propósito de la purificación.

La purificación permite eliminar otras moléculas contaminantes como proteínas y DNA, entre otros. La cantidad final de una enzima pura en particular depende de su uso al que se tenga destinada. El propósito de decidir el grado de purificación es lograr el máximo rendimiento posible de la enzima con la mayor actividad catalítica y la máxima pureza posible (Chandra & Madakka, 2019). En la Figura 4. Se presenta un esquema que resume los pasos usualmente llevados a cabo en la purificación de proteínas.



- **Figura 4.** Enfoque generalizado utilizado para purificar una proteína.

Un factor adicional que influye significativamente en el protocolo de purificación es el propósito para el cual la proteína es purificada. Si es meramente académico, la meta más importante es una purificación homogénea, con cuestiones como el número de pasos requeridos. La duración del procedimiento, el costo y porcentaje de rendimiento del producto final son de importancia secundaria. Por otro lado, si la proteína se purifica para una aplicación comercial, los factores técnicos y económicos serán de preocupación, donde la proteína generalmente se purifica solo al nivel mínimo requerido. Los propósitos académicos usualmente requieren la obtención de la proteína pura en el rango de miligramos para realizar estudios funcionales y estructurales. Las proteínas destinadas para propósitos de aplicación, por otra parte, son requeridas usualmente en mucho mayores cantidades y el nivel de pureza demandado variará de acuerdo a la aplicación (Walsh, 2014).

En el caso de las enzimas siempre se venden sobre una base de actividad, en lugar de peso o concentración. Un requisito previo esencial para trabajar con enzimas es la disponibilidad de un método preciso y confiable mediante el cual se pueda detectar y cuantificar la actividad enzimática. La actividad de la enzima se prueba (mide) invariablemente incubándola con su sustrato y cuantificando la cantidad de sustrato consumido o la cantidad de producto generado durante un

período de tiempo especificado (generalmente minutos) en condiciones específicas de pH y temperatura, que obviamente pueden afectar la actividad de la enzima.

La actividad enzimática se suele expresar en unidades (U). Una definición común de una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima que catalizará la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto en las condiciones de reacción definidas utilizadas.

Con base en lo anterior la purificación y caracterización de la inulinasa producida por *K. marxianus* es de importancia para buscar la producción óptima de la enzima en escala industrial y buscar una aplicación futura en el tratamiento de residuos de la industria del agave.

2. Justificación.

La industria mexicana del agave (tequilera, mezcalera, de destilados y otros), genera como subproducto una gran cantidad de hojas de agave como desperdicio en la mayor parte del país (Caro Bermúdez. *et. al.* 2001). La industria tequilera demanda anualmente un volumen aproximado de un millón de toneladas de cabezas de agave para la producción de tequila, actividad que también genera alrededor de 400,000 toneladas de hojas que actualmente no se utilizan (Soto *et. al.* 2011). Dichas hojas tienen potencial biotecnológico por su contenido de celulosa e inulina.

La cepa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 aislada del bagazo mezcalero hidroliza a la inulina mediante una enzima extracelular, la cual tiene una actividad elevada comparada con otras inulinasas de la misma levadura reportadas. Por ende su estudio es importante con la finalidad de buscar una aplicación futura.

3. Hipótesis

La purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 permitirá determinar las mejores condiciones de hidrólisis de la inulina de agave, así como sus parámetros cinéticos y la caracterización bioquímica de la enzima.

4. Objetivos

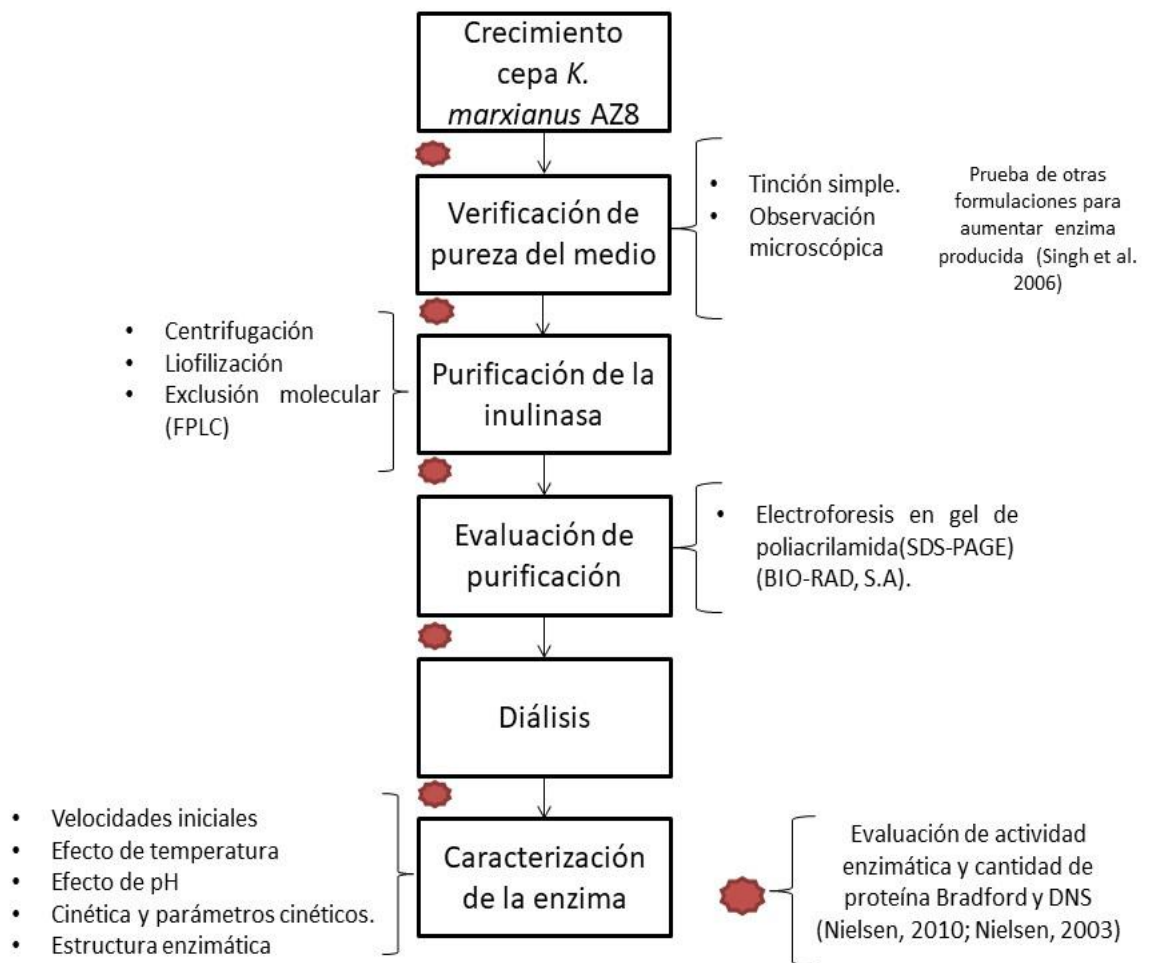
4.1 Objetivo general.

Purificar la inulinasa extracelular y caracterizar los parámetros de mayor relevancia de esta enzima proveniente de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 con respecto a la hidrólisis de la inulina de agave.

4.2 Objetivos particulares.

- Estudiar la producción de inulinasa de *K. marxianus* AZ8 en diferentes medios de cultivo.
- Purificar la inulinasa del medio de cultivo y evaluar el proceso de purificación.
- Evaluar el comportamiento óptimo de la enzima (pH, temperatura) utilizando como sustrato la inulina de agave.
- Caracterizar los parámetros cinéticos de la inulinasa en la hidrólisis de inulina de agave.
- Comparar la actividad de la enzima respecto a diferentes sustratos.
- Determinar algunas características estructurales de la enzima (peso molecular, nivel glicosilaciones, etc.)

5. Metodología.



- **Figura 5.** Estrategia experimental seguida durante la investigación, (Nielsen, 2003, 2010; Singh, *et. al.*, 2006)

5.1 Crecimiento de la cepa.

Se preparó un preinóculo añadiendo 10 μ L de cepa pura en criopreservación a un tubo de ensaye con 5 mL de medio mínimo, y se incubó a condiciones de 24h/35°C en agitación.

Medio mínimo empleado para el crecimiento de *K. marxianus* AZ8.

- Inulina de agave..... 0.5%
- Extracto de levadura... 0.2%
- Sulfato de amonio..... 0.1%
- Cloruro de potasio..... 0.05%

- Fosfato monobásico.... 0.1%
- Agar bacteriológica (Medios sólidos)... 1.5%

5.2 Verificación de pureza del medio

Se realizó una tinción simple al preinóculo con safranina para observar que no se encontraran microorganismos contaminantes (cocos o bacilos).

Una vez comprobada la pureza se escaló el preinóculo a 500 mL de medio mínimo y se incubó 72h/35°C en agitación.

Se probaron otras formulaciones descritas posteriormente para producir una mayor cantidad de enzima con base en lo reportado por (Singh et al., 2006).

Se probaron dos formulaciones basadas en el medio mínimo, aumentando la inulina de agave (fuente de carbono) y el extracto de levadura (fuente de nitrógeno, carbono y micronutrientes) hasta un 1% para la formulación 1, la formulación 2 es igual a la uno, únicamente se añade 2% de bacto-peptona.

A partir de este paso se determinó la actividad enzimática y cantidad de proteína por triplicado bajo la siguiente metodología.

- **Cantidad de Proteína** (Método de Bradford): Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (0-10 µg/mL) (Apéndice B). De cada muestra a lo largo del proceso de purificación se tomaron alícuotas de 50-200 µL, se llevaron a un volumen de 800 µL y se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm y con ayuda de la curva patrón se obtuvo la concentración de proteína.
- **Actividad enzimática**
 Primeramente se realizó una reacción con 800 µL de agavina al 1% disuelta en buffer de acetatos pH 5.0, a este volumen se le añadió 200 µL de la enzima obtenida a lo largo de los distintos pasos de purificación. La concentración de proteína varió de acuerdo al paso de purificación donde se midió la actividad enzimática.
 La solución anterior se incubó 20 min/ 50 °C a 500 rpm. Posteriormente se detuvo la reacción en un baño a 95°C/ 5min. Finalmente del producto

de reacción obtenido a los 20 min de reacción, se determinó la cantidad de azúcares reductores mediante el método de (DNS)

Para ello, se realizó una curva patrón de fructosa de (0-1% m/v) (Apéndice B). De cada muestra se tomó 100 μ L de la reacción descrita, se añadió 200 μ L de buffer de acetatos pH 5, 600 μ L de reactivo DNS y se calentó a 90°C por 5 min. Posteriormente se dejó enfriar en hielo, se añadió 4 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados se correlacionan con la curva patrón y se reporta en porcentaje (m/v) de fructosa.

5.3 Purificación de la inulinasa

Después del periodo de incubación (72h/ 35 °C en agitación) el medio de cultivo se centrifugó a 9, 500 rpm, 4° C por 12 minutos, empleando el equipo (Pro-Research, Centurion Scientific Lid) con el objetivo de separar las células del medio de cultivo y obtener el sobrenadante.

El sobrenadante se liofilizó (FD1.0, Heto), resuspendió y filtró con membranas Millipore con un tamaño de poro de 0.45 μ m. Posteriormente el sobrenadante filtrado se purificó usando un FPLC Äkta Purifier y una columna de exclusión molecular Superdex 200 utilizando como fase móvil buffer de fosfatos 50 mM + 500 mM de NaCl pH 7.2 a temperatura ambiente y un flujo de 0.5 mL/min, con una presión constante en la columna de 0.75 MPa.

Las fracciones provenientes de la columna de exclusión molecular que mostraron absorbancia a 280 nm, se recolectaron y se evaluó la actividad enzimática de estas mediante el método previamente descrito, de tal forma que fue posible identificar las fracciones donde se encuentra la enzima purificada.

5.4 Evaluación de la pureza de la enzima y estimación del peso molecular

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) de las fracciones recuperadas en exclusión molecular para comprobar la pureza de la enzima. Para ello se ocupó una cámara vertical de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra System).

Para la determinación se deben preparar un gel de dos fases, un gel inferior o separador (5 mL y grosor de 0.75 mm) y otro gel superior o concentrador. Para los geles preparados se utilizó una concentración de acrilamida del 10% para el

gel inferior y una concentración del 4% en el gel superior. En la Tabla 4 se resumen los reactivos empleados para ambos geles. El uso de estas concentraciones se discute en los resultados obtenidos.

Tabla 4. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.

Componente	Gel inferior (μL)	Gel superior (μL)
Acrilamida/Bisacrilamida (30% m/v)	3330	670
Buffer 1.5 M Tris pH 8.8	2500	-
Buffer 0.5 M Tris pH 6.8	-	1250
SDS 10%	100	50
Agua desionizada	4000	3000
Persulfato de Amonio 10%	100	100
TEMED	13	13

Para los geles se siguió el protocolo del proveedor donde se colocaron los moldes para el gel, se vertió lentamente la mezcla del gel inferior señalada en la Tabla 4 hasta una marca señalada en las placas, evitando la formación de burbujas; se añadió isobutanol a la mezcla para evitar la formación de un menisco en la parte superior del gel, y se dejó polimerizar la mezcla al menos 10 minutos.

Se retiró el isobutanol y se preparó el gel superior de igual manera que el inferior, una vez vertido en el molde, se coloca el peine sin atrapar burbujas y se dejó polimerizar 10 minutos. Una vez polimerizado se retiró el peine deslizándolo suavemente.

La muestra de proteína se preparó utilizando un buffer que contiene 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 2% β -mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol. La muestra se calentó con buffer de carga en relación 1:1 a 95°C cinco minutos y se cargó en gel.

Se colocó el gel en la cámara y ésta se llenó con buffer de corrida (1x) el cual contiene: 25 mM Tris, 192 mM de glicina y 0.1% SDS. Con la cámara llena se

depositó de 20-30 μL de muestra y 5 μL de estándar (marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards #161-0374) en los pozos correspondientes del gel.

Se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 75-100 v hasta que el frente corrió por completo saliendo del gel. Terminada la corrida se separó el gel de las placas y se enjuagó con agua corriente para eliminar el SDS. Finalmente se colocó en un envase de plástico para su posterior tinción.

5.5 Tinción de Coomasie del gel de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de las bandas.

Con el gel ya corrido y en un molde de plástico se fija el gel empleando una solución metanol: agua desionizada 1:1 durante 20 min. Posteriormente se enjuagó con agua desionizada por 15 minutos y se tiñó cubriéndolo con azul de Coomasie hasta que todo el gel tuviera un color homogéneo. Como último paso se destiñó con una solución de agua desionizada: metanol: ácido acético 50:50:1 de 1-2 horas hasta que se observa un fondo limpio (Brunelle & Green, 2014).

5.6 Determinación de peso molecular.

El peso molecular de la enzima se determinó empleando la columna de exclusión molecular Superdex 200. La columna se calibró con el kit de la marca Biorad (1511901). Este kit contiene una mezcla de proteínas y una vitamina: (Vitamina B12, mioglobina de equino, ovoalbúmina de gallina, gama globulina bovina y tiroglobulina bovina, con un peso molecular de 1.35, 17.44, 158 y 670 kDa, respectivamente. El volumen muerto de la columna se determinó con azul dextrana con un peso molecular de 2,000 KDa.

5.7 Tinción de Schiff (Glicosilaciones en la enzima)

Con el objetivo de evaluar si la enzima presentaba glicosilaciones, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE de la muestra. Una vez corrido el gel junto con un marcador de peso molecular se lavó el gel con agua Mili Q para retirar el SDS. Se fijó el gel con una solución de metanol al 50% durante 60 minutos y posteriormente se lavó dos veces durante 20 min con agua Mili Q. Se agregó una solución de ácido peryódico al 1% (m/v) y se dejó en agitación por 60 min. Nuevamente se lavó dos veces durante 20 minutos con agua Mili Q; se colocó en una solución con reactivo de Schiff hasta completar la reacción, la cual se

evidencia por la aparición de bandas color magenta generado por la reacción entre el aldehído y el reactivo de Schiff. Se retiró el gel y se dejó en una solución de metabisulfito de sodio al 0.5 % por 2h, y finalmente se dejó destiñendo con agua Milli Q.

5.8 Diálisis

Se dializaron las fracciones donde se comprobó se ubicaba la enzima pura; para ello se utilizó una membrana de celulosa para diálisis con tamaño de poro de 12 kDa (Sigma-Aldrich). La membrana se hidrató con agua destilada, se cerró un extremo con pinzas, se vertió la muestra y se cerró el otro extremo. La membrana cargada se colocó en un vaso de precipitados cubierta con buffer de acetatos 50 mM pH 5.0. El vaso se colocó en un baño de hielo con agitación suave durante 24 h.

Una vez dializada la enzima, se liofilizó para concentrar la enzima.

5.9 Caracterización de la enzima

El liofilizado se resuspendió en un volumen mínimo tratando de disolver 1g de liofilizado/mL de buffer de acetatos 50 mM pH 5.0 y para obtener una concentración deseada de enzima. Se midió la cantidad de proteína mediante el método de Bradford previamente descrito y a partir de la solución obtenida se diluyó a la cantidad de enzima requerida procediendo a su caracterización.

5.10 Cromatografía en capa fina.

Para observar los productos de la hidrólisis de la agavina se usaron placas de silica en aluminio de 5x10 cm como fase estacionaria y como eluyente se empleó una mezcla de butanol, metanol, agua (3:2:1). Las muestras se revelaron con una solución de H₂SO₄ al 5% en etanol y orcinol (10mg/mL). Esta solución se dispersó por nebulización por toda la placa y se calentó a 90°C en una parrilla para favorecer la reacción y detectar los carbohidatos presentes.

5.12 Velocidades iniciales.

La velocidad inicial se determinó durante los primeros 30 min de reacción, con intervalos de 3 min. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 1mL de una solución de inulina de agave 1% m/v y 1.49 µg de enzima para cada tubo de reacción a 50°C y 500 rpm. De igual manera se siguió la metodología descrita

para la determinación de actividad enzimática cuantificando los azúcares reductores en solución mediante DNS. Cada determinación se hizo por triplicado.

5.13 Determinación de temperatura óptima y ensayos de estabilidad térmica

Se evaluó el efecto de temperatura sobre la actividad enzimática en un intervalo de temperaturas de 25-70 °C cada 5°C. Se utilizó inulina de agave azul al 1% y 1.49 µg de enzima. La reacción se llevó a cabo en un termomixer con agitación (500 rpm) por triplicado.

Para determinar la estabilidad térmica se midió la actividad enzimática residual después de incubar la enzima a 30, 40, 50 y 60 °C por 2h, se tomaron alícuotas de la enzima y se llevó a cabo la reacción enzimática por triplicado usando como sustrato agavina al 1% en buffer de acetatos 50 mM pH 5.0. La actividad obtenida se comparó contra un control. El control consiste en una reacción llevada a cabo en las condiciones óptimas determinadas y sin ningún tratamiento térmico.

5.14 Determinación de pH óptimo.

Se determinó la actividad enzimática a la temperatura de trabajo óptima pre-establecida, en un rango de pH 3,5-7,5 con intervalos de 0.5. Se empleó inulina de agave azul como sustrato (1%) y 1.49 µg de enzima en ensayos por triplicado. Para el rango de pH 3.5-5.5 se empleó el par ácido-base del ácido acético, mientras que los correspondientes a pH 6.0-7.5 se realizaron con sales de fosfatos.

5.15 Cinética enzimática

Se evaluó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima y se determinó sus parámetros cinéticos, para el caso de la inulina de agave fue de 2.0-6.0 mM con base en la solubilidad de esta sustancia. Esta agavina previamente se caracterizó por exclusión molecular y se obtuvo que tiene un peso molecular de 3,826 Da.

De cada concentración se obtuvo la velocidad inicial de reacción (U/mg), y con el programa estadístico Prisma se obtuvieron los parámetros cinéticos de la enzima y se calculó Kcat y el cociente Kcat/Km.

6. Resultados y discusión.

6.1 Reactivación y comprobación de pureza de la cepa AZ8 de *K. marxianus*.

Como etapa inicial para la purificación de la enzima fue necesario evaluar la pureza de la cepa de *K.marxianus* AZ8. Se creció toda la noche en medio mínimo y se observó al microscopio encontrando formas ovoides de tamaño pequeño conglomeradas. Se observaron algunas células en gemación y en el campo de visión no se detectaron bacilos ni cocos (Figura 6).

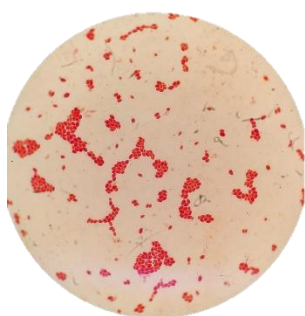


Figura 6. Observación microscópica de la cepa AZ8 de *K. marxianus*.

10/Enero/2019

Kluyveromyces marxianus AZ8

Tinción simple (safranina)

Aumento total: 1000x

Con base a la descripción anterior se comprobó que la cepa se encontraba pura. Además, se determinó la cantidad de proteína y actividad enzimática del sobrenadante para verificar la presencia de la enzima.

Para evaluar los productos de la reacción después de 20 min utilizando inulina de agave como sustrato, se realizó una cromatografía en capa fina (Fig.7)

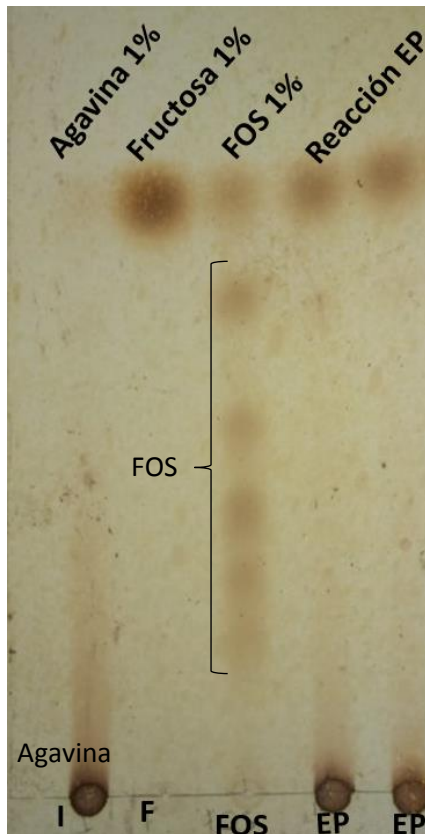


Figura 6. Cromatografía en placa fina de la actividad inulinolítica

En la Figura 7, se muestra la señal de la inulina al 1% (Carril I), fructosa al 1% (Carril F). En el carril FOS se observa una muestra de fructooligosacáridos al 1%, el carril EP corresponde a la reacción con enzima purificada y dializada. Se observa que la reacción enzimática produce fructosa, porque la señal del producto eluye a la misma distancia que la fructosa. Con esto se podría considerar que la enzima es una exo-inulinasa ya que únicamente produce fructosa y no se observan otras señales por debajo que indiquen la producción de fructooligosacáridos.

6.2 Purificación de la inulinasa.

En la Tabla 5. Se presenta de manera resumida los pasos que se llevaron a cabo para purificar a la enzima desde el medio de cultivo líquido.

Durante cada etapa se hizo un seguimiento de la concentración de proteína debido a que el producto de interés (inulinasa) es una proteína, y la cuantificación de la actividad enzimática durante cada etapa para comprobar la presencia y actividad de la enzima en cuestión.

Tabla 5. Tabla de purificación durante cada etapa realizada para la obtención de la inulinasa ACH1

Paso de purificación	Vol total (mL)	[Prot] (mg/mL)	Tot. Prot (mg)	Act. Total	Act. Vol. (U/mL)	Act. Esp. U/mg	Veces de purific.	%Rendimiento
Sobrenadante crudo	440	0,017	7,30	116,66	0,27	15,98	1	100
Exclusión molecular	24	0,022	0,52	58,08	2,42	112,31	7	49,79
Enzima concentrada	12	0,027*	0,32	113,26	9,44	352,02	22,03	97,08

Se observa que la cantidad de proteína va disminuyendo debido a que en los pasos de purificación se separan otras proteínas, enzimas extracelulares que se puedan producir por la levadura y restos proteicos del mismo medio que la levadura no haya aprovechado.

En cuanto a la actividad específica, esta se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de fructosa/min ya que se relaciona directamente con la cantidad de proteína y se observa que al purificar la enzima la actividad específica aumenta considerablemente.

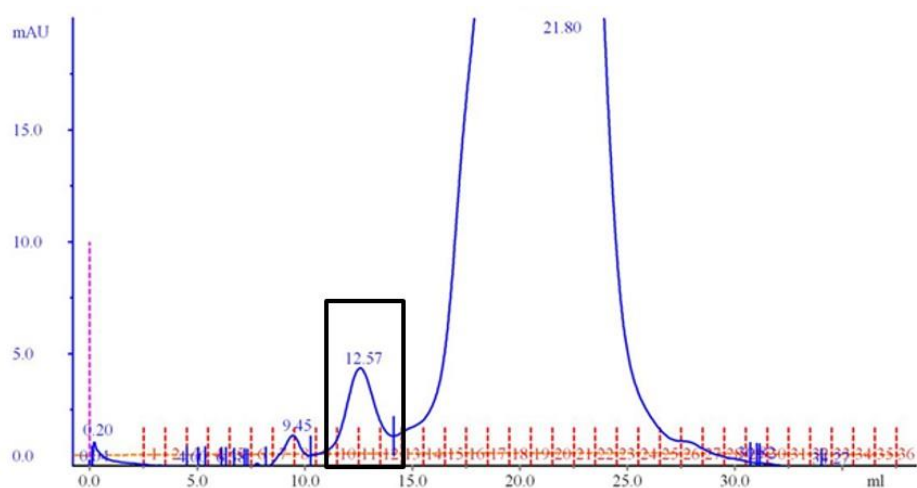
Finalmente, el rendimiento se calcula con base a la actividad total (U) que resulta de multiplicar la actividad volumétrica por el volumen total. Esta actividad idealmente debe mantenerse constante al final de la purificación y al obtener un rendimiento del 97,08% se concluye que el proceso de purificación es eficiente.

Se destaca que la actividad aumenta después de que se concentra la enzima, esto se asocia a que en la exclusión molecular, la enzima se purificó con una fase móvil que contiene 0.5 M de sodio, esta cantidad se añadió para evitar la aglomeración de la proteína, dicha cantidad de sodio modifica la fuerza iónica y la actividad de la enzima puede verse afectada.

La fuerza iónica tiene dos principales efectos: El efecto neutralizante por el contraión de las sales en las interacciones electrostáticas requeridas para la unión del sustrato y otro efecto en la influencia en los valores de pKa de los

residuos ionizables en la enzima y los sustratos, lo que afecta sus interacciones electrostáticas. La fuerza iónica también puede afectar la actividad de una enzima al cambiar su estabilidad y solubilidad, así como la de los sustratos. Los efectos de las sales sobre la estabilidad se vuelven más importantes con las enzimas hidrofílicas (Eun, 1996)

Antes de concentrar la enzima, se dializó reduciendo la concentración iones obteniendo un aumento de la actividad enzimática.



- **Figura 8.** Cromatograma obtenido por exclusión molecular.

Al realizar la purificación por FPLC se obtienen diferentes fracciones que se muestran en el cromatograma (Figura 8). Las fracciones que contienen proteína dan una señal que se mide en mili-absorbancia UV (mAU) en el eje de las abscisas, en el eje de las ordenadas está el volumen de elución en mL. Los números en color rojo son las diferentes fracciones de un mL que separa el equipo. De esta manera en donde se obtienen picos de absorbancia UV, se tomó una muestra y se evaluó el contenido de proteína y actividad enzimática. Así se descartaron las fracciones sin actividad enzimática y se concluyó que la inulinasa en cuestión se encuentra en las fracciones 10 y 11.

6.3 Evaluación de otras formulaciones.

El procedimiento anterior se realizó con otras formulaciones del medio de cultivo (descritas en la metodología) donde se aumentó la fuente de carbono y de nitrógeno para producir más enzima, obteniendo los siguientes resultados.

Formulación	Volumen de medio	mg enzima/mL
Mínima	1000 mL	0,00052
F1	100 mL	0,0016
F2	100 mL	0,0006

Tabla 6. Cantidad final de enzima obtenida al evaluar diferentes medios de cultivo con mayor fuente de carbono y nitrógeno (La enzima reportada es después de haber sido purificada mediante FPLC).

Con base en lo descrito en la Tabla 6 se determinó que la formulación 1 es con la que se debe trabajar, debido a que la formulación mínima es un volumen diez veces mayor y solo se produce aproximadamente 3 veces más enzima. Mientras que la formulación dos, la cual a pesar de tener dos fuentes de nitrógeno (peptona y extracto de levadura), no presentó correlación con la producción de la inulinasa. El hecho anterior se justifica con la investigación de (Singh et al., 2006), el cual evaluó la producción de inulinasa a partir de la cepa YS-1 de *K. marxianus* con diferentes variables, entre ellas la concentración de inulina y la de la fuente de nitrógeno de tal forma que se concluyó que una cantidad mayor al 0.5% (m/v) de fuente de nitrógeno reprime la actividad de inulinasa debido a que el sulfato de amonio, el cloruro de amonio, el nitrato de amonio y la urea son inhibidores de la síntesis de inulinasa, debido a la liberación de iones de amonio. De igual manera el nitrato de sodio mostró un efecto inhibitor en la producción de la enzima, sustancia que es parte de la formulación del medio, por lo que para futuros ensayos se recomienda no utilizarla. Lo anterior explica porque al aumentar la fuente de nitrógeno no necesariamente alcanza un aumento en la producción de enzima.

Finalmente el principal factor que se debe tomar en cuenta respecto a la producción de inulinasa para la levadura *K. marxianus* es la inulina. En el estudio anterior se determinó una máxima producción de enzima utilizando 3.5% (m/v) de inulina en el medio de cultivo.

6.4 Verificación de la purificación.

Para evaluar la pureza de la proteína en cada paso de separación se realizó una electroforesis SDS-PAGE (10 y 4% poliacrilamida) siguiendo la metodología de Laemmli la cual consiste en un gel discontinuo con un gel de apilamiento superior

y un gel de resolución inferior que tienen diferentes valores de pH y concentraciones de poliacrilamida. El gel de apilamiento superior tiene un porcentaje menor de poliacrilamida que permite que las proteínas se muevan rápidamente y se "apilen" en una banda apretada antes de entrar en el gel de resolución de poliacrilamida de mayor porcentaje para la separación (Brunelle & Green, 2014).

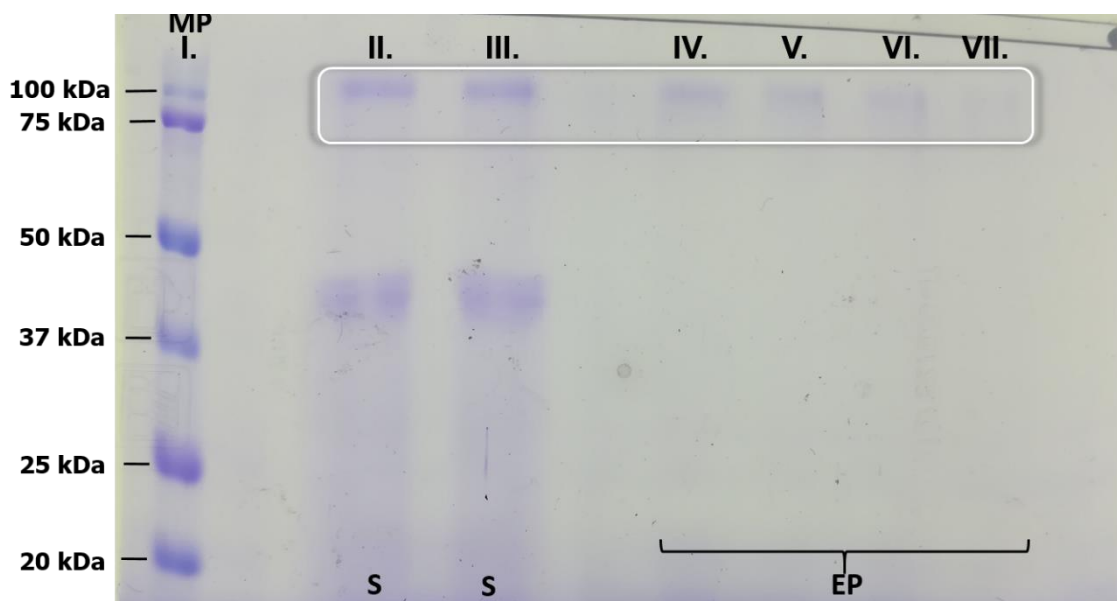


Figura 9. Electroforesis (SDS-PAGE) del sobrenadante de medio de cultivo (S) y de enzima purificada (EP) junto con un marcador de peso molecular (MP). En los carriles IV-VII se disminuyó gradualmente la cantidad de muestra (40- 10 μ L) en intervalos de 10 μ L.

En el gel realizado se aplicaron: un marcador de peso molecular (MP), dos muestras de sobrenadante de medio de cultivo liofilizado y concentrado (S), y la enzima pura re suspendida (EP) (Figura 9). Se observa una banda tanto en la muestra de sobrenadante y la de enzima purificada a una altura de entre 100-150 kDa. Esta enzima es similar a la reportada por (Arrizon et al., 2011). La primera enzima purificada a partir de una cepa de *Kluyveromyces marxianus* aislada de la fermentación de agave mezcalero es una fructanasa la cual se reportó como un dímero de 250 kDa. (Trapala Reyna y Montiel Pacheco, 2017) A partir de una cepa de *K. marxianus* aislada de residuos de agave, obtuvieron una inulinasa de 256 kDa también dimérica y que se observa como una sola

banda en el gel de electroforesis cerca de los 100 kDa. Con ello se justifica la banda que aparece entre los 100 y 150 kDa, pero no es posible confirmar el peso molecular. Posteriormente se determina este mediante exclusión molecular.

Comparando con la muestra sin purificar, en ésta se observan dos bandas gruesas (entre 100-150 y otra 37-50 kDa) y algunas muy ligeras en contraste con la banda única de la muestra purificada (entre 100-150 kDa). Con esto se afirma que se obtuvo enzima pura. La tinción de Coomasie se recomienda para muestras en donde se tiene una cantidad de enzima de 0.2 µg o más en la muestra, mientras que si es mayor se recomienda emplear tinción con sales de plata que permiten detectar hasta 5 ng de proteína (He, 2011). Con lo anterior se recomienda teñir el gel mediante la técnica de sales de plata o realizar la electroforesis con muestra más concentrada, de tal forma que se tenga la certeza de que la enzima está pura.

6.5 Peso molecular.

El método de SDS-PAGE aporta una aproximación del peso molecular de la enzima, pero al ser un método desnaturizante, solo se obtiene información del monómero de la proteína. Por ello se recurrió a la exclusión molecular, el cual no es desnaturizante y permite estudiar el dímero.

Tabla 7. Estándares empleados para la calibración de la columna de exclusión molecular.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Volumen de elución (mL)	Ka
Tiroglobulina (bovina)	670	10.33	0.045
gama-globulina (bovina)	158	13.53	0.268
Ovoalbúmina (gallina)	44	16.66	0.487
Mioglobina (caballo)	17	19.03	0.653
Vitamina B12	1.35	22.75	0.913
Azul de dextrana	2000	9.69	

Para obtener el coeficiente de retención de la muestra en la columna (Ka) 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 el volumen muerto es el volumen de elución del azul de dextrana y el volumen total es el de la columna (24 mL). En la Tabla 7 se muestran los volúmenes de elución de cada proteína empleada, así como el peso molecular de cada una.

La curva de calibración (Apéndice B) se realizó graficando Ka vs el Log del peso molecular en Dalton y de esta forma se determinó el peso molecular de la enzima de interés. El volumen de elución de la muestra es de 12.57 mL lo que resulta en un Ka de 0.2013 y utilizando la ecuación de la recta se obtiene un peso molecular de 274.17 kDa.

En contraste con lo obtenido en SDS-PAGE donde se estima un peso molecular de entre 100-150 KDa, se confirma que se trata de un dímero y por eso solo se ve una banda al teñir el gel de electroforesis y por lo tanto el tamaño del monómero sería de 137 kDa

Es importante señalar que la inulinasa obtenida es de un tamaño considerable debido a que, comparando con otras reportadas de hongos y bacterias en bases de datos, el peso molecular de las inulinasas oscila entre 60-70 KDa y son monoméricas, no diméricas como la reportada. Aún no existe una cristalografía de alguna inulinasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, por lo que es de importancia científica desarrollar investigación para entender el tamaño y la función del dímero en esta inulinasa reportada.

6.5 Tinción de Schiff (Glicosilaciones en la enzima).

La glicosilación en enzimas es importante debido a que es una modificación postraducional que ocurre en particular sobre proteínas secretadas y transmembrana de eucariotas, arqueas y, en menor medida, en procariotas. Nuevos estudios han demostrado que los glicanos tienen distintos efectos sobre la actividad de muchas enzimas, en particular como módulos reguladores para la unión y la rotación de sustratos (Goettig, 2016).

Para la tinción de Schiff se utilizó ácido peryódico, el cual genera grupos aldehído en los carbohidratos presentes. Posteriormente al adicionar el reactivo de Schiff, éste reacciona con dos grupos aldehídos contiguos dando lugar a una coloración magenta como se observan en las bandas señaladas del gel (Figura 10), indicando que la enzima se encuentra glicosilada.

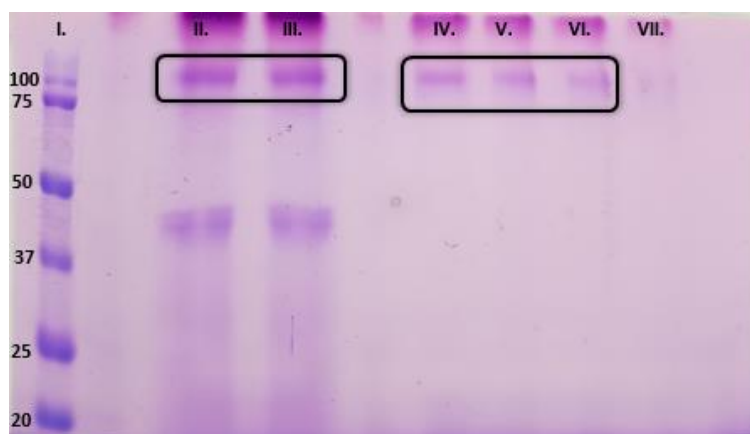


Figura 10. Tinción de Schiff. Gel de acrilamida 10% teñido con reactivo de Schiff. Carriles: I. Marcador de peso molecular (kDa); II-III. Sobrenadante del medio de cultivo; IV-VII. Muestra purificada.

Las glicosilaciones en inulinasas de *K. marxianus* han sido reportadas por (Pessoa y Vitolo, 1997), con un peso molecular entre 200 a 250 kDa. Esto concuerda con los resultados obtenidos hasta el momento. Así mismo la inulinasas reportada por (Trapala Reyna y Montiel Pacheco, 2017) también se encuentra glicosilada, aunque su peso molecular es menor al encontrado en este trabajo, por lo que se podría suponer diferencias en el grado de glicosilación.

6.6 Velocidades iniciales.

La determinación de las velocidades iniciales es de suma importancia debido a que bajo esta condición se puede considerar que la concentración de sustrato es prácticamente constante a lo largo del experimento. Esto se debe a que bajo velocidades iniciales la enzima se encuentra en un estado que no ha sido modificado ya sea por productos o bien por el medio y condiciones de reacción. La velocidad de transformación aumenta inicialmente de forma lineal a medida que aumenta la concentración de sustrato (Restrepo et al., 1996). Por ello es

importante tener una pendiente lineal como se observa en la Figura 11, al paso del tiempo ocurre que la gráfica se acercase a una meseta a medida que la reacción se ralentiza y se forma menos producto. Con lo anterior se afirma que durante los primeros 30 minutos de reacción se está trabajando a velocidades iniciales (Figura 11). Todas las determinaciones de actividad fueron realizadas bajo velocidad inicial de reacción.

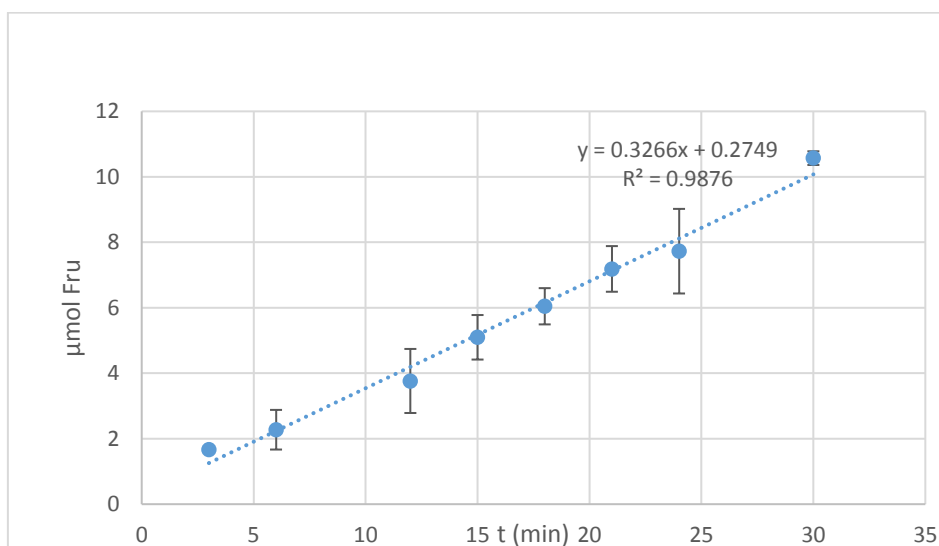
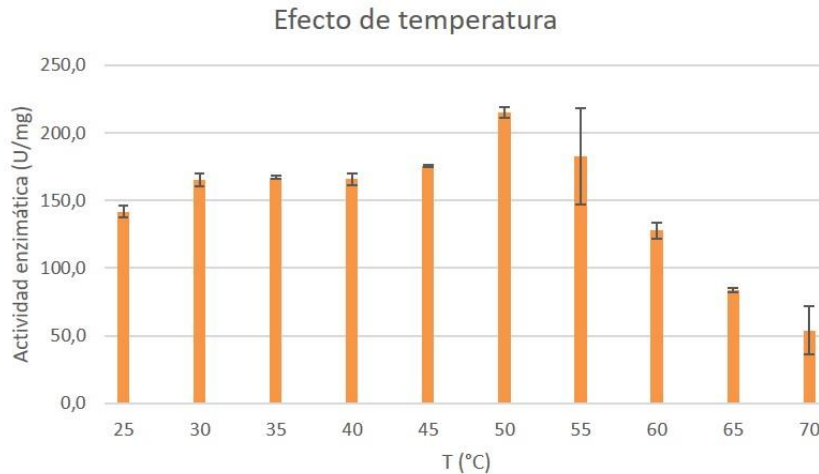


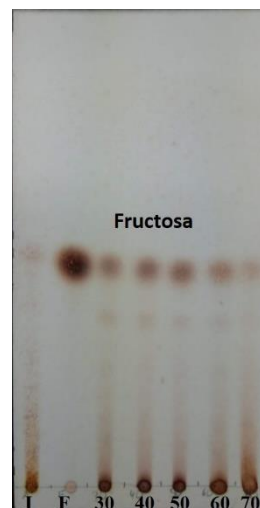
Figura 11. Determinación de velocidad inicial de la inulinasa de *K. marxianus* utilizando como sustrato inulina de Agave Azul.

6.8 Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica de la inulinasa.

Aunque la enzima presentó actividad en un intervalo de temperatura de 25 a 70°C (Figura. 12 y 13), la máxima actividad se observó a los 50°C, mientras que a 70°C la enzima sólo conserva el 30% de la actividad máxima. Así mismo este comportamiento se comprobó por medio de cromatografía de capa fina (TLC), en donde se puede observar la desaparición de la fructosa (producto de reacción) conforme aumenta la temperatura (Figura 13).



- **Figura 12.** Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática. (La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 1 mL a diferentes temperaturas (25-70°C) pH 5 y 500 rpm. Para iniciar la reacción se agregaron 1.49 µg de enzima).

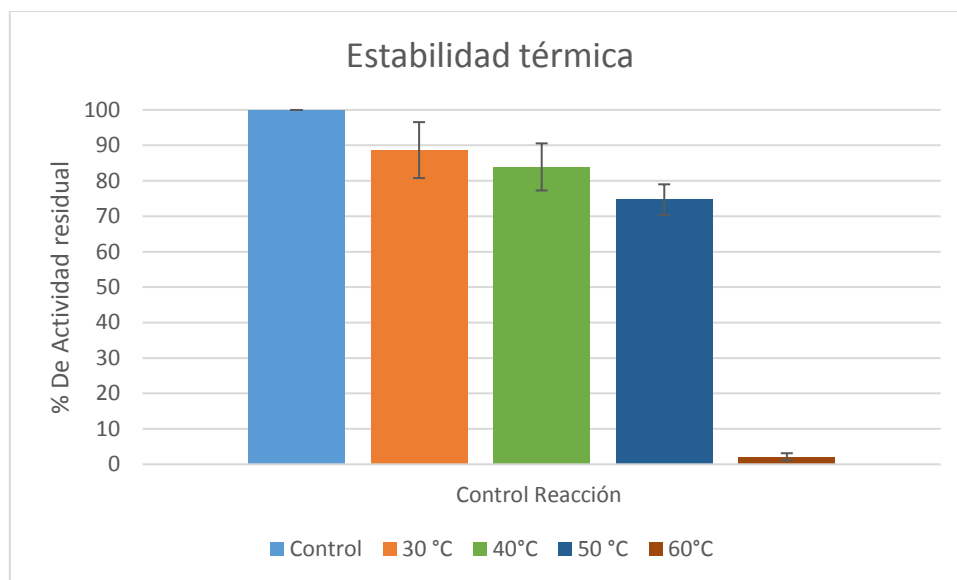


- **Figura 13.** Cromatografía en capa fina sobre el efecto de temperatura (30-70 °C en intervalos de 10 °C). I: Control de inulina de agave y F: Control de fructosa

La termoestabilidad es un factor importante a considerar dentro las propiedades de una enzima, ya que esta podría jugar un papel fundamental dentro de la industria química y alimenticia. Sin embargo, muchas de la inulinasas reportadas pierden su actividad en fracciones de horas. Por ejemplo; la inulinasas de *K. marxianus* CCMB 322 retuvo solo el 55.28% de la actividad original después de

50 min a 60°C y pierde toda la actividad después de 10 min a 70°C (Flores et al., 2016).

En cuanto a la termoestabilidad se evaluó la actividad enzimática de la inulinasa después de incubarse 2h a las temperaturas de trabajo (30, 40, 50 y 60 °C) (Figura 14). Se comparó la actividad contra un control de reacción a las condiciones de trabajo usadas (20 min, 50 °C).



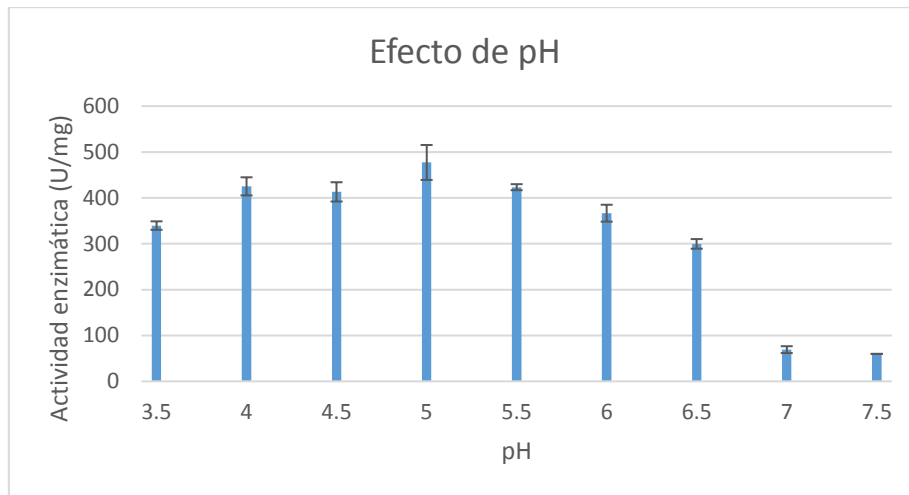
- **Figura 14.** Estabilidad de la inulinasa después de ser incubada a 30, 40, 50 y 60 °C.

La forma en que las enzimas responden a la temperatura es fundamental en muchas áreas de la biotecnología. Una limitante es la termosensibilidad de la estructura de las proteínas; a mayores temperaturas las enzimas se desnaturalizan irreversiblemente, precipitan y pierden su capacidad catalítica. La desnaturalización no ocurre a la misma temperatura para todas las enzimas, y depende de varios factores que determinan la estabilidad. La relación de la actividad enzimática con la temperatura se determina por dos efectos, el aumento de velocidad de reacción a temperaturas menores y la disminución debido a la desnaturalización térmica (Bisswanger, 2019).

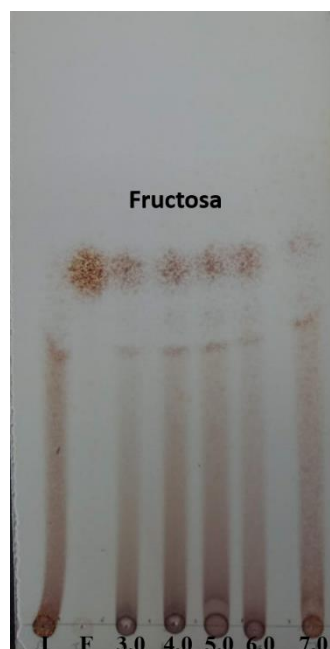
La inulinasa en estudio es más termosensible respecto a la inulinasa con mayor similitud reportada por (Arrizon et al., 2011), donde a 40 °C después de 72 horas la enzima tiene un 98% de actividad residual y la enzima estudiada después de 2h a 40°C tiene cerca de 85% de actividad residual (Figura 14).

6.7 Efecto de pH sobre la actividad enzimática.

Respecto a los valores óptimos de temperatura y pH obtenidos, estos son similares respecto a otras inulinasas reportadas de la misma levadura (Kushi *et. al.*, 2000).



- **Figura 15.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática.



- **Figura 16.** Cromatografía en capa fina sobre el efecto del pH. (3.0-7.0 en intervalos de 1.0). I: Control de inulina de agave y F: Control de fructosa

En las figuras 15 y 16, se observa que la inulinasa presenta actividad desde pH 3,5 hasta 7,5, con máximo de actividad a pH 5,0. A pH 3,5 la enzima tiene un 71% de la actividad máxima mientras que a 7,5 presenta un 12.5%. Tanto en la gráfica como en la cromatoplaca se puede observar que en el intervalo de pH de 4-6 la actividad es similar.

6.8 Afinidad por otros sustratos.

Al evaluar la enzima con diferentes sustratos en una concentración 1% (Figura 17) se observó que la inulinasa tiene una actividad predominante sobre la sacarosa con una actividad específica de 1,331 U/mg, posteriormente a la actividad de la achicoria que es lineal, por lo que se estima que la inulinasa con la que se trabaja se une con mayor facilidad a sustratos de estructura simple como son la achicoria y la sacarosa en comparación con la inulina de agave azul, que es una estructura altamente ramificada, para la cual se obtuvo una actividad específica de 350 U/mg. La inulina de tubérculos de dalia es la única que no concuerda con esta aseveración ya que de acuerdo a (Vereyken, *et. al.*, 2003) también es lineal; únicamente tiene un mayor grado de polimerización en comparación con la inulina de achicoria.

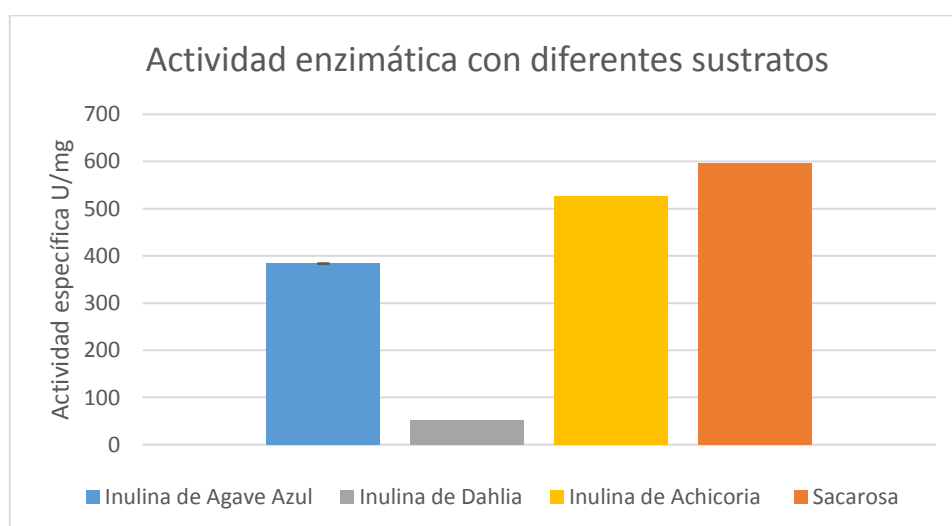


Figura 17. Actividad enzimática de la inulinasa con diferentes sustratos.

Para evaluar la afinidad de una manera más precisa es necesario determinar la K_m para todos los sustratos de tal forma que comparando este valor se tiene una mayor certidumbre de la afinidad de la enzima por diferentes sustratos.

6.9 Parámetros cinéticos de la inulinasa ACH1.

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima de estudio se evaluó la velocidad inicial de la enzima con diferentes concentraciones de agavina. Se construyó la Figura 18 y con el software estadístico descrito en la metodología. Se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: $K_m = 4 \pm 1.085$ mM y una $V_{max} = 600 \pm 85$ U/mg con una R^2 de 0.99 para el modelo empleado.

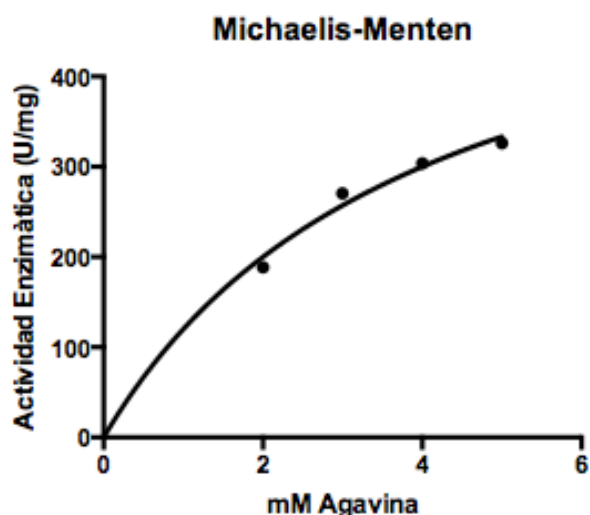


Figura 18. Gráfico de Michaelis-Menten para la determinación de la cinética enzimática de la inulinasa de *K. marxianus* empleando como sustrato inulina de agave.

En la Tabla 8 se presentan los parámetros cinéticos de las inulinasas con mayor similitud reportados para la hidrólisis de agavina. Se muestra el cociente K_{cat}/K_m que indica la eficiencia catalítica y es adecuado para comparar las actividades de las enzimas frente a un mismo sustrato, de tal forma que entre mayor sea el valor del cociente, mayor será la eficiencia catalítica.

Con los resultados obtenidos se tiene que la enzima es comparativamente mejor para la hidrólisis de agavina.

Tabla 8. Parámetros cinéticos para inulinasas provenientes de *Kluyveromyces marxianus* en la hidrólisis de agavina.

Inulinasa	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (s ⁻¹ *mM ⁻¹)
<i>K. marxianus</i> AZ8	4.00	2738	638.89
(Arrizon, et al. 2011)	12.9	11	0.90
(Trapala Reyna et. al 2017)	11.79	339	28.76

7. Conclusiones.

- Se logró purificar la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 mediante exclusión molecular.
- La enzima en estudio es una exoinulinasa glicosilada, demostrado mediante tinción de schiff.
- A partir de exclusión molecular y electroforésis SDS-PAGE se demostró que estructuralmente la inulinasa es un dímero con un peso molecular de 274.17 kDa.
- El aumento en la concentración de inulina en el medio de cultivo, aumenta la producción enzimática.
- En la hidrólisis de inulina de agave, la temperatura óptima de actividad de la inulinasa se encuentra a los 50 °C, mientras que el pH óptimo de actividad es de 5.0.
- A partir de la cinética de la hidrólisis de inulina de agave, se determinó que tiene una: Km 4.00 ±1.085 mM, una Vmax de 600 ±85 U/mg, y una Kcat de 2,738 s⁻¹, De tal forma que se tiene una enzima con mayor afinidad y actividad en la hidrólisis de inulina de agave, respecto a otras inulinasas reportadas.

8. Perspectivas.

Estandarizar una metodología para evitar la pérdida de actividad de la enzima.

Evaluar mayores concentraciones de inulina para intentar aumentar la producción de inulinasa.

Evaluar el uso de cationes que puedan aumentar o inhibir la actividad enzimática.

Determinar parámetros cinéticos de otros sustratos para evaluar la afinidad.

Evaluar que efecto causa la temperatura en el dímero para conocer la función de este mediante dispersión dinámica de luz.

Desarrollar una metodología utilizando la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 en pencas de agave. La metodología debe incluir la extracción de la inulina de este material, el acondicionamiento del extracto a condiciones óptimas de reacción y la cuantificación del rendimiento.

9. Referencias.

Alonso, M.S. and Rigal, L. (1997) Caracterización y valoración del bagazo de Agave tequilana Weber de la industria del tequila. Revista Chapingo, Serie Horticultura, 3, 31-39

Alvarado, C., Camacho, R.M., Cejas, R., Rodríguez, J.A.,(2014) Profiling of commercial agave fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography. Revista Mexicana de Ingeniería Química [en línea] 2014, 13 [Fecha de consulta: 17 de julio de 2019] Disponible en:<<http://5.redalyc.org/articulo.oa?id=62031508006>> ISSN 1665-2738

Álvaro-Benito, M., Sainz-Polo, M. A., González-Pérez, D., González, B., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural and Kinetic Insights Reveal That the Amino Acid Pair Gln-228/Asn-254 Modulates the Transfructosylating Specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β -Fructofuranosidase, an Enzyme That Produces Prebiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19674-19686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355503>

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2011). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. *Bioresource Technology*, 102(3), 3298-3303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.071>

- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.088>
- Ávila-Fernández, Á., Rendón-Poujol, X., Olvera, C., González, F., Capella, S., Peña-Álvarez, A., & López-Munguía, A. (2009). Enzymatic Hydrolysis of Fructans in the Tequila Production Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5578-5585. <https://doi.org/10.1021/jf900691r>
- Benkeblía, N. (2013). Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A*, 1313, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.013>
- Bisswanger, H. (2019). *Practical Enzymology*. Recuperado de <http://public.ebib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=5798189>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie Blue Staining. En *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 161-167). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). En *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>.
- Caro Bermúdez Mario A., z, Martínez Jiménez Alfredo, Serrano Carreón Leobardo (2001). Caracterización del bagazo de agave como fuente de azúcares para la producción de etanol. Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería. https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IX/CIX-03.pdf.
- Castillo Calderón, Augusto; Chamy Maggi, Rolando Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus* *Scientia Agropecuaria*, vol. 1, núm. 3-4, 2010, pp. 235-245 Universidad Nacional de Trujillo Trujillo, Perú
- Chandra, M. R. G. S., & Madakka, M. (2019). Comparative Biochemistry and Kinetics of Microbial Lignocellulolytic Enzymes. En *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 147-159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00011-8>

- Eun, H.-M. (1996). Enzymes and Nucleic Acids. En *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* (pp. 1-108). <https://doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50004-1>
- Flores Adriana C., Morlett Jesús A. & Rodríguez Raúl (2016) Inulin Potential for Enzymatic Obtaining of Prebiotic Oligosaccharides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:11, 1893-1902, DOI: 10.1080/10408398.2013.807220
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., & Guillarme, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 161-173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 670 pp.
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., & Bárzana, E. (2003). SINGLE-CELL PROTEIN | Yeasts and Bacteria. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 5277-5284). <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01088-9>
- Goettig, P. (2016). Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1969. <https://doi.org/10.3390/ijms17121969>
- He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *BIO-PROTOCOL*, 1(11). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.80>
- Iñiguez-Covarrubias, G., Díaz-Teres, R., Sanjuan-Dueñas, R., Anzaldo-Hernández, J., & Rowell, R. M. (2001). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: Potential value of Agave tequilana Weber azul leaves. *Bioresource Technology*, 77(2), 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00167-X)
- Kushi, R. T., Monti, R., & Contiero, J. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 63-69. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000032>
- Lachance, A., 1998. *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, 227-247.

- Lane, M. y Morrissey, J., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *British Mycological Society*, 24, 17-26.
- Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker, P. y Dujon, B., 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*. *FEBS Lett.*, 487, 71-75.
- Mancilla-Margalli, N., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7832-7839. doi: 10.1021/jf060354v
- McCarter, J. D., & Stephen Withers, G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), 885-892. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2)
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 130, 405-419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>
- Meyer, D., & Blaauwhoed, J.P. (2009). Inulin. En *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 829-848). <https://doi.org/10.1533/9781845695873.829>
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of β -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44(8), 891-898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.013>
- Neagu Bonciu, Camelia & Bahrim, Gabriela. (2011). Inulinases-a versatile tool for biotechnology. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 9. 1-11.
- Nielsen, S. S. (2003). *Food analysis laboratory manual 2003*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food Analysis* (Fourth edition). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1>
- Pessoa, A., Vitolo, M., 1997. Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnol. Tech.* 11, 421–422.
- Restrepo M, Angela, Bedoya, V. I., Borrero, J., Botero, D., Restrepo, J., ... Corporación para Investigaciones Biológicas. CIB. (1996). *Fundamentos*

- de medicina Enfermedades infecciosas*. Medellín (Antioquia, Colombia): Corporación para Investigaciones Biológicas.
- SAGARPA (2017) Planeación agrícola nacional 2017-2030. Agave tequilero y mezcalero mexicano. México.
- Singh, R. S., Dhaliwal, R., & Puri, M. (2006). Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Process Biochemistry*, 41(7), 1703-1707. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.005>
- Singh, R. S., Singh, T., & Larroche, C. (2019). Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. *Bioresource Technology*, 273, 641-653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.031>
- Soto, José Luis & González, José & Vivar-Vera, María & Ramos-Ramírez, Emma. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro*. 23. 199-206.
- Trapala Reyna, J., & Montiel Pacheco, C. (2017). Obtención y caracterización de inulinasas a partir de *Kluyveromyces* sp. en la hidrólisis de agavina. Retrieved from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000768321&lang=es&site=eds-live>
- Vázquez-García, J. A., Muñiz-Castro, M. Á., Sahagún-Godínez, E., Cházaro-Basáñez, M. de J., De Castro-Arce, E., Nieves-Hernández, G., & Padilla-Lepe, J. (2013). Four New Species of *Agave* (Agavaceae) of the *Marmoratae* Group. *Systematic Botany*, 38(2), 320-331. <https://doi.org/10.1600/036364413X666642>
- Velázquez-Martínez, J., González-Cervantes, R., Hernández-Gallegos, M., Mendiola, R., Aparicio, A., & Ocampo, M. (2014). Prebiotic Potential of *Agave angustifolia* Haw Fructans with Different Degrees of Polymerization. *Molecules*, 19(8), 12660-12675. <https://doi.org/10.3390/molecules190812660>
- Vereyken, I. J., van Kuik, J. A., Evers, T. H., Rijken, P. J., & de Kruijff, B. (2003). Structural requirements of the fructan-lipid interaction. *Biophysical Journal*, 84(5), 3147-3154.

- Waleckx, E., Mateos-Diaz, J. C., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., Brin, N., García-Quezada, G. Monsan, P. (2011). Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production. *Food Chemistry*, 124(4), 1533-1542.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.007>
- Walsh, G. (2014). *Proteins: Biochemistry and biotechnology*. Recuperado de <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4039253>

Apéndice A.

Métodos Cuantitativos

Método de Bradford para la determinación de proteínas.

Cuando el colorante Coomassie Azul Brillante G-250 se une a una proteína, el colorante cambia de color rojizo a azulado, y el máximo de absorción del colorante se desplaza de 465 a 595 nm. El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína de la muestra. La técnica de Bradford se basa en la naturaleza anfótera de las proteínas. Cuando la solución que contiene proteínas se acidifica a un pH menor que el punto isoeléctrico de la proteína de interés, el tinte agregado se une electrostáticamente. La eficacia de la unión se ve aumentada por la interacción hidrofoba de la molécula de tinte con el esqueleto polipeptídico contiguo a los residuos cargados positivamente en la proteína.

Este procedimiento se ha mejorado para medir microgramos de proteínas (1-100 $\mu\text{g/mL}$). Debido a su rapidez, sensibilidad y menos interferencias que el método de Lowry, el método de Bradford se ha utilizado ampliamente para el análisis de bajas concentraciones de proteínas y enzimas en su purificación y caracterización (Nielsen, 2010).

Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC).

La cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza para purificar proteínas y otras biomoléculas (ácidos nucleicos y/o polisacáridos) a partir de mezclas complejas contenidas en un extracto, mediante el uso de columnas cromatográficas de diversos tipos como son: filtración en gel, interacción hidrofóbica, intercambio iónico y afinidad las cuales se conectan a un equipo automatizado equipado con un detector de luz UV-visible (190-700 nm) en línea con hasta tres longitudes de onda simultáneas (280/214/254 nm), un medidor de conductividad (0.001-999.9 mS/cm) y un mezclador de gradientes .

Las resinas para FPLC, dependiendo de la aplicación, están disponibles en una amplia gama de tamaños y ligandos en su superficie. En el estudio llevado a cabo se empleó la columna Superdex 200 que es una columna de exclusión

molecular con un alto poder de resolución para las proteínas y otras biomoléculas en el rango de peso molecular: ~ 10 000 a 600 000 Da.

La cromatografía de exclusión molecular es un método en el que la separación de diferentes compuestos se produce de acuerdo con su tamaño (volumen hidrodinámico) medido por la eficiencia con la que penetran en los poros de la fase estacionaria. La fase estacionaria consiste en partículas porosas esféricas con un tamaño de poro cuidadosamente controlado, a través del cual las biomoléculas se difunden utilizando un buffer acuoso como fase móvil.

Las proteínas más grandes, que se excluyen de los poros, se eluyen primero. Las proteínas posteriores se eluyen en orden decreciente. Como las formas de las proteínas también podrían variar (por ejemplo, las cadenas globulares, similares a barras o flexibles), sus radios no se correlacionan exactamente con el peso molecular (Fekete, *et. al.*, 2014).

- **Determinación de peso molecular por exclusión molecular.**

En la exclusión molecular la separación basada en el tamaño permite la construcción de una curva de calibración basada en un conjunto de analitos conocidos, que se pueden usar para estimar el peso molecular de un analito desconocido. Las curvas de calibración típicas se basan en proteínas o polímeros de pesos moleculares conocidos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS).

En presencia de algunos compuestos químicos, las proteínas pierden su estructura nativa; tales compuestos, llamados agentes desnaturizantes, producen el desplegamiento de la proteína que queda, así, sin la organización tridimensional característica de su funcionalidad biológica.

Los detergentes afectan a la estructura nativa de las proteínas y a las interacciones con otras moléculas (proteínas, lípidos, etc.), ya que las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son sustituidas por interacciones detergentes-proteína. El SDS posee una carga negativa y un fuerte carácter desnaturizante.

La PAGE-SDS permite el cálculo de parámetros moleculares (al contrario que el resto de los tipos de electroforesis), pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular.

El SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína. Enmascara o anula las cargas propias de la proteína aportando una carga negativa y los complejos formados adquieren una forma elipsoide.

Esta técnica es la más utilizada en el análisis de proteínas debido a que:

- La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- Todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido.
- Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- La separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, que se puede calcular.
- Los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

- **Método de Laemmli.**

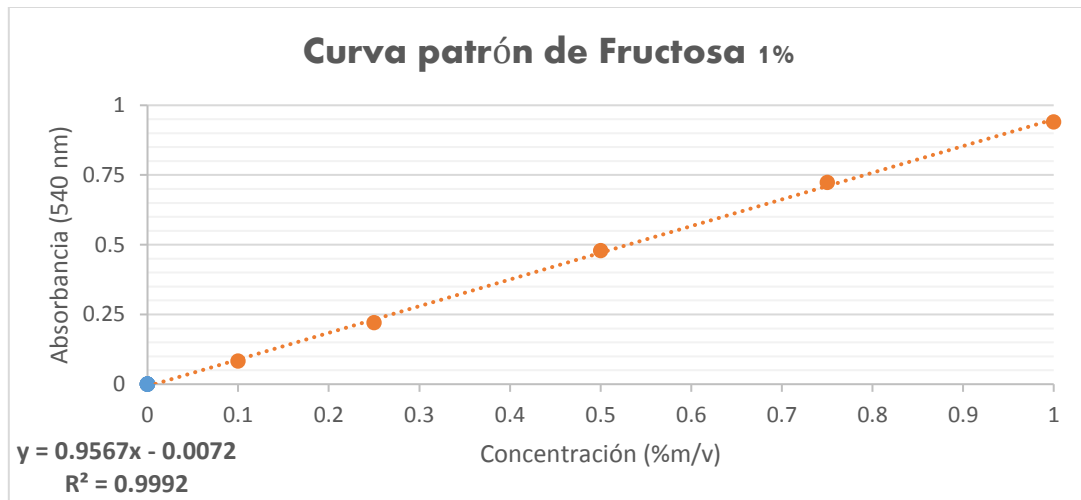
Este método es el más utilizado en la PAGE-SDS, fue publicada en 1970. El sistema se basa en un sistema discontinuo de buffer. Dos iones de movilidad electroforética diferente (glicinato y cloruro) forman un límite móvil cuando se aplica voltaje. Las proteínas tienen una movilidad intermedia, lo que hace que se concentren o "acumulen" en una zona estrecha al comienzo de la electroforesis.

El efecto de apilamiento es responsable del alto poder de resolución del sistema Laemmli. La muestra se carga en una zona relativamente amplia, y el límite móvil concentra las proteínas en bandas afiladas antes de la separación. A medida que el límite se mueve a través del gel, el efecto de tamizado del gel de poliacrilamida hace que diferentes proteínas se muevan a diferentes velocidades. Una ventaja del sistema Laemmli es que permite el análisis de muestras relativamente diluidas. La muestra se concentra antes de la separación.

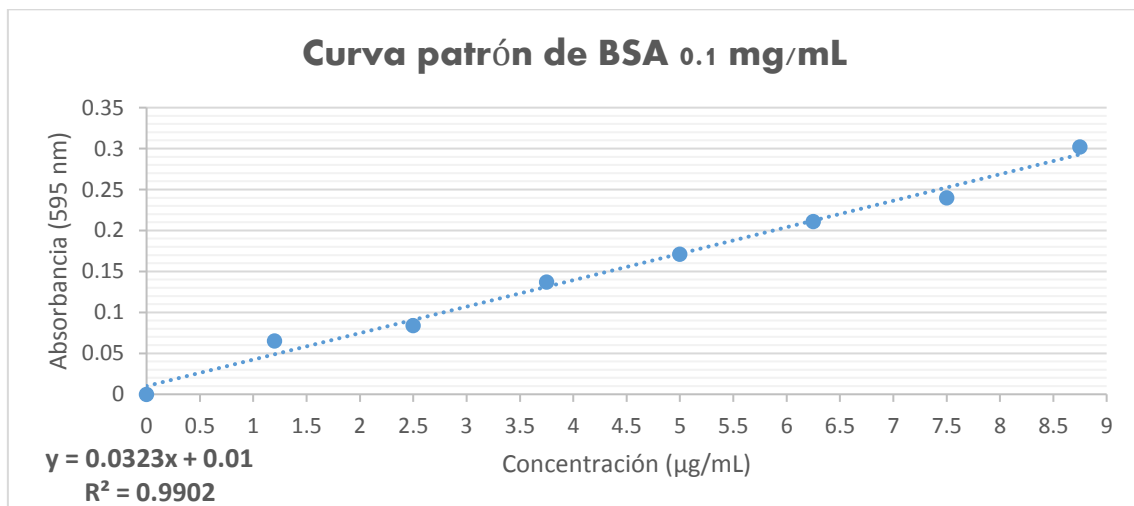
Desde su desarrollo, el sistema Laemmli se ha convertido en la herramienta principal para analizar mezclas de proteínas debido a su simplicidad, versatilidad y robustez. Es considerado como el "Estándar de oro" de las técnicas de PAGE-SDS por su capacidad para resolver limpiamente muestras complejas de diversas fuentes.

Apéndice B.

1.- Curva patrón para la medición de azúcares reductores por el método DNS.



2.- Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Bradford.



3.- Curva de calibración para la determinación de peso molecular mediante FPLC.

