



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Producción y aplicación de inulinasas utilizando penca de
Agave tequilana como fuente de carbono en fermentaciones
sumergidas con el hongo *Aspergillus niger* CH – A – 2010

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA
LUIS JAVIER GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La inulina es un polisacárido compuesto de unidades fructosa al que puede estar unido una molécula de glucosa. Es un polímero de reserva para diversos géneros vegetales, en los cuales actúa como fuente de energía y probablemente ayuda a prevenir los daños por temperaturas extremas. Los fructanos de *Agave tequilana* son un carbohidrato de reserva, que se encuentra principalmente en la zona de la piña y la base de las pencas de la planta, las pencas la poseen en menores cantidades. Al utilizar enzimas para hidrolizar las pencas del agave se liberan azúcares reductores, que pueden utilizarse para producir etanol y fructooligosacáridos útiles como prebióticos. Estas enzimas se pueden obtener de fermentaciones sumergidas utilizando las pencas como fuente de carbono, por lo cual es posible darle un uso integral al agave tequilero, pues estas pencas constituyen un residuo de la industria del Tequila. La producción de las enzimas extracelulares se llevó a cabo en cultivo sumergido con *Aspergillus niger* CH – A – 2010, utilizando pencas de *Agave tequilana* Weber como fuente de carbono, adicionadas con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, además de fosfatos. Se establecieron las condiciones de cultivo, pH, agitación, temperatura, concentración y la edad del inóculo a nivel matraz Fernbach con 1 litro de medio de cultivo y la producción de las enzimas se realizó a nivel fermentador de 16 L con 10 litros de medio, en el cual se obtuvieron 1.2 U/mL de inulinasa. Igualmente se establecieron las operaciones unitarias para la separación, purificación parcial y la obtención de un extracto crudo con actividad enzimática. Estos extractos se utilizaron para hidrolizar sustratos ricos en fructanos tipo inulina y agavinas y se evaluó la capacidad para producir azúcares reductores. El potencial de las enzimas obtenidas es la producción de fructosa y fructooligosacáridos a partir de fructanos, además de servir de intermediarios en la producción de etanol. Al utilizar las pencas en la producción de enzimas se proporciona un valor agregado al residuo agroindustrial y se favorece el uso integral del *Agave tequilana*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El *Agave tequilana* es un cultivo importante en el país por sus aplicaciones en la industria de las bebidas alcohólicas, en la que se utilizan alrededor de 1 millón de toneladas anuales. Desde el punto de vista industrial, el agave está constituido por las hojas o pencas y la piña. La piña es el corazón del agave rodeado por la base de las pencas, esta sección contiene la mayor cantidad de fructanos de toda la planta. Las pencas se separan de la piña durante la *jima* y permanecen en el campo de cultivo sin utilidad alguna. La piña se somete a cocimiento para obtener azúcares fermentables a través de hidrólisis físico química. Una vez obtenidos los azúcares se realiza la formulación del mosto y se inocula con levaduras para obtener el etanol. El residuo de este proceso es el bagazo de la piña el cual está constituido principalmente por celulosa, un uso potencial de este residuo es la fabricación de papel (Iñiguez – Covarrubias, 2001). Las pencas por otra parte, tienen entre sus componentes, celulosa, pectina, xilanos y fructanos, los cuales pueden servir como sustratos en fermentaciones con microorganismos para la producción de compuestos de interés industrial (Huitron *et al.*, 2008).

La inulina es un polisacárido constituido de fructosas y generalmente posee un residuo terminal de glucosa, algunos autores consideran que los polisacáridos de fructosa mayores de 10 unidades pueden considerarse como inulina, sin embargo algunos otros argumentan que la inulina es un mezcla de fructanos de longitudes diversas y que así se encuentra en la naturaleza. Este polisacárido se extrae comercialmente de vegetales como la achicoria y la dalia, pero está presente en alcachofa, el diente de león, la cebolla, el ajo y en los espárragos (Rica *et al.*, 2007).

La inulina puede emplearse como ingrediente funcional en los alimentos, pues se considera un prebiótico entre algunos otros beneficios que aporta su consumo, además si se hidroliza enzimáticamente se pueden obtener fructooligosacáridos que también poseen propiedades prebióticas y poseen dulzor de entre 30 – 50 % comparado con la sacarosa. La inulina es una fuente potencial de fructosa y

podrían prepararse jarabes con un porcentaje mayor al 90 %, con menos pasos enzimáticos comparados con los jarabes de fructosa elaborados con almidón de maíz. Para hidrolizar la inulina hasta fructosa pueden emplearse métodos fisicoquímicos, pero las condiciones drásticas producen compuestos coloridos y de dulzor nulo. Los métodos enzimáticos no producen compuestos indeseables y se puede alcanzar alta eficiencia en la hidrólisis (Singh, 2006).

Las enzimas que hidrolizan los fructanos hasta fructosa y fructooligosacáridos, son la exoinulinasa que libera las unidades de fructosa y la endoinulinasa que corta fructooligosacáridos de diversas longitudes. Las fuentes más productivas para obtener estas enzimas son de origen microbiano, entre las que destacan los hongos del género *Aspergillus* y levaduras del género *Kluyveromyces*, aunque algunas bacterias también las producen. Los hongos poseen la ventaja de producir las exo y endo inulinasas, además de que sus enzimas son extracelulares, por lo que los procesos de separación y purificación pueden ser más sencillos (Rica *et al.*, 2007).

Al utilizar los residuos de la industria tequilera como son las pencas, se podrían obtener enzimas con valor para la industria de los alimentos, pues podrían tener el potencial para producir jarabes de fructosa y fructooligosacáridos, al tiempo podrían utilizarse en la producción de azúcares fermentables requeridos para la producción de etanol.

CAPÍTULO 2. GENERALIDADES

2.1 Inulina y fructooligosacáridos.

La inulina es un polisacárido que consiste consistente en una cadena de D-fructosa unida con un enlace β (2 \rightarrow 1) y terminada con una D – glucosa unidad con un enlace α (1 \rightarrow 2). La inulina se puede describir con la fórmula GF_n , donde G se refiere a la glucosa, F a la fructosa y n al número de monosacáridos (Korakli *et al.*, 2003).

Cuando un fructooligosacárido tiene un grado de polimerización de al menos 30 unidades de fructosa, es llamado inulina. Esto corresponde a un peso molecular de 5400 Da. La longitud de las cadenas de la inulina depende de la variedad de la planta y de la estación del año, por lo cual, grados de polimerización más altos y bajos están presentes en los polifruktanos de la misma planta. De acuerdo con estas variaciones el peso molecular de la inulina varía entre los 3500 – 5500. Algunos autores señalan que la inulina siempre contiene regiones con moléculas que tienen cadenas laterales. El grado de polimerización y el nivel de ramificación son determinados por el origen de la inulina (Vandamme *et al.*, 1983).

La inulina es insoluble en agua fría, y en agua a 10° C es poco soluble (10 %), mientras que a 90° C se solubiliza parcialmente (35 %). Se hidroliza en medio ácido a altas temperaturas (70 – 80° C), pero se hidroliza en fructosa y oligosacáridos en condiciones suaves con inulinasas microbianas y vegetales

La inulina es un polímero de origen vegetal que sirve como reserva de carbohidratos por lo tanto no es un polisacárido estructural. En la naturaleza es muy abundante pues está presente en gran cantidad de plantas, tal como se muestra en la tabla 1 de las cuales se puede obtener fácilmente, mediante extracciones con agua caliente. Posteriormente se disminuye la temperatura para precipitarla, dada su limitada solubilidad a bajas temperaturas (Rica *et al.*, 2007).

Algunas plantas que contienen inulina han sido usadas para alimentación humana y pertenecen a los géneros *Liliacea* (cebolla, ajo y espárrago) o *Compositae* (alcachofa, dalia y achicoria). La mayor proporción de inulina que se usa en la actualidad en la industria de los alimentos, se obtiene de la achicoria (*Cichorium intybus*).

Tabla 1. Contenido de inulina en algunos vegetales % peso húmedo, (Rica *et al.*, 2007).

Fuente	Parte del vegetal	Sólidos	Contenido de inulina
Cebolla	Bulbo	6 – 12	2 – 6
Achicoria	Raíz	20 – 25	15 – 20
Puerro	Bulbo	15 – 20	3 – 10
Ajo	Bulbo	40 – 45	9 – 16
Alcachofa	Corazón	14 – 16	3 – 10
Centeno	Cereal	88 – 90	0.5 – 1.0
Diente de león	Hojas	50 – 55	12 – 15
Plátano	Fruto	24 – 26	0.3 – 0.7

Se ha propuesto a la inulina como competencia para la glucosa de maíz y la sacarosa del azúcar de caña, en cuanto a la posibilidad de obtener jarabes de fructosa (Rica *et al.*, 2007). Sin embargo la hidrólisis química de la inulina presenta serios inconvenientes, pues siempre se generan colores indeseables en los hidrolizados además de la formación de difructosa anhidro (~ 5%), la cual prácticamente no posee propiedades edulcorantes (Mancilla-Margalli *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 1999).

2.1.1 Fructooligosacáridos.

Los fructooligosacáridos son reconocidos por la mayoría de los autores como una mezcla de prebióticos del tipo inulina de cadena corta, sintetizados a partir de la sacarosa. Esta mezcla incluye únicamente fructanos que tienen la estructura química GF_n , en los cuales las fructosas adicionales, de 1–3 unidades han sido agregadas a la fructosa que forma parte de la sacarosa con grado de polimerización máximo de 4. También nombran como oligofructosa a las mezclas producidas por hidrólisis parcial de inulina. Estas mezclas contienen fructanos del tipo GF_n y F_n y consisten en fructanos con grado de polimerización menor de 10. Sin embargo otros autores usan los términos fructooligosacáridos y oligofructosa, por lo que suele haber confusión al usar estos nombres (Kelly, 2008).

2.1.2 Los fructooligosacáridos como prebióticos.

Los prebióticos como los fructooligosacáridos son ingredientes alimentarios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de bacterias intestinales que tienen potencial para mejorar la salud. Dado que los fructooligosacáridos no son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, éstos pasan al colon y favorecen el crecimiento de bacterias benéficas las cuales disminuye el potencial de crecimiento de los microorganismos patógenos y se mejora la salud del tracto gastrointestinal (Kelly, 2008).

Además de la capacidad de los fructooligosacáridos para estimular el crecimiento de bacterias benéficas en el colon humano, tienen la capacidad de mejorar las propiedades de algunos alimentos porque poseen propiedades funcionales como un valor calórico bajo, no son cariogénicos y pueden incluirse en la dieta de personas diabéticas. Además ayudan a disminuir los niveles de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol; así como ayudar a la absorción del calcio y el magnesio en el tracto gastrointestinal (Mussatto *et al.*, 2009).

La inulina puede ser hidrolizada de manera selectiva por la acción de endoinulinasas en inulooligosacáridos como la inulotriosa e inulotetraosa; sus propiedades son alta solubilidad, dulzura y propiedades prebióticas. Los fructooligosacáridos han demostrado su efecto prebiótico en pruebas *in vivo* e *in vitro* (Ronkarta *et al.*, 2007).

La estructura general de los fructooligosacáridos es la siguiente:



Los inulooligosacáridos tienen una estructura y funcionalidad similar a la de los fructooligosacáridos, los cuales proporcionan efectos benéficos en los humanos y han sido caracterizados como edulcorantes funcionales. Los inulooligosacáridos se pueden usar como fibra soluble dietética, como edulcorante funcional o como prebiótico para favorecer la población de *Bifidobacteria* (Kango, 2008).

La estructura general de los inulooligosacáridos es la siguiente:



2.1.3 Jarabes de fructosa.

El almidón es un polímero de reserva que se encuentra en muchos cereales, granos y vegetales (Hanover, 1993; Vuilleumier, 1993). El descubrimiento de que el almidón puede ser hidrolizado hasta monómeros de glucosa, ha hecho de la glucosa una alternativa muy atractiva para sustituir a la sacarosa en numerosas aplicaciones. Sin embargo la glucosa tiene una dulzura relativa menor a la sacarosa, además sus propiedades físicas y funcionalidad contribuyen a hacerla un reemplazo imperfecto para la sacarosa en muchos alimentos y bebidas. Los avances en las tecnologías de refinación, isomerización y separación han hecho posible la producción de jarabes de alta fructosa a partir de almidón de maíz (HFCS por sus siglas en inglés), con dulzor equivalente al de la sacarosa.

La facilidad de manejo de estos endulzantes líquidos y la baja en los precios han acelerado la aceptación de los HFCS en la industria de las bebidas y los alimentos. La conversión del almidón a fructosa requiere de al menos tres enzimas diferentes y sus respectivos pasos de reacción: α – amilasa, glucoamilasa y glucosa – fructosa isomerasa. De este proceso se obtiene ~ 45 % de fructosa como máximo, la producción de estos jarabes se muestran en el diagrama 1, donde se aprecian las operaciones más importantes de la producción de HFCS partiendo de almidón (Diagrama 1) (Hanover, 1993; Kirk *et al.*, 2002).

La formación de fructosa a partir de inulina sólo requiere una reacción: hidrólisis enzimática usando inulinasas. Al final se obtiene fructosa prácticamente pura, con rendimientos tan altos como 95 % (Pandey *et al.*, 1999).

La industria del azúcar ha entrado en una intensa competencia con la de los jarabes de alta fructosa (HFCS) que están siendo usados como edulcorantes de bajo costo. La inulina ofrece mejores perspectivas dada la creciente necesidad de producción de jarabes con alto contenido de fructosa y puede verse como

alternativa para producir los llamados jarabes de ultra alta fructosa (UHFS), en lugar de aquellos que se obtienen del almidón (Zhen-Ming *et al.*, 2011).

2.2 Agaves.

Las *Agaveceae* es una familia de plantas con nueve géneros y alrededor de 293 especies. El género más importante es *Agave* con cerca de 166 especies. El territorio mexicano tiene la mayor diversidad, pero hay especies representativas desde el suroeste de Estados Unidos, hasta Centroamérica, el Caribe y en el norte de Sudamérica.

Los agaves han jugado un papel muy importante en la vida de los habitantes del norte de América desde tiempos ancestrales. Estas plantas fueron domesticadas con diversos propósitos y entre los más sobresalientes está la producción de bebidas alcohólicas, lo cual tiene importancia económica desde la época prehispánica. En el centro de México se extrae aguamiel y se elabora pulque de magueyes como *Agave salmiana*, *A. americana*, *A. maximiliana* y *A. hookeri* (Valenzuela - Zapata, 2003).

Otras especies como el *Agave sisalana* es una fuente de fibra “sisal” o henequén. Se trata de un producto que tuvo importancia en el pasado para la fabricación de diversos tejidos y que fue domesticado por los mayas de Yucatán antes de la conquista española.

En el caso del *Agave tequilana* se ha usado desde la época de la Colonia para la elaboración del tequila, esta bebida tiene producción protegida por la denominación de origen y limitada al territorio que comprende el estado de Jalisco y algunos municipios de los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas (NOM – 006 – SCFI – 1994, 1997).

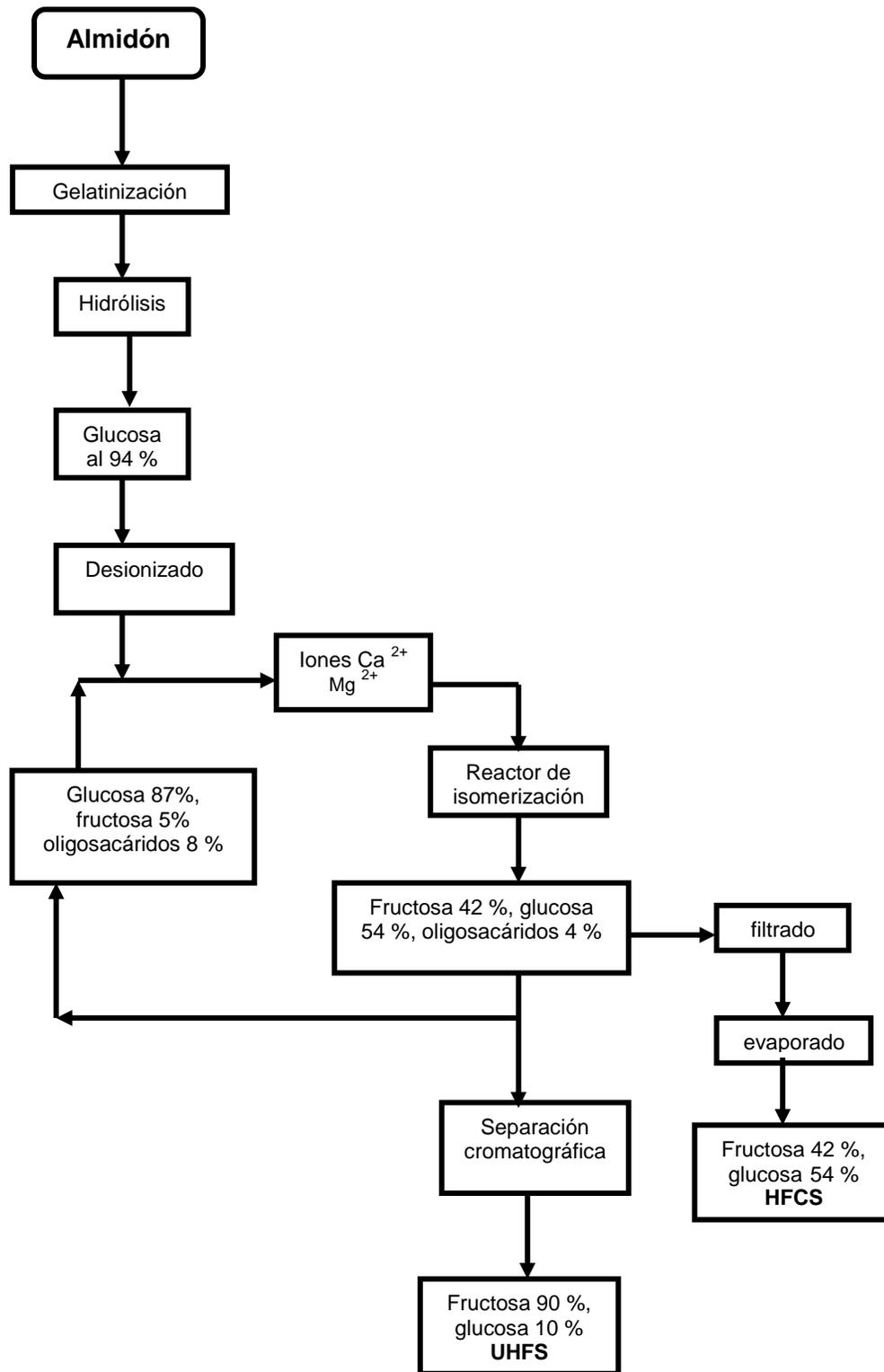


Diagrama 1. Producción de jarabes de fructosa a partir de almidón con las operaciones unitarias principales. (Vandamme, 1983).

2.2.1 *Agave tequilana* Weber var. *azul*.

El *Agave tequilana* pertenece al género *Agave* y está clasificado dentro del grupo *Rigidae*, porque sus características fenotípicas son las hojas rígidas lanceoladas (Rodríguez-Garay *et al.*, 2009). Crecen de forma radial alcanzando una altura de entre 1.7 – 2.0 metros, con un ancho de 1.5 metros. Sus hojas están dispuestas en forma de roseta, generalmente con espinas marginales o dientes y una espina terminal. (Consejo Regulador del Tequila, 2004). Las hojas rígidas (pencas) miden de 90 – 120 cm de longitud x 8 – 12 cm de ancho, éstas son firmes y fibrosas, cóncavas de ascendentes horizontales, con lo más ancho a lo largo de la mitad, angostas y gruesas hacia la base, generalmente azules o azul – verdosas. Los dientes son regulares en tamaño y en espacio, con color café oscuro, tiene de 3 – 7 mm de longitud en la parte media de la hoja y disminuyen de tamaño hacia la base y el ápice de la hoja. Desarrolla una inflorescencia que puede llegar a medir 5 – 6 metros de alto (Iñiguez – Covarrubias *et al.*, 2001; Valenzuela – Zapata, 2003), la cual emerge del centro de la roseta ya sea con forma de espiga (racemosa) o ramificada (paniculada) con las flores creciendo en grandes agregados (umbelas) sobre pedúnculos laterales, son de tallo muy corto y grueso.

Su reproducción puede ser sexual y asexual mediante vástagos llamados hijuelos, los cuales emergen de rizomas de la planta madre, creciendo cerca de la base de la roseta o mediante bulbilos, pequeñas plántulas que surgen de la inflorescencia. Estas formas reproductivas se consideran mecanismos de adaptación evolutiva para asegurar la producción de progenie cuando la inflorescencia es cortada por el humano o por herbívoros (Consejo Regulador del Tequila, 2004).

Las plantas que evolucionaron en regiones áridas y semi áridas, modificaron su metabolismo con la finalidad de ahorrar agua. Así los estomas se abrirán en la oscuridad para tomar el CO₂ atmosférico y se cerrarán durante el día. Este metabolismo se encontró por primera vez en plantas de la familia *Crassulacea* y se llamó metabolismo de ácido crasuláceo o CAM. Se ha comprobado que *Agave tequilana* posee metabolismo CAM, evaluando el patrón de fijación de bióxido de

carbono y la acidez nocturna, así como el intercambio de vapor de agua (Valenzuela – Zapata, 2003). El *Agave tequilana* contiene fructanos ramificados conocidos como agavinas como polímero de reserva, lo cual está determinado por la evolución de la planta y el metabolismo CAM.

El *Agave tequilana* Weber var. *azul*, es una de las plantas más importantes de México, desde el punto de vista económico, porque ha sido cultivado como materia prima para la producción de tequila. En los últimos años las mieles de agave, hechas a partir de jugo de agave, han tenido aceptación mundial en la industria de los alimentos.

Gracias al alto contenido de agavinas en el *Agave tequilana*, hay posibilidades de producir fructooligosacáridos de alta pureza e incorporarlos como ingredientes en los alimentos funcionales. Se han hecho estudios en los cuales se utilizaron plantas de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, de 6 años de edad. Se recolectaron muestras de la piña (corazón) del agave y de las pencas (base y región media).

Los contenidos de materia seca, cenizas y fibra dietética fueron determinados con métodos de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC). El contenido y la composición de los carbohidratos fueron analizados por métodos cromatográficos y enzimáticos (Praznik *et al.*, 2002). A partir de estos análisis se encontraron los datos siguientes de las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Composición de *Agave tequilana* Weber var. *azul* (Praznik *et al.*, 2002).

Determinación	Piña y Base de la Penca (%)	Penca zona media (%)
Materia Seca	31.0 – 31.5	17.4
Proteína	1.3-1.4	0.35
Minerales	1.7 –1.9	0.7
Fibra Dietética Insoluble	5.9 – 7.1	6.8
Carbohidratos	22.3 - 22.7	9.0

Tabla 3. Composición Aproximada de los carbohidratos de *Agave tequilana* Weber var. azul (Praznik *et al.*, 2002).

Determinación	Piña y Base de la Penca (%)	Penca zona media (%)
Monosacáridos (Glu - Fru)	Ausentes	5.2
Sacarosa	0.5 - 1.3	9.3
Fructooligosacáridos DP 3-10	35 - 43	60
Fructooligosacáridos DP 11-60	56 - 64	30

Por medio de cromatografía en capa fina se identificaron tres fructooligosacáridos neokestosa, 1-kestosa and 6-kestosa, se trata de moléculas del tipo GF₂ que se diferencian por la posición entre los enlaces de la fructosa y glucosa (Praznik *et al.*, 2002).

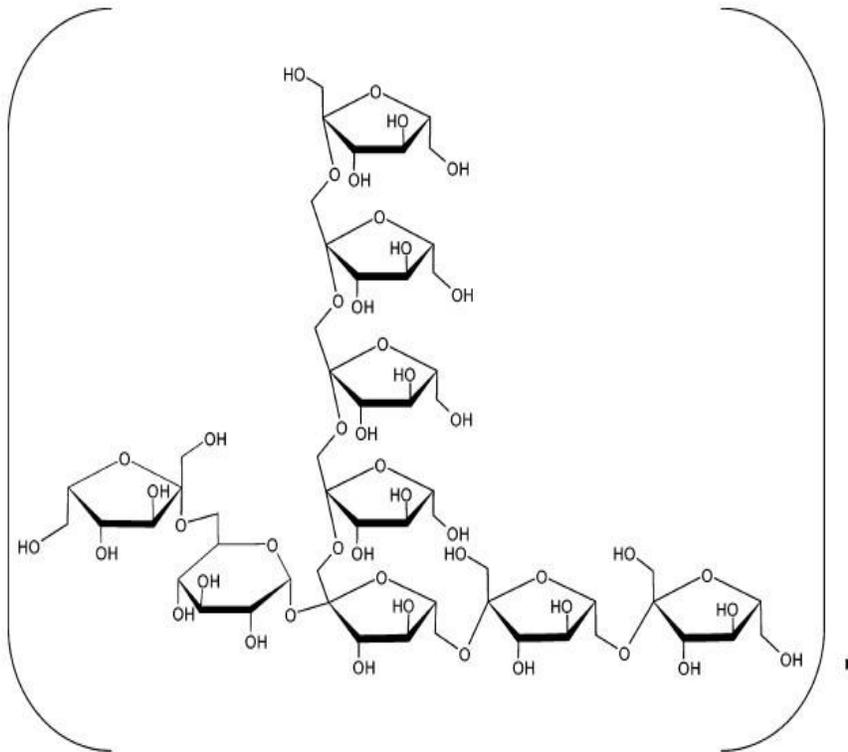


Figura 1. Fructanos de *Agave tequilana*, agavinas. Estructura propuesta para una planta de 8 años (Lopez *et al.*, 2003).

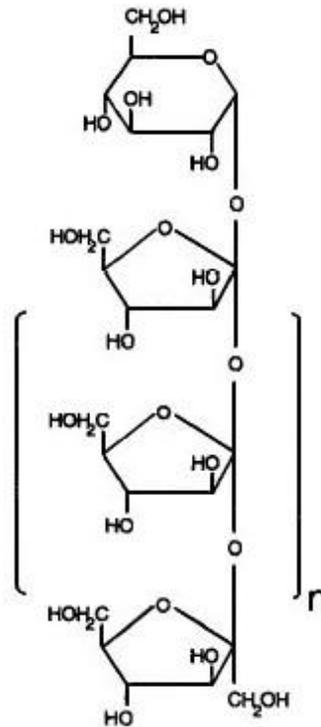


Figura 2. Estructura de la inulina de achicoria (Yun, 1996).

2.2.2 Tequila.

El agave se cosecha entre los 7 – 9 años de crecimiento, porque después de este periodo se produce una inflorescencia. La *jima* o cosecha consiste en cortar la planta y sus hojas para dar forma a un cuerpo ovoide, que es la cabeza o piña.

La manufactura del tequila comienza con el cocimiento de las piñas de *Agave tequilana* para hidrolizar los polímeros presentes en la planta, principalmente los fructanos, hasta azúcares fermentables, en su mayoría fructosa (Iñiguez – Covarrubias *et al.*, 2001; Valenzuela – Zapata, 2003).

La oferta y demanda de plantas de *Agave tequilana* determinan la disponibilidad. La oferta estaba formada en 2007 por 26 millones de plantas. La cifra total es importante pero no refleja la disponibilidad presente ni futura. Un inventario con edades o fechas de plantación es lo que refleja la disponibilidad. La información

de los inventarios de agave es crucial para el comportamiento de los precios en el mercado.

Se ha propuesto la diversificación de productos de agave, encaminada principalmente a las mieles de fructosa, pues el segmento de consumidores que desean cuidar su salud se ha incrementado.

Las fibras de las hojas y los residuos de cosecha son estudiados para darles una aplicación práctica (Valenzuela – Zapata, 2003).

2.3 Enzimas y aplicaciones.

La producción de alimentos como el pan y el queso, y de bebidas como la cerveza, han involucrado el uso de las enzimas a lo largo de cientos de años, sin embargo se desconocía la existencia de estos catalizadores. En Europa el uso de las enzimas gira alrededor de las industrias de la cerveza y el pan, gracias a las cuales las investigaciones se centraron en las fermentaciones de las levaduras y el proceso de conversión de almidón en azúcar. En Asia se han consumido una amplia variedad de alimentos fermentados, la mayoría de los cuales se elaboran usando hongos filamentosos como fuente de enzimas. En la actualidad la producción en masa de enzimas está dedicada a las que hidrolizan los enlaces glicosídicos de los carbohidratos y a las proteasas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas. Ha habido un incremento en el uso de enzimas altamente purificadas en procesos industriales, medicina e investigación. El uso de enzimas puras es muy costoso, y pueden alcanzar precios de cientos de dólares por gramo de enzima. En contraste el uso de enzimas crudas puede tener valor de algunos dólares por kilogramo. En las operaciones como el clarificado de jugos y vinos, malteado y mejoramiento de masas para panificación el uso de enzimas crudas añade un costo muy pequeño al producto final. (Bennett, 1998).

2.3.1 Ventajas del uso de enzimas en procesos industriales.

Se puede hacer un recuento de las ventajas y desventajas de los procesos enzimáticos y de las percepciones que de ellas tienen los actores principales en este campo. En el lado de las ventajas se citan frecuentemente las siguientes:

- Se pueden lograr niveles de especificidad muy altos, especialmente útiles cuando se trabaja con materias primas complejas.
- Operan en condiciones relativamente suaves de temperatura y presión. Las instalaciones y equipos utilizados en los procesos fermentativos y biocatalíticos son independientes del producto particular de que se trate. Como consecuencia, la inversión realizada en estos equipos puede ser, en principio, reutilizable en nuevos procesos conforme surgen demandas y oportunidades.

En el lado de las desventajas, la mayoría tienen que ver más con la *percepción* que actualmente se manifiesta en la industria química que con desventajas inherentes:

- Las enzimas son caras.
- Las enzimas son inestables.
- Su productividad es baja.
- Las reacciones redox requieren cofactores difíciles de reciclar.
- Las enzimas no catalizan reacciones interesantes para la industria.

Actualmente se observa un despegue importante del ámbito industrial como una tercera fase de aplicaciones de la biotecnología, debido a la inserción del potencial de la biocatálisis y las tecnologías que impactan su desarrollo. En la actualidad, a pesar de representar una proporción muy pequeña de la actividad industrial, ya se emplean las enzimas en un buen número de procesos (Soberón, 2007).

2.3.2 Inulinasas.

Las enzimas se clasifican de acuerdo a la Comisión de Enzimas en seis tipos que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de las enzimas según la Comisión de Enzimas (Whitaker, 2000).

1. Óxido – reductasas	2. Transferasas
3. Hidrolasas	4. Liasas
5. Isomerasas	6. Ligasas

Las hidrolasas son enzimas que catalizan las reacciones en las que el agua participa en la ruptura de enlaces covalentes de un sustrato con la adición de elementos del agua a los elementos de ese enlace. El nombre sistemático se forma como “sustrato hidrolasa”

Las inulinasas están clasificadas dentro de las hidrolasas que cortan los enlaces que unen dos moléculas de carbohidratos, es decir son glicosidasas.

La enzima que hidroliza los enlaces *fructano* – β – 1,2 de la inulina, es llamada endoinulinasa o β – 1,2 *fructan fructano hidrolasa*, con número EC 3.2.1.7. La endoinulinasa que actúa sobre los enlaces internos de la molécula de inulina y produce inulo – oligosacáridos.

La exoinulinasa es la enzima que hidroliza inulina en fructosa, es la β – D – *fructan fructohidrolasa* con número EC 3.2.1.80. La exoinulinasa, separa una molécula de fructosa terminal al romper el enlace glicosídico y puede continuar con esta acción hasta llegar a la glucosa que se encuentra en el extremo opuesto. (L’homme, C. 2003).

Las propiedades de las enzimas de acción endo o exo, dependen del origen de las mismas. La mayoría de las inulinasas de origen fúngico son extracelulares y de acción exo. Sin embargo los hongos producen varias clases de enzimas en un

solo cultivo, lo cual se ha demostrado con metodologías como electroforesis en gel y cromatografía en capa fina, entre otros análisis.

Se han reportado estudios en los cuales se utilizaron varias cepas de *Aspergillus* spp. Se llevaron a cabo fermentaciones sumergidas y se recuperó el extracto enzimático. Éste se separó en dos fracciones, una contenía endoinulinasa y la otra exoinulinasa. Se concluyó que mezcla de exo y endo inulinasa puede mejorar la conversión de inulina a fructosa con respecto a la acción de una sola de las enzimas. Esto se explicó porque la acción sumada de ambas enzimas se desarrolla de la siguiente manera: las endoinulinasas cortan las moléculas de inulina en varios oligosacáridos, y esto multiplica los sitios de ataque para la exoinulinasa, por lo cual se incrementa la tasa de producción de fructosa

Las inulinasas se usan en la producción de jarabes de alta fructosa, que han cobrado importancia como edulcorantes. También se pueden usar en la producción de fructooligosacáridos, que son sacáridos que actúan como prebióticos, pues favorecen el crecimiento de microorganismos benéficos en la microbiota intestinal. Otra aplicación de las inulinasas es la producción de etanol de inulina (Rica *et al.*, 2007).

2.3.3 Producción de inulinasas.

Las inulinasas son producidas por vegetales y microorganismos. Se han obtenido inulinasas del diente de león y la alcachofa de Jerusalén, pero estas fuentes vegetales tienen producción inferior a las fuentes microbianas. Por esta razón se han realizado esfuerzos para encontrar microorganismos productores de la mayor cantidad de inulinasas.

Numerosas cepas de hongos, levaduras y bacterias han sido utilizadas para la producción de inulinasas. Las cepas de hongos filamentosos que pertenecen al género *Aspergillus* y las levaduras del género *Kluyveromyces* son las más destacadas.

Lo que distingue a las enzimas producidas por diferentes microorganismos son las unidades de actividad enzimática / mL de medio de cultivo, así como las características de la enzima, lo cual depende del tipo de microorganismo empleado y del tipo de fermentación (Rica *et al.*, 2007).

Gran cantidad de hongos se han utilizado como fuentes de inulinasas gracias a su productividad de enzimas extracelulares y a sus requerimientos nutricionales.

La producción a nivel matraz involucra cepas como *Aspergillus niveus* 4128URM que produce las enzimas en fermentación sumergida usando inulina como fuente de carbono (Souza – Motta *et al.*, 2005).

En otros estudios se han empleado cepas de *Aspergillus candidus* NCIM 883, *Aspergillus chevalieri* NCIM 940, *Aspergillus oryzae* NCIM 631, *Aspergillus terreus* NCIM 653, *Fusarium moniliforme* NCIM 1099, *Mucor rouxii* MTCC 386, *Neurospora crassa* MTCC 260, *Penicillium funiculosum* MTCC 287, *Rhizopus oryzae* NCIM 1009. Y *Aspergillus candidus* destacó con la producción de 10 U/mL a nivel matraz, mientras que el resto de los hongos probados produjeron niveles menores de inulinasa (Kochhar *et al.*, 1999).

En trabajos previos empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* para producir inulinasas en matraz y se han optimizado las condiciones para la producción en fermentador. En el caso de *K. marxianus* YS – 1 se optimizó el medio para fermentación a nivel matraz con 50 mL de medio, seleccionando la mejor fuente de carbono y de nitrógeno, se ensayaron diversas concentraciones de metales traza, además de elegir el tipo de surfactante. Posteriormente, se eligieron los parámetros del proceso, pH del medio, temperatura, agitación, tiempo de incubación y la concentración del inóculo. Una vez que se encontraron las mejores condiciones de cultivo a nivel matraz, se pasó a nivel fermentador de 1.5 litros, en el cual se optimizó la velocidad de agitación, el volumen de aire suministrado y el tiempo de incubación, las mejores condiciones de cultivo permitieron producir 55.4 U/mL de inulinasa, contra 3.41 U/mL del medio basal (Singh *et al.*, 2007).

El nivel de producción de inulinasas por bacterias no es comparable con la de las levaduras o los hongos. Pero la capacidad de muchas bacterias para sobrevivir a altas temperaturas ha dado lugar a que se aislen cepas que pueden producir inulinasas con estabilidad térmica a altas temperaturas. Se han aislado algunas cepas bacterianas que producen inulinasas estables a 70° C y que sólo se activan a temperaturas a partir de los 45 – 50° C. Las inulinasas que poseen temperatura óptima alta son muy importante para la aplicación comercial de las enzimas en la producción de fructosa o fructooligosacáridos a partir de inulina, porque a altas temperaturas, de 60° C o más altas se favorece la solubilidad de la inulina y se previene la contaminación microbiana, además se disminuyen costos debido a que se requiere menos energía para el enfriamiento en los reactores (Singh, 2006).

En general, no hay muchas diferencias en propiedades como el pH y la temperatura óptima de las inulinasas obtenidas de diversas fuentes microbianas, hongos, levaduras y bacterias. Muchas cepas de hongos han mostrado un pH óptimo entre 4.5 y 7.0, para las cepas de levadura está entre 4.4 y 6.5 y para las bacterias se encuentra entre 4,8 y 7.0. En el caso de las temperaturas óptimas, para los hongos hay en el rango de los mesofílicos y termofílicos, mientras que para las levaduras y bacterias generalmente muestran temperatura óptima más alta que la de los hongos (Pandey *et al.*, 1999).

2.3.4 Purificación de inulinasas.

En la mayoría de los reportes la purificación de inulinasas extracelulares producidas por hongos, levaduras o bacterias, se hace por métodos convencionales de centrifugación y ultrafiltración, precipitación con sales o solventes, seguido de cromatografía en columna.

Las enzimas intracelulares requieren pasos adicionales para romper la pared celular y una vez liberadas las enzimas utilizar procedimientos similares a los de las enzimas extracelulares.

Del total de inulinasas de *F. oxysporum* el 14 % es extracelular y el resto está unida al micelio. Ambas inulinasas extra e intracelular fueron purificadas por cromatografía en columna con Sephadex G – 100. El hongo *Penicillium* spp. produce inulinasas extracelulares, las cuales se han purificado utilizando precipitación por sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico con DEAE – Sepharose y DEAE – Sephacel, ultrafiltración y filtración en gel con Sephadex G – 100. De estos procedimientos se obtuvieron dos formas de inulina que se purificaron con electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida. Una preparación de inulinasas crudas de *Aspergillus* spp. fue dializada por 48 horas y la enzima liofilizada se cargó en una columna para cromatografía de intercambio iónico CM – Sepharose, como paso selectivo. Después se hizo una cromatografía de permeado en gel, donde se separaron endo y exoinulinasas.

En otra investigación fueron obtenidas dos formas de inulina en un cultivo de *Aspergillus niger*, las cuales se separaron por cromatografía en una columna de DEAE cellulofine A – 500, y después separado en una columna Q – Sepharose HP (Pandey *et al.*, 1999).

Las enzimas obtenidas con el hongo *Penicillium rugulosum*, se procesaron de la siguiente forma: La preparación de las enzimas crudas, se hizo removiendo el micelio y centrifugando el sobrenadante, para posteriormente concentrarlo por ultrafiltración con una membrana de 10 000 Da hasta alcanzar un volumen del 20% inicial. Éste se precipitó con 4 volúmenes de acetona a –30° C. El precipitado obtenido después de centrifugar fue deshidratado con un flujo de N₂ y almacenado a – 18° C. Después de estos pasos se obtuvo un polvo con actividad de entre 29 – 32 U/mg de materia seca (Barthomeuf *et al.*, 1991).

Las exoinulinasas de *Aspergillus fumigatus* fueron purificadas usando precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografías en DEAE – Sephacel, Octyl – Sepharose (HIC), Sephacryl S – 200, y cromatografía de afinidad en columnas de agarosa ConA – CL y Sephacryl S – 100 (Vijayaraghavan *et al.*, 2009).

Las enzimas crudas de *Streptomyces* sp. se precipitaron con sulfato de amonio, seguida de diálisis contra un buffer de citratos – fosfatos a pH 6.0, luego se aplicaron en una columna DEAE – Sephacel. Las proteínas adsorbidas fueron eluídas en un gradiente de sal. Las fracciones con actividad de inulinasa fueron dializadas en buffer de fosfatos citratos a pH 6.0 y posteriormente sujetas a una cromatografía de afinidad usando una columna empacada con agarosa ConA – CL. Las proteínas adsorbidas fueron eluídas con metil – α – D – manopiranosido en buffer de citratos (Sharma, 2007).

2.3.5 Sustratos para la producción de inulinasas.

La inulina es el sustrato más común usado para la producción de inulinasas, pero se emplean una amplia variedad de sustancias como fuentes de carbono y energía en la producción de las enzimas por diferentes microorganismos. Entre estas sustancias se incluyen sustancias puras, sustratos de origen natural ricos en inulina y sustratos mezclados. Los sustratos puros más comunes que se han empleado en la producción de inulinasas son los azúcares, entre los que se encuentran mono, di o polisacáridos, entre los cuales se han preferido la inulina y la sacarosa (Pandey *et al.*, 1999).

El costo en la producción de inulinasas comerciales es un factor limitante para realizar una aplicación a nivel industrial. Una reducción de costos se consigue si se emplean sustratos de bajo costo y ricos en inulina para la producción de inulinasas, de esta manera es posible conseguir un proceso rentable. Muchos vegetales que contienen inulina pueden ser usados como fuente de carbono en fermentaciones con microorganismos que producen inulinasas, ya que son de alta disponibilidad y bajo costo (Kango, 2008; Zhengyu *et al.*, 2005).

Existen reportes en los cuales se usaron sustratos naturales en fermentaciones sumergidas con algunas cepas de *Aspergillus* para la producción de inulinasas, las materias usadas fueron extractos de alcachofas de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y de diente de león (*Taraxacum officinale*). Una vez obtenidas las enzimas se ensayó la hidrólisis de inulina y se evaluaron los productos de la

reacción para determinar la presencia de fructooligosacáridos empleando cromatografía en capa fina. Los resultados arrojaron la presencia de fructooligosacáridos, generados por la endoinulinasa; además de monosacáridos, producidos por la exoinulinasa. Se encontró que las enzimas crudas de *Aspergillus ficcum* JNSP5-06 y *Aspergillus niger* NK-126 son una mezcla de endoinulinasas y exoinulinasas (Zhengyu *et al.*, 2005; Skowronek, 2006).

Los hongos *Penicillium rugulosum* y *Chrysosporium pannorum* también produjeron una mezcla de endoinulinasas y exoinulinasas en fermentaciones sumergidas, lo cual fue observado analizando con HPLC los productos en la hidrólisis de inulina (Barthomeuf *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 1988). Otro ejemplo de este comportamiento en los hongos es *Aspergillus niger* TISTR 3570 que produce ambas exo y endoinulinasas, aunque el medio de fermentación contenía inulina purificada como fuente de carbono. Estos microorganismos producen inulinasas extracelulares, lo cual facilita la recuperación del producto del medio de fermentación (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007).

Se han utilizado otras fuentes vegetales para la producción de inulinasas; el ajo (*Allium sativum*) ha servido como fuente de carbono a *Streptomyces* sp. y se encontró que este sustrato permite la producción de inulinasas con actividad hidrolítica más alta comparada con la que se obtiene al usar inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) (Sharma *et al.*, 2006).

2.4 Producción de FOS.

Para la producción de fructooligosacáridos se pueden emplear dos metodologías alternas. Una consiste en utilizar la enzima fructosil transferasas (Ftasas) y sacarosa, esta enzima cataliza la producción de una mezcla de 1 – kestosa (GF₂), 1 – nistosa (GF₃) y fructofuranosil nistosa (GF₄), además de residuos de glucosa. Esta enzima se puede obtener principalmente de hongos y de algunas bacterias (Sangeetha *et al.*, 2005; Yun, 1996).

De manera general, el proceso para la obtención de los fructooligosacáridos es:

- Obtención de las enzimas fructosiltransferasas (Ftasas) por fermentación sumergida o en estado semi sólido.
- Purificación de las enzimas Ftasas.
- Reacción enzimática para obtener los FOS.
- Separación y concentración de los FOS.

La segunda metodología consiste en utilizar enzimas endoinulinasas e inulina para obtener una mezcla de fructooligosacáridos con diferentes longitudes. Las enzimas se obtienen de fuentes microbianas, como los hongos, levaduras y bacterias (Yun *et al.* 1997).

El procedimiento consiste en:

- Obtención de enzimas inulinasas por fermentación sumergida o en estado semisólido.
- Purificación de enzimas inulinasas.
- Reacción enzimática para obtener los FOS.
- Separación y concentración de FOS.

2.5 Miel de agave.

El 8 de diciembre de 1998 se otorgó la patente 5 846 333 de los Estados Unidos de Norteamérica solicitada el 12 de marzo de 1996 titulada "Método para producir jarabes fructosados a partir de plantas de agave" a los inventores Virgilio Zúñiga Partida, Arturo Camacho López y Álvaro de Jesús Martínez Gómez, adscritos al Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI, de la Universidad de Guadalajara. Dicho proceso consiste en la aplicación de una enzima comercial a un extracto de agave libre de sólidos conteniendo principalmente agavinas. La enzima aplicada es una inulinasa comercial (Fructozyme TM) elaborada por Novo Nordisk AVS de Dinamarca y aplicada en forma soluble, después de tratar el extracto con carbón activado y resinas de intercambio iónico con el fin de llevar a cabo su desmineralización. La enzima se agrega a razón de 1 – 1.5 g / L de solución (2 880 INU / L) y la reacción procede por 4 – 5 horas a 40 – 50° C.

La empresa Industrializadora Integral de Agave, S.A. de C.V. elabora a partir de este proceso un producto líquido en forma de jarabe denominado "Naturel" o "Sweetrel" que contiene en promedio 68% (P / V) de fructosa y 5% de glucosa.

Se trata de un proceso enzimático que constituye un exitoso desarrollo que permite canalizar los excedentes de agave (López – Munguía, 2004).

2.6 Producción de etanol a partir de inulina.

La inulina es el principal carbohidrato de reserva de la alcachofa de Jerusalén y la achicoria, y se encuentra entre 16 – 20 % en base húmeda. La hidrólisis de estos carbohidratos resulta en al menos 75 % de fructosa, es por esto que algunos vegetales que contienen inulina se han convertido en atractivos para la producción industrial de fructosa para edulcorantes y en la obtención de etanol (Zhen-Ming *et al.*, 2011; Guiraud, 1981).

Como parte de los experimentos para producir etanol se han utilizado extractos de vegetales ricos en inulina como materia prima. La levadura *Kluyveromyces marxianus* se ha empleado como microorganismo productor de enzimas que degradan la inulina, además se ha aprovechado su capacidad para fermentar la fructosa y producir etanol. Utilizando extractos de inulina derivados de achicoria y de dalia se han realizado hidrólisis y fermentación simultánea utilizando *Kluyveromyces marxianus* (Ohta *et al.*, 1993).

Sin embargo se ha observado que la levadura *S. cerevisiae* es más tolerante al etanol que *K. marxianus* (Graciano *et al.*, 2008). Por lo que en búsqueda de mejorar el rendimiento en la producción de etanol se han montado sistemas de hidrólisis y fermentación, que consisten en emplear un sustrato de inulina pura obtenida de dalia y achicoria, enzimas de *Aspergillus niger* exo y endo inulinasas, para hidrolizar la inulina de una manera eficiente hasta obtener fructosa y una vez completada la hidrólisis se empleó una cepa de *S. cerevisiae* resistente al etanol para fermentar la fructosa. Así se obtuvieron concentraciones del 20 – 21 % (V / V) de etanol, en un periodo de 72 horas (Ohta *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 1993).

El mismo sistema de producción de fructosa y fermentación alcohólica simultáneas, utilizando cepas de *A. niger* y *S. cerevisiae*, se ha empleado para hidrolizar inulina en forma de polvo extraída de alcachofas de Jerusalén, que se obtuvo de tubérculos deshidratados y molidos, por este medio se alcanzaron rendimientos de etanol superiores al 20 % v / v (Nakamura *et al.*, 1996).

Otros estudios realizados con alcachofas de Jerusalén han abordado la producción de etanol utilizando una cepa de *K. marxianus* que produce inulinasas para hidrolizar la inulina hasta fructosa la cual posteriormente se utilizó para producir etanol en el mismo cultivo, con rendimientos de 0.49 etanol/sustrato. Este procedimiento tiene como ventaja la disminución de las operaciones de producción con respecto a la hidrólisis y fermentación alcohólica realizada con dos microorganismos diferentes (Negro, 2006).

El costo de la producción de etanol está ligado en parte a la pérdida de la mitad de la fuente de carbono durante la fermentación de azúcares por los microorganismos. La producción de etanol con caña de azúcar es un proceso relativamente simple, la complejidad se incrementa cuando el etanol se produce con almidón de maíz o trigo, ya que se requiere hidrolizar el almidón como paso previo a la fermentación. La producción de etanol a partir de biomasa vegetal necesita de procesos más complejos y caros, relacionados con la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa presentes en las plantas. Para complicar aun más la obtención de etanol, en el proceso de liberación de azúcares se generan subproductos que inhiben la fermentación, además algunos de los azúcares de la biomasa celulósica son difíciles de fermentar.

Tomando en cuenta los puntos anteriores se ha considerado a la inulina como fuente alterna al maíz en la producción de fructosa, además de vislumbrar su potencial en la producción de bioetanol, dado que es posible obtenerla partiendo de fuentes vegetales que no se emplean en la alimentación, aunado a lo anterior los procesos de hidrólisis son menos complejos que aquellos empleados en la degradación de celulosa y hemicelulosa (Mielenz, 2001).

2.7 Hongos.

Taxonómicamente los hongos filamentosos corresponden a un amplio grupo de microorganismos. Los miembros de éste ocupan un amplio rango de micro y macro hábitats, los hay desde los saprófitos heterótrofos hasta los simbioses y los parásitos. El factor que está asociado al éxito de los hongos filamentosos es su diversidad en el metabolismo y bioquímica. Esto les ha permitido una adaptación y aprovechamiento de ambientes que son inhóspitos para otros organismos (Arora, 1992).

Como todos los hongos, los filamentosos son heterótrofos. Es decir requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía; aquí entran un amplio rango de carbohidratos, ácidos grasos y amino ácidos. Las fuentes de carbono son de gran importancia porque proveen el carbono necesario para la biosíntesis de varios constituyentes celulares como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y para su oxidación que provee energía para la célula.

Los hongos tienen preferencia por los monosacáridos solubles, por los ácidos grasos y ácidos orgánicos, que pueden ser usados sin sintetizar ni excretar enzimas hidrolíticas. Los disacáridos, polisacáridos y lípidos son generalmente hidrolizados por enzimas extracelulares o superficiales, las cuales están bajo control de la represión por glucosa y la inducción de un sustrato en particular.

Algunos azúcares son asimilados lentamente o tienen una tasa de entrada lenta, como es el caso de la galactosa o por la producción de cantidades limitadas de enzimas extracelulares, como en el metabolismo de la lactosa.

La utilización de los sustratos insolubles como el almidón y la celulosa está acompañada de una acción secuencial de varias enzimas que facilitan la hidrólisis total del compuesto (Gadd, 1988).

Ya que los hongos son saprófitos, pueden utilizar un amplio rango de fuentes de nitrógeno. Como en el caso de las fuentes de carbono, las unidades más

pequeñas suelen ser usadas primero ya que no requieren la producción de enzimas. El amoníaco puede ser usado por todos los hongos y muchos pueden aprovechar los nitratos. Las proteínas y los aminoácidos son excelentes fuentes de nitrógeno y que a la vez pueden servir como fuente de carbono (Arora, 1992).

Las melazas de caña o remolacha, el agua de cocimiento de maíz, suero de leche, harina de soya o extracto de levadura pueden usarse también como materiales ricos en nitrógeno. Como fuente de fósforo se pueden usar fosfatos o bien fuentes orgánicas de fósforo, las cuales son las más usadas en los procesos industriales. El nitrógeno y el fósforo juegan un papel importante en la sobreproducción de metabolitos y afectan la morfología del hongo. La ausencia de nitrógeno afecta gravemente el crecimiento y la producción de metabolitos (Papagianni, 2004).

2.7.1 El Género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* pertenece a la división *Eumycota* y está dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*, esta enlistado en la clase de los *Hyphomycetos*. El nombre genérico de *Aspergillus* se deriva del latín *aspergillum*, un tipo de escobilla para distribuir el agua bendita en la liturgia católica y se refiere a la apariencia de los conidióforos maduros, los cuales son los medios de esporulación asexual dentro del género (Williams, 1988).

Un conidióforo crece perpendicularmente a la hifa-sustrato y a los lados se desarrolla una protuberancia, la vesícula. A partir de la vesícula crecen numerosas hifas cortas. Estas desarrollarán la conidia o se pueden ramificar para dar forma a una hifa corta que soporte la conidia. Las cadenas de conidias crecen en gran cantidad a partir de la vesícula y producen la apariencia de escobilla del microorganismo. Las conidias son muy hidrofóbicas y no se pueden humedecer fácilmente. Por lo tanto en la madurez, las conidias se separan fácilmente y se dispersan con las corrientes de aire. *Aspergillus* es tolerante a una baja actividad de agua, siendo posible que crezca sobre sustratos con alto potencial osmótico y pueden esporular en una atmósfera con humedad relativa baja.

El género *Aspergillus* está dividido en subgéneros y secciones, comúnmente llamados grupos. Cada grupo se nombra a partir de una de sus especies mejor conocida. Algunos grupos tienen gran significancia en el aspecto práctico.

Los miembros del grupo de *Aspergillus niger* han tenido importancia en las fermentaciones a nivel industrial, como la principal fuente de ácido cítrico para alimentos; y más recientemente para la producción de enzimas (Carlile, 1994; Schuster, 2002).

El género *Aspergillus* puede utilizarse para producir una gran variedad de enzimas de importancia comercial, la mayoría de éstas son extracelulares. La tabla 5 nos permite observar algunas de las más representativas.

Tabla 5. Enzimas de importancia industrial producidas por el género *Aspergillus* (Smith, 1993).

Enzima	Microorganismo
α - amilasa	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Glucoamilasa	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Glucosa oxidasa	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Lipasa	<i>A. malleus, A. oryzae</i>
Proteasa neutra	<i>A. ochraceous, A. oryzae</i>
Catalasa	<i>A. niger</i>
Hemicelulasa	<i>A. niger</i>
Lactasa	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Endo poligalacturonasa	<i>A. niger</i>
Endo polimetil galacturonasa	<i>A. foetidus, A. niger</i>
Exo poligalacturonasa	<i>A. niger, A. foetidus</i>
Oligo 1,6 - glucosidasa	<i>A. awamori</i>
Pectin trans eliminasa	<i>Varias especies Aspergillus</i>
α - glucosil transferasa	<i>Varias especies Aspergillus</i>
β - glucosil transferasa	<i>Varias especies Aspergillus</i>
β - 1,4 - xilanasas	<i>A. niger</i>
Ciclohexagluconasa	<i>A. oryzae</i>
Cicloheptagluconasa	<i>A. oryzae</i>
β - 1,2 - glucanhidrolasa	<i>A. fumigatus</i>

2.7.2 Morfología de los hongos en cultivo sumergido.

Los hongos filamentosos son microorganismos morfológicamente complejos, que exhiben diferentes estructuras a lo largo de su ciclo de vida. La estructura vegetativa básica de crecimiento consiste en un filamento tubular conocido como

hifa, que se origina de la germinación de una sola espora reproductiva. Mientras la hifa continúa su crecimiento, puede ramificarse en forma repetida, para formar una masa de filamentos hifales llamados micelio. Cuando crece en fermentaciones sumergidas, estos hongos crecen en forma diferente, arreglándose de filamentos miceliales dispersos hacia masas miceliales entretrejidas nombradas pellets.

La forma de crecimiento es determinada, por el material genético del hongo, la naturaleza del inóculo, los constituyentes del medio de cultivo, la temperatura, el pH y las fuerzas mecánicas. En algunas fermentaciones con hongos se prefiere una morfología particular, para alcanzar el mayor rendimiento. El crecimiento filamentososo de *Aspergillus niger* se prefiere para la producción de enzimas pécticas, mientras la formación de pellets es mejor para la producción de ácido cítrico (Papagianni, 2004).

Aspergillus niger es uno de los hongos más usados en la industria, pues se utiliza para la obtención de ácido cítrico y de un gran número de enzimas comerciales y ha recibido la certificación GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) por la FDA de Estados Unidos (Bennett, 2009; Schuster *et al.*, 2002).

2.7.3 Importancia económica de los hongos.

Los hongos pueden provocar grandes pérdidas económicas, sus actividades dañinas como saprofitos incluyen descomposición de madera, combustibles, alimentos y bienes manufacturados. Como parásitos pueden causar pérdidas en cultivos y enfermedades en animales y humanos. En el aspecto benéfico los hongos y las levaduras, también tiene importancia económica. Éstos se han explotado como alimentos, para la producción de alimentos procesados y en la producción de alcohol.

Actualmente la industria de las fermentaciones ha incrementado el rango de productos con alto valor, los cuales incluyen antibióticos, vitaminas y enzimas. La

tabla 5 nos da una perspectiva de la importancia de los hongos desde el punto de vista económico por su valor en el mercado (Bennett, 1998).

Tabla 6. Productos de interés comercial obtenidos por biotecnología con hongos (Bennett, 1998).

Proceso o producto	Organismos
<i>Antibióticos y otros farmacéuticos</i>	
Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporinas	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Ciclosporinas (inmunosupresivo)	<i>Tolyocladium inflatum</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>
Mevalonina	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Enzimas</i>	
α -Amilasas	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Celulasas	<i>Humicola insolens, Penicillium funiculosum, Trichoderma viride</i>
Glucosamilasas	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar, R. niveus</i>
Glucosa oxidasa	<i>A. niger</i>
Invertasas	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Lacasa	<i>Coriolus versicolor</i>
Pectinasas	<i>A. niger, A. oryzae, Humicola insolens</i>
Proteasas	<i>A. oryzae, Aspergillus melleus, R. delemar</i>
Rennina (microbiana)	<i>Mucor miehei, M. pusillus</i>
<i>Ácidos Orgánicos</i>	
Ácido cítrico	<i>A. niger</i>
Ácido itacónico	<i>A. terreus</i>

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La industria productora del tequila emplea el *Agave tequilana* Weber var. *azul* para la obtención de azúcares que se usan en los procesos de fermentación para la producción de etanol. Sin embargo, de la totalidad de la planta se desechan las raíces y las pencas, pues sólo se aprovecha la piña que consiste en el tallo de la planta y la base de las pencas.

En el campo de cultivo el agave es *jimado* y se obtienen las piñas, las pencas se dejan en el lugar, donde se descomponen y pueden llegar a ser una fuente de contaminación. Algunos de los carbohidratos que contienen las pencas son la pectina, fructanos y los xilanos, los cuales que se pueden aprovechar como fuente de carbono en fermentaciones sumergidas y ser inductores en la producción de enzimas de interés industrial. Adicionalmente cuando se hidrolizan enzimáticamente las pencas se pueden obtener azúcares fermentables, para la producción de etanol.

El hongo *Aspergillus niger* CH – A – 2010, aislado en campos de cultivo de agave, ha demostrado que produce inulinasas en fermentaciones sumergidas con pencas de *Agave tequilana* como fuente de carbono, por lo que se requiere seleccionar las condiciones para producir las enzimas a nivel matraz de 1 L y fermentador de 10 L. Una vez obtenidas las enzimas se deben establecer las operaciones unitarias que permitan obtener un extracto crudo con actividad enzimática para la producción de azúcares fermentables y FOS.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales.

Establecer las condiciones de cultivo de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 para la producción de inulinasas, utilizando como sustrato penca de agave y evaluar la capacidad hidrolítica de estas enzimas sobre sustratos ricos en fructanos tipo agavinas, teniendo como marco de referencia las enzimas comerciales y la inulina comercial.

4.2 Objetivos particulares.

- a) Establecer las condiciones de cultivo de *A. niger* CH – A – 2010 para producir enzimas a nivel fermentador de 10 L.
- b) Establecer las operaciones unitarias que permitan la obtención de extractos con actividad de inulinasa.
- c) Evaluar el nivel de actividad inulolítica de los extractos crudos enzimáticos obtenidos.
- d) Valorar la actividad enzimática de los extractos crudos sobre sustratos ricos en fructanos, como los fructanos de agave en polvo, inulina de achicoria, jugo de agave crudo, penca de agave.
- e) Comparar las actividades enzimáticas de los extractos crudos mediante el uso de enzimas comerciales.
- f) Evaluar la hidrólisis ácida de los sustratos ricos en fructanos con relación a las hidrólisis enzimáticas.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo utilizado.

La cepa *Aspergillus niger* CH – A – 2010 utilizada en este estudio es un hongo saprofito del suelo en el campo de cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco y asilado en el laboratorio del Dr. Carlos Huitrón V. (Huitron *et al.*, 2008). Este microorganismo produce enzimas con actividad de inulinasa cuando se utiliza penca de *Agave tequilana* como fuente de carbono en fermentaciones sumergidas.

5.2 Reactivos.

Agar papa dextrosa (PDA; Merck), bacto agar (Oxoid), fosfato de potasio monobásico (Baker), fosfato de potasio dibásico (Baker), sulfato de amonio (Baker), inulina de achicoria (Sigma), ácido clorhídrico (Baker), hidróxido de sodio (Baker), ácido acético glacial (Baker), acetato de sodio (Baker), ácido 3 - 5 dinitro salicílico (Sigma), tartrato de sodio y potasio (Merck), metabisulfito de sodio (Baker), fenol (Baker), glicerol (Baker), cloruro de sodio (Baker), inulinasas líquidas (Sigma), inulinasas liofilizadas (Fluka), cloranfenicol (Sigma).

5.3 Medios de cultivo.

5.3.1 Medio para la propagación de la cepa.

Se utilizó PDA al 3.9 % (P/V) adicionado con bacto agar al 2.0 % (P/V), se esterilizó 15 minutos a 121° C y 15 lb de presión; posteriormente se vació en placas de Petri. Las placas se mantuvieron durante 24 horas a 37° C, para verificar su esterilidad.

5.3.2 Medio para la conservación de esporas.

Las esporas de *A. niger* CH – A – 2010 se conservaron a – 20° C en crioviales. Para este fin se preparó el glicerol a una concentración de 30 % (V/V) ajustado con solución isotónica al 0.85 % (P/V); esta solución se esterilizó por 15 minutos a 121° C y 15 lb de presión.

5.3.3 Medio para la producción de inulinasas por *Aspergillus niger* CH – A – 2010.

Se utilizaron 200 mL de agua desionizada para disolver las sales, K_2HPO_4 al 0.05 % (P/V), KH_2PO_4 al 0.05 % (P/V) y $(NH_4)_2SO_4$ al 0.4 % (P/V), se ajustó el pH a 4.5 y se reservó. Como fuente de carbono se utilizó penca de *Agave tequilana* al 1.0 % (P/V), la penca se cortó en trozos de alrededor de 5 mm^3 , y se suspendió en 800 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 4.5 para la fuente de carbono. Se esterilizaron sales y fuente de carbono por separado durante 15 minutos a 121°C , 15 lb. Después de la esterilización las sales se agregaron a la fuente de carbono y se obtuvo un volumen final de 1 litro. Este procedimiento se utilizó para preparar matraces inóculo (MI), matraces testigo (MT). Para los fermentadores con 10 L de medio, se suspendió la fuente de carbono en 8.8 L de agua desionizada y por separado se esterilizan las sales en 200 mL de agua desionizada. Las sales se agregan a la fuente de carbono una vez estériles y se completa un volumen de 9 L. Al final se incorporó el MI (matraz inóculo) de 1 L al reactor.

5.4 Conservación y propagación de la cepa.

Los hongos se propagaron en el medio sólido PDA, las placas se sembraron por estrías con la suspensión de esporas en glicerol y se incubaron a 37°C por 5 días, para permitir la esporulación.

Una vez que esporuló el hongo se hizo un raspado del crecimiento micelial y las conidias con un asa bacteriológica y éstos se suspendieron en 10 mL la mezcla de glicerol con solución salina isotónica estéril. Posteriormente se agregó un volumen de 1 mL de suspensión de esporas a los crioviales. Estos crioviales se establecieron como banco de trabajo y se mantuvieron a -20°C con el fin de conservar su viabilidad.

5.5 Preparación del inóculo.

Para inocular matraces de 1 L (MI y MT), se recolectaron esporas por raspado, de un placa Petri donde se propagó el hongo en 15 mL de agua desionizada. Se midió la densidad óptica de la suspensión con el espectrofotómetro a 550 nm y se inoculó con un volumen correspondiente a 1 en D. O. en cada matraz. En el caso del reactor de 10L, éste fue inoculado con el cultivo de un matraz Fernbach (MI) con 24 horas de incubación.

5.6 Producción de inulinasas.

La producción de las inulinasas se realizó en matraces Fernbach de 2800 mL con 1000 mL de medio de cultivo y a nivel de fermentador de 16 L con 10 L de medio de cultivo en. Los matraces con 1 L de medio se utilizaron como testigo (MT) y como inóculo (MI), diagrama 2.

Los matraces Fernbach inoculados se incubaron 37° C y 200 RPM en agitadora orbital (New Brunswick Scientific). Los matraces testigo (MT) se incubaron durante 120 bajo las mismas condiciones. El matraz Fernbach que se usó como inóculo (MI) se incubó por 24 horas a 37° C y 200 RPM, transcurrido este periodo se adicionó al fermentador en proporción del 10 % (V/V). El fermentador de 16 L (New Brunswick Scientific) con 9 L de medio contenía la fuente de carbono al 1% (V/V) estéril, fue adicionado las sales aproximadamente 200 mL y posteriormente se agregó el inóculo del matraz Fernbach (MI) con aproximadamente 1 L de medio, con lo cual se completó un volumen de 10 L.

El fermentador se mantuvo a 37° C, 200 RPM y 1 vvm de aire, durante 120 horas. La muestras se tomaron cada 24 horas, retirando un volumen de 10 mL en condiciones de esterilidad, posteriormente se centrifugaron estas muestras a 2500 RPM durante 15 minutos en una centrífuga clínica (Solbat), el sobrenadante se separó y se utilizó como filtrado enzimático libre de biomasa.

5.7 Determinación de la actividad de inulinasa.

La actividad de inulinasa se determinó como el aumento de los azúcares reductores de una solución de inulina comercial al 2.5 % (P/V) en buffer de acetatos. La mezcla de reacción contenía 1 mL de inulina comercial al 2.5 % (P/V) disuelta en buffer de acetatos 0.1 M, 0.5 mL de agua desionizada y 0.5 mL de filtrado enzimático libre de células, este último es la muestra a la cual se le determina actividad. Para preparar los tubos testigo se inactivaron 0.5 mL de filtrado enzimático, hirviendo 5 minutos la muestra. Este filtrado sin actividad se trató de la misma manera que el filtrado enzimático.

La reacción fue incubada a 50° C por 30 minutos; posteriormente para detener la reacción se adicionaron 3.0 mL de DNS. Este reactivo nos permite determinar los azúcares reductores presentes en el medio (Miller, G. L. 1959). Las muestras se agitaron y se hirvieron durante 5 minutos, una vez frías se les adicionaron 15 mL de agua a cada tubo. Las lecturas se llevaron a cabo en el espectrofotómetro [Beckman Coulter] a 550 nm de longitud y se utilizó una curva estándar de 0 – 20 μ moles de fructosa. Una unidad (U) de actividad de inulinasa se determina como la cantidad de enzima que libera un micromol de azúcares reductores por minuto, en la mezcla de reacción (García, 1999).

5.8 Purificación del filtrado enzimático del fermentador de 10 L.

Después de las 120 horas de fermentación en el reactor se drenó el cultivo y se determinó el volumen final, posteriormente se hizo pasar por un filtro de gasa y algodón. Para eliminar la biomasa residual de la muestra se utilizó una centrífuga de discos (Westfalia Separator). Se determinó el volumen que se obtuvo después de la centrifugación y se le denominó muestra clarificada. La muestra clarificada se concentró utilizando un equipo de ultrafiltración por flujo tangencial (Pellicon Millipore) con membrana de corte de 10 000 Da MWCO, se midió nuevamente el volumen, esta porción fue denominada muestra concentrada. A esta muestra se le determinó el nivel de actividad de inulinasa.

El siguiente paso fue liofilizar la muestra concentrada (Lyph Lock 4.5 Labconco) hasta obtener polvo libre de agua. La muestra liofilizada se pesó y se le determinó el nivel de actividad. De esta manera se pudo conocer las unidades de actividad de inulinasa por cada gramo de enzimas liofilizadas.

5.9 Hidrólisis de sustratos ricos en fructanos.

Los filtrados enzimáticos liofilizados se utilizaron para hidrolizar diferentes sustratos. El sistema se llevó a cabo en matraces de 250 mL, con 50 mL de buffer de acetatos 1.0 M de pH 4.8 y para prevenir la contaminación se adicionaron 30 µg de cloranfenicol por mL de medio. Se utilizaron 0, 10, 100 y 1000 unidades de enzima liofilizada, por lo cual se prepararon cuatro matraces diferentes. El sustrato se agregó en proporción del 5 % P/V, éstos eran: fructanos de agave (jugo de agave clarificado y secado por aspersion, el cual contiene un alto grado de agavinas y fructooligosacáridos), fructanos de agave nanofiltrados (jugo de agave clarificado, nanofiltrado por membranas y posteriormente secado por aspersion), inulina comercial de achicoria, al 10 % P/V en el caso de penca de *Agave tequilana* y 20 % P/V jugo de agave crudo. Las condiciones de incubación fueron 50° C, 200 RPM, durante 72 horas. Se tomaron muestras cada 24 horas. Cada muestra se inactiva a ebullición por 5 minutos y posteriormente se refrigeró hasta su uso.

5.9.1 Hidrólisis fisicoquímica de sustratos ricos en fructanos.

Como comparativo se realizaron hidrólisis fisicoquímicas en matraces de 250 mL con 50 mL de agua desionizada utilizando una correspondiente de 5, 10 o 20 % P/V de sustrato respectivamente, se empleó H₂SO₄ al 0.01 % V/V en condiciones de 121° C y 15 lb, durante 3 horas. De estos sistemas se evaluaron los azúcares reductores liberados por la actividad hidrolítica de las enzimas sobre el sustrato, con la técnica de DNS. Se utilizó la misma curva estándar que se empleó para determinar la actividad de inulinasa. Los azúcares reductores se expresaron como gramos por litro (Miller, 1959).

Diagrama general de procesos

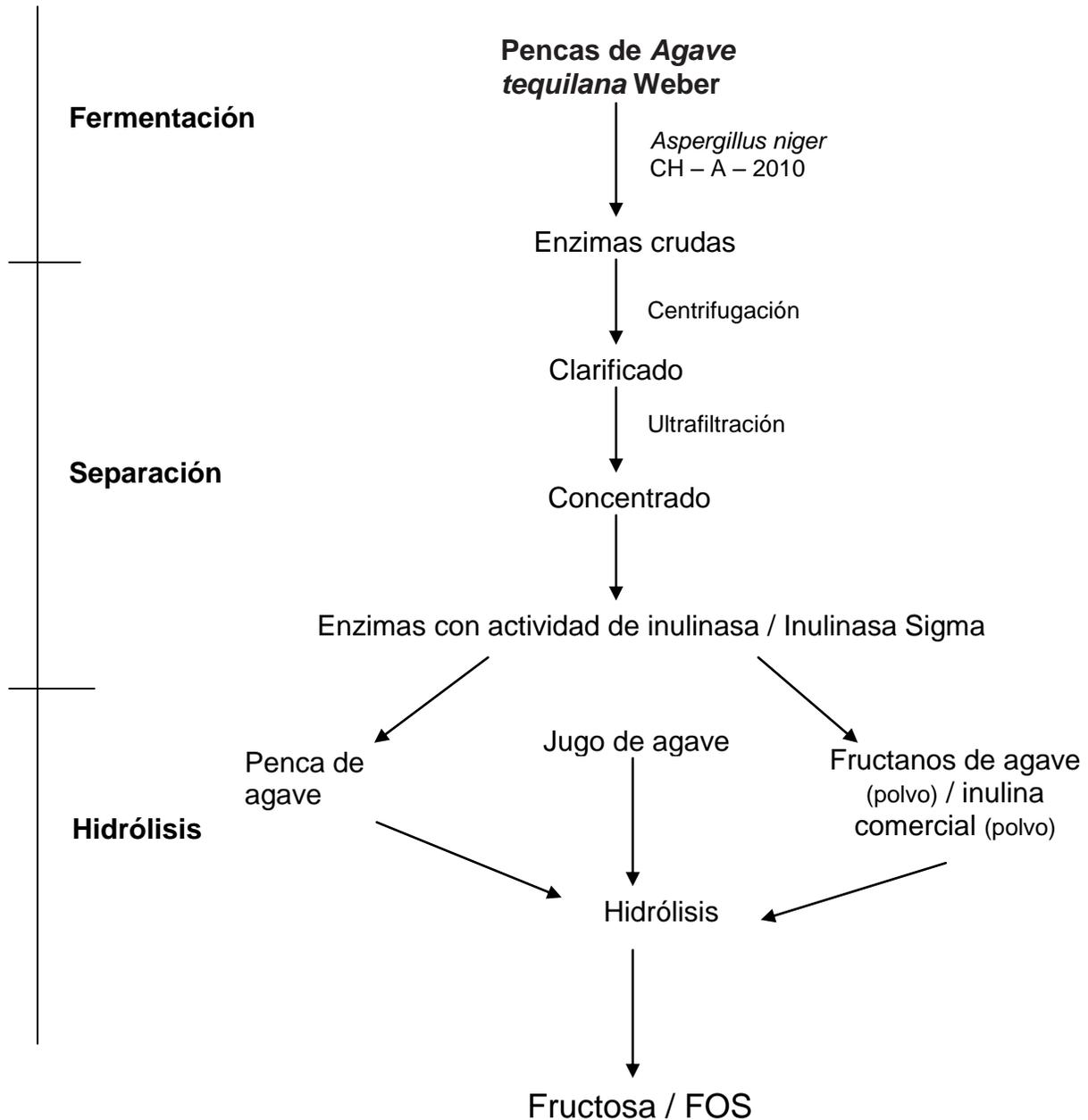


Diagrama 2. Proceso general empleado para la producción de enzimas y el uso de éstas para hidrolizar diferentes sustratos ricos en fructanos.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción de enzimas inulinasas a nivel fermentador 10 L utilizando *Agave tequilana* como fuente de carbono.

Las fermentaciones se realizaron a nivel de matraz Fernbach con 1 L de medio de cultivo y a nivel de fermentador de 10 L. En la figura 3 se muestra la producción de inulinasas extracelulares con la cepa *Aspergillus niger* CH – A – 2010 en los dos sistemas. Se muestra que en estas condiciones no parece haber diferencia y al cabo de 120 horas de fermentación se obtienen los niveles de actividad muy similares de 1.2 U/mL.

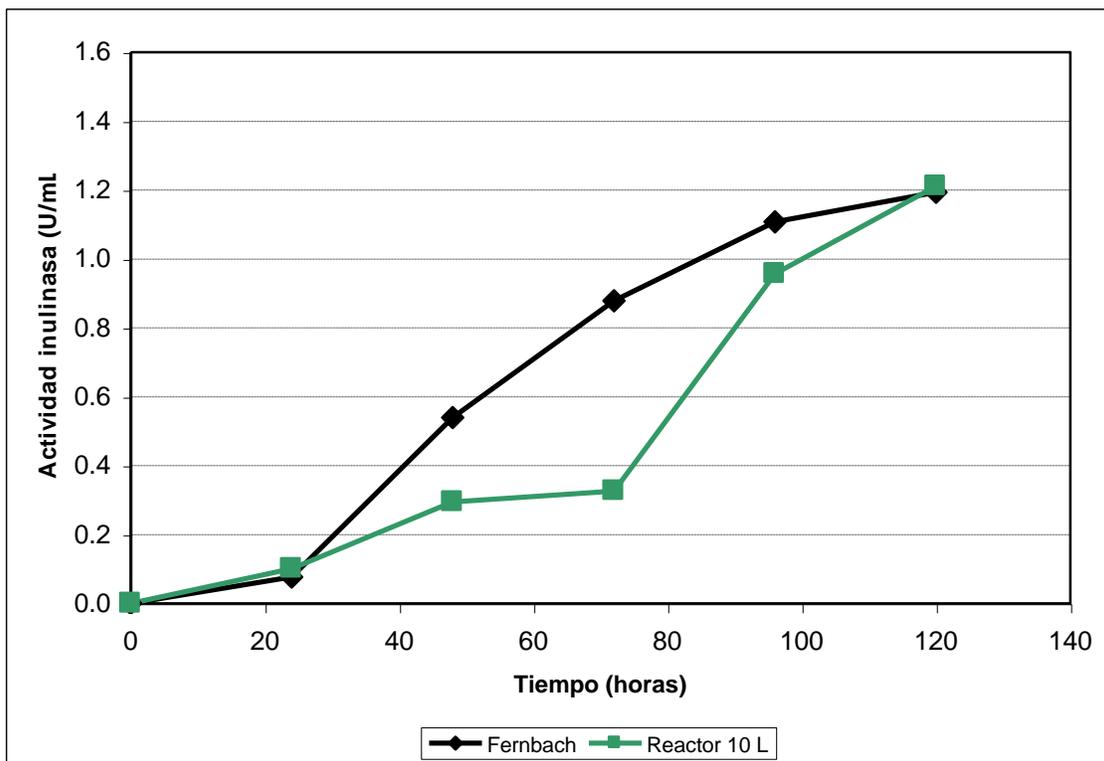


Figura 3. Comparación de actividad de inulina de Fernbach con 1 L y fermentador con 10 L de medio; 1.0 % (P/V) de penca de *Agave tequilana*, 37° C, 200 RPM, 1 vvm de aire para el fermentador.

En la producción de inulinasas a nivel Fernbach se observó que las actividades obtenidas son similares a las reportadas en la literatura por Huitron *et al.*, 2008, donde ya se había determinado la concentración de las fuentes de carbono, nitrógeno y sales de fosfatos, por lo que para la producción a nivel fermentador

con 10 litros se establecieron las condiciones de agitación y aereación de 200 RPM y 1 vvm respectivamente.

Cabe señalar que las pencas de *Agave tequilana* son la fuente de carbono y energía, además de ser probables inductores en la producción de inulinasas.

Los cultivos obtenidos a nivel de fermentador de 10 L, se purificaron de forma parcial, empleando filtración y centrifugación para separar la biomasa a partir de los caldos de cultivo, posteriormente, se concentró el clarificado por ultrafiltración, después de la purificación se perdió aproximadamente 10 % de actividad. El concentrado se liofilizó y se obtuvieron polvos con actividad enzimática. Al tener las enzimas en forma de polvo, se facilitó el manejo pues no requieren refrigeración.

A estos extractos enzimáticos se les determinó actividad de inulinasas, aunque es posible encontrar otros tipos de actividad enzimática como las pectinasas, celulasas y xilanasas, dado que el sustrato puede inducir también la producción de éstas enzimas (Huitron *et al.* 2008).

6.2 Aplicaciones de las enzimas obtenidas en las fermentaciones sumergidas con *A. niger* CH – A – 2010.

Las enzimas obtenidas en los cultivos con *A. niger* CH – A – 2010 se utilizaron para llevar a cabo estudios para determinar la capacidad de hidrólisis de sustratos ricos en fructanos como: la penca de *Agave tequilana*, inulina de achicoria, fructanos de jugo de agave en polvo y jugo de agave fresco. Además se emplearon enzimas comerciales liofilizadas para comparar la capacidad hidrolítica de las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 (Rica *et al.*, 2009; Waleckx *et al.*, 2011).

6.3 Hidrólisis enzimática de penca de agave.

En la figura 4, se observa la hidrólisis de penca de agave 10 % P/V fresca y deshidratada con las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010. Ambos sistemas tuvieron un comportamiento similar, aunque se observaron diferencias en los azúcares reductores producidos después de 24 horas de hidrólisis. Se observa que al hidrolizar pencas de agave frescas se obtienen más azúcares reductores (10 g/L) comparado con la penca deshidratada (5 g/L), lo cual puede deberse a la mayor difusión de las enzimas sobre la penca fresca, que da lugar a mayor degradación del sustrato. En la penca seca la estructura se ha modificado por la deshidratación y el acceso de las enzimas hacia la matriz donde se encuentra el sustrato puede ser difícil.

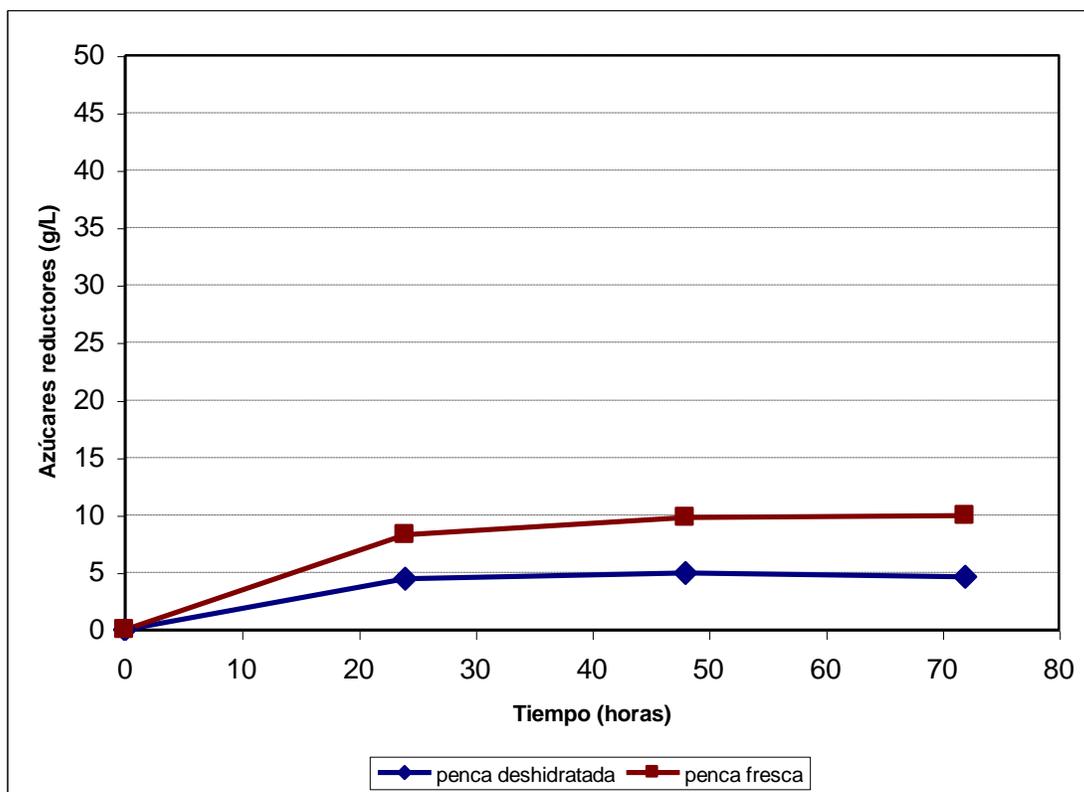


Figura 4. Hidrólisis de penca fresca y deshidratada de *Agave tequilana* (10 % P/V) con extractos enzimáticos crudos de *A. niger* CH – A – 2010, usando 500 U de inulinasa, a 50° C y 200 RPM.

6.4 Hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010.

Las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 se emplearon para hidrolizar fructanos de agave nanofiltrados y secados por aspersión (50 g/L); en la figura 5 se observa que a las 24 horas de incubación empleando diferentes concentraciones de enzimas se llegó a un máximo de hidrólisis. En los primeros minutos de la hidrólisis comienzan a producirse azúcares reductores, los cuales se incrementan con la concentración de las enzimas, esto pudiera deberse a la alta disponibilidad del sustrato, la especificidad de las enzimas por el mismo y la cantidad de enzimas usada. Al utilizar 1000 unidades de enzima se obtuvo el mayor grado de hidrólisis desde los primeros minutos y hasta las 24 horas, pero después de este tiempo la cantidad de azúcares reductores liberados es muy similar con las tres concentraciones de enzimas utilizadas. En el ensayo de control no se usaron extractos con actividad enzimática, pero hubo presencia de azúcares reductores libres en el medio desde el inició los cuales no se incrementaron a lo largo de las 72 horas de incubación.

6.4.1 Hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados con enzimas Sigma.

Para valorar la capacidad hidrolítica de las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010, sobre fructanos de agave nanofiltrados se realizó un comparativo de la hidrólisis con enzimas comerciales bajo las mismas condiciones de reacción. En la figura 6 se observa el perfil de hidrólisis del sustrato donde los azúcares reductores se liberaron en menor proporción (38 g/L) con respecto a lo que se obtuvo con las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 (43 g/L). La rapidez de la hidrólisis a tiempo cero también fue menor. Los ensayos con 100 y 1000 unidades de enzimas mostraron cantidades de azúcares reductores muy similares a los tiempos 48 y 72 horas.

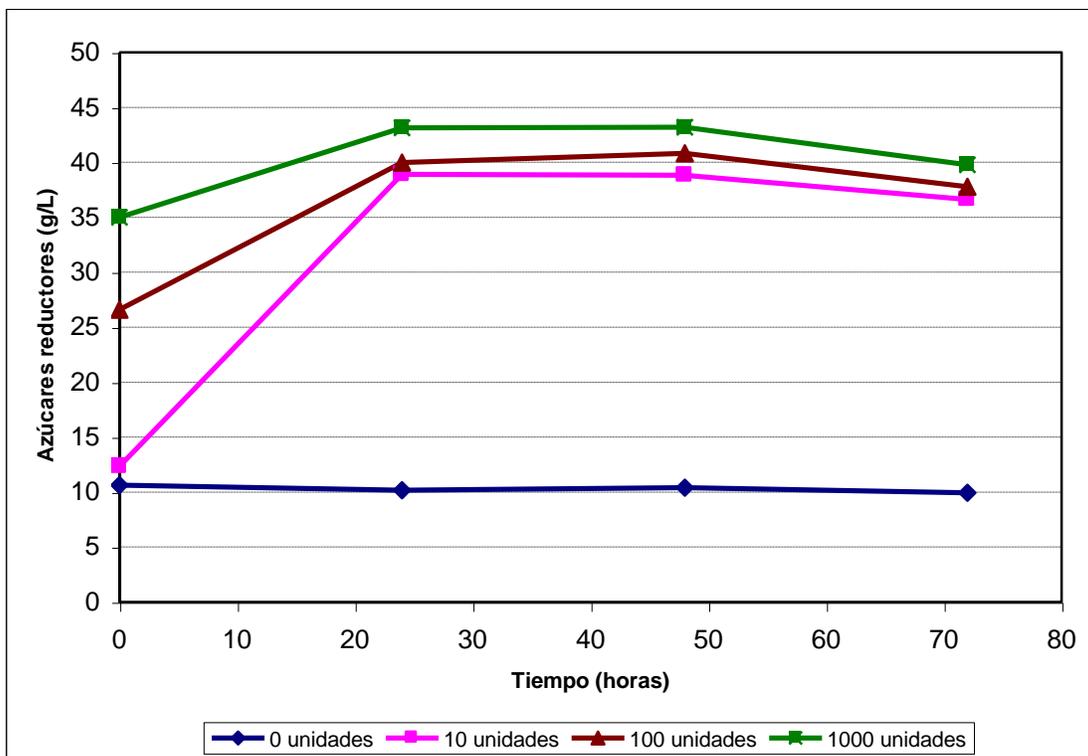


Figura 5. Hidrólisis de fructanos nanofiltrados de *Agave tequilana* (50 g/L) con extractos enzimáticos crudos de *A. niger* CH – A – 2010; 50° C y 200 RPM.

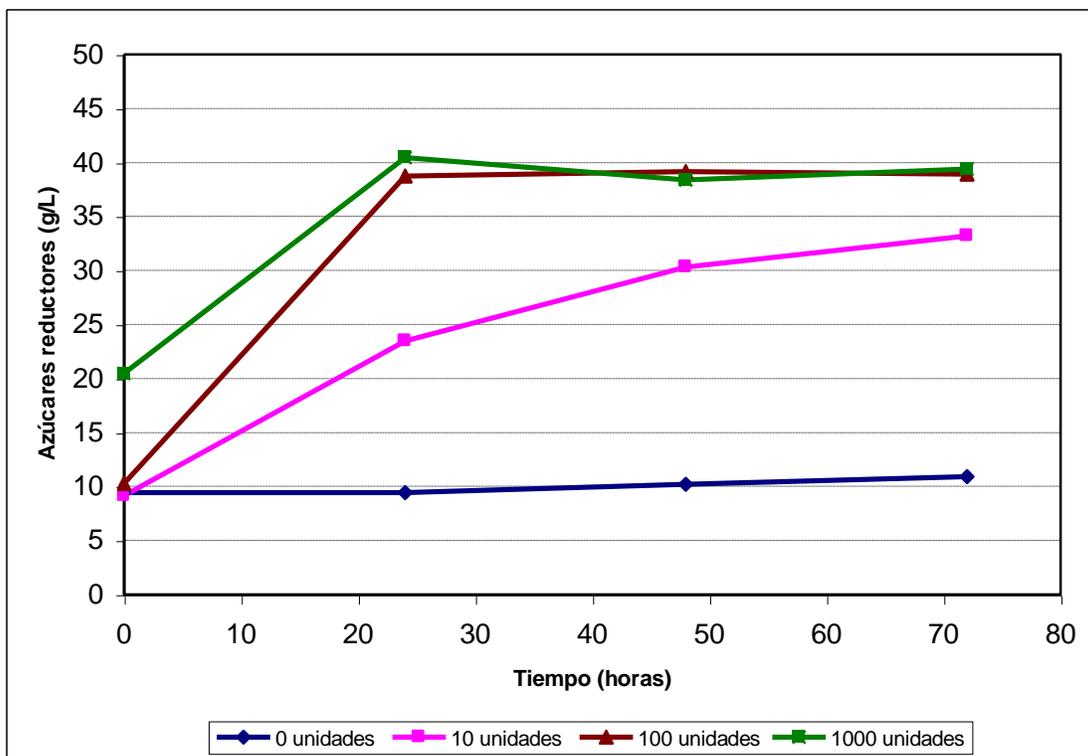


Figura 6. Hidrólisis de fructanos nanofiltrados de *Agave tequilana* (50 g/L) con enzimas Sigma; 50° C y 200 RPM.

Al comparar las figuras 5 y 6 se observa un ligero incremento de hidrólisis de alrededor de 5 g/L utilizando las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 comparado con las enzimas de Sigma y también la rapidez de la hidrólisis mostró ser superior a tiempos anteriores de las 24 horas. Sin embargo después de 24 horas las cantidades de azúcares reductores liberados por las dos enzimas son muy similares en las cinéticas con 100 y 1000 unidades. Solamente cuando se usan 10 unidades se muestran diferencias en los azúcares reductores que se liberan al medio de reacción debido a la presencia de endoinulinasas y exoinulinasas en las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010, pues la presencia de ambas permitiría la hidrólisis más eficiente del sustrato, pues las enzimas endo facilitarían la actuación de las exo, al crear más extremos donde ataquen estas últimas. Los fructanos nanofiltrados que se utilizaron como sustrato contenían azúcares reductores de origen (10 g/L), sin embargo mostró estabilidad a las condiciones de incubación pues en el matraz testigo no se registró aumento de los reductores aun cuando se mantuvo a 50° C durante 72 horas continuas.

6.4.2 Comparativo de hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados.

En la figura 7 se observa el comparativo de hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados con los registros máximos de azúcares reductores en cada sistema, donde se aprecian las diferencias entre los métodos enzimáticos y el fisicoquímico. En esta última condición la liberación de azúcares reductores puede deberse a las condiciones de acidez y temperatura, puesto que hay lugar para reacciones de caramelización y formación de melanoidinas, lo cual afectaría las características organolépticas del hidrolizado y disminuiría la cantidad de azúcares reductores disponibles. Entre los métodos enzimáticos hay diferencias desde los primeros minutos, donde destacan los sistemas con 1000 U de enzimas pues se obtuvo una diferencia de 15 g/L, atribuible a la especificidad de las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 por los fructanos de agave.

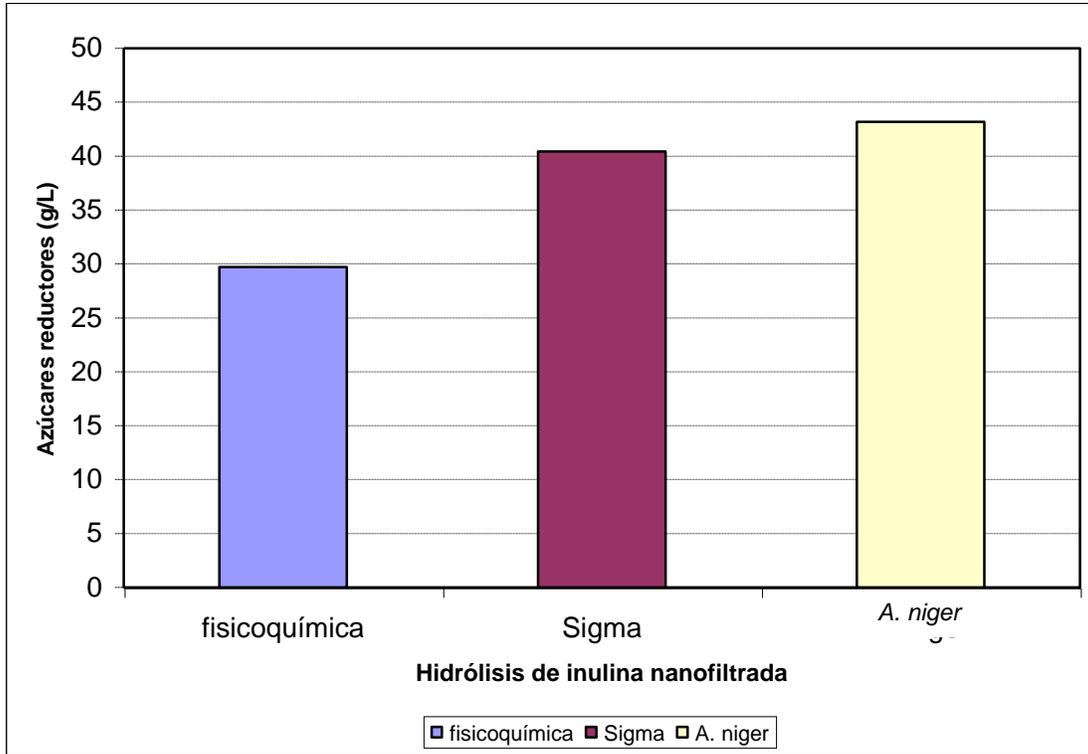


Figura 7. Concentración máxima de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados en concentración de 50 g/L, empleando tres métodos distintos: fisicoquímico e hidrólisis con 1000 unidades de enzimas Sigma y de *A. niger* CH – A – 2010.

6.5 Hidrólisis de fructanos de agave en polvo utilizando enzimas de *A. niger* CH – A – 2010.

En la figura 8 se observa la hidrólisis de fructanos de agave en polvo a una concentración de 50 g/L con enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010. Los fructanos utilizados se obtuvieron de jugo de agave que no se purificó por nanofiltración ni se secó por aspersion. En este experimento se utilizaron 100 y 1000 unidades de enzimas. Las enzimas hidrolizan tan rápidamente el sustrato que desde los primeros minutos se detectó la presencia de azúcares reductores. A las 24 horas, utilizando 1000 unidades de enzimas se alcanza el grado máximo de hidrólisis y la cantidad de azúcares obtenida se mantiene hasta las 48 horas. La concentración de azúcares reductores obtenidos cuando se utilizan 100 y 1000 unidades es de 41 y 43 g/L respectivamente. Esto muestra que la concentración máxima de azúcares reductores obtenidos puede ser similar hacia las 24 horas, pero la velocidad de hidrólisis es mayor al emplear 1000 unidades de enzimas.

6.5.1 Hidrólisis de fructanos de agave en polvo utilizando enzimas Sigma.

Por otra parte en la figura 9 se muestra la hidrólisis de fructanos de agave con enzimas comerciales Sigma, como parte del comparativo con las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 para determinar la eficiencia de estas últimas. A los primeros minutos de la hidrólisis las concentraciones de azúcares reductores son menores con las enzimas Sigma, comparada con las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010. Se encuentran diferencias de hasta 20 g/L menos azúcares reductores producidos con 100 unidades enzimas comerciales Sigma comparado con los generados utilizando enzimas de *A. niger* CH – A – 2010. Dado que las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 fueron obtenidas en cultivo sumergido con penca de *Agave tequilana* como fuente de carbono, éstas deben tener diferencias con las enzimas comerciales de Sigma, en cuanto a las condiciones óptimas de pH y temperatura además de la especificidad por el sustrato, que pueden ser la causa de las diferencias en la producción de azúcares reductores en el ensayo con 100 unidades de enzimas. En el ensayo con 1000 unidades de inulinasa ambas enzimas mostraron comportamientos muy similares.

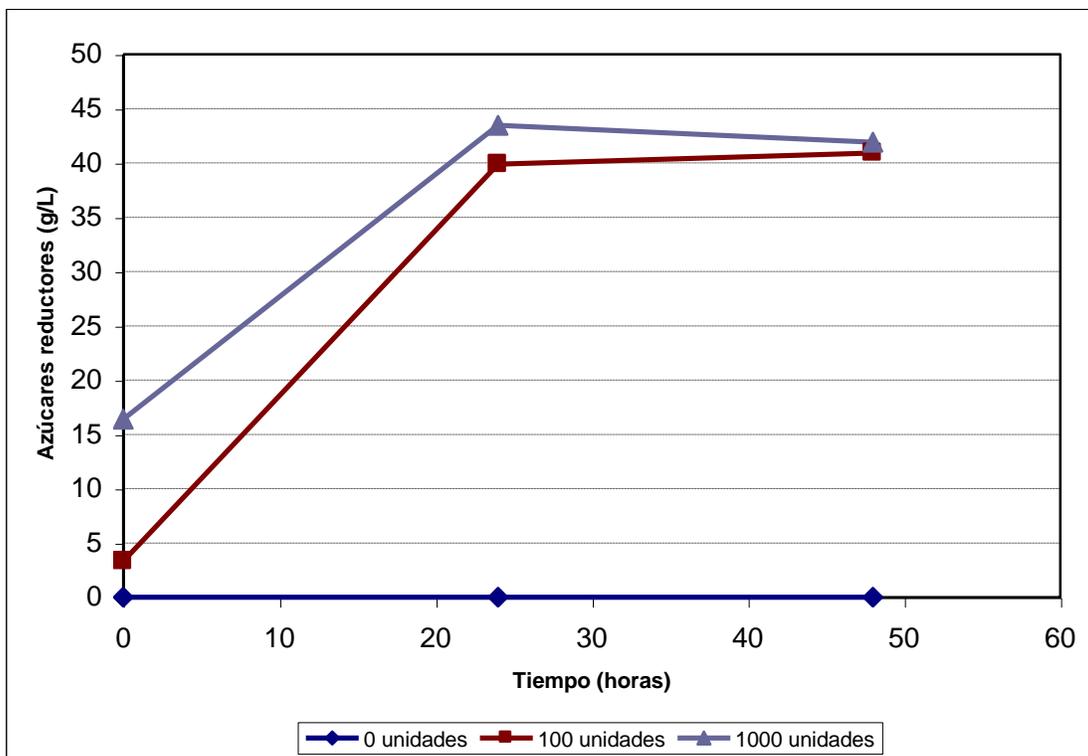


Figura 8. Hidrólisis de fructanos de *Agave tequilana* en polvo a 50 g/ L con extractos enzimáticos crudos de *A. niger* CH – A – 2010; 50° C y 200 RPM.

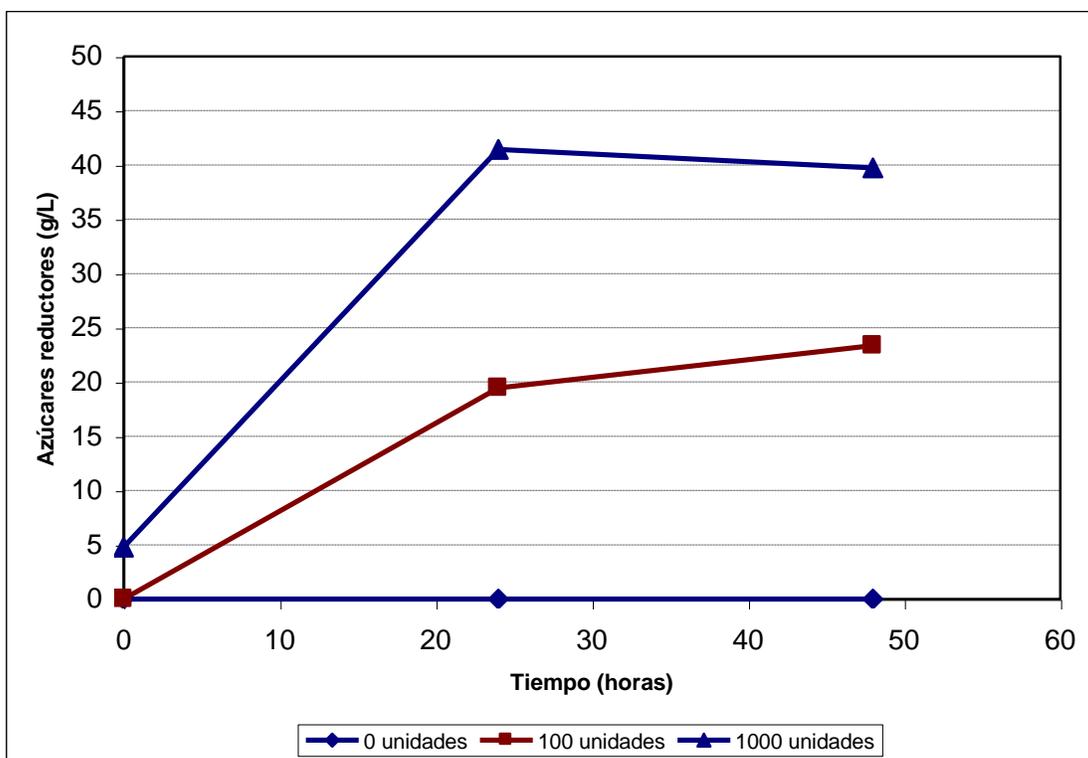


Figura 9. Hidrólisis de fructanos de *Agave tequilana* en polvo a 50 g/L con enzimas Sigma; 50° C y 200 RPM.

6.5.2 Comparativo de hidrólisis de fructanos de agave en polvo.

En un comparativo de hidrólisis de fructanos de agave en polvo con los tres métodos se puede observar en la figura 10, que el grado de hidrólisis es muy similar para ambas enzimas cuando se utilizan 1000 unidades y es menor la concentración de azúcares liberados cuando se emplea un método fisicoquímico.

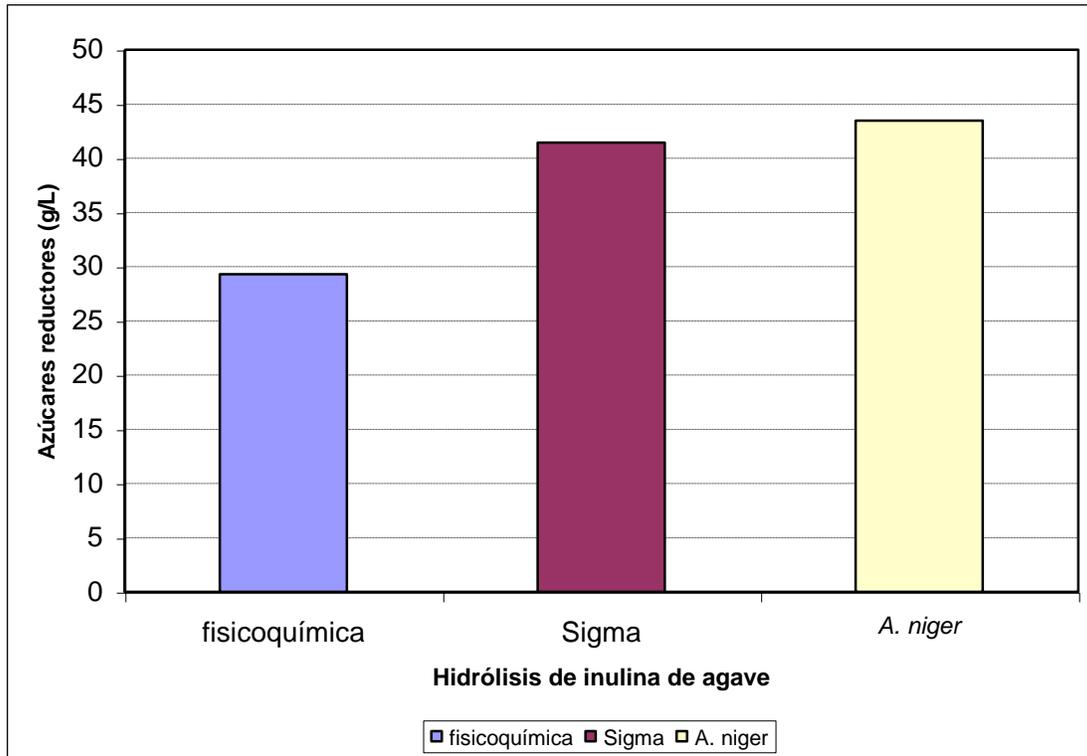


Figura 10. Concentración máxima de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de fructanos de agave en concentración de 50 g/L, empleando tres métodos: fisicoquímico e hidrólisis con 1000 unidades de enzimas Sigma y de *A. niger* CH – A – 2010.

6.6 Hidrólisis de inulina comercial con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 y con enzimas Sigma.

Como parte de la evaluación de las inulinasas, se llevó a cabo la hidrólisis de inulina comercial de achicoria (50 g/L) con 1000 unidades de inulina de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y con enzimas comerciales Sigma. Así la capacidad hidrolítica de estas enzimas queda patente en sustratos comerciales. En la figura 11 se observa que la mayor parte del sustrato fue convertido en azúcares reductores, por lo cual las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 también son eficientes al hidrolizar inulina de grado reactivo proveniente de achicoria. La cual es lineal y no posee ramificaciones como los fructanos de agave. A partir de las 24 horas ya no se produjeron cantidades importantes de azúcares reductores, por lo que las cinéticas podrían acortarse a este intervalo.

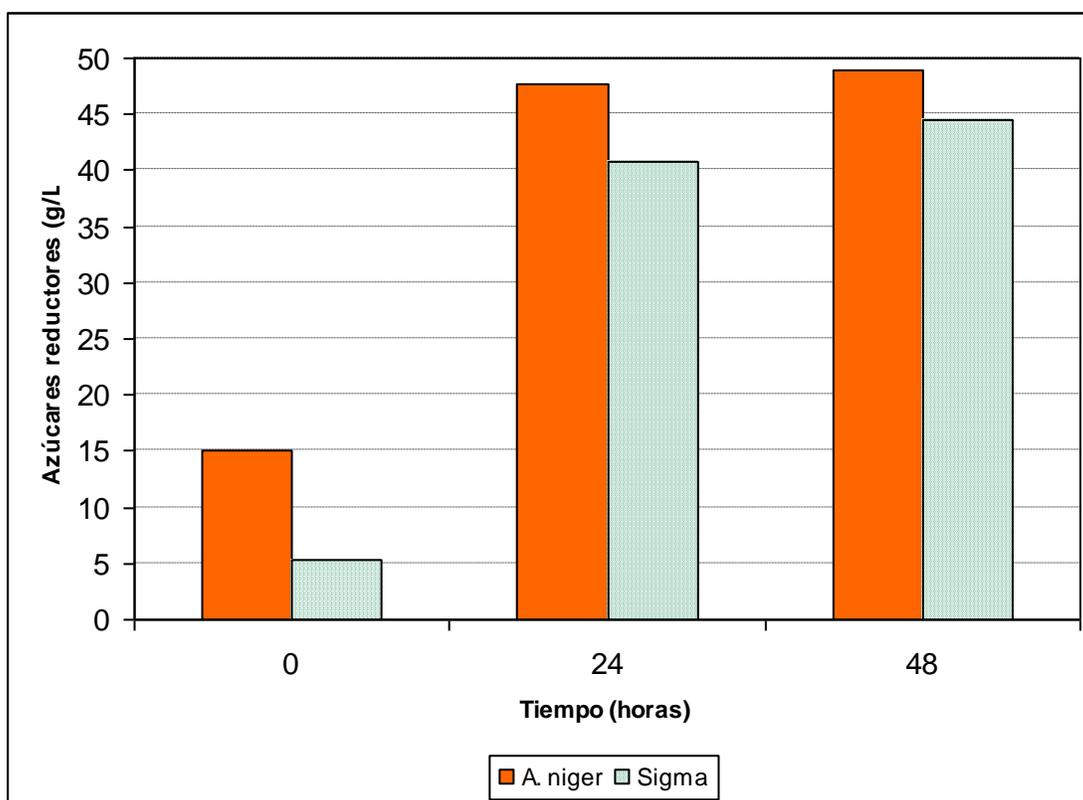


Figura 11. Hidrólisis de inulina comercial a 50 g/L con extractos enzimáticos crudos de *A. niger* CH – A – 2010 y con enzimas Sigma 50° C y 200 RPM.

De la hidrólisis de inulina de achicoria con enzimas comerciales se observa que la producción de azúcares reductores fue menor a los que se obtuvieron con las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010. Es posible que la mayor producción en el ensayo con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 se deba a la presencia de inulinasas con condiciones óptimas distintas diferentes a las inulinasas de Sigma, o bien las inulina tipo exo y endo en proporciones distintas, lo cual da lugar a comportamientos hidrolíticos diferentes.

6.6.1 Comparativo de hidrólisis de inulina comercial.

En la figura 12 se comparan los datos de producción de azúcares reductores en cada uno de los sistemas de hidrólisis, se determinó que al usar como sustrato inulina de achicoria, las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 liberaran más azúcares comparado con la hidrólisis con enzimas Sigma y con la fisicoquímica. La hidrólisis fisicoquímica liberó gran cantidad de azúcares reductores (42 g/L), sin embargo se producen en menor cantidad que en las hidrólisis enzimáticas (*A. niger* CH – A – 2010 49 g/L y Sigma 44 g/L), aunado a lo anterior presentó una coloración oscura lo cual constituye una desventaja frente a las hidrólisis enzimáticas. Los tonos oscuros se presentan por la formación de subproductos y la caramelización de los azúcares. Las hidrólisis enzimáticas liberaron azúcares reductores en cantidades mayores a la hidrólisis fisicoquímica, porque las enzimas tienen alta especificidad por el sustrato. En las reacciones con catalizadores biológicos no hay reacciones secundarias que impliquen la pérdida de productos, lo que sí sucedió en la hidrólisis fisicoquímica (Mancilla – Margalli, 2002).

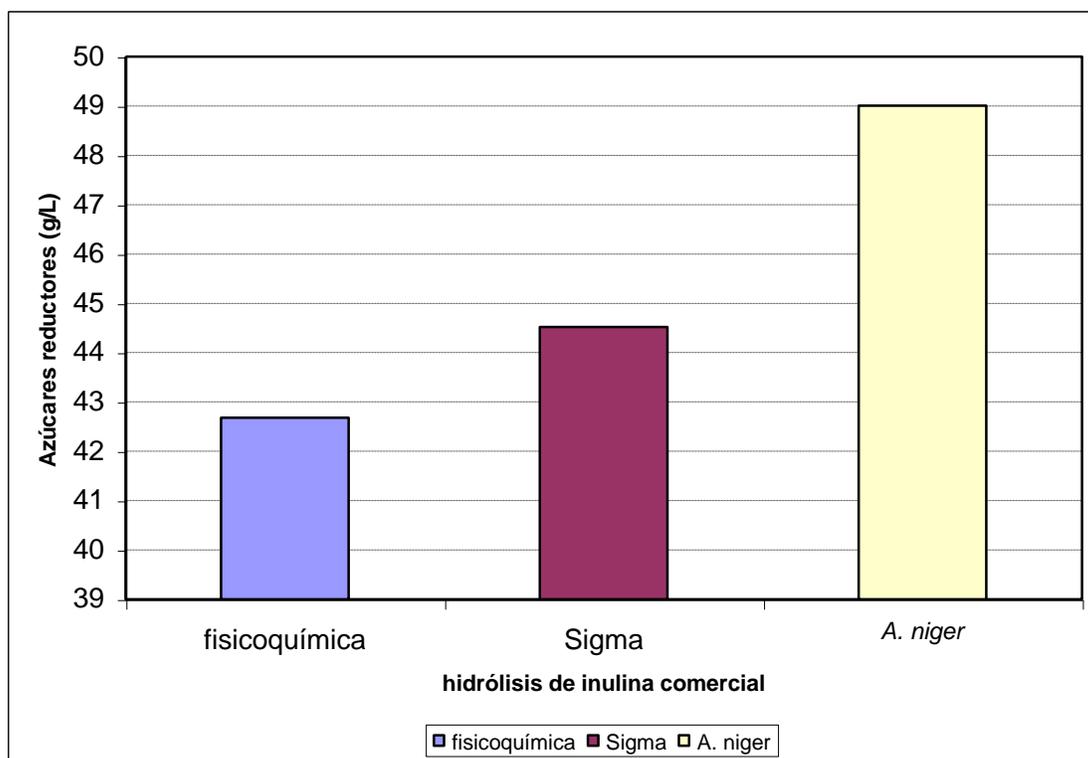


Figura 12. Concentración máxima de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de inulina comercial de achicoria en concentración de 50 g/L, empleando tres métodos: fisicoquímico e hidrólisis con 1000 unidades de enzimas Sigma y de *A. niger* CH – A – 2010.

6.7 Hidrólisis enzimática de jugo de agave al 20 % utilizando enzimas de *A. niger* CH - A – 2010.

El jugo de agave es un sustrato de interés para la producción de azúcares reductores, por lo que se llevaron a cabo hidrólisis de este jugo con enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y enzimas comerciales Sigma, a concentraciones de 10, 100 y 1000 unidades. Los azúcares reductores obtenidos provienen fundamentalmente de los polímeros de fructosa presentes en el jugo. En la figura 13 se observa que el grado máximo de hidrólisis se alcanzó a las 24 horas siendo mayor la concentración de azúcares reductores cuando se utilizan 1000 unidades de enzimas. La mayor velocidad con que actúan las enzimas sobre este sustrato se aprecia cuando se utilizan 1000 unidades, pues desde los primeros minutos ya hay cantidades significativas de azúcares reductores (15 g/L), mientras que al usar 10 y 100 unidades de inulinasa no hay liberación de reductores y sus máximos son de 22 g/L a las 72 horas y de 27 g/L a las 24 horas respectivamente.

6.7.1 Hidrólisis enzimática de jugo de agave al 20 % utilizando enzimas comerciales Sigma.

Se llevó a cabo una hidrólisis de jugo de agave al 20 % P/V con enzimas comerciales Sigma y se cuantificaron los azúcares reductores que libera esta enzima comercial para compararlos con los producidos por las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 y así determinar las capacidad hidrolítica de éstas. En la figura 14 se observa que el nivel máximo de hidrólisis de jugo de agave con las enzimas comerciales se presenta a las 24 horas al emplear 1000 unidades de enzimas (27 g/L). Y al comparar estos resultados con los de las enzimas de *A. niger* CH – A – 2010, la concentración de azúcares reductores es menor en todas las proporciones de enzimas usadas, lo cual podría deberse a que las enzimas de *A. niger* tienen mayor especificidad por este tipo de sustrato.

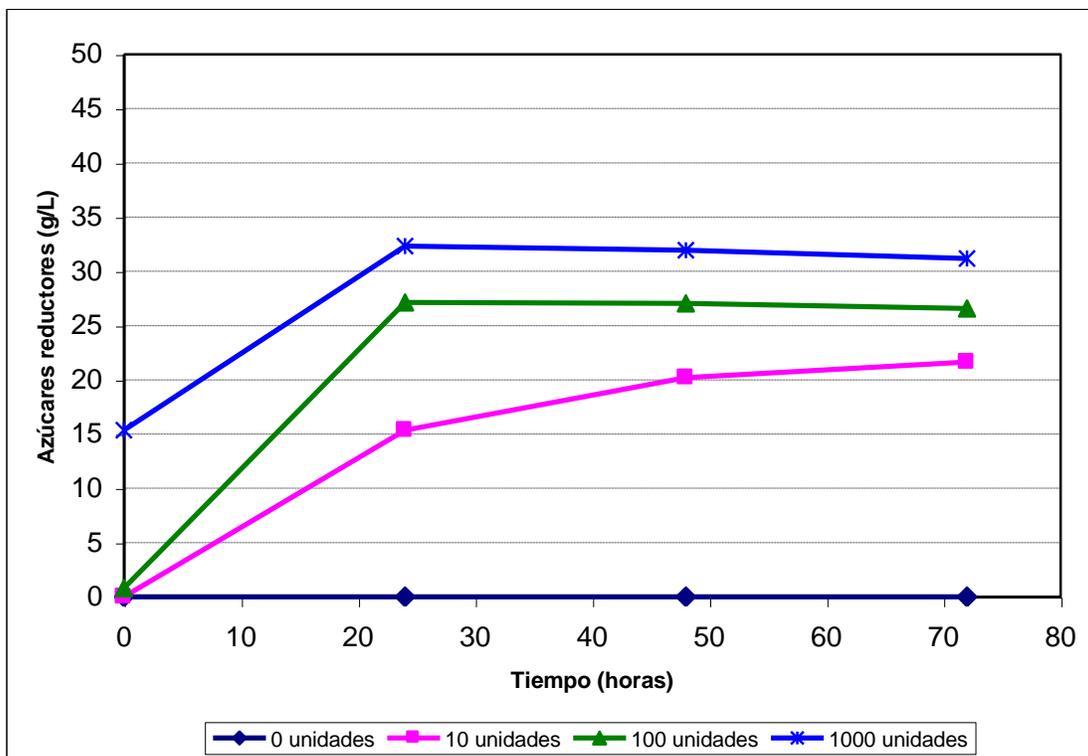


Figura 13. Hidrólisis de jugo de *Agave tequilana* al 20 % P/V con extractos enzimáticos crudos de *A. niger* CH – A – 2010; a 50° C y 200 RPM.

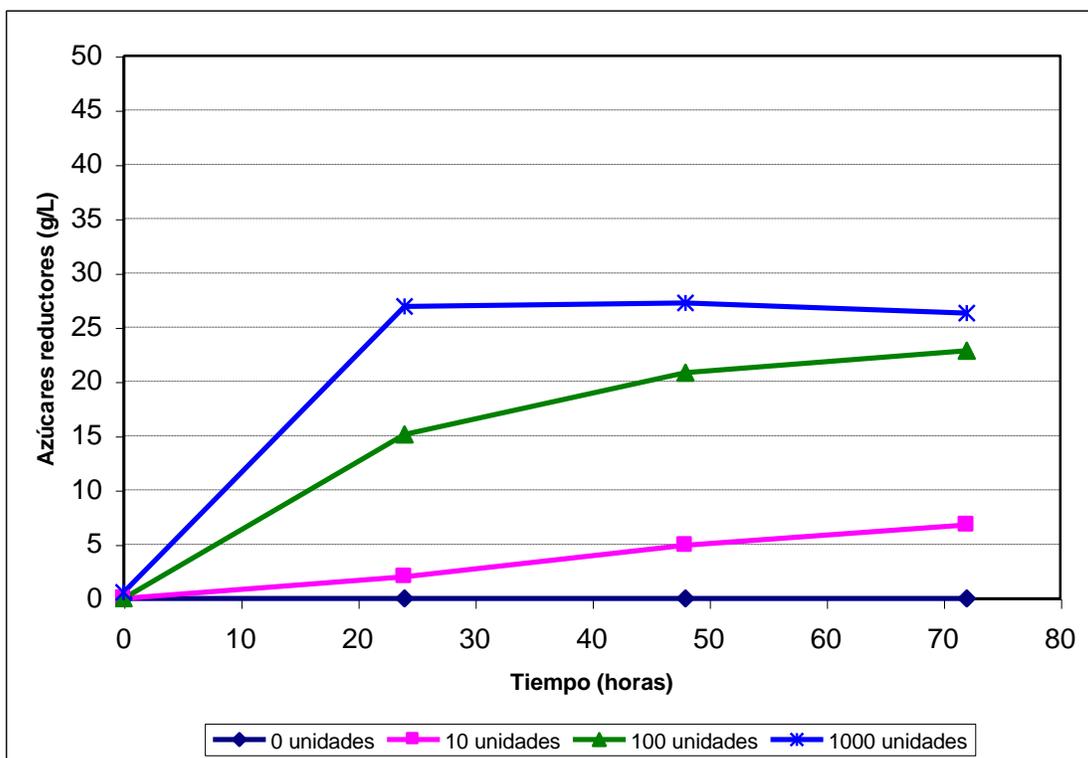


Figura 14. Hidrólisis de jugo de *Agave tequilana* al 20 % P/V con enzimas Sigma; 50° C y 200 RPM.

6.7.2 Comparativo de hidrólisis de jugo de agave al 20 % P/V.

Como parte del comparativo, se hidrolizó jugo de agave al 20 % P/v con el método fisicoquímico y se obtuvieron azúcares reductores en cantidades comparables a los métodos enzimáticos, sin embargo se generaron colores oscuros provenientes de reacciones secundarias entre los azúcares del jugo (Mancilla – Margalli, 2002). La concentración máxima de azúcares reductores obtenidos para cada uno de los métodos de hidrólisis se muestra en la figura 15. Observamos que en los tres ensayos que las concentraciones más altas de azúcares reductores se obtienen al utilizar las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010.

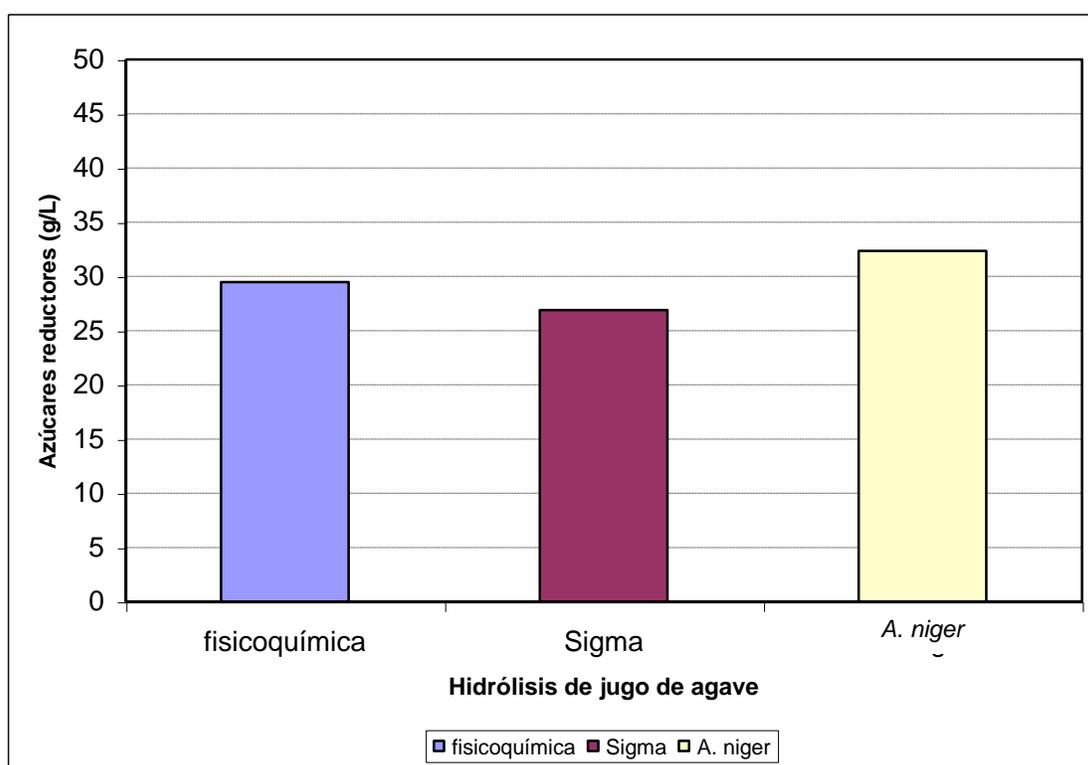


Figura 15. Concentración máxima de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de jugo de agave de 160.58 mg / mL de azúcares totales, en concentración de 20 % P/V empleando tres métodos: fisicoquímico e hidrólisis con 1000 unidades de enzimas Sigma y de *A. niger* CH – A – 2010.

6.8 Hidrólisis de fructanos de agave y de inulina comercial marca Sigma, con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010 y con enzimas comerciales Sigma

Como parte de los estudios realizados se incluyeron hidrólisis de inulina comercial de achicoria y fructanos de agave (50 g/L en cada ensayo), con enzimas comerciales Sigma y de *A. niger* CH – A – 2010. Estos ensayos las hidrólisis se llevaron a cabo por 72 horas en una primera etapa y se observan en la figura 16. Estas enzimas producen cantidades similares de azúcares reductores (43 – 50 g/L) además la concentración de éstos se mantiene constante por todo el tiempo de hidrólisis. En las hidrólisis de fructanos e inulina se había observado que a partir de los primeros minutos se generaban azúcares reductores en el sistema de reacción. Por tal motivo se llevó a cabo una hidrólisis a tiempos cortos para determinar cómo se hidrolizaban los fructanos entre 0 y 120 minutos.

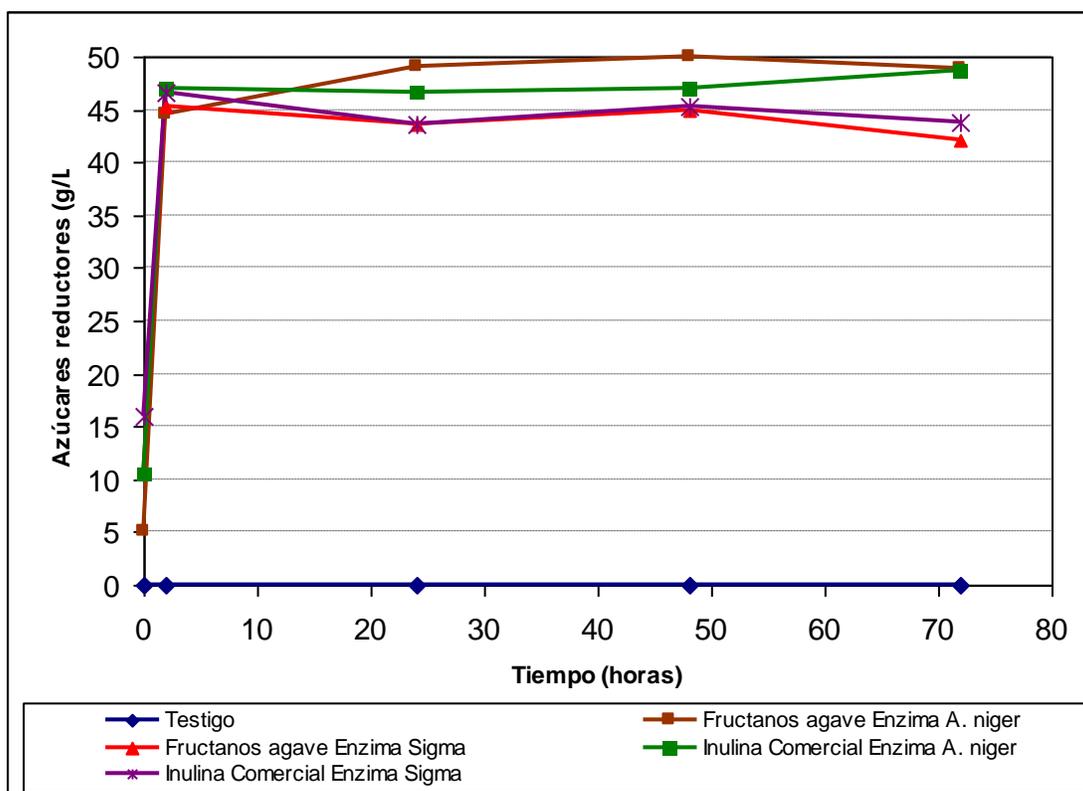


Figura 16. Hidrólisis de fructanos de agave e inulina comercial con enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y enzimas Sigma, con 50 g/L de inulina y 500 unidades de enzimas, a 50° C, 200 RPM.

En la figura 17 se observa la presencia de azúcares reductores libres desde los primeros minutos de hidrólisis en todos los ensayos excepto en el testigo sin enzimas, lo cual nos muestra la velocidad con que son hidrolizados los fructanos. A partir de 10 minutos de hidrólisis se había alcanzado alrededor de 40 g/L de azúcares reductores en el ensayo de inulina comercial con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010, pero hacia los 120 minutos la concentración de azúcares reductores es muy similar para todos los ensayos con alrededor de 45 g/L. Las observaciones anteriores nos permiten plantear que las enzimas tienen capacidad hidrolítica muy similar a tiempos cortos reduciendo ampliamente el tiempo de hidrólisis de 72 horas a solamente 2 horas.

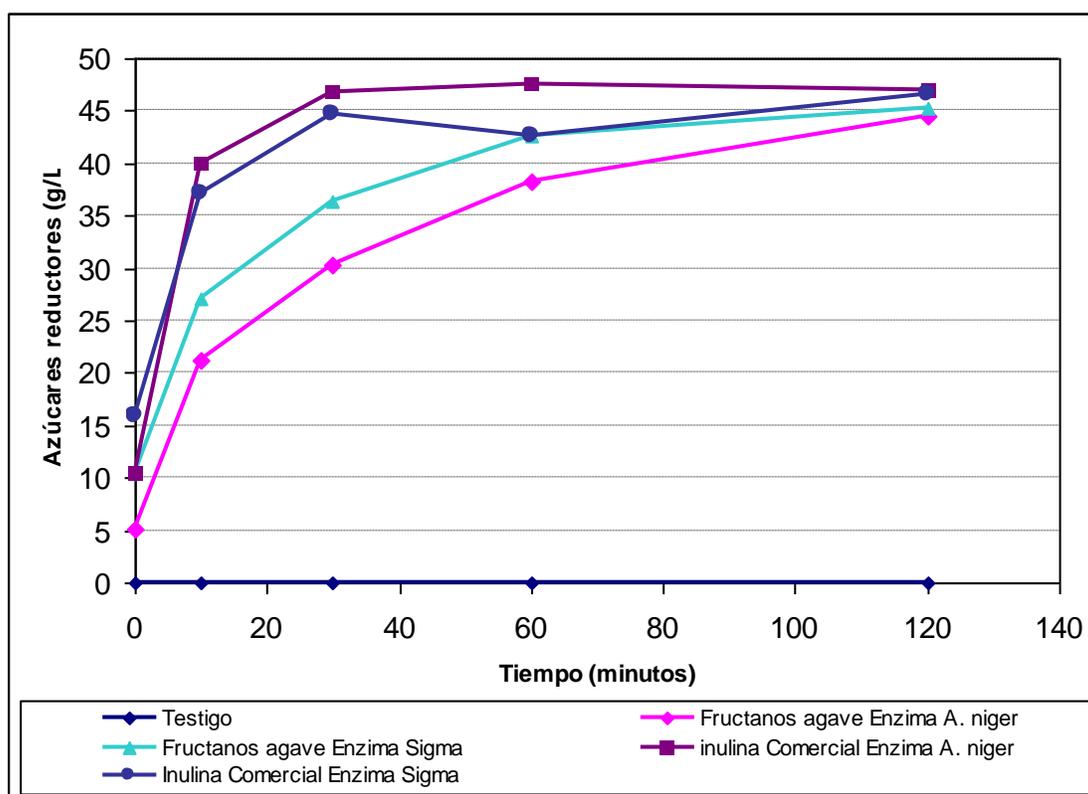


Figura 17. Hidrólisis de fructanos de agave e inulina comercial con enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y Enzima Sigma con 50 g/L de fructanos y 500 unidades de enzimas, a 50° C, 200 RPM.

En la figura 18 se muestra la hidrólisis de los dos tipos de fructanos del experimento anterior, pero el tiempo de reacción se extendió a 180 minutos de incubación con las mismas enzimas probadas. Se observa que desde los primeros minutos de reacción ya había producción azúcares reductores en cada uno de los ensayos. Y a los 10 minutos de incubación los de azúcares reductores obtenidos de la inulina comercial se incrementan notablemente, como en el experimento anterior. A tiempos mayores de 60 minutos en todos los ensayos había porcentajes de hidrólisis similares. Además la inulina comercial es hidrolizada rápidamente a tiempos cortos, pero a partir de los 60 minutos la concentración de azúcares reductores tiende a ser similar para los dos tipos de fructanos y se mantiene constante hacia los 180 minutos del ensayo (45 – 50 g/L). También se puede observar que los fructanos de agave son hidrolizados más lentamente con ambos tipos de enzimas a tiempos cortos, lo cual puede deberse a las ramificaciones presentes en las agavinas (Lopez *et al.*, 2003).

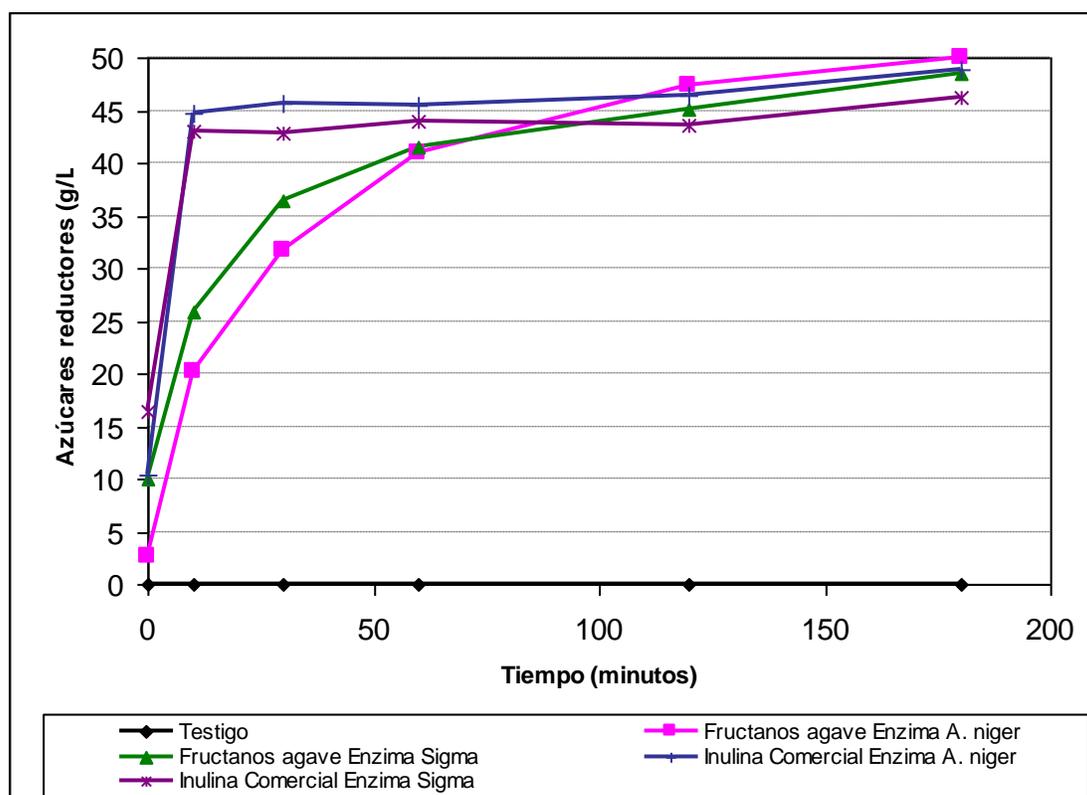


Figura 18. Hidrólisis de fructanos de agave e inulina comercial con enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y Enzima Sigma, con 50 g/L de fructanos y 500 unidades de enzimas, a 50° C, 200 RPM.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El hongo *Aspergillus niger* CH – A – 2010 es capaz de producir inulinasas en cultivos sumergidos en un medio que contiene penca de *Agave tequilana* Weber como fuente de carbono, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y sales de fosfato.

Las condiciones de cultivo seleccionadas a nivel reactor de 10 litros fueron 200 RPM y 1 vvm de aire permitieron la producción de inulinasas en niveles de 1.2 U/mL.

Se emplearon operaciones unitarias de filtración, centrifugación, ultrafiltración y liofilización, para obtener extractos enzimáticos crudos con actividad de inulinasas.

Se evaluó la capacidad de hidrólisis de los extractos crudos con actividad enzimática de inulinasas sobre sustratos ricos en fructanos y se comparó con la actividad hidrolítica de las enzimas comerciales. En estos ensayos se encontró lo siguiente:

Cuando se utilizan sustratos ricos en fructanos (penca de agave, fructanos de agave en polvo y nanofiltrados, inulina de achicoria y jugo de agave) la capacidad hidrolítica de las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 es muy similar a la actividad de las enzimas comerciales utilizadas con fines comparativos.

En las hidrólisis de fructanos a tiempos cortos (120 y 180 minutos) utilizando ambas enzimas, se observó la presencia de azúcares reductores desde los primeros minutos de la reacción.

En las hidrólisis de fructanos a 120 y 180 minutos la mayor parte de los azúcares reductores se obtuvieron entre 10 a los 60 minutos.

La hidrólisis fisicoquímica produce menores concentraciones de azúcares reductores comparado con las enzimas de *Aspergillus niger* CH – A – 2010 y con las enzimas Sigma.

Al utilizar las pencas de *Agave tequilana* Weber, éstas pueden obtener un valor agregado al ser empleadas como sustrato para la producción de enzimas con interés comercial.

Las pencas de *Agave tequilana* Weber son un sustrato potencial para la producción de azúcares reductores con capacidad de obtener biocombustibles derivados de los azúcares fermentables en la penca.

El jugo de *Agave tequilana* Weber y los fructanos en polvo, son sustratos potenciales para la producción de jarabes de fructosa, útiles en la industria alimentaria.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS

Optimizar las condiciones de la fermentación para obtener mayores rendimientos en la producción enzimática, para lo cual se requiere modificar las fuentes de carbono y nitrógeno, además optimizar las condiciones agitación y aireación para fermentaciones en reactor.

Probar jugo de agave como fuente de carbono, para mantener condiciones de agitación uniformes que aumenten la disponibilidad de nutrientes en la fermentación.

Determinar las actividades de enzimas pectinasas, xilanasas y celulasas, en los cultivos.

Medir la cantidad de proteínas extracelulares en el medio de la fermentación para determinar las actividades enzimáticas específicas.

Determinar la presencia de invertasas en las los cultivos y observar la proporción Inulinasas / Invertasas con fines comparativos.

Establecer los parámetros catalíticos de las inulinasas, tales como V_{max} y K_m .

Determinar la presencia de fructooligosacáridos en las hidrólisis de fructanos con enzimas de *A. niger* CH – A – 2010.

Probar eficiencia de las enzimas como parte del procedimiento de elaboración de mieles de agave.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

Arora D. K., Elander R. P. Handbook of applied mycology. Volume 4: Fungal biotechnology. Editorial Marcel Dekker. New York 1992. Páginas 1 – 4

Avances de la investigación en el Agave Tequilero. Consejo Regulador del Tequila. México 2004. Páginas 1 – 12.

Ávila – Fernández Á., Rendón P. X., Olvera C., González F., Capella S., Peña Á. A., López – Munguía A. (2009). “Enzymatic hydrolysis of fructans in the tequila production process”. Journal of agricultural and food chemistry. 57: 5578–5585.

Barthomeuf C., Regerat F., Pourrat H. (1991). “Production of Inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*”. Journal of fermentation and bioengineering. Vol. 72, No. 6: 491-494.

Bennett J. W. (2009). “Aspergillus: a primer for the novice”. Medical mycology. 47 (Supplement 1): S5 – S12.

Bennett J. W. (1998). “Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology”. Journal of biotechnology 66: 101–107

Carlile M. J., Watkinson S. C. The fungi. Academic Press. London 1994. Páginas 50 – 52, 373 – 382.

Corona G. R., Pelayo O. C., González Á. V., Zúñiga P. V. (2005). “Optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces* sp. a partir de *Agave tequilana* Weber variedad azul”. E-Gnosis. 3: 1 – 10.

Gadd G. M. 1988. Carbon nutrition and metabolism. En: David Richard Berry. Physiology of industrial fungi. Oxford: Blackwell Scientific Publications. Páginas 21 – 26.

García C. Fernando, Navarrete del T. Ángeles. 1999. Métodos generales de manipulación enzimática. En: Prado B. Arely *et al.* Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. UAM, México. Páginas 67 – 72

Graciano F. G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A. K. (2008). “The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential”. Applied microbiology and biotechnology. 79: 339–354.

Guiraud J. P., Galzy P. (1981). “Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin”. Enzyme and microbial technology. 3: 305 – 308.

Hanover L. and White J. S. (1993). “Manufacturing, composition, and applications of fructose”. The american journal of clinical nutrition. 58: 724S-732S.

Huitron C., Perez R., Sanchez A. E., Lappe P., Rocha Z. L. (2008). “Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes”. Journal of environmental biology. 29: 37 – 41.

Iñiguez – Covarrubias G., Díaz – Teres R., Sanjuán – Dueñas R. (2001). “Utilization of by – products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves”. Bioresource technology. 77: 101 –108.

Kango N. (2008). “Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*”. Journal of food engineering. 85: 473–478.

Kelly Greg. (2008). “Inulin-type prebiotics – A review: Part 1”. Alternative medicine review. 13: 315-329.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C C. (2002). “Industrial enzyme applications”. Current opinion in biotechnology. 13: 345–351.

Kochhar A., Gupta A. K., Kaur N. (1999). "Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose". Journal of the science of food and agriculture. 79: 549-554.

Korakli M., Hinrichs C., Ehrman M. A. (2003). "Enzymatic determination of inulin and fructooligosaccharides in food". European food research and technology. 217: 530 – 534.

L'homme C., Puigserver A., Biagini A. (2003). "Effect of food-processing on the degradation of fructooligosaccharides in fruit". Food chemistry 82: 533–537.

López – Munguía A. 2004. Casos exitosos de la tecnología enzimática y la biocatálisis en México en: Bolívar, F. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. páginas. 429-448.

Lopez M. G., Mancilla – Margalli N. A., Mendoza-Diaz G. (2003). "Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*". Journal of agricultural and food chemistry. 51: 7835-7840.

Mancilla – Margalli N. A., Lopez M. G. (2002). "Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. *azul*". Journal of agricultural and food chemistry. 50: 806-812.

Mielenz J.R. (2001). "Ethanol production from biomass: technology and commercialization status". Current opinion in microbiology. 4:324–329.

Miller G.L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars". Analytic chemistry. 31: 426 – 428.

Mussatto S. I., Aguilar C. N., Rodrigues L. R., Teixeira J. A. (2009). "Fructooligosaccharides and β - fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials". Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 59: 76–81

Nakamura T., Ogata Y., Hamada S., Ohta K. (1996). "Ethanol production from jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*". Journal of fermentation and bioengineering. 81: 564-566.

Nakamura T., Ogata Y., Shitara A., Nakamura A., Ohta K. (1995). "Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817". Journal of fermentation and bioengineering 80: 164-169.

Negro M. J., Ballesteros I., Manzanares P. (2006). "Inulin-containing biomass for ethanol production". Applied biochemistry and biotechnology. 129–132: 922-932.

Norma oficial mexicana NOM – 006 – SCFI – 1994, Bebidas alcohólicas – Tequila – Especificaciones. Secofi 1997.

Ohta K., Akimoto H., Moriyama S. (2004). "Fungal inulinases: enzymology, molecular biology and biotechnology". Journal of applied glycoscience. 51: 247 – 254.

Ohta K., Hamada S., Nakamura T. (1993). "Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*". Applied and environmental microbiology. 59: 729 – 733.

Pandey A., Soccol C. R., Selvakumar P. (1999). "Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications". Applied biochemistry and biotechnology. 81: 34 –52.

Papagianni M. (2004). "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes". *Biotechnology advances*. 22: 189 – 259.

Praznik, W.; Cieslik, E.; Lopez, M.G.; En: Ninth seminar on inulin, Budapest, Hungary, april 18-19, 2002, Composition of nutritional components in *Agave tequilana* Weber var. *azul*.

Ricca E., Calabrò V., Curcio S. (2007). "The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis". *Critical reviews in biotechnology*. 27: 129 –145.

Ricca E., Calabrò V., Curcio S. (2009). "Optimization of inulin hydrolysis by inulinase accounting for enzyme time – and temperature – dependent deactivation". *Biochemical engineering journal*. 48: 81 – 86.

Rodríguez-Garay B., Lomelí-Sención J.A., Tapia-Campos E. (2009). "Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. *azul* and *Agave angustifolia* Haw. var. Lineño". *Industrial crops and products*. 29: 220 – 228.

Ronkarta S., Blecker Christophe S., Fourmanoir Hélène. (2007). "Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis". *Analytica chimica acta*. 604: 81–87.

Sangeetha P. T., Ramesh M. N., Prapulla S. G. (2005). "Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides". *Trends in food science & technology*. 16: 442 – 457.

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C. (2002). "On the safety of *Aspergillus niger* – a review". *Applied microbiology and biotechnology*. 59: 426–435.

Sharma A. D., Gill P. K. (2007). "Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp.". *Journal of food engineering*. 79: 1172–1178.

Sharma A. D., Kainth S., Gill P. K. (2006). "Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp." Journal of food engineering 77: 486–491.

Singh P., Gill P. K. (2006). "Production of Inulinases: Recent advances". Food technology and biotechnology. 44: 151–162.

Singh R.S., Sooch B. S., Puri M. (2007). "Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1". Bioresource technology. 98: 2518–2525

Sirisansaneeyakul S., Worawuthiyanan N., Vanichsriratana W. (2007) "Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*". World journal of microbiology and biotechnology. 23: 543–552.

Skowronek M., Fiedurek J. (2006). "Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM". Food technology and biotechnology 44 (1): 53–58.

Smith J. E. 1993. *Aspergillus – biotechnology*, Plenum Press. Páginas 154 –156.

Soberón M. X., Montero M. G. 2007. Ingeniería de proteínas y evolución dirigida. En: Francisco G. Bolívar Zapata. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Páginas 195 – 218.

Souza-Motta C. M., Queiroz C. M., Figueiredo P. A. (2005). "*Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: New source for inulinase production". Brazilian archives of biology and technology. 48: 343 – 350.

Valenzuela – Zapata Ana G. El Agave tequilero. Cultivo e industria en México. Mundi Prensa México. México 2003. Páginas 36 – 38, 52, 143 – 149.

Vandamme E. J., Derycke D. G. (1983). "Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications". *Advances in applied microbiology*. 29: 139 – 176.

Vijayaraghavan K., Yamini D., Ambika V., Sowdamini N. S. (2009). "Trends in inulinase production – a review". *Critical reviews in biotechnology*. 29: 67–77.

Vuilleumier S. (1993). "Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose". *The american journal of clinical nutrition*. 58: 733S-736S.

Waleckx Etienne, Mateos-Diaz J. C., Gschaedler Anne, Monsan Pierre. (2011). "Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production". *Food chemistry* 124: 1533–1542.

Whitaker John. 2000. Enzimas. En: Fennema Owen. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, España. Páginas 513 – 631.

Williams M. A. J. , Kirk P. M. 1988. Introduction: Characteristics of industrial fungi, En: David Richard Berry. *Physiology of industrial fungi*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. Páginas 1 – 17.

Xiao R., Tanida M., Takao S. (1988). "Inulinase from *Chrysosporium pannorum*". *Journal of fermentation technology*. Vol. 66, No. 5: 553-558.

Yun J. W. (1996). "Fructooligosaccharides occurrence, preparation, and application". *Enzyme and microbial technology*. 19: 107-117.

Yun J. W., Kim D. H., Uhm T. B., Song S. K. (1997). "Production of high-content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase". *Biotechnology Letters*. 19: 935–938

Zhengyu J., Jing W., Bo J., Xueming X. (2005): “Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*”. Food research international. 38: 301–308.

Zhen-Ming Chi, Tong Zhang, Tian-Shu Cao. (2011). “Biotechnological potential of inulin for bioprocesses”. Bioresource technology. 102: 4295 – 4303.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
VOCAL:	Profesor:	MARTHA GILES GÓMEZ
SECRETARIO:	Profesor:	ABEL BLANCAS CABRERA
1er. SUPLENTE:	Profesor:	JORGE ARTURO ABURTO ANELL
2° SUPLENTE:	Profesor:	JESÚS VILLEGAS CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE BIOPROCESOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS, UNAM**

ASESOR:

SUPERVISOR TÉCNICO:

Ing. Abel Blancas Cabrera

Biól. Jesús Villegas Cruz

SUSTENTANTE:

Luis Javier Gutiérrez Hernández

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Ofelia y Ezequiel por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de toda la vida, con su impulso y confianza han hecho posible que termine este trabajo, gracias por todo lo que han hecho por mí.
- A mis hermanas Karla, Nancy y Brenda, con quienes he compartido la vida en familia, gracias por todo su cariño y amistad.
- A mis asesores el Ingeniero Abel Blancas y el Biólogo Jesús Villegas, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y ayudarme a tomar las mejores decisiones en el proyecto, además de la convivencia día a día en la cual me mostraron su gran calidad humana.
- A la Dra. Leticia Rocha por su sensibilidad y confianza además del impulso a mi trabajo.
- Al Dr. Carlos Huitrón por iniciar el trabajo que fue el origen de esta investigación y permitirme retomarlo.
- A la QFB Rosalba Pérez, por inculcarme la disciplina y el gusto por el trabajo en el laboratorio.
- A mis amigos en la facultad Karen, Azucena, Olga y José Luis y en el IIB a Isabel, Paulina, Gaby, Blanca, Leslie, Martha, Adalid, Lalo y Charly por estar siempre a mi lado y hacer mi estancia divertida y dinámica.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. GENERALIDADES	4
2.1 Inulina y fructooligosacáridos	4
2.1.1 Fructooligosacáridos	5
2.1.2 Los fructooligosacáridos como prebióticos	6
2.1.3 Jarabes de fructosa	7
2.2 Agaves	8
2.2.1 <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	10
2.2.2 Tequila	13
2.3 Enzimas y aplicaciones	14
2.3.1 Ventajas del uso de enzimas en procesos industriales	15
2.3.2 Inulinasas	16
2.3.3 Producción de inulinasas	17
2.3.4 Purificación de inulinasas	19
2.3.5 Sustratos para la producción de inulinasas	21
2.4 Producción de FOS	22
2.5 Miel de agave	23
2.6 Producción de etanol a partir de inulina	24
2.7 Hongos	26
2.7.1 El género <i>Aspergillus</i>	27
2.7.2 Morfología de los hongos en cultivo sumergido	28
2.7.3 Importancia económica de los hongos	29
3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	31

4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivos generales	32
4.2 Objetivos particulares	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Microorganismo utilizado	33
5.2 Reactivos	33
5.3 Medios de cultivo	33
5.4 Conservación y propagación de la cepa	34
5.5 Preparación del inóculo	35
5.6 Producción de inulinasas	35
5.7 Determinación de la actividad de inulinaasa	36
5.8 Purificación del filtrado enzimático del fermentador de 10 L	36
5.9 Hidrólisis de sustratos ricos en fructanos	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Producción de enzimas inulinasas a nivel fermentador 10 L, utilizando <i>Agave tequilana</i> como fuente de carbono	39
6.2 Aplicaciones de las enzimas obtenidas en las fermentaciones sumergidas con <i>A. niger</i> CH – A – 2010	41
6.3 Hidrólisis enzimática de penca de agave.....	42
6.4 Hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados con enzimas de <i>A. niger</i> CH – A – 2010	43
6.4.1 Hidrólisis de fructanos de agave nanofiltrados nanofiltrada con enzimas Sigma	43
6.5 Hidrólisis enzimática de fructanos de agave en polvo utilizando enzimas de <i>A. niger</i> CH – A – 2010	47

6.5.1 Hidrólisis enzimática de fructanos de agave en polvo utilizando enzimas Sigma	47
6.6 Hidrólisis de inulina comercial con enzimas de <i>A. niger</i> CH – A – 2010 y enzimas Sigma	50
6.7 Hidrólisis de jugo de agave al 20 % utilizando enzimas de <i>A. niger</i> CH – A – 2010	53
6.7.1 Hidrólisis de jugo de agave al 20 % utilizando enzimas Sigma	53
6.8 Hidrólisis de fructanos de agave en polvo y de inulina comercial Sigma, con enzimas de <i>A. niger</i> CH – A – 2010 y con enzimas comerciales Sigma	56
7. CONCLUSIONES	59
8. PERSPECTIVAS	61
9. BIBLIOGRAFÍA	62