



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Obtención y caracterización de inulinasas a partir de *Kluyveromyces sp.* en la hidrólisis de agavina”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Jonathan Trapala Reyna

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Agustín López-Munguía Canales
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México 21 de Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco el financiamiento otorgado para este trabajo a

CONACyT proyecto CB-2011/167507

DGAPA proyecto PAPIIT IA-204415

Facultad de Química UNAM PAIP 5000-9153

Al CONACyT por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Aguascalientes, 2016.

Contenido

Índice de tablas	3
Índice de figuras	4
0.Resumen	6
1 Introducción	8
2. Marco teórico.....	10
2.1 Agave.....	10
2.2 Fructanos.....	13
2.3. Usos de los fructanos.....	14
2.4. Organismos productores de inulinasas	16
2.5. <i>Kluyveromyces</i>	18
2.6. Inulinasas	19
3 Hipótesis y objetivos	26
4 Materiales y métodos	27
4.1. Materiales	27
4.1.1. Material celular	27
4.1.2. Reactivos y kits	27
4.1.3. Equipos.....	28
4.10. Peso molecular de la enzima.....	33
4.11. Punto isoeléctrico.....	34
4.12. Tinción de Schiff (glicosilación)	35
4.13. Deglicosilación	35
4.14. Ensayos de estabilidad térmica.....	35
4.15. Caracterización enzimática.....	36
4.15.1. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática	36
4.15.2. Ensayos de especificidad por sustrato.....	36
4.15.3. Ensayos cinéticos	37
4.2. Identificación del microorganismo por la amplificación y secuenciación de la región ITS1	28
4.3. Purificación de DNA	30
4.4. Ensayos de crecimiento microbiano usando distintas fuentes de carbono.	30
4.5. Ensayo enzimático en el sobrenadante	31
4.6. Ensayos de azúcares reductores	31
4.7. Cromatografía en capa fina	31
4.8. Análisis de secuencias y propiedades teóricas de las inulinasas reportadas de <i>Kluyveromyces. marxianus</i>	32
4.9. Purificación de la inulinasa	32
5 Resultados y discusión	38
5.1. Identificación de la levadura ISO3 por medio de la amplificación de la región ITS	38

5.2. Ensayos de crecimiento microbiano de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 y producción de la inulinasa.....	39
5.3. Purificación de la inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3	42
5.3.1. Análisis de secuencias y propiedades teóricas de las inulinasas reportadas de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	42
5.3.2. Purificación de la inulinasa empleando cromatografía de intercambio aniónico	44
5.3.3. Purificación de la inulina usando cromatografía de exclusión molecular	47
5.3.4. Peso molecular de la enzima	50
5.3.4.1. Determinación de peso molecular por exclusión molecular	50
5.3.4.2. Determinación del peso molecular por dispersión dinámica de luz	52
5.3.5. Punto isoeléctrico.....	54
5.3.6. Determinación de las glicosilaciones en la inulinasa por medio de la tinción de Schiff y ensayos de deglicosilación.....	54
5.3.7. Ensayos de estabilidad térmica.....	56
5.3.8. Caracterización cinética de la inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3	58
5.3.8.1. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática	59
5.3.8.2. Ensayos cinéticos de la inulinasa.....	62
6 Conclusiones	69
7. Perspectivas	70
8 Bibliografía.....	71

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de Agaves en México y sus usos.	11
Tabla 2. Microorganismos productores de inulinasas.....	17
Tabla 3. Ejemplos de fructosilhidrolasas.....	19
Tabla 4. Reactivos que se emplearon para realizar la PCR	28
Tabla 5. Características fisicoquímicas de las inulinasas.	43
Tabla 6. Resultados del proceso de purificación de la inulinasa de <i>Kluyveromyces</i> . <i>marxianus</i> ISO3.....	48
Tabla 7. Volúmenes de elución y valor Ka de los estándares para la calibración de la columna superdex 200s 10/300.....	50
Tabla 8. Mejores condiciones de temperatura y pH para los sustratos empleados.....	63
Tabla 9. Parámetros cinéticos para la inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3.....	67

Índice de figuras

Figura 1. A. Inulina, B Levana C. Agavina presente en el <i>Agave tequilana weber</i> (tomado de (Mancilla-Margalli y López 2006).....	13
Figura 2. Estructura de una fructosilhidrolasa de la familia GH32 (Invertasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PDB 2AC1).....	20
Figura 3. Posible mecanismo de reacción propuesto por Nagen para las exo-inulinasas ..	21
Figura 4. Alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de invertasas e inulinasas presentes en plantas. Tomado de Van der Ende, 2007	22
Figura 5. Estructura de la endo-inulinasa de <i>Aspergillus ficcum</i> (3RWK) y la estructura de la exo-inulinasa de <i>Aspergillus awamori</i> (1y4W) respectivamente.	23
Figura 6. DO a 600 nm después de 24 horas de crecimiento en medio con y sin inulina de agave de ocho microorganismos distintos tomado de Robert 2013.....	24
Figura 7. Gel de electroforesis de DNA de la muestra del microorganismo ISO3 amplificada por PCR de la región ITS. El gel de agarosa al 1 % se corrió a 100 V durante una hora en buffer TAE.....	37
Figura 8. Resultados del alineamiento de la amplificación de la región ITS	38
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (ISO3) en distintas fuentes de carbono 1%(m/v) (agavina, sacarosa, FOS, fructosa, glucosa), a 30°C y 120 rpm.	39
Figura 10. Actividad enzimática de los diferentes medios de cultivo. La reacción se llevó a cabo usando 1% de agavina, a 50°C, pH 5.5, 300 rpm, durante 10 minutos de reacción en un volumen total de 1 mL	40
Figura 11. Motivos de las inulinasas de distintas cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> presentes en el NCBI. Las cepas fueron <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC12424 (Laloux, y otros 1991), YS-1 (Singh, Dhaliwal y Puri 2007), NBRC 1777 (Hai-Xiang, y otros 2014), DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul, y otros 2011).	42
Figura 12. Cromatograma del intercambio iónico después de aplicar un gradiente lineal salino que llegó a una concentración máxima de 1M a un flujo de 1 mL/min	44
Figura 13 Cromatograma del gradiente lineal a una concentración de 0.2 M de NaCl usando la columna DEAE FF de 24 mL a un flujo de 0.5 mL/min.....	45
Figura 14. Cromatograma del gradiente segmentado a una concentración de 0.14 M de NaCl usando la columna DEAE FF de 24 mL a un flujo de 0.5 mL/min	45
Figura 15. Cromatograma del paso de exclusión molecular en la columna Superdex 200 usando buffer de fosfato con una concentración de 0.05 M pH 7.2 + 0.5 M de NaCl a un flujo de 0.5 mL/min.....	46
Figura 16. Cromatografía en capa fina de las reacciones enzimáticas de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación. Siendo B el blanco de reacción, M el sobrenadante del medio, C el concentrado por ultrafiltración, I la muestra por intercambio iónico y A* B* y C* las fracciones obtenidas en la exclusión molecular	47
Figura 17. Gel de acrilamida al 10% SDS-PAGE del proceso de purificación corrido a 100 V durante una hora. En el carril A se encuentra el marcador de peso molecular, carril B sobrenadante, carril C muestra concentrada por ultrafiltración, carril D muestra de intercambio iónico y carril E exclusión molecular	47

Figura 18. Calibración de la columna de exclusión molecular.	51
Figura 19. Cromatograma obtenido de la exclusión molecular de la inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> de volumen de elución de 12.71 mL y un peso aproximado de 256 kDa.....	52
Figura 20. Diámetro hidrodinámico de la inulinasa medido a 25 °C en buffer de fosfatos 50 mM y pH 7.2.	52
Figura 21. Gel de 2 dimensiones realizado para la inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . El gel se corrió por una hora a 120 V usando condiciones no reductoras	53
Figura 22. Ensayos de desglicosilación y tinción de Schiff, donde A marcador de peso molecular, B es el control positivo, C es la enzima desglicosilada (condiciones desnaturalizantes), D enzima sin desglicosilar y E enzima parcialmente desglicosilada (condiciones nativas)	55
Figura 23. Diámetros hidrodinámicos de la inulinasa a diferentes temperaturas medidos en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2.....	56
Figura 24. Actividad enzimática residual a diferentes temperaturas usando como sustrato a la agavina en buffer de fosfatos 50 mM pH 5.5.....	57
Figura 25. Curso temporal de la reacción de hidrólisis de la agavina a 50°C y pH 5.5.....	58
Figura 26. Actividad enzimática a diferentes temperaturas usando agavina como sustrato.	59
Figura 27. Actividad enzimática a diferentes valores de pH.	59
Figura 28. Actividad enzimática de 4 diferentes sustratos a pH 5.5 y temperatura de reacción de 50°C.....	60
Figura 29 Actividad de la inulinasa a diferentes temperaturas y pHs usando como sustrato inulina de chicoria.	62
Figura 30. Actividad de la enzima a diferentes temperaturas y pHs usando como sustrato sacarosa.....	63
Figura 31. Cinética tipo Michaelis-Menten de la inulina de chicoria a pH 4.5 y temperatura de 50°C.	64
Figura 32. Cinética tipo Michaelis-Menten de la inulina de agave a un pH de 5.5 y una temperatura de 50°C.....	65
Figura 33. Cinética tipo Michaelis-Menten de la sacarosa a un pH de 4.5 y una temperatura de 60°C.....	66

RESUMEN

México cuenta con una gran variedad de agaves que crecen a lo largo de todo el país. Esta planta ha sido aprovechada por la industria ya que a partir de ella se pueden producir bebidas alcohólicas. La inulina producida por las plantas de agave también puede ser usada como sustrato para el crecimiento de distintos microorganismos que producen inulinasas. Estas enzimas han tomado gran importancia en la industria alimenticia debido a que pueden ser empleadas en la obtención de productos de alto valor.

En este trabajo se realizaron ensayos de crecimiento con *Kluyveromyces marxianus* ISO3 y su producción de inulinasas. Se observó un mejor crecimiento en glucosa y una mayor producción de enzima con inulina de agave .

Posteriormente se llevó a cabo la purificación de la inulinasa extracelular producida por la levadura. Se emplearon dos métodos de cromatografía; intercambio iónico y exclusión molecular. El proceso de purificación se siguió por electroforesis SDS-PAGE. Por medio de dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión molecular se observó que la enzima es un dímero con un peso molecular de 256 kDa.

La enzima se caracterizó, encontrando que su punto isoeléctrico es de 4.6, que aproximadamente el 28% de su masa está compuesta por manosa. Se observó que el producto de reacción enzimática de la agavina es fructosa.

Se llevó a cabo la caracterización cinética usando diferentes sustratos: inulina de achicoria, agavina y sacarosa, observándose que la inulina lineal (chicoria) es el mejor sustrato para la enzima.

1.INTRODUCCIÓN.

El agave también conocido en México como planta del maguey, ha representado una fuente importante de fibra, medicinas tradicionales y principalmente materia prima para elaborar bebidas alcohólicas. Debido a esto, en el país se cultivan una gran cantidad de agaves de diferentes tipos siendo el *Agave tequilana* la especie que más se produce ya que a partir de esta se obtiene el tequila que tiene denominación de origen.

Esta denominación de origen sólo permite obtener la bebida a partir de la especie *Agave tequilana* weber, dejando a los productores de otros agaves sin la posibilidad de obtener tequila a partir de estos. Esto ha generado que los agaves que no puedan ser usados para la producción de esta bebida alcohólica sean destinados a la obtención de fibra dietética como la inulina, también conocida como agavina (Lopez, Mancilla-Margalli y Mendoza-Diaz 2003).

La inulina de agave o agavina es un polímero compuesto de fructosa y glucosa, se le considera un fructano mixto ya que presenta enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre las moléculas de fructosa y además presenta moléculas internas de glucosa. Estas características de composición y tipo de enlace hacen que las inulinasas comerciales como la mezcla Novozyme 960, no logren hidrolizar a este polisacárido. Una alternativa a esto ha sido la búsqueda y obtención de enzimas que degraden a la agavina. Se ha reportado que las levaduras *Kluyveromyces sp.* producen inulinasas que hidrolizan este sustrato (Arrizon, y otros 2011).

Existen dos clases de inulinasas, las exo- y las endoinulinasas. El primer tipo genera como producto fructosa ya que hidroliza los extremos de la inulina, mientras que las segundas hidrolizan al interior del sustrato generando como producto fructooligosacáridos de cadenas cortas que pueden ir de 3 hasta 8 unidades de fructosa (Van der Ende, y otros 2009).

Los fructooligosacáridos (FOS) presentan hoy en día un gran interés, ya que se ha demostrado que pueden funcionar como prebióticos para bacterias gastrointestinales como los lactobacillus y bifidobacterias (Patel y Goyal 2011).

También la generación de jarabes de alta fructosa a partir de fructanos es aplicado actualmente para llevar a cabo fermentaciones para la producción de bioetanol entre otras sustancias. La obtención de estos compuestos de alto valor agregado por vía enzimática surge como una opción viable usando como sustrato la agavina.

En el presente trabajo se planteó aislar, purificar y caracterizar bioquímica y cinéticamente a las posibles inulinasas obtenidas a partir de una cepa de *Kluyveromyces* sp aislada de los residuos de agaves. También se evaluó mediante técnicas cromatográficas los patrones de hidrólisis de la o las enzimas obtenidas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. AGAVE

Los agaves son considerados según su ciclo de crecimiento y floración como plantas perenes, es decir que su crecimiento puede variar entre uno o varios años según su tipo. Estas plantas por lo general tienen hojas duras que contienen una espina terminal, sus tallos son pequeños y sirven de base para las hojas que emergen (Irish y Irish 2000).

El agave pertenece a la familia de las Agavaceae y comprende cerca de 166 especies, estas crecen naturalmente en el norte y centro del continente Americano, algunas de estas especies se han adaptado a países en África y Asia donde es usado como fuente de alimento, fibra y planta ornamental (Almaraz-Abarca, y otros 2013).

México es el centro de origen del agave, cerca de 125 especies crecen desde el sur del país en estados como Yucatán, Oaxaca o Chiapas, pasando por el centro de la república en estados como Jalisco, Querétaro, Estado de México hasta el norte en regiones como Sonora o Durango. También se ha visto que se ve favorecido su crecimiento en climas áridos y semiáridos; debido a esto México cuenta con una gran riqueza de agaves (Tabla 1). Las distintas variedades de agave tienen diferentes características y propiedades; algunos, por ejemplo, son mejores productores de fibra, otras de savia o bien pueden crecer mejor en condiciones más severas de clima. Se ha propuesto que el origen de la diversidad botánica de estas especies es el resultado de una selección humana antigua, con la finalidad de mejorar algunas cualidades lo que favoreció la diversidad y la especialización (Parsons y Darling 2000).

Estas plantas representan un gran interés comercial ya que son la materia prima de un gran número de industrias, siendo la principal la producción de bebidas alcohólicas, como el tequila y el mezcal (Díaz-Montaño 2013). Además de estas industrias se han desarrollado propuestas muy interesantes para el aprovechamiento de esta planta en industrias como la alimenticia, farmacéutica, textil y bioenergética entre otras (Nava-Cruz, y otros 2015). A nivel industrial la planta se divide en dos partes principalmente, la primera parte son las hojas en donde es posible extraer grandes cantidades de fibra. La segunda es la piña que generalmente se somete a cocción para posteriormente extraer

un jugo que tiene una gran cantidad de carbohidratos que pueden ser usados en la fermentación.

Tabla 1. Tipos de Agaves en México y sus usos.

Espece de agave	Estado donde se produce	Uso	Característica principal
<i>Agave tequilana Weber</i>	Jalisco, regiones del estado de Nayarit, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato	Producción de tequila	Alto contenido de azúcar
<i>Agave rhodacantha Trel.</i> <i>Agave shrevei Gentry</i> <i>Agave wocomahi Gentry</i> <i>Agave durangensis</i>	Oaxaca, San Luis Potosí, Durango, Jalisco	Producción del mezcal	Alto contenido de azúcar
<i>Agave angustifolia</i>	Sonora	Industria Bacanora	Alto contenido de azúcar
<i>Agave atrovirens</i> <i>Agave lehmannii</i> <i>Agave cochelaris</i>	Tlaxcala, Distrito Federal, Querétaro, Puebla, Morelos, San Luis Potosí	Industria del pulque	Alto contenido de azúcar
<i>Agave angustifolia</i> <i>Agave inaequidens</i> <i>Agave maximiliana</i>	Jalisco	Industria de la raicilla	
<i>Agave lechuguilla</i> <i>Agave striata</i> <i>Agave sisalana</i>	Yucatán	Industria de la fibra	Fibra de las hojas

En México la Secretaria de Agricultura reportó en 2009 que los estados de la república que más produjeron agave fueron Jalisco con 660,000 toneladas seguido por Oaxaca con 306,000 toneladas y Nayarit con 118,000 toneladas. Además de lo producido en el país se ha reportado el crecimiento del agave con fines ornamentales en países de

África como Kenia y Tanzania, también en el norte de Estados Unidos de América y muy recientemente en algunas regiones de Australia (Davis, Dohleman y Long 2011).

Debido a la composición química del lugar donde se desarrollan, se cultivan agaves que son ricos en carbohidratos y algunos compuestos que son fermentables y que le dan a las bebidas su sabor particular. Los carbohidratos que componen al agave en su mayoría son fructanos, que son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos durante el proceso de fermentación (Mancilla-Margalli y López 2006).

Se ha reportado que existen diferencias interesantes en la estructura de los fructanos según el origen de la agavácea. Estas diferencias en la producción de fructanos se ve influenciada por factores como: la región en la que crece la planta, los nutrientes del lugar, los cambios de clima, la estación del año o la cantidad de agua. El *Agave americana* por ejemplo tiene fructanos lineales mayoritariamente (Nandra y Bhatia 1979), mientras que el *Agave veracruz* y el *Agave tequilana* son de otro tipo ya que contienen una mayor cantidad de ramificaciones β -(2-6) que el *Agave americana* (Dorland, y otros 1977) (Lopez, Mancilla-Margalli y Mendoza-Diaz 2003).

La industria tequilera contribuye al desarrollo de la agricultura y la industria en México, especialmente en el estado de Jalisco. En los últimos años, el consumo y producción de tequila se ha incrementado notablemente por ejemplo en 2012 se produjeron 880,000 toneladas de agave y para 2016 se cosecharon 941,800 toneladas (CRT 1993). Esto genera una gran cantidad de residuos como el bagazo y las hojas del agave que no son necesarias en la producción de la bebida destilada y que presentan cantidades bajas de fructanos que son considerables al ver el tamaño de la producción de agave.

Otro punto importante es la utilización de los agaves que debido a la denominación de origen del tequila, el mezcal o la bacanora no pueden ser empleados en la elaboración de estas bebidas. Esto ha generado que los productores planteen otras opciones que puedan ser viables para aprovechar estas Agaváceas. Una oportunidad para usar estas plantas en la obtención de compuestos de alto valor agregado como son los Fructooligosacáridos (FOS) y jarabes de alta fructosa que se podrían obtener de la hidrólisis de los fructanos presentes en la planta, estos temas serán retomados en este trabajo más adelante.

2.2. FRUCTANOS.

En las plantas del 12 al 15% de los carbohidratos presentes son fructanos, estos son polímeros que se encuentran formados por unidades β -fructofuranosil principalmente y en menor concentración unidades de glucosa. Estos polímeros comúnmente son solubles en agua y son sintetizados a partir de sacarosa que se acumula en vacuolas para ser usados como agentes contra la desecación (Vijin y Smeekens 1999).

De acuerdo al tipo de unión de las unidades de fructosa se han identificado cinco tipos de fructanos: 1. Inulina que presenta enlaces β -(2,1) en las unidades fructofuranosas 2. Levana cuando los enlaces predominantes son β -(2,6), 3. Las neoseries de inulina que tienen algunas ramificaciones β -(2,6) y además tienen una molécula de glucosa entre las unidades de fructosa, 4. Las neoseries de levana son un caso similar pero en este caso las ramificaciones son β -(2,1).

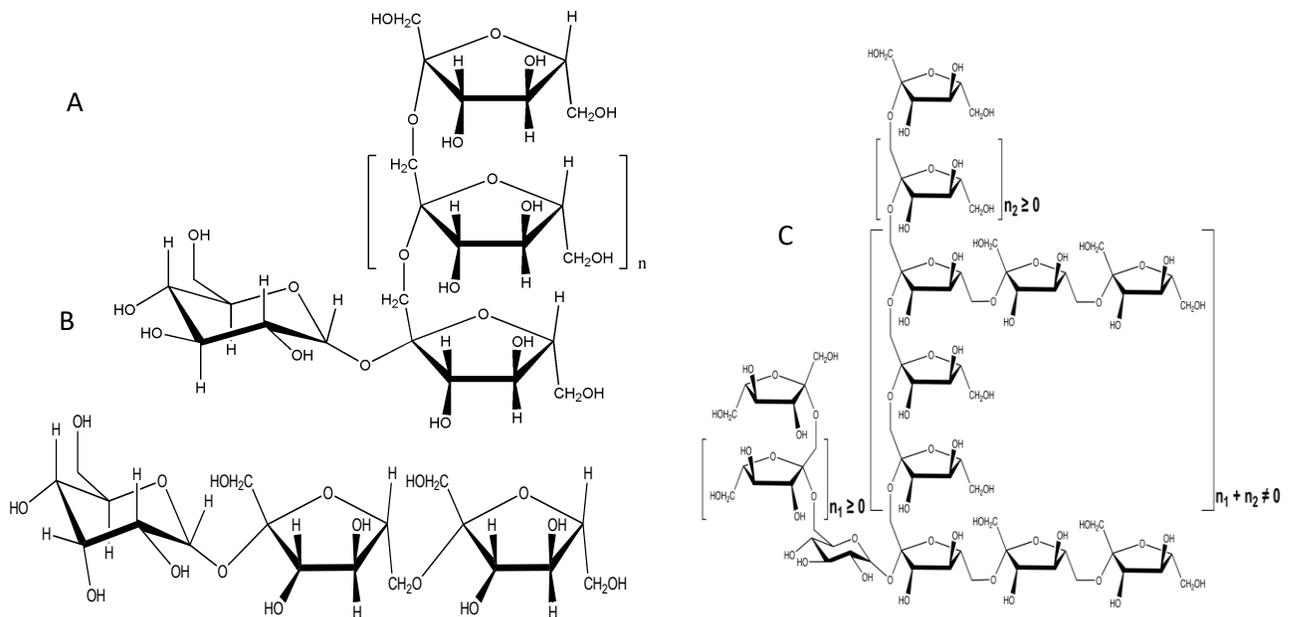


Figura 1. A. Inulina, B Levana C. Agavina presente en el *Agave tequilana weber* (tomado de (Mancilla-Margalli y López 2006)

5. Las gramíneas que son otro tipo de fructanos que se componen por una unidad de sacarosa con ramificaciones de fructosa con enlaces β -(2,1) y β -(2,6) y moléculas de glucosa en los extremos (Mancilla-Margalli y López 2006).

Sin embargo, se ha encontrado que los fructanos presentes en el *Agave tequilana* weber que contienen uniones β -(2,1) y β -(2,6) con unidades internas y externas de glucosa, a este nuevo fructano se le ha denominado agavina (Figura 1).

Generalmente la inulina que se usa como materia prima comercial es obtenida de la raíz de achicoria o de la alcachofa ya que son moléculas lineales con enlaces β -(2-1). Este polímero de fructosa se obtiene de estas plantas a partir de un proceso, primero de trituración y posteriormente se adiciona agua caliente para llevar a cabo la extracción de la inulina de la planta. Una vez obtenido este líquido rico en carbohidratos se agrega etanol para ir precipitando los distintos carbohidratos presentes en ellos. Ya que se obtiene el precipitado se retira el disolvente restante quedando un polvo blanco (Arango, Cuaran y Fajardo 2008). Los principales países productores de inulina en el mundo son Bélgica, Países Bajos y Chile con cerca del 93 por ciento del mercado a nivel mundial (Traub 2014). Estos países son los principales exportadores de esta sustancia y México es uno de los tantos países que importan este producto. Sin embargo, una opción para producir inulina dentro del país es el empleo de las distintas agaváceas que crecen en el territorio nacional (Leyva-Porras, y otros 2014). A partir de la inulina se pueden obtener diferentes compuestos de alto valor agregado como los fructooligosacaridos o jarabes de alta fructosa. Los fructanos son de gran interés para diversas industrias como la alimentaria y la farmacéutica ya que se ha visto que su consumo está asociado a beneficios a la salud.

2.3. USOS DE LOS FRUCTANOS

Existen diferentes fructanos en la naturaleza que van desde dos unidades, como la kestosa, hasta veinte unidades de fructosa y polímeros de gran tamaño como el levano o la inulina que pueden llegar a tener hasta 200 unidades de fructosa. Algunos fructanos se han asociado a una serie de funciones en pro de la salud, dentro de las cuales destacan su efecto benéfico como prebiótico cuando son consumidos en forma de oligosacáridos y en el aumento de la capacidad de captación de minerales cuando se ingiere como inulina o levano (Tuohy, Rouzaud, Bruck, & Gibson, 2005).

Los prebióticos son componentes alimentarios no digeribles que benefician a la salud del huésped por estimulación selectiva del crecimiento y actividad de bacterias en el

colon, anulando el crecimiento de bacterias patógenas como *Bacteroides fragilis* o *Clostridium perfringens* (Gómez y Acero 2011). Durante el proceso de fermentación de ciertos fructooligosacáridos se forman ácidos grasos de cadena corta que estimulan el crecimiento de células de la mucosa colono rectal (Ulloa, y otros 2010)

Los fructooligosacáridos son carbohidratos de bajo peso molecular, no digeribles y que contienen un bajo grado de polimerización que se encuentra entre 3 a 10 unidades de fructosa. Estos compuestos al igual que otros oligosacáridos son de gran importancia en distintas industrias ya que son usados como suplementos prebióticos, inmuno estimuladores o excipientes en la industria farmacéutica (Patel y Goyal 2011).

Hoy en día estos compuestos se obtienen a partir de procesos de hidrólisis química que son poco eficientes e inespecíficos en el tamaño de los fructooligosacáridos (FOS) partiendo de fuentes como la achicoria o la alcachofa. En este proceso se calienta la inulina en una solución de ácido clorhídrico o sulfúrico, después se neutraliza con una solución de bicarbonato de sodio. Una vez neutralizada se lleva a cabo una precipitación fraccionada con etanol, de esta forma se obtienen los fructooligosacáridos. Este proceso es el más común para la obtención de estos compuestos ya que es barato, aunque tiene las desventajas de ser poco específico ya que no se logra controlar el tamaño de los FOS y además se generan compuestos coloridos no deseables debido a la reacción de Maillard. Debido a estos problemas se han hecho avances tecnológicos para obtener estos compuestos de alto valor agregado a partir del empleo de enzimas (Pandey, Naik y Vakil 2015).

Una alternativa de producción es por vía enzimática que resulta más costosa que la vía química pero que requiere de condiciones más suaves de reacción y que además son amigables con el medio ambiente por el tipo de residuos que genera. Las enzimas que logran hidrolizar el enlace β 2-1 de los fructanos se les denomina inulinasas. A partir del uso de estas enzimas se podría obtener FOS o jarabes de alta fructosa que son de gran interés por la industria alimentaria. Estas enzimas son capaces de usar como sustrato algunas fuentes como residuos agroindustriales o plantas como las agaváceas que son ricas en fructanos y que pueden ser una alternativa en México como materia prima. En la literatura se tienen pocos reportes sobre organismos que sean capaces de degradar a los fructanos presentes en el agave, por lo que se requiere encontrar y estudiar

aquellos microorganismos que sean capaces de realizar esta función (Arrizon, y otros 2011).

2.4. ORGANISMOS PRODUCTORES DE INULINASAS

Las inulinasas son enzimas capaces de hidrolizar el enlace β -(2,1) que se encuentra en la inulina. En la naturaleza existen diferentes organismos productores de inulinasas como las plantas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Se ha observado que las plantas productoras de inulina como la achicoria, el agave y la alcachofa son capaces de producir enzimas que degradan el polímero de fructosa. En particular se ha logrado aislar e identificar una inulinasa de la raíz de achicoria de un peso molecular cercano a los 70 KDa (Claessens, Van Laere y De Proft 1990). Estas enzimas obtenidas de las plantas a pesar de poder usar como sustrato inulina tienen la desventaja de no ser tan eficientes como las de origen microbiano (Kochhar, Gupta y Kaur 1999).

Por otro lado, las enzimas aisladas de fuentes microbianas tienen una gran relevancia debido a que presentan la mayor eficiencia catalítica y tienen la capacidad de trabajar a temperaturas mayores a los 50°C por lo que podrían ser aplicables a la industria.

Los microorganismos que producen estas enzimas son bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Tabla 2.). Las bacterias como el *Staphylococcus* sp son capaces de crecer en cereales con bajas cantidades de inulina como el salvado de trigo que puede presentar del 1% al 3% m/m. Por otro lado las bacterias gram negativas como las *Xanthomonas* sp son capaces de usar como sustrato la inulina presente en la cebolla que puede estar presente entre el 2% al 6% m/m (Chi, y otros 2009).

Los organismos con mayor interés para la producción de inulinasas son los hongos filamentosos y las levaduras, ya que se ha observado que estas enzimas poseen características deseables para ser usados en procesos industriales como son la resistencia a altas temperaturas además de su eficiencia catalítica. Los hongos filamentosos como el *Aspergillus ficcum* se ha estudiado a detalle ya que es capaz de producir enzimas que degradan a la inulina y producen fructooligosacáridos. Otros hongos como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* o *Penicillium* sp son capaces de producir inulinasas que hidrolizan la inulina a fructosa. Estos hongos se han estudiado usando diferentes medios para hacerlos producir la enzima que van desde el uso de

residuos agroindustriales como residuos de ajo, achicoria o alcachofa hasta la modificación de las fuentes de nitrógeno y sales. (Treichel, y otros 2011).

Tabla 2 Microorganismos productores de inulinasas

Microorganismo	Fuente de carbono en el que se creció el microorganismo	Actividad enzimática	Referencia
Bacterias			
<i>Staphylococcus sp.</i>	Salvado de trigo	53.82 U/mL	(Selvakumar y Pandey 1991)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Cebolla	11.7 U/mL	(Chi, y otros 2009)
Hongos filamentosos			
<i>Aspergillus niger</i>	Inulina de achicoria	55 U/mL	(Kango, 2008)
<i>Penicillium sp</i>	Inulina de achicoria	9.9 U/mL	(Nakamura, y otros 1997)
Levaduras			
<i>Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	Bagazo de caña	39.19 U/mL	(Mazutti, y otros 2006)
<i>Pichia guilliermondii</i>	Inulina de achicoria	60 U/mL	(Gong, y otros 2007)
<i>Cryptococcus aureus G7</i>	Inulina de achicoria	85 U/mL	(Sheng, y otros 2007)

Las levaduras por su parte son capaces de producir enzimas que trabajan a temperaturas altas que van desde 35°C hasta 60°C, degradan inulinas más complejas como la agavina y además son secretadas al medio por lo cual se purificación resulta más sencilla. Se ha reportado algunas características bioquímicas de las enzimas provenientes de levaduras como el peso molecular pH de trabajo y temperatura óptima. Por ejemplo la inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* tiene un peso promedio de 250 kDa y un pH óptimo entre 4.5 y 6 (Treichel, y otros 2011) .

Las levaduras y en particular las *Kluyveromyces* sp. han presentado buenos rendimientos en la producción de inulinasas. Estos microorganismos además tienen la ventaja de ser reconocidos como seguros ya que cuentan con la denominación GRAS de la FDA (Lane y Morrissey 2010).

Las inulinasas pueden ser usadas en una gran cantidad de aplicaciones industriales como por ejemplo; obtención de jarabes de alta fructosa, producción de bioetanol, y producción de FOS entre otras aplicaciones.

2.5. *Kluyveromyces* sp

Las levaduras en particular las del género *Kluyveromyces* tienen un enorme potencial biotecnológico ya que tienen aplicaciones en múltiples industrias como la de alimentos, farmacéutica entre otras. La cepa *Kluyveromyces marxianus*, en especial, tiene un gran número de características que son ideales para la industria ya que tiene un crecimiento rápido, amplio espectro de sustratos que pueden ser usados para que este microorganismo crezca. Además de estas características, es termotolerante, se le considera GRAS (Generally Regarded as Safe) y es capaz de secretar enzimas (Gombert, y otros 2016). Una de las ventajas más importantes es el buen crecimiento en medio cuya fuente de carbono es xilosa, galactosa o inulina. Estos sustratos pueden provenir de residuos agroindustriales que pueden ser aprovechados para la obtención de compuestos de interés a la industria (Graciano-Fonseca y Heinzle 2008). En la literatura se ha reportado que este microorganismo es capaz de producir compuestos de alto valor comercial como son feniletanol, fenilalanina, ácido hexanoico, xilitol o enzimas de alto interés industrial como las inulinasas. *Kluyveromyces marxianus* es una levadura aerobia que se ha encontrado en la fermentación del agave mezcalero. Esta especie ha demostrado tener una buena capacidad de producción de inulinasas. Estas enzimas se cree que están asociadas a la pared celular y que además pueden ser secretadas al medio de cultivo por lo que se ha generado gran interés (Rouwenhorst, y otros 1988).

2.6. INULINASAS

Todos los fructanos y la sacarosa pueden ser hidrolizados por distintas enzimas hidrolíticas denominados fructosilhidrolasas entre las cuales se encuentran la kestosa

hidrolasa, las invertasas de pared celular, las invertasas de vacuola, las inulinasas y las levasas (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplos de fructosilhidrolasas

Nombre de la proteína	Organismo	Sustrato	Referencia
Invertasa de pared celular	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sacarosa	(Hothorn, y otros 2010)
Fructan 1-exohidrolasa	<i>Cichorium intybus</i>	Inulina	(Claessens, Van Laere y De Proft 1990)
Exo-inulinasa	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Inulina	(Cruz-Guerrero, y otros 1995)
Exo-levanasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	levana	(Feng, y otros 2015)
Invertasa vacuolar	<i>Agave tequila</i>	sacarosa	(Cortés-Romero, y otros 2012)

Este grupo de enzimas en su mayoría pertenecen a la familia denominada GH32 y algunos casos particulares pertenecen a la familia GH38. Estudios recientes han encontrado que la estructura tridimensional de estas enzimas está organizada principalmente por dos dominios. El primer dominio se encuentra en el extremo amino terminal y está constituido por cinco hojas beta que forman un β propela que está presente tanto en la familia GH32 como la GH38. El segundo dominio se le denomina β -sandwich, se encuentra en el extremo carboxilo terminal y está formado por dos hojas beta que solo se encuentra en la familia GH32 (Cimini, y otros 2016)(Figura 2).

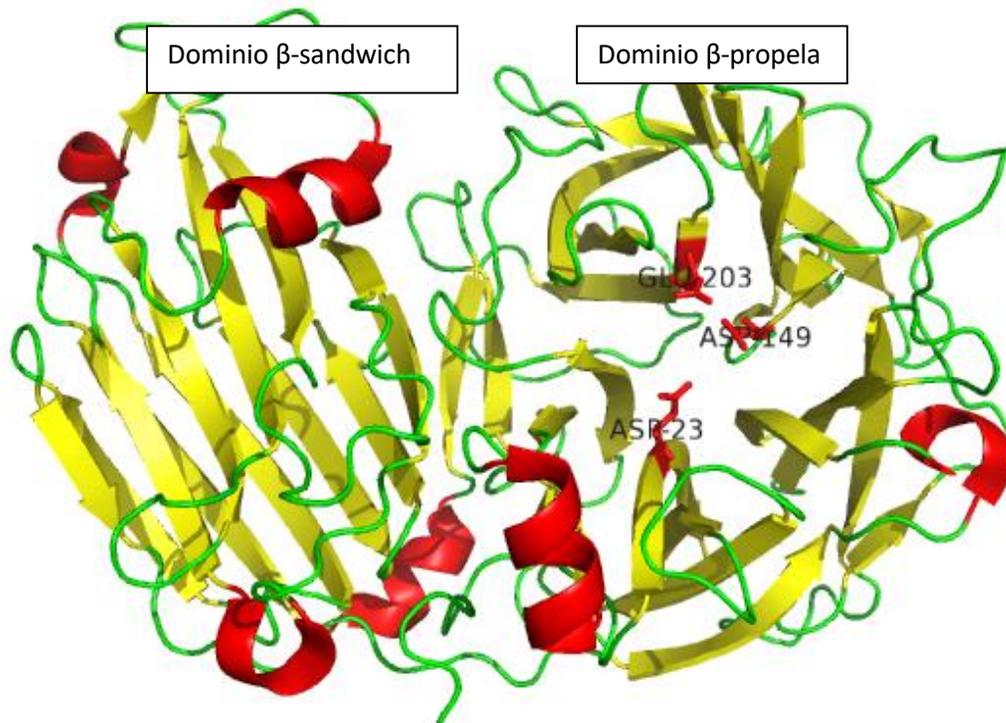


Figura 2. Estructura de una fructosilhidrolasa de la familia GH32 (Invertasa de *Arabidopsis thaliana* (PDB 2AC1).

El sitio activo de estas proteínas se encuentra en el dominio β propela y en él están tres motivos conservados que son característicos. El primer motivo conservado es WMNDPNG, en este se encuentra un residuo de ácido aspártico que tiene la función de nucleófilo en la reacción de hidrólisis. El segundo motivo está compuesto por tres residuos que son RDP, este motivo tiene a la mitad del mismo un ácido aspártico que tiene la función de estabilizar el estado de transición durante la reacción. Por último se tiene un tercer motivo constituido solo por dos residuos que son EC. En él, el ácido glutámico juega un rol muy importante en la catálisis ya que es el encargado de donar protones (Figura 3) (Van der Ende, y otros 2009).

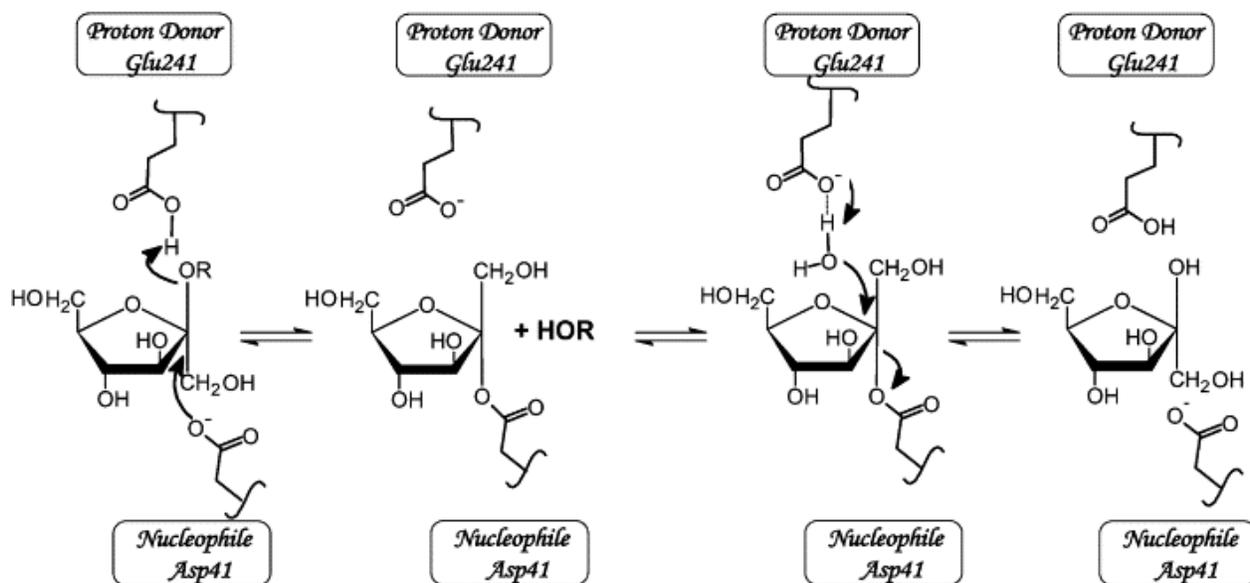


Figura 3. Posible mecanismo de reacción propuesto por Nagen para las exo-inulinasas

Dentro de esta familia de proteínas se ha generado la incertidumbre de cuál es la diferencia entre una fructanhidrolasa como las levasas o las inulinasas y las invertasas ya que cualquiera de estas enzimas es capaz de hidrolizar tanto a la sacarosa como a los fructanos, pero en diferente proporción. Se ha reportado que en algunas fructosilhidrolasas extraídas de plantas hay cambios sutiles alrededor del sitio catalítico que aumenta o disminuye la afinidad del sustrato a hidrolizar. Verrhaest y colaboradores en 2007 usaron como modelo una invertasa y una fructanhidrolasa, ambas enzimas son capaces de llevar a cabo la hidrolisis de sacarosa pero en particular la fructanhidrolasa tiene una baja actividad a hidrolizar este carbohidrato comparado con la invertasa. Los autores diferenciaron a estas dos enzimas mediante los alineamientos múltiples de distintas secuencias de invertasas y fructanhidrolasas. Encontraron que existen cinco regiones conservadas, una de estas regiones se encuentra muy cercana al sitio de catálisis el cual difiere entre ambos tipos de enzimas. También observaron una delección de los últimos dos residuos en las fructosilhidrolasas, mientras que las invertasas se encuentra un residuo de lisina que es un fuerte formador de puentes de hidrogeno (Figura .4). Además de esto demostraron que la presencia de un residuo de serina o de glicina antes del primer motivo catalítico en las fructanhidrolasas aumenta el grado de inhibición a la sacarosa, mientras que las invertasas en esa misma posición se encuentra un residuo de isoleucina (Verhaest , y otros 2007).

A		↓ ↓
6-FEH <i>Arabidopsis.thaliana</i> *		HVLKVS L IET L HDYYTIGSYDREKDVY
6-FEH <i>Beta vulgaris</i> *		HVLKLS L FDT Q YEYYTIGRYDIEKDIY
1-FEHI <i>Cichorium intybus</i> *		HVLKVS F NS--REYYVIGTYDPIKDKF
1-FEHIa <i>Cichorium intybus</i> *		HVMKAG F EG--HDWYTIGTYS PDRENF
1-FEHIb <i>Cichorium intybus</i> *		HVMKAG F EG--HDWYTIGTYS PDRENF
1-FEH <i>Campanula.rapunculoides</i> *		HVVK V GFNG--IDWYTIGTLS-ERDNY
6&1-FEH <i>Arabidopsis thaliana</i> *		HVLKAS F GG--NDCYVIGKYSSETEDF
1-FEHw1 <i>Triticum aestivum</i> *		HALKMS V DS--VDKYMIGVYDLQRDAF
1-FEHw2 <i>Triticum aestivum</i> *		HALKMS V DS--VDKYMIGVYDLQRDAF
6&1-FEH <i>Triticum aestivum</i> *		HVLKMS I NS--CDMYIVGVYDLKRDEF
1-FEH <i>Hordeum vulgare</i>		HALKMS V DS--VDKYMIGVYDLQRDAF
6-KEHw1 <i>Triticum aestivum</i> *		HVLKMG M NF- G EDVYVIGVYDLKRDAF
6-KEHw2 <i>Triticum aestivum</i> *		HVLKMG L NF- G EDVYVIGVYDLKRDAF
1-FEH <i>Lolium perenne</i> *		HVLKMS L DS--CDKYMIGVYDLKSDTF
6-FEH <i>Triticum aestivum</i> *		HVLKLS V MNT T QDYAVVGRYDDVADTF
B		239 242
CWINV1 <i>Arabidopsis.thaliana</i> *		HVLK I SLDD T KHDYYTIGTYDRVKDKF
CWINV1 <i>Solanum tuberosum</i>		HVLKVS F DVTRFDHYTIGTYDTKKDKY
CWINV <i>Nicotiana tabacum</i> *		HVLKVS L DVTRFEYYTVGTYDTRKDRY
CWINV2 <i>Solanum tuberosum</i>		HVLKNS M DLTRFEYYTLGKYDTKKDRY
CWINV3 <i>Solanum tuberosum</i>		HVLKNS L DVNRFEYYTIGMYDTKKDRY
CWINV5 <i>Lycopersicon esculentum</i> *		I V LKNS L DVARFDYYTIGMYHTKIDRY
CWINV <i>Vicia faba</i>		HVLKNS L DITRYEYYTIGYYLQNQDKY
CWINV <i>Pisum sativum</i>		HVLKVS L DD T KHDHYLIGSYDVVKDVF
CWINV2 <i>Vicia faba</i>		HVLKVS L DD K KHDYYLIGSYDEEKDRF
CWINV <i>Chenopodium rubrum</i> *		HVLKVS L DVSKHDVYTIGGYDTKKDAY
CWINV2 <i>Arabidopsis thaliana</i>		HVLKVS L DLTRYEYYTLGTYDTKKDRY
CWINV4 <i>Arabidopsis thaliana</i>		HVLKVS L DITRYEYYTLGKYDLKKDRY
CWINV1 <i>Daucus carota</i> *		HVLKVS L DLTRYEYYTVGTYLTDKDRY
CWINV <i>Oryza sativa</i>		Y V LKNS L DLTRYDYYTVGIYNKVERTY
CWINV <i>Triticum.aestivum</i>		Y V LKVS L DVTRYEYYTIGWYDHAKDRY
CWINV1 <i>Zea mays</i>		Y V LK S SLDLTRYDYYTIGSYDGGKDRY
CWINV3 <i>Zea mays</i>		Y V LKVS L DLTRYEYYTVGTYDHATDRY
CWINV2 <i>Zea.mays</i>		HVLKNS L DLRRYDYYTVGTYHPRAERY
CWINV5 <i>Arabidopsis.thaliana</i>		HVLKVS L TDT F NDYYTIGTYDEVRDVY

Figura 4. Alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de invertasas e inulinasas presentes en plantas. Tomado de Van der Ende, 2007

Las inulinasas que pertenecen a la familia de las fructanhidrolasas son 2,1-β-D fructanfurohidrolasas (EC 3.2.1.7) responsables de hidrolizar los enlaces β-(2,1) de la inulina y producir fructosa o fructooligosacáridos (Marsella 2015).

Las inulinasas microbianas se clasifican acorde su vía de acción, las exo-inulinasas (2,1 β-D-fructano-fructohidrolasa EC 3.2.1.80) son aquellas que rompen los enlaces 2-1 en los extremos del fructano generando fructosa principalmente. Las endo-inulinasas (β-D-fructano-fructohidrolasa EC 3.2.1.7) actúan en la parte media de la inulina generando inulo-triosa, inulo-tetraosa e inulo-pentaosa (Chi, y otros 2009).

Actualmente sólo se han reportado 5 estructuras cristalográficas de enzimas con actividad inulinasas. Dos de ellas, una exoinulinasas, (1Y9M) y una endoinulinasas (3RWV) provienen de hongos filamentosos como *Aspergillus awamori* y *Aspergillus ficcum*

respectivamente (Nagem, y otros, 2004; Samygina, y otros 2011) (Figura 5). Una de levadura *Schwanniomyces occidentalis*, que aunque (Sainz-Polo y otros, 2011) como inulinasa, presenta actividad frente a la inulina de achicoria. Una de planta obtenida a partir de las hojas de achicoria (Verhaest , y otros 2007) y una de bacteria proveniente de *Thermotoga maritima* que es un organismo extremofilo (Alberto y otros, 2006)

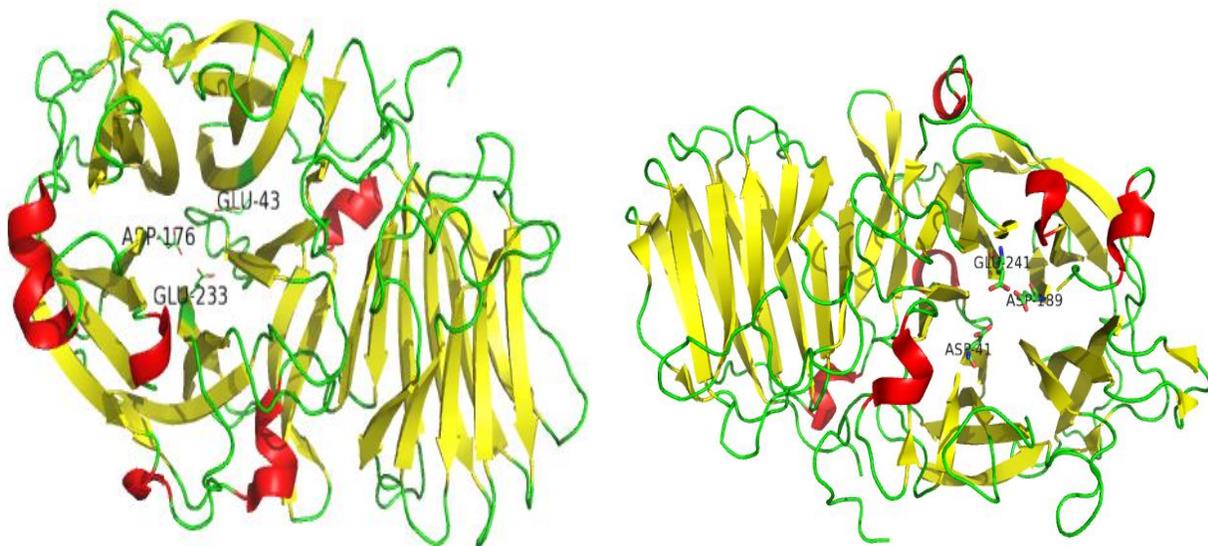


Figura 5. Estructura de la endo-inulinasa de *A. ficcum* (3RWK) y la estructura de la exo-inulinasa de *A. awamori* (1y4W) respectivamente.

En la actualidad las inulinasas han generado gran interés por las aplicaciones que pueden tener en las diferentes industrias como la alimenticia y farmacéutica por lo que nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en su estudio.

En el laboratorio se han realizado ensayos de actividad inulinolítica, usando la enzima comercial Novo960, que contiene ambas inulinasas (endo- y exo-), empleando como sustrato a las inulinas de agave y de achicoria. A pesar de que esta preparación enzimática es capaz de hidrolizar la inulina de achicoria hasta fructosa, la hidrólisis de la agavina es casi nula. Dadas estas limitaciones de la enzima comercial, ha sido fundamental el aislamiento, la purificación y la caracterización de enzimas capaces de hidrolizar inulinas como la agavina.

Previo a este trabajo, en 2013 Robert se dedicó a seleccionar las mejores cepas de la colección de microorganismos aislados. De esta forma se seleccionaron ocho cepas

que cumplieran con las características previamente mencionadas y cuyos extractos celulares o sobrenadantes presentaron actividad hidrolítica contra la inulina de agave. De las ocho cepas seleccionadas solo 2 mostraron características de actividad y crecimiento sobresalientes (ISO3 y IPO3) (Robert 2013) (Figura 6).

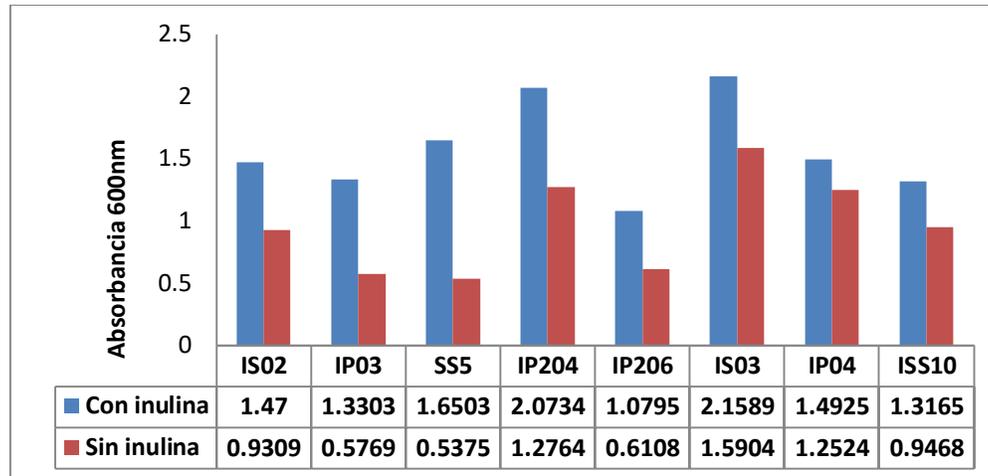


Figura 6. DO a 600 nm después de 24 horas de crecimiento en medio con y sin inulina de agave de ocho microorganismos distintos tomado de Robert 2013

Las cepas ISO3 e IPO3 se caracterizaron morfológicamente y observó que eran levaduras, se estudió el efecto de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos y se encontró que la mejor fue de 30°C

Por otro lado, en 2015 Guillén retomó dos cepas la AZ8 y la ISO3, ambas crecían en medios con inulina de agave como única fuente de carbono y sus sobrenadantes presentaban actividad inulinolítica. Se realizaron ensayos usando distintas columnas de intercambio iónico para montar una técnica de purificación para las posibles enzimas que podrían ser exo-inulinasas o endo-inulinasas. Se obtuvo una purificación parcial de la inulinasa presente en el sobrenadante de la levadura ISO3 que generaba como productos fructosa y fructooligosacáridos detectados por medio de cromatografía en capa fina (Guillén 2015).

Tomando en cuenta esta información se decidió seguir estudiando la inulinasa producida por la levadura ISO3 ya que el sobrenadante presenta una buena actividad enzimática usando como sustrato la inulina de agave además de que esta enzima es capaz de trabajar a 50°C.

3. HIPÓTESIS

La levadura ISO3 aislada de los residuos de agave de la industria tequilera (Tequilera Sauza, Tequila Jalisco) es capaz de usar como única fuente de carbono a la agavina, por lo tanto, este microorganismo producirá endo y exoinulinasas que hidrolizarán al fructano ramificado.

3.1. OBJETIVOS

Objetivo general

- Obtener y caracterizar las enzimas capaces de usar como sustrato a la agavina.

Objetivos particulares

- Identificar por métodos moleculares el microorganismo que se empleó para la obtención de las inulinasas.
- Establecer sobre que fuente de carbono hay una mayor producción de inulinasas
- Implementar una metodología de purificación de las posibles enzimas que hidrolizan a la inulina.
- Identificar por técnicas cromatográficas los productos de reacción de las enzimas obtenidas.
- Determinar las mejores condiciones de reacción enzimática (temperatura y pH) para realizar los ensayos cinéticos
- Determinar los parámetros cinéticos (K_m , k_{cat}) de las posibles proteínas purificadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material celular

La cepa IS03 que se empleó en este trabajo es parte una colección que se tiene en el laboratorio 314 de la Facultad de Química de la UNAM, este microorganismo se aisló de una planta procesadora de tequila.

4.1.2. Reactivos y kits

Reactivos y kits	
Agavina (Nekutli S.A.)	Fructooligosacáridos (Nekutli S.A.)
Acido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)	Glucosa (Sigma Aldrich)
Fructosa (Sigma Aldrich)	Extracto de levadura (Sigma Aldrich)
Butanol (Sigma Aldrich)	Metanol (Sigma Aldrich)
Isopropanol (Sigma Aldrich)	Hidroxido de sodio (Merck)
Sulfato de magnesio (Merck)	Sacarosa (Merck)
Sulfato de amonio (Droguería cosmopolita)	Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)
DNAzol (Invitrogen)	Agarosa (Invitrogen)
Fosfato monobásico (Merck)	Fosfato di básico (Merck)
Cloruro de sodio (Droguería cosmopolita)	Ácido clorhídrico (Sigma Aldrich)
Inulina de chicoria (Sigma Aldrich)	Ácido sulfúrico (Sigma Aldrich)
Persulfato de amonio (Sigma Aldrich)	Orcinol (Sigma Aldrich)
Acrilamida (JT Baker)	Bis acrilamida (JT Baker)
Azul de bromofenol (Sigma Aldrich)	EDTA (Sigma Aldrich)
SDS (Sigma Aldrich)	Ácido acético (Merck)
Marcador de peso molecular de proteínas (Biorad)	Marcador de peso molecular de DNA 1 Kb plus (Invitrogen)
Acetato de sodio (Sigma Aldrich)	Cloruro de potasio (JT Baker)
Cromatoplasmas de capa fina de silica gel (Merck)	Kit de purificación de DNA QIAquick (Invitrogen)
Metabisulfito (Sigma Aldrich)	Reactivo de Schiff (Sigma Aldrich)
Kit de tinción de plata (Biorad)	Kit de calibración para exclusión molecular (Biorad)
Azul de dextrana (Biorad)	Kit para gel 2D (Biorad)

4.1.3. Equipos

Equipos	
Centrifuga PrO-Research (Centurion Scientific Lid)	Centrifuga (Eppendorf)
Cromatógrafo de proteínas AKTA purifier (General Electric)	Fuente de poder (Major Science)
Cámara de electroforesis para DNA (Select Bioproducts)	Cámara de Electroforesis para proteínas (Biorad)
Espectro de luz UV Genesys 10S (Thermo Scientific)	Potenciómetro (Beckman)
Agitador orbital Aros 160 (Thermolyne)	Balanza analítica (Ohaus)
Termociclador (Applied Biosystems)	Nanodrop (Thermo Scientific)
Purificador de agua MilliQ (Millipore)	Incubadora innova 4330 (New Brunswick Scientific)
Termomixer (Eppendorf)	Baño de agua (IKA)
Ultra congelador ULT390 (Gs Laboratory)	Columna DEAE Fast Flow de 24 mL (Sigma Aldrich)
Columna Superdex 200 de 24 mL (Sigma Aldrich)	Unidad de ultrafiltración (Millipore)
zetasizer μ V (Malvert)	Protean i12 IEFD (Biorad)
Liofilizadora FD1.0 (Heto)	

4.2. Identificación del microorganismo por la amplificación y secuenciación de la región ITS1.

La cepa de interés se creció en un medio de cultivo con 1% de agavina durante 24 horas a 30°C a 150 RPM. Posteriormente el medio se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 1 mL de DNAzol con la finalidad de extraer el DNA genómico. La mezcla se calentó a 90°C por 2 minutos y se congeló con nitrógeno líquido, este paso se realizó tres veces con la finalidad de lisar las células. Se centrifugó la muestra a 10000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se agregó 0.5 mL de isopropanol a -20°C, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos, después se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm. Se eliminó el

sobrenadante y se lavó el DNA genómico con 0.8 mL de etanol al 70%, posteriormente se centrifugó nuevamente por 3 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se dejó secar el pellet de DNA a 35 °C. Finalmente el pellet se resuspendió en 40 µL de agua milliQ estéril. Para corroborar la presencia del DNA genómico se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con un voltaje de 100 Volts por una hora en buffer TAE.

Una vez corroborada la presencia de DNA, se amplificó la región ITS utilizando los siguientes cebadores

ITS1 (F) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS4 (R) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Los reactivos que se emplearon en la PCR se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos que se emplearon para realizar la PCR

Reactivo	Cantidad
Buffer 5x	1 µL
dNTP's 2 mM	2 µL
Cebador ITS1 2 mM	0.5 µL
Cebador ITS4 2 mM	0.5 µL
DNA genómico	1 µL
Taq Polimerasa	0.5 µL
Solución de MgCl	2 µL
Agua milliQ esteril	12.5 µL

Para llevar a cabo la amplificación del fragmento de DNA, se utilizó un termociclador Veriti 90 Well thermal cycler de AB Applied Biosystems usando las siguientes condiciones:

Desnaturalización primaria (94°C, 3 minutos), un ciclo, se consideró como desnaturalización secundaria (94 °C, 40 segundos), alineamiento (56°C, 40 segundos), elongación (72°C, 40 segundos) realizándose 34 ciclos. Por último, se realizó una elongación final (72°C, 5 minutos).

4.3. Purificación de DNA

Se colocaron 80 µL de DNA amplificado por PCR en un gel de agarosa al 1% se realizó una electroforesis a 100 V por una hora y se reveló el gel con bromuro de etidio. Se cortaron las bandas con el DNA amplificado de interés teniendo cuidado con el tiempo de exposición de la luz UV. La purificación se llevó a cabo usando el kit de purificación de DNA QIAquick extraction de Qiagen y se midió la concentración de DNA en un nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific.

La muestra se envió a secuenciar al laboratorio Laragen Inc. Y los resultados obtenidos se ingresaron a la página del NCBI para realizar un Blast y comparar la secuencia con las ya reportadas.

4.4. Ensayos de crecimiento microbiano usando distintas fuentes de carbono.

El crecimiento de la cepa ISO3 se realizó en matraces Erlenmeyer de 200 mL, en un volumen total de 100 mL, midiendo la absorbancia a 600 nm con respecto al tiempo. Las condiciones que se usaron para realizar el crecimiento fueron: temperatura 30 °C, agitación de 150 rpm. El medio base que se empleó fue: 0.5 % m/v de inulina, 0.2 % m/v de extracto de levadura, 0.1 % m/v de sulfato de amonio, 0.05 % m/v KCl y 0.1% m/v de fosfato monobásico. Se usó un preinóculo de 5 mL con el mismo medio base para inocular cada medio usado.

Se realizaron ensayos con diferentes fuentes de carbono usando glucosa, fructosa, fructooligosacaridos (FOS) y sacarosa en las mismas concentraciones que la agavina. Los preinoculos utilizados para cada caso también fueron modificados en su fuente de carbono.

Los monitoreos en todos los casos se realizó a los tiempos: 0, 11.5, 16, 20, 24, 38 y 64 horas tomando una muestra de 1.5 mL y congelándolas para posterior análisis.

4.5. Ensayo enzimático en el sobrenadante.

Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 10000 rpm para realizar el ensayo enzimático con el sobrenadante. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 1000 μ L de buffer de acetatos 20 mM a un pH 5.5, 300 μ L una solución estéril de agavina al 5 % m/v y 200 μ L de sobrenadante de cada muestra. La reacción enzimática se colocó en un termomixer modelo AG 22331 de la marca Eppendorf a 50 °C por un tiempo de 30 minutos y posteriormente se inactivó la reacción colocándola a 100°C por 10 minutos. A la par de la reacción, se realizaron dos controles negativos a las mismas condiciones usando buffer e inulina y por otro lado solo buffer y enzima. La determinación de la actividad enzimática se realizó usando el ensayo de azúcares reductores con el reactivo de DNS. El resultado se expresó como U/mL donde la U es igual a un μ mol equivalentes de fructosa por minuto de reacción.

4.6. Ensayo de azúcares reductores

El ensayo de azúcares reductores se realizó usando la metodología de Miller, (1959) con algunas modificaciones. Se colocó en un tubo de ensayo de 5 mL 0.2 mL de buffer de acetatos 50 mM a un pH de 5, 0.1 mL de muestra y 0.6 mL de reactivo de DNS. Los tubos se calentaron a 90°C por 5 minutos, terminado el tiempo se enfriaron en hielo por 20 minutos y se agregaron 4 mL de agua destilada a cada muestra.

Las muestras se midieron a una longitud de onda 540 nm y para determinar la concentración de cada una se realizó una curva patrón de fructosa como referencia con intervalos de concentración de 0 a 0.58 μ M. El resultado se reportó como μ mol equivalentes de fructosa.

4.7. Cromatografía en capa fina (TLC)

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

4.8. Análisis de secuencias y propiedades teóricas de las inulinasas reportadas de *Kluyveromyces marxianus*

Se recopilaron las secuencias reportadas en el NCBI de las inulinasas producidas por la levadura *Kluyveromyces marxianus*, posteriormente se colocaron en el servidor Clustal Omega para realizar un alineamiento múltiple de las proteínas.

Las propiedades teóricas como el punto isoeléctrico, peso molecular, porcentaje de aminoácidos cargados fueron determinados para cada inulina reportada por medio del servidor ProtParam tools del ExPASy.

4.9. Purificación de la inulina

Con la finalidad de purificar a la proteína extracelular, se creció la levadura a las mejores condiciones previamente determinadas (64 horas de incubación, 30 °C, 150 rpm, fuente de carbono agavina), posteriormente el medio de cultivo se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 15 min para separar las células del sobrenadante. El sobrenadante recuperado se ultrafiltró a 4500 rpm a una temperatura de 4°C usando filtros Amicom Ultra de un tamaño de corte de 30 KDa .

Una vez concentrada la muestra, se colocó en un buffer de fosfatos 50 mM a un pH de 7, para introducirla en una columna de intercambio aniónico DEAE FF ya que las secuencias reportadas para esta proteína tienen una mayor cantidad de residuos con carga negativa. Se introdujo 1 mL de muestra y las condiciones de trabajo de la columna fueron: flujo de 1 mL/min, gradiente lineal de NaCl 2 M durante 15 minutos hasta llegar a 50% del gradiente salino. Posteriormente se realizaron pruebas de actividad enzimática a las fracciones que presentaron valores más altos de absorbancia a 280 nm. Con la finalidad de mejorar la separación de las proteínas se llevó a cabo otra prueba de gradiente lineal pero solo hasta el 10 % de gradiente y se realizaron pruebas enzimáticas. Con esta prueba se decidió usar un gradiente segmentado al 7% de NaCl 2 M.

La fracción recuperada del paso anterior se concentró por ultrafiltración y se llevó a cabo la separación de proteínas usando cromatografía de exclusión molecular con dos columnas que fueron comparadas para decidir cuál presentaba una mejor separación.

La columna Superdex 200 de un volumen de 24 mL se ocupó bajo la siguiente condición de flujo 0.5 mL/min. La fase móvil que se empleó fue buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 + 500 mM de NaCl. La columna fue empacada en laboratorio usando un flujo máximo de 8 mL/min de etanol al 20% y una presión máxima de 1.5 MPa, posteriormente se pasó agua y después buffer de fosfatos con azul de dextrano para verificar su correcto empaquetamiento.

Para evaluar el proceso de purificación (ultrafiltración, intercambio catiónico y Exclusión molecular por la columna Superdex 200) se realizó un gel SDS-PAGE para ver la pureza de la muestra.

4.10. Determinación del peso molecular de la enzima

Para determinar el peso molecular de la enzima se emplearon dos técnicas, por un lado se usó cromatografía de exclusión molecular y por otro dispersión dinámica de luz. Para la técnica de cromatografía por exclusión molecular se empleó una columna Superdex 200S 10/300, se usó como fase móvil buffer de fosfatos 50 mM a un pH de 7.2 con 500 mM de cloruro de sodio. Esta columna se calibró usando el kit de la marca Biorad catálogo 1511901. Este kit contiene una mezcla de proteínas: vitamina B12, mioglobina de equino, ovoalbúmina de gallina, gama globulina bovina y tiroglobulina bovina, con un peso molecular de 1.35, 17, 44, 158 y 670 kDa respectivamente. Para determinar el volumen muerto de la columna se ocupó azul dextrano.

Se mezcló una alícuota de 0.1 g del kit de calibración en 500 microlitros de buffer de fosfatos y se inyectó a la columna a un flujo de 0.5 mL/min. De la misma forma se procedió con el azul de dextrano. Una vez obtenido los volúmenes de elución de cada patrón se calculó el factor K_a que es

$$K_a = \frac{(Vol.muestra-vol.muerto)}{(Vol.total-vol.muerto)} .$$

Esta fórmula relaciona el volumen de elución de la muestra, el volumen muerto y el volumen total de la columna. Una vez obtenidos estos valores se graficaron contra sus respectivos pesos moleculares en forma logarítmica. Se obtuvo la ecuación de la recta y a partir de ella se calculó el peso molecular de la muestra.

Para la determinación del peso molecular mediante la dispersión dinámica de luz se empleó el equipo zetasizer μ V con celdas de vidrio. Esta técnica tiene como fundamento hacer pasar un láser que difracte con las partículas presentes en la solución, de esta forma al colisionar el haz de luz se difracta. Este fenómeno se puede usar para determinar el peso molecular partiendo de la suposición de que la partícula es una esfera que generara ángulos de difracción según su tamaño. Para usar esta técnica primero se colocaron 500 μ L de la proteína a una concentración de 100 μ g/mL en la celda y se equilibró 25°C por 10 minutos, posteriormente se realizaron 10 mediciones de 30 segundos cada una. Una vez obtenido el diámetro de la proteína se estimó el peso molecular tomando en cuenta este dato.

4.11. Punto isoelectrónico

Para determinar el punto isoelectrónico de la enzima, se preparó 15 μ g de la muestra en 125 μ L del buffer que contiene CHAPS al 2% (m/v), tiourea 2 mol/L, urea 7 mol/L y anfolinas al 0.05% (m/v). Esta muestra se colocó en una tira de isoelectroenfoque, que es un soporte de acrilamida y bisacrilamida, que se encuentra derivatizado con grupos ácidos o básicos cuya unión covalente a la matriz impide la distorsión del gradiente. Esta tira fue de 7 centímetros y de un intervalo de pH de 3 a 10, posteriormente se cubrió con aceite mineral y se colocó en el equipo Protean i12 IEFD. Se dejó hidratar por 12 horas y se corrió a un voltaje de 100 V por una hora para realizar el isoelectroenfoque. A continuación, se retiró la tira del equipo y se realizaron dos lavados de 20 minutos cada uno con 2mL de una solución de 1% (m/v) de SDS. En un gel de poliacrilamida a 10 % sin gel de apilamiento, se colocó la tira lavada y en el espacio sobrante se puso el marcador de peso molecular. Se preparó una solución de 0.6 % (m/v) de agarosa con azul de bromofenol y se vertió en la parte superior del gel para sellarlo. En una cámara de electroforesis se corrió el gel durante una hora y media a 100 volts. El gel se fijó con una solución de metanol al 50 por ciento y se tiñó con una solución de azul de Coomassie.

4.12. Tinción de Schiff (glicosilación)

Para determinar el grado de glicosilación de la proteína, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE de 25 μ L de la muestra a una concentración de 1.85 μ g/mL.

Durante dos horas se corrió el gel a un voltaje de 100 V, posteriormente se lavó el gel de policarilamida al 10 por ciento con agua Milli Q para retirar el SDS. Se fijó el gel con una solución de metanol al 50 por ciento durante 60 minutos, terminado este paso se lavó dos veces durante 20 minutos cada una con agua Milli Q. Una vez lavado se agregó una solución oxidativa de ácido peryódico al 1 % (m/v) por 60 minutos para generar grupos aldehído en el carbohidrato, posteriormente se lavó dos veces con agua Milli Q por 20 minutos y se colocó en una solución de Schiff hasta ver bandas magentas, este color generado por la reacción entre el aldehído y el reactivo de Schiff. Se retiró la solución anterior y se dejó en una solución de metabisulfito al 0.5 por ciento por 2 horas. Por último, se dejó destiñendo con agua MilliQ. Para esta técnica se usó como control positivo a la proteína peroxidasa de rábano que presenta glicosilaciones y como control negativo albumina bovina.

4.13. Deglicosilación

Una vez identificada que la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* está glicosilada se usó el kit de deglicosilación enzimática de sigma-aldrich. Como primer paso se colocó 0.001 g de la proteína liofilizada en 35 microlitros de agua Milli Q y 10 microlitros de buffer 5x. Posteriormente se adicionó un microlitro de las enzimas O-glicosilasa que hidroliza el enlace entre serina y galactosa, la peptido N-glicosilasa F hidroliza el enlace de asparagina con manosa, la α (2,3,6,8,9) neuromidasa que hidroliza el enlace entre galactosa y ácido sialico, La β -N-Acetilglucosamidasa hidroliza el enlace beta acetilglucosamina con manosa o galactosa y la β -(1-4) galactosidasa. Esta reacción se dejó durante 5 días a una temperatura de 37°C. Para corroborar la deglicosilación se llevó a cabo nuevamente una tinción de Schiff.

4.14. Ensayos de estabilidad térmica.

En una celda de vidrio se colocó 500 μ L inulinasa a una concentración de 100 μ g/mL que se encontraba en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2 a continuación, se introdujo la celda en el equipo zetasizer μ V, se dejó equilibrar el equipo a distintas temperaturas que van desde 25°C hasta 70°C por diez minutos y posteriormente se realizaron 10 mediciones del diámetro hidrodinámico de la proteína durante 30 segundos.

También se realizaron ensayos de estabilidad térmica midiendo la actividad enzimática residual durante un intervalo de 24 horas de incubación de la enzima a tres temperaturas 40°C, 50°C y 60°C. Se tomaron alícuotas de la enzima a diferentes tiempos de incubación y se llevó a cabo la reacción enzimática usando como sustrato agavina al 1%(m/v) en buffer de fosfatos pH 5.5 y a una temperatura de reacción de 50°C por 10 minutos, cada reacción por el método de DNS.

4.15. Caracterización enzimática

Se realizaron ensayos con la enzima pura en buffer de fosfatos 5.5 con 1 % (m/v) de agavina durante intervalos de tiempo que fueron de 0 hasta 18 minutos a una temperatura de 50 °C con una cantidad de enzima de 5.93 µg. Este procedimiento se usó para verificar el tiempo en el cual se mantenía la reacción en velocidad inicial. La cantidad de fructosa producida por esta reacción se determinó por el método de azúcares reductores DNS.

4.15.1. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

Una vez purificada la enzima y verificada la velocidad inicial se llevó a cabo la reacción enzimática en buffer de fosfatos pH 5.5 con 1% de agavina, por 10 minutos a 150 rpm y se varió la temperatura (30, 40, 50, 55, 60 y 70 °C). La reacción se detuvo colocando las muestras a 95°C por 5 minutos. Se cuantificaron azúcares reductores por el método de DNS para determinar la actividad enzimática y se analizaron las muestras para determinar la mejor temperatura.

Ya determinada la mejor temperatura de reacción, se evaluó el efecto del pH en un intervalo de 3.5 a 7.5 usando buffer de fosfatos a 50 mM y la mejor temperatura obtenida (50 °C).

4.15.2. Ensayos de especificidad por sustrato.

Con la finalidad de evaluar la actividad sobre los enlaces β -(2,1) y β -(2,6), se llevaron a cabo experimentos con inulina de chicoria que cuenta únicamente con enlaces β -(2,1), mientras que el levano cuenta con β -(2,6). También se usó como sustrato sacarosa para observar la actividad de invertasa. Estos experimentos se llevaron a cabo de manera independiente a pH 5.5 y 50°C con una concentración de proteína de 5.93 µg y

de 1% m/v de sustrato. Las reacciones de inulina de chicoria y levano se llevaron a cabo en un volumen total de reacción de 500 μ L por 10 minutos y la de sacarosa por 6 minutos en un termoblock en agitación constante (150 rpm). Después del tiempo de reacción, esta se detuvo calentando a 95°C por 2 minutos. La cantidad de producto formado se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores por el método de DNS.

4.15.3. Ensayos cinéticos

Una vez confirmado la actividad enzimática en los sustratos sacarosa, inulina de chicoria e inulina de agave se determinaron las mejores condiciones de reacción para cada sustrato evaluando diferentes valores de temperatura (40°C, 50°C y 60°C) así como diferentes pH (4.5, 5.5 y 6.5). El ensayo con levano no se llevó a cabo por la baja actividad presentada.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de reacción para cada sustrato se llevaron a cabo los ensayos de cinética enzimática variando la concentración del sustrato que en caso de la agavina fueron de 0.93 mM a 5.58 mM. El peso molecular de la inulina de agave fue de 2700 Da determinado por exclusión molecular.

Para el caso de la inulina de chicoria se usaron concentraciones de sustratos que van de 0.25 mM a 2.5 mM. El peso molecular que se usó para llevar a cabo el cálculo de la concentración fue de 4753 Da determinado por exclusión molecular.

Las concentraciones de sacarosa para la determinación de los parámetros cinéticos fueron de 29.21 mM a 291.1 mM. Para todos los ensayos se adicionó una cantidad de 5.93 μ g de enzima pura a un volumen final de reacción de 0.5 mL, cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la obtención de la inulinasa proveniente de la levadura ISO3 se planteó primero identificar por técnicas moleculares al microorganismo que se eligió en este trabajo para posteriormente encontrar las mejores condiciones para producir la enzima, purificarla y caracterizarla.

5.1. Identificación de la levadura ISO3 por medio de la amplificación de la región ITS

Con la finalidad de identificar al microorganismo de trabajo se llevó la amplificación por PCR de la región ITS, por sus siglas en inglés (Internal transcribed spacer), que es empleada comúnmente para identificar levaduras, ya que es una región conservada entre cada especie (White, y otros 1990). Una vez realizada la amplificación de la región ITS se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para observar el tamaño del amplicon obtenido. En la Figura 7 se observa el gel obtenido en el cual se aprecia una banda entre 600 y 850 pares de bases. Esta banda se purificó y se mandó a secuenciar.

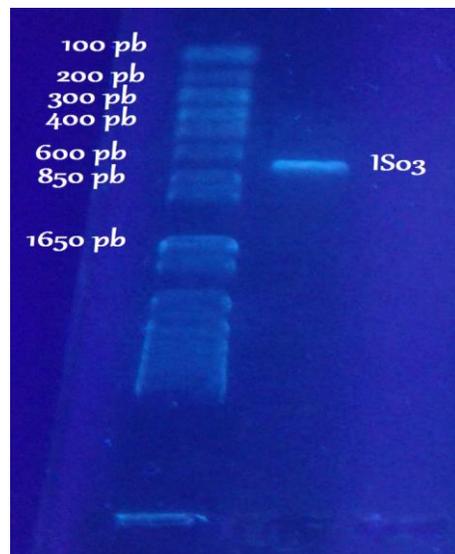


Figura 7. Gel de electroforesis de DNA de la muestra del microorganismo ISO3 amplificada por PCR de la región ITS. El gel de agarosa al 1 % se corrió a 100 V durante una hora en buffer TAE.

La secuencia obtenida fue de 628 pares de base que se alineó a otras secuencias empleado el algoritmo BLAST (Basic local alignment search tool, por sus siglas en inglés)

cuya función es comparar la secuencia problema contra una cantidad de secuencias que se encuentran en una base de datos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Kluyveromyces marxianus strain S-2-05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	1138	1138	63%	0.0	99%	KP219445.1
Kluyveromyces marxianus strain YA3-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	1138	1138	63%	0.0	99%	KR089890.1
Kluyveromyces marxianus strain YA003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	1138	1138	63%	0.0	99%	KR089884.1
Kluyveromyces marxianus strain WM 03.237 isolate ISHAM-ITS ID MITS756 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribo	1138	1138	63%	0.0	99%	KP132326.1
Kluyveromyces marxianus DNA, chromosome 5, complete genome, strain: NBRC 1777	1138	2277	63%	0.0	99%	AP014603.1
Kluyveromyces marxianus strain PZ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	1138	1138	63%	0.0	99%	KF964549.1
Kluyveromyces marxianus strain M11 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	63%	0.0	99%	KF851354.1
Kluyveromyces marxianus strain P2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1623	63%	0.0	99%	KF851351.1
Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042 DNA, complete genome, chromosome 5	1138	2277	63%	0.0	99%	AP012217.1

Figura 8. Resultados del alineamiento de la amplificación de la región ITS

Se puede observar que la región que se amplificó empata con la región ITS1 y una secuencia parcial de ADN de la subunidad 5.8 ribosomal de varias cepas del microorganismo *Kluyveromyces marxianus* con un 99 % de identidad y valores E (error de cálculo) de cero.

5.2. Ensayos de crecimiento microbiano de la levadura *Kluyveromyces marxianus* ISO3 y producción de la inulinasa

Una vez identificado el microorganismo, se analizó el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento microbiano y la producción de la inulinasa, esto con la finalidad de encontrar las mejores condiciones para producir la enzima. Cabe señalar que la producción de la enzima se observó a través de su actividad inulinolítica.

Con el propósito de determinar la mejor fuente de carbono para producir la inulinasa se llevó a cabo el monitoreo del crecimiento de la levadura por medio de turbidimetría en distintas fuentes de carbono: sacarosa, glucosa, fructosa, fructooligosacáridos (FOS) y agavina (Figura 9).

Se observó que la fuente de carbono en la que se presenta un mayor crecimiento microbiano es la glucosa, seguido por la fructosa y la sacarosa. Por otro lado, los FOS y agavina presentaron los crecimientos más bajos. En el año 2011 Nitsche, Abrahao-Neto y Karoly encontraron resultados similares para la cepa PYCC 3886 de *Kluyveromyces marxianus*, observando un mayor crecimiento cuando la fuente de carbono es glucosa comparada con otras fuentes de carbono como sacarosa.

Estos resultados son los esperados ya que la glucosa es un monosacárido de fácil asimilación y metabolización al igual que la fructosa, mientras que los polisacáridos necesitan ser hidrolizados para su posterior aprovechamiento por el microorganismo.

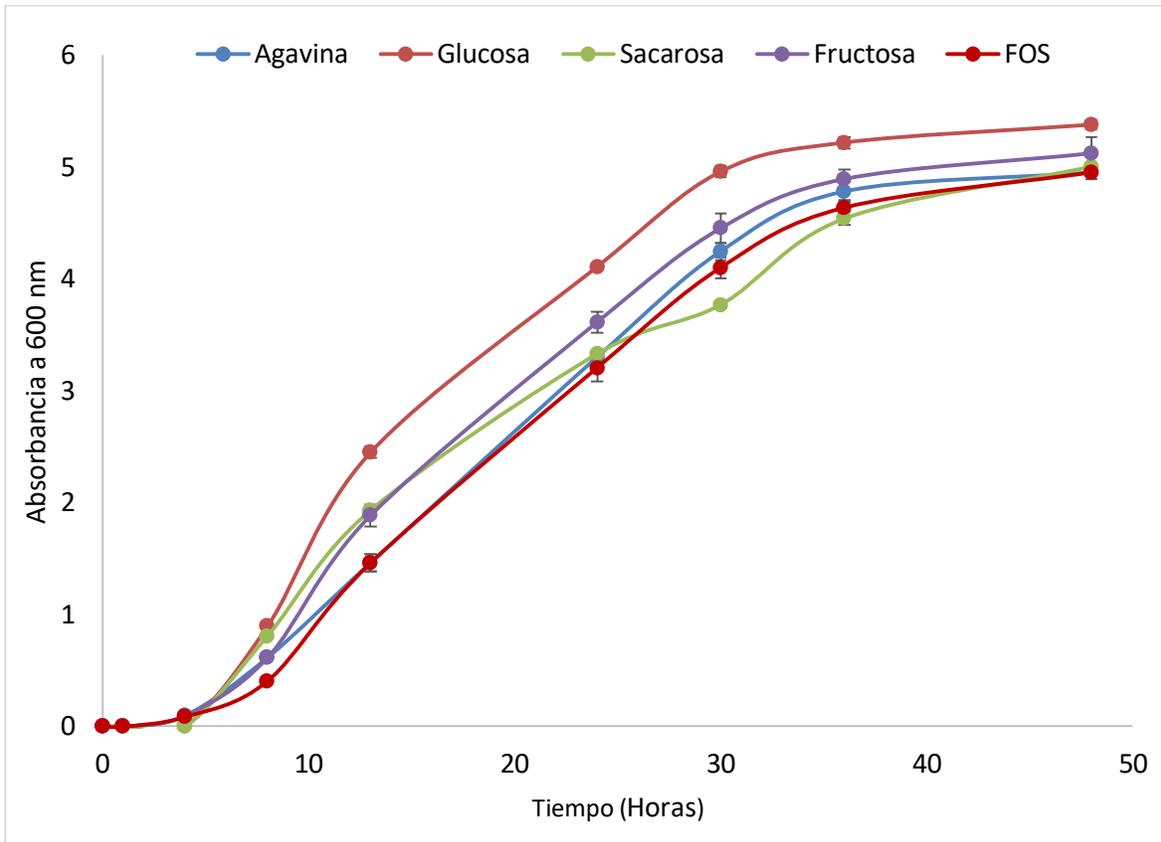


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* (ISO3) en distintas fuentes de carbono 1%(m/v) (Agavina, Sacarosa, FOS, Fructosa, Glucosa), a 30°C y 120 rpm.

También se observa que la fase de adaptación es más larga en el medio con agavina, dado que, como se mencionó anteriormente este polímero debe ser hidrolizado.

Una vez evaluado el crecimiento de la levadura, se determinó la producción de la inulinasa a través de su actividad enzimática, para esto, se consideraron tres puntos de la curva de crecimiento, para observar si existía una relación directamente proporcional entre el crecimiento de la cepa y la producción de la inulinasa.

En la Figura 10 se muestra la actividad enzimática durante el monitoreo del crecimiento de la levadura en tres intervalos de tiempo con cada una de las fuentes de carbono. Se observa que durante la primera fase del crecimiento (13 horas) el medio con inulina de

agave, comparado con los otros medios, presenta una mayor actividad enzimática (50%). Esto se puede deber a que la levadura para crecer necesita producir la inulinasa para lograr degradar a la agavina en fructosa.

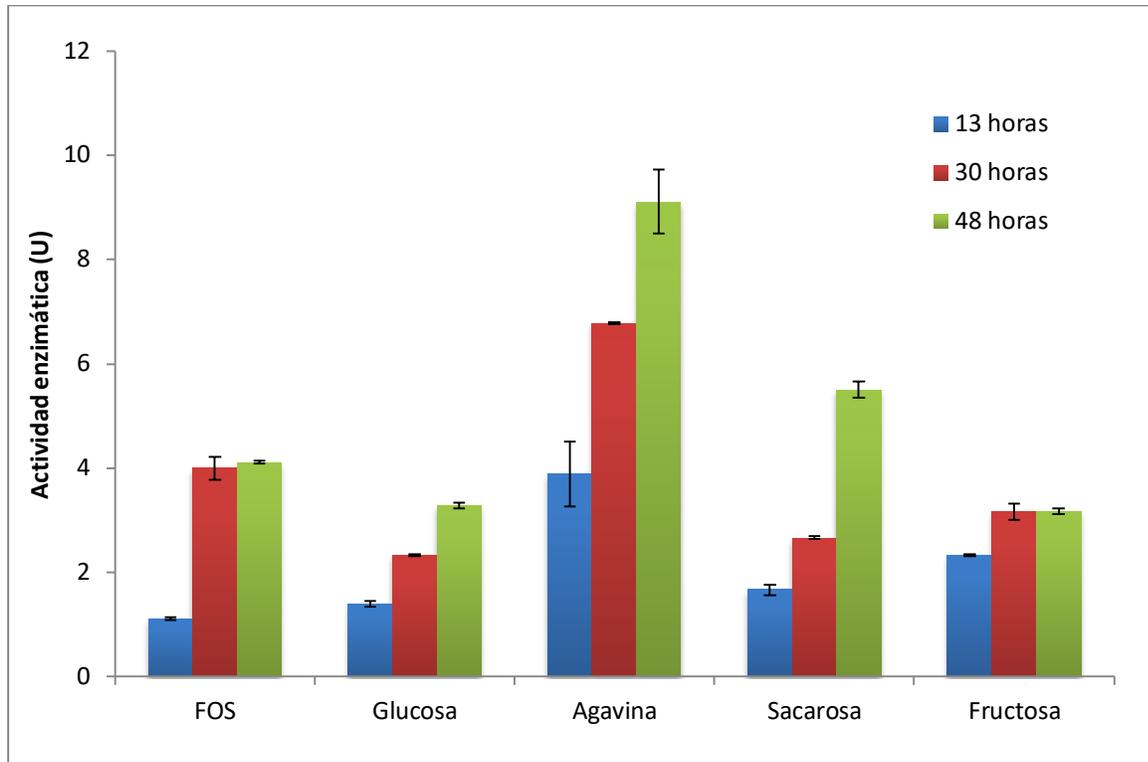


Figura 10. Actividad enzimática de los diferentes medios de cultivo. La reacción se llevó a cabo usando 1% de agavina, a 50°C, pH 5.5, 300 rpm, durante 10 minutos de reacción en un volumen total de 1 mL

A las 30 horas se observa en todos los casos un aumento en la actividad enzimática. Los medios de crecimiento donde se usó un monosacárido o disacárido el aumento fue de una unidad de actividad mientras que los medios que contenían polisacáridos la actividad aumento al doble que la observada a las 13 hora. A las 48 horas se observa que los medios con fructosa y FOS no presentan un aumento en la actividad enzimática mientras que el medio que contenía glucosa presenta un pequeño aumento. Sin embargo, el medio de crecimiento con agavina presentó la mayor actividad enzimática de todos los medios analizados. Además, al comparar con el crecimiento se observa que, aunque el medio que contenía inulina de agave presenta un menor crecimiento celular tiene mayor actividad enzimática. Singh y colaboradores en 2007 reportaron que para la cepa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 la actividad más alta se encontraba

cuando la levadura crecía en un medio con inulina de Dalia que con otras fuentes de carbono como sacarosa o glucosa (Singh, Dhaliwal y Puri 2007). Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, el medio con glucosa que presentó mayor crecimiento celular fue uno de los medios con menor actividad enzimática. El grupo de Sokolenko & Karpechenko en 2015 usando una cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB L 278 demostraron que la producción de la enzima inulinasa en medio con glucosa es mínima, ya que el gen de inulinasa es reprimido en presencia de glucosa. En este mismo trabajo también demostraron que existe una mejor producción de la enzima cuando la levadura crece en presencia de inulina o sacarosa. Se cree que la expresión del gen de la inulinasa el cual codifica para la enzima, depende de la fuente de carbono en la que se encuentre el microorganismo (Sokolenko y Karpechenko 2015). Esta información respalda los resultados obtenidos en este trabajo ya que se observa que las mejores condiciones de producción de la enzima son cuando se usa la inulina de agave como fuente de carbono por lo cual se usó este medio para obtener la enzima que fue purificada.

5.3. Purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3

Una vez obtenidas las mejores condiciones de producción de la enzima, se montó la metodología para llevar a cabo la purificación de la inulinasa. Como primer paso se recopiló información sobre las secuencias ya reportadas para obtener valores de peso molecular y punto isoeléctrico de referencia para que a partir de esta información se estableciera una metodología de purificación. Como paso previo a la purificación se llevó a cabo el alineamiento múltiple de todas las secuencias reportadas con el fin de observar su variación además de observar la cantidad de aminoácidos cargados y su punto isoeléctrico teórico.

5.3.1. Análisis de secuencias y propiedades teóricas de las inulinasas reportadas de *Kluyveromyces marxianus*

Se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de las inulinasas de *K. marxianus* presentes en el NCBI, en él se observa que las secuencias reportadas tienen un intervalo de 533 a 556 residuos de aminoácidos. Todas las secuencias comparten un porcentaje de identidad mínimo del 98% y solo tienen cambios en los

residuos 165 (Q por E), 168 (T por S) y los residuos 228, 229, 230 (T por I, T por H, H por V); estos cambios en algunos casos generan modificaciones de carga (Q por E, T por H y H por V) o pérdida de grupos polares (T por I).

<i>K. marxianus</i>	1		60
ATCC12424	MKFAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGDSKAITNTTFLNRPSVHFTPSHG	WMNDP	NGLWYD
YS-1	MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGDSKAITNTTFLNRPSVHFTPSHG	WMNDP	NGLWYD
NBRC 1777	MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGDSKAITNTTFLNRPSVHFTPSHG	WMNDP	NGLWYD
DMKU3-1042	MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGDSKAITNTTFLNRPSVHFTPSHG	WMNDP	NGLWYD
	181		240
ATCC12424	RDPKVFWHEGENGEDGRWIMAVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQY	ECP	
YS-1	RDPKVFWHEGENGEDGRWIMAVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQY	ECP	
NBRC 1777	RDPKVFWHEGENGEDGRWIMAVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQY	ECP	
DMKU3-1042	RDPKVFWHEGENGEDGRWIMAVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQY	ECP	

Figura 11. Motivos de las inulinasas de distintas cepas de *Kluyveromyces marxianus* presentes en el NCBI. Las cepas fueron *K. marxianus* ATCC12424 (Laloux, y otros 1991), YS-1 (Singh, Dhaliwal y Puri 2007), NBRC 1777 (Hai-Xiang, y otros 2014), DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul, y otros 2011).

En la Figura 11 se muestra la identificación de los tres motivos conservados de la familia 32 de las glicosilasas. El primer motivo que se encuentra en color verde se encuentra el residuo de ácido aspártico que es parte del sitio activo. El segundo motivo se sabe que el ácido aspártico ayuda a estabilizar al complejo catalítico formado por los residuos ácidos de los motivos antes mencionados. En el tercer motivo de color morado se encuentra el segundo residuo catalítico (ácido glutámico).

Previo a la purificación se analizaron las propiedades de las secuencias reportadas, como primer paso se comparó la cantidad de residuos cargados, en la Tabla 5 se observa que se tienen 58 residuos cargados negativamente siendo superior a los 36 residuos positivos. Esto nos llevó a calcular el punto isoeléctrico teórico usando el programa compute pI/Mw que se encuentra en el portal del ExPASy, este valor nos permitió plantear el pH al cual se trabajaría.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de las inulinasas.

Cepa	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Inulinasas)				Exo-inulinasa (<i>K. marxianus</i>)	Endo-inulinasa (<i>A. awamory</i>)
	ATCC124 24	NBRC1777	YS-1	DMKU310		
No residuos	556	556	556	555	533	516
Res. C/carga neg. (E, D)	58	58	58	58	58	56
Res. C/carga pos. (R, K)	36	36	36	36	32	28
P. Mol. Teo (KDa)	62.29	62.29	62.29	62.13	59.83	55.88
P. Isoeléctrico teo	4.88	4.88	4.88	4.89	4.71	4.56

El punto isoeléctrico calculado fue de 4.6 a 4.8 por lo que se decidió usar un buffer de fosfatos pH 7, 50 mM para que la proteína de interés tuviera una carga negativa y además, este pH es cercano al que emplean en trabajos reportados (Arrizon, y otros 2011).

5.3.2. Purificación de la inulinasa empleando cromatografía de intercambio aniónico

Como primer paso de la purificación de la enzima se empleó cromatografía de intercambio aniónico (DEAE FF) para separar parcialmente a la inulinasa. Se usó primero un gradiente lineal al 50% de una solución 2M de NaCl con la finalidad de hacer un barrido de concentración de NaCl que va desde 0 M hasta 1 M de sal. De esta forma se puede observar que concentración de sal es necesaria para que poder eluir la inulinasa de la columna. En la Figura 12 se muestran los picos obtenidas que se identificaron como A, B , C, D y E. Se realizaron ensayos enzimáticos a cada fracción para determinar cuál era la que presentaba mayor actividad y por lo tanto a la enzima.

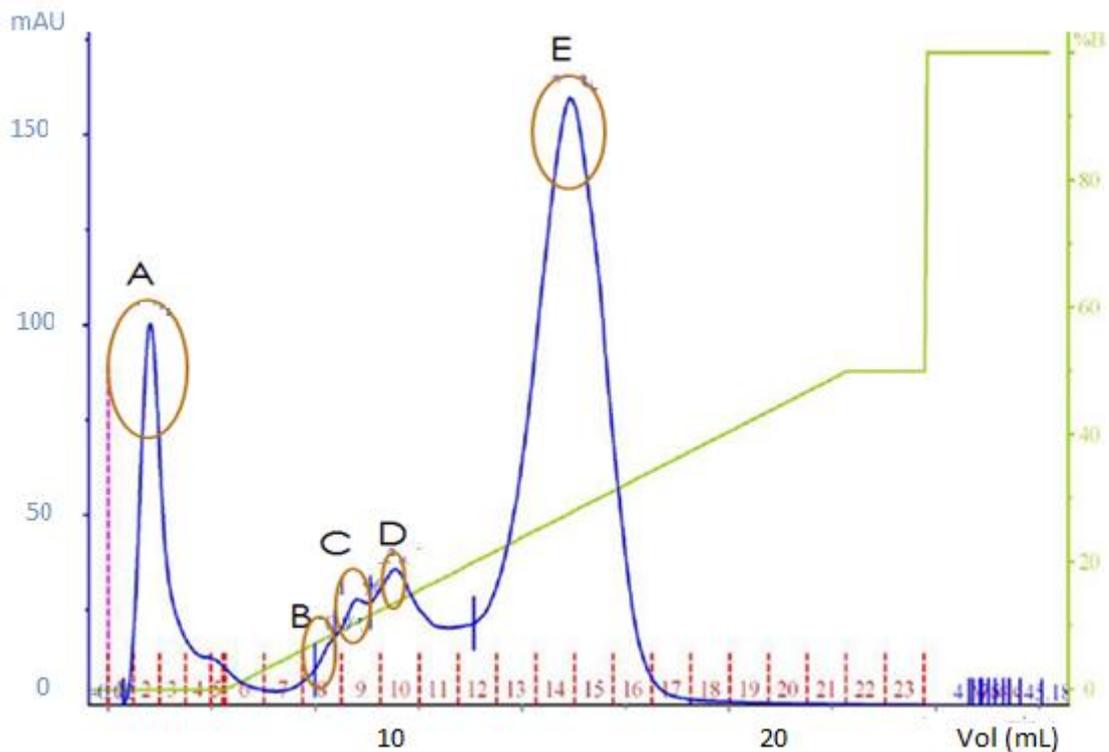


Figura 12. Cromatograma del intercambio iónico después de aplicar un gradiente lineal salino que llega a una concentración máxima de 1M a un flujo de 1 mL/min

La fracción A fue la parte de la muestra que no interaccionó con la columna y por lo tanto no quedó retenida, tuvo una actividad específica de 36.9 U/mg de proteína. Este valor es inferior comparado a la actividad que tuvo la fracción B que fue de 297.97 U/mg de proteína. El pico que fue eluido con 0.15 M de NaCl presentó la mayor actividad comparada con las demás. Los picos C, D y E presentaron una actividad específica de 120.28, 84 y 62 U/mg de proteína y eluyeron con 0.20 M, 0.26 M y 0.56 M respectivamente. Con estos resultados se decidió realizar otro gradiente lineal a una concentración de sal de 0.2 M para definir la concentración de sal necesaria para eluir a la proteína de interés.

En la Figura 13 se observan las fracciones obtenidas al llevar a cabo este ensayo, los picos D y E que eluyeron a 0.12 y 0.14 M de NaCl respectivamente, estas muestras presentaron el valor más alto de actividad específica con 86.9 y 160.5 U/mg de proteína respectivamente.

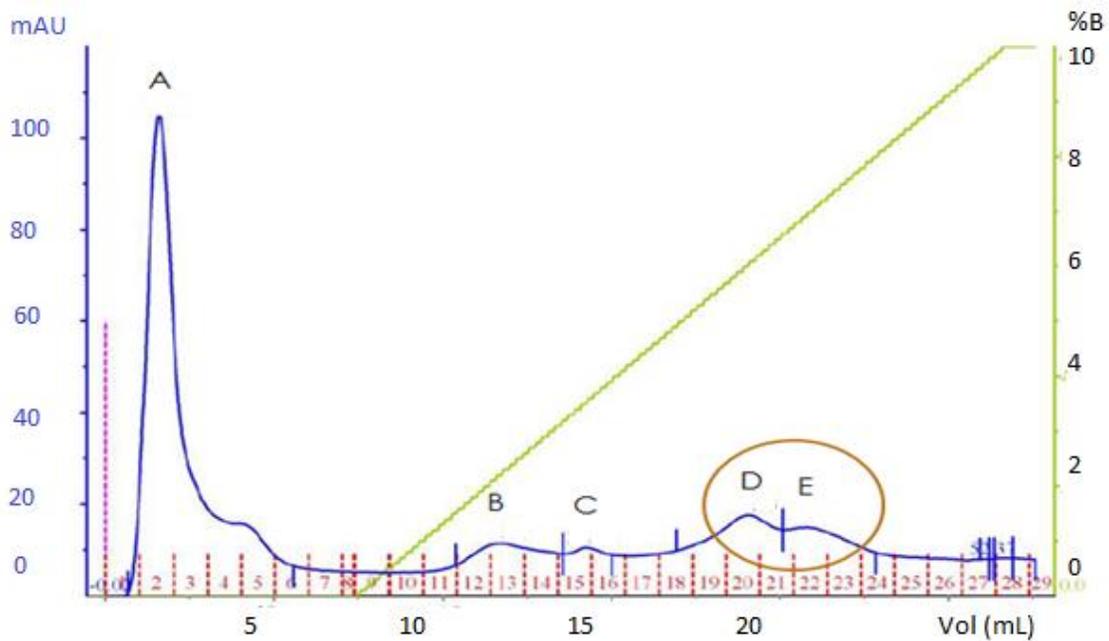


Figura 13 Cromatograma del gradiente lineal a una concentración de 0.2 M de NaCl usando la columna DEAE FF de 24 mL a un flujo de 0.5 mL/min.

Con estos resultados se decidió usar un gradiente segmentado a una concentración de sal de 0.14 M, con este paso se le hace pasar a la columna una concentración constante de NaCl para eluir la muestra. Posteriormente se concentró la muestra obtenida la cual tenía una actividad de 235 U/mg y se usó cromatografía de exclusión molecular (Figura 14).

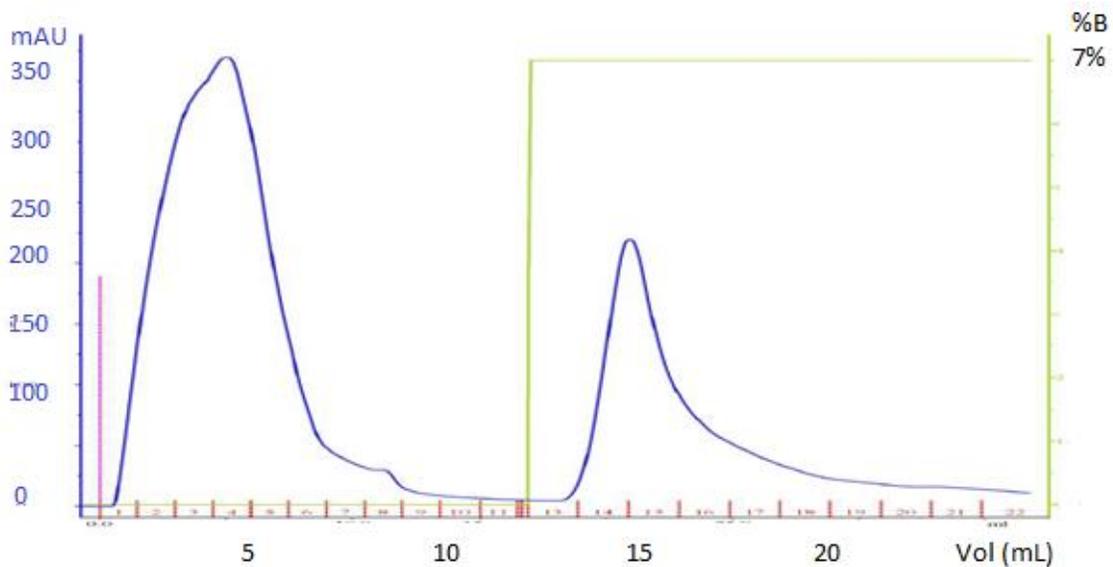


Figura 14. Cromatograma del gradiente segmentado a una concentración de 0.14 M de NaCl usando la columna DEAE FF de 24 mL a un flujo de 0.5 mL/min

5.3.3. Purificación de la inulinasa usando cromatografía de exclusión molecular

Después de haber pasado la muestra por la columna de intercambio aniónico se decidió usar una columna Superdex 200 de 24 mL de volumen para separar la proteína de interés usando su peso molecular. Se decidió emplear esta columna ya que es capaz de separar proteínas globulares que pueden ir de los 10 kDa hasta los 600 kDa con una buena eficiencia. Se introdujeron a la columna 0.5 mL de muestra de intercambio iónico con una concentración de 0.01 mg.

Durante el proceso de purificación usando la columna Superdex 200 se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 15, en él se muestran las fracciones obtenidas. Solo la fracción A presentó actividad enzimática la cual fue de 13.6 U/mg de proteína.

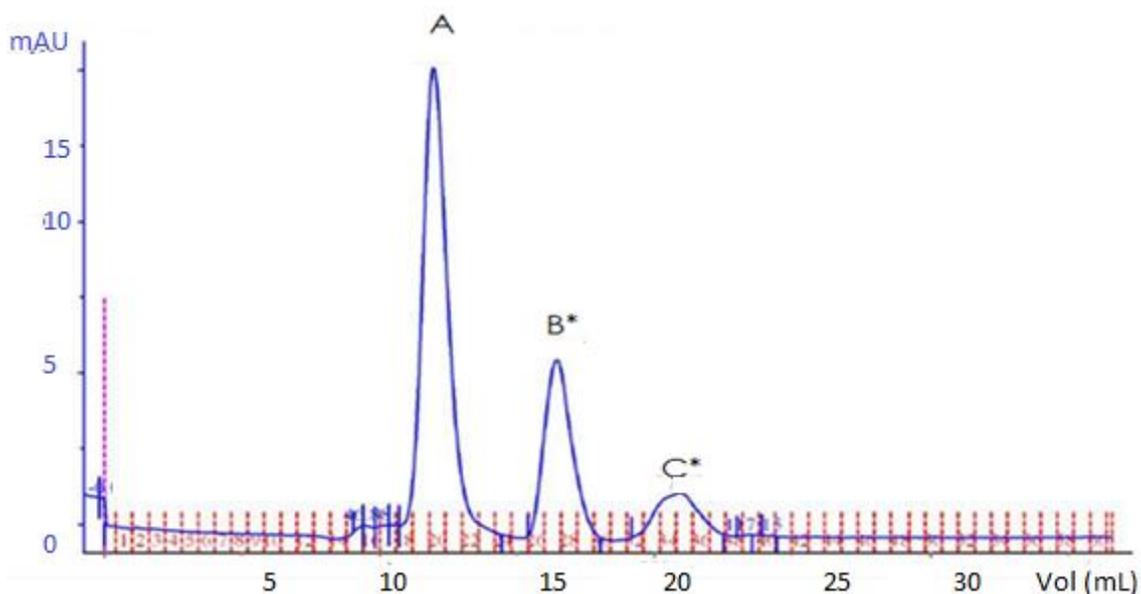


Figura 15. Cromatograma del paso de exclusión molecular en la columna Superdex 200 usando buffer de fosfato con una concentración de 0.05 M pH 7.2 + 0.5 M de NaCl a un flujo de 0.5 mL/min.

Para confirmar la actividad enzimática y observar el producto de la reacción se llevó a cabo una prueba por cromatografía en capa fina (Figura 16) de las reacciones y al igual que la determinación de actividad por azúcares reductores tampoco se observa presencia de producto en las fracciones B* y C*, además se observa que para la fracción A prácticamente usa toda la agavina del medio de reacción.

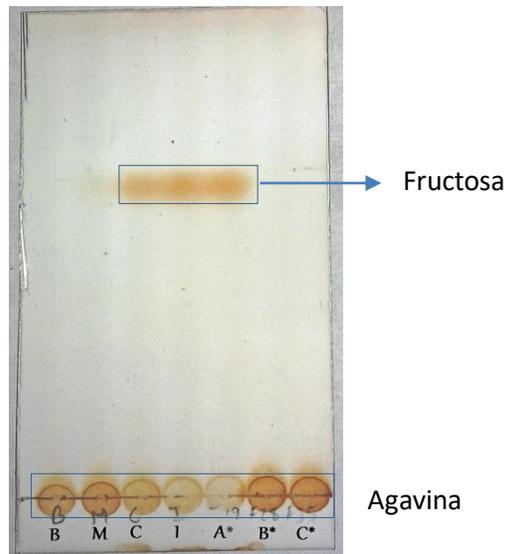


Figura 16. Cromatografía en capa fina de las reacciones enzimáticas de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación. Siendo B el blanco de reacción, M el sobrenadante del medio, C el concentrado por ultrafiltración, I la muestra por intercambio iónico y A* B* y C* las fracciones obtenidas en la exclusión molecular

Para verificar la pureza de la muestra se llevó a cabo un gel SDS-PAGE de todo el proceso (Figura 17), en él se colocaron muestras del sobrenadante recuperado, el concentrado por ultrafiltración, el intercambio aniónico y la exclusión molecular.

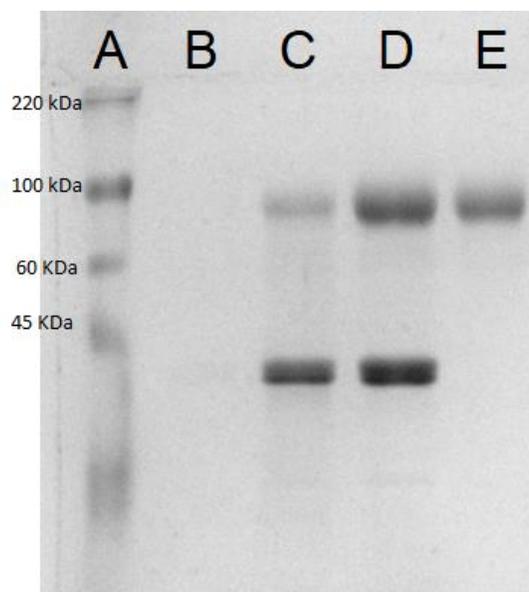


Figura 17. Gel de acrilamida al 10% SDS-PAGE del proceso de purificación corrido a 100 V durante una hora. En el carril A se encuentra el marcador de peso molecular, carril B sobrenadante, carril C muestra concentrada por ultrafiltración, carril D muestra de intercambio iónico y carril E exclusión molecular

Se puede apreciar que el carril E que contiene la muestra obtenida del último proceso de purificación se encuentra pura ya que sólo se aprecia una sola banda. Al comparar la muestra con los patrones moleculares se obtiene un peso molecular aproximado de 89.4 kDa en el gel de electroforesis. Una vez verificado que la enzima se encontraba pura se llevó a cabo todo el proceso de purificación de manera continua por lo que fue posible calcular el rendimiento del proceso y las veces de purificación obtenido. Estos resultados se muestran en la Tabla 6, este proceso se comenzó con 703 mL del sobrenadante obtenido del crecimiento celular, posteriormente se concentró por ultrafiltración hasta obtener un volumen de 14 mL con una cantidad de proteína de 0.32 mg.

Los pasos de cromatografía fueron los siguientes obteniendo una cantidad de proteína de 0.04 mg para un volumen recuperado de 2 mL. Como último paso se inyectó la muestra a una columna de exclusión molecular recuperando un mililitro de enzima con una concentración de 0.02 mg.

Tabla 6. Resultados del proceso de purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3

Pasos	Volumen (mL)	Proteína total. (mg)	Actividad (U)	Act. Esp. (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento
Extracto crudo	703	2.62	12,575.89	4,803.96	1.00	100.00
Ultrafiltración	14	0.32	5,553.33	17,241.13	3.59	44.16
Intercambio iónico DEAE FF 24mL	2	0.04	1,007.48	26,853.65	5.59	8.01
Exclusión molecular Superdex 200	1	0.02	504.52	27,721.86	5.77	4.01

Como se observa en la Tabla 6 la concentración por ultrafiltración es un paso en el cual se pierde mucha proteína ya que el rendimiento disminuye hasta el 44.16 por ciento, esto se debió a que la proteína se quedaba unida a la membrana de filtración. Se realizó un balance de materia para observar cuanta proteína se quedaba adherida, para esto se introdujo una muestra con 1.98 mg de proteína y se ultrafiltro. Se obtuvo un concentrado de 1.09 mg de proteína total y 0.19 mg de proteína total en el sobrenadante, estos valores indican que 0.70 mg de proteína se quedaron adheridos en la membrana. Se intentaron varios métodos para desprender la proteína de la membrana como el uso de solución de NaCl a altas concentraciones (0.5 M, 1M y 2M) sin éxito. Debido a este problema se consideró para futuros experimentos tratar de liofilizar la muestra para concentrarla.

A pesar del bajo rendimiento se obtuvo la proteína pura para poder ser analizada y se pretende que en el futuro se mejore la técnica de purificación con las recomendaciones descritas en este trabajo o si es posible hacerla recombinante.

5.3.4. Peso molecular de la enzima

5.3.4.1. Determinación de peso molecular por exclusión molecular

Para determinar el peso molecular de la enzima mediante exclusión molecular primero se calibró la columna con las proteínas estándar del kit de Biorad mencionado en los métodos. La mezcla de los estándares se solubilizó en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 y se inyectó al cromatógrafo. Con los valores de volumen de elución se calculó el valor K_a que es un cociente que toma en cuenta el volumen total de la columna y su volumen muerto. Para calcular el valor de coeficiente de retención (K_a) tanto de los estándares como de las muestras se usó la siguiente fórmula

$$\text{Coeficiente de retención } (K_a) = \frac{(\text{Vol.muestra}-\text{vol.muerto})}{(\text{Vol.total}-\text{vol.muerto})}$$

en donde el volumen muerto es el equivalente al volumen de elución del azul de dextrana y el volumen total de la columna es de 24 mL. En la Tabla 7 se muestran los valores de volumen de elución de cada estándar, el volumen de elución del azul de dextrana (volumen muerto), el valor de K_a y el peso molecular de cada uno.

Tabla 7. Volúmenes de elución y valor Ka de los estándares para la calibración de la columna superdex 200s 10/300

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

Una vez obtenido el valor Ka de cada estándar se graficó este valor contra su peso molecular de forma logarítmica, se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta y su valor de coeficiente de regresión lineal como se muestra en la figura 18. Para corroborar la calibración de la columna se inyectó una proteína de referencia que fue la albúmina sérica bovina, esta tuvo un volumen de elución de 15.5 mL y un valor de Ka de 0.406. Con estos valores se calculó el peso molecular de la muestra que fue de 64.4 kDa, este valor es muy cercano al peso de la albúmina que es de 66 kDa.

Una vez elaborada la calibración de la columna se inyectaron 0.5 mL de inulinasa a una concentración de 40 µg a la columna y se obtuvo un volumen de elución de 12.71 mL como se observa en la figura 19. Al calcular el valor de Ka con el volumen de elución se obtiene un valor de 0.211. Tomando en cuenta estos valores el peso molecular de la inulinasa es de 256 kDa, este valor es similar a lo reportado por Pessoa y colaboradores en 1997 y Arrizon en 2012 con pesos de 200 kDa y 250 kDa respectivamente.

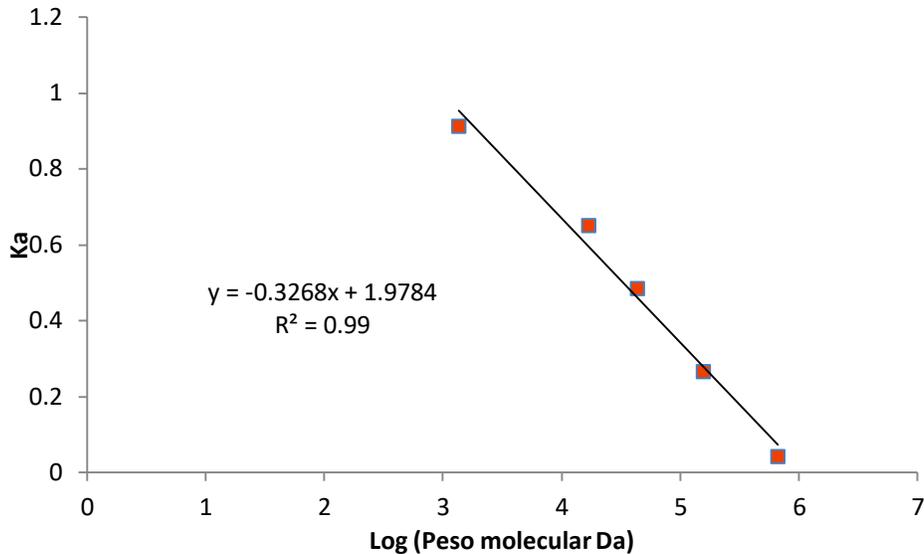


Figura 18. Calibración de la columna de exclusión molecular.

Comparado con el peso molecular observado por SDS-PAGE (90 kDa) y considerando que esta técnica permite conocer el peso del monómero, ya que se encuentra completamente desaturada. Este dato sugiere que la enzima podría ser un dímero o un trímero.

5.3.4.2. Determinación del peso molecular por dispersión dinámica de luz.

Una segunda prueba que permitió comprobar el peso molecular y la pureza de la enzima es la dispersión dinámica de luz. La muestra se analizó en un equipo zetasizer μ V para determinar su diámetro hidrodinámico a 25°C obteniéndose un valor de 11.62 nm que se muestra en la figura 21 y que equivale a un peso molecular alrededor de 232 kDa cercano al peso obtenido por la técnica de permeación en gel que fue de 256 KDa.

En 2013 Artykhov y colaboradores realizaron ensayos de dispersión dinámica de luz con una exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* obteniendo un diámetro de 12 nm. A pesar de ser valores cercanos entre sí (11.62 vs 12 nm) esta variación se puede deber a la temperatura del ensayo y al pH en el que se encuentre la enzima (estas condiciones no son mencionadas en el artículo). También se puede observar tanto en la Figura 19 como en la figura 20 la presencia de una sola población obteniendo una curva monomodal, de esta forma corroboramos la pureza de la muestra y el peso molecular

obtenido.

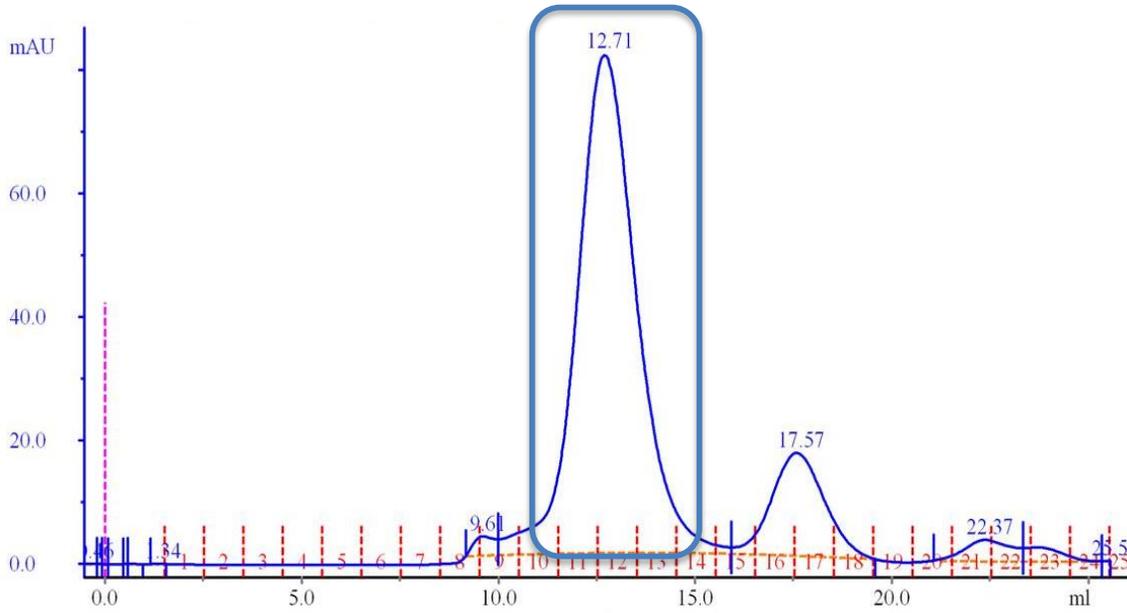


Figura 19. Cromatograma obtenido de la exclusión molecular de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* de volumen de elución de 12.71 mL y un peso aproximado de 256 kDa

Con estos resultados obtenidos sugerimos que la inulinasa que estamos estudiando es de tipo oligomérica que contiene posiblemente 2 o 3 subunidades de 90 kDa cada una y un peso molecular de 256 kDa para el complejo.

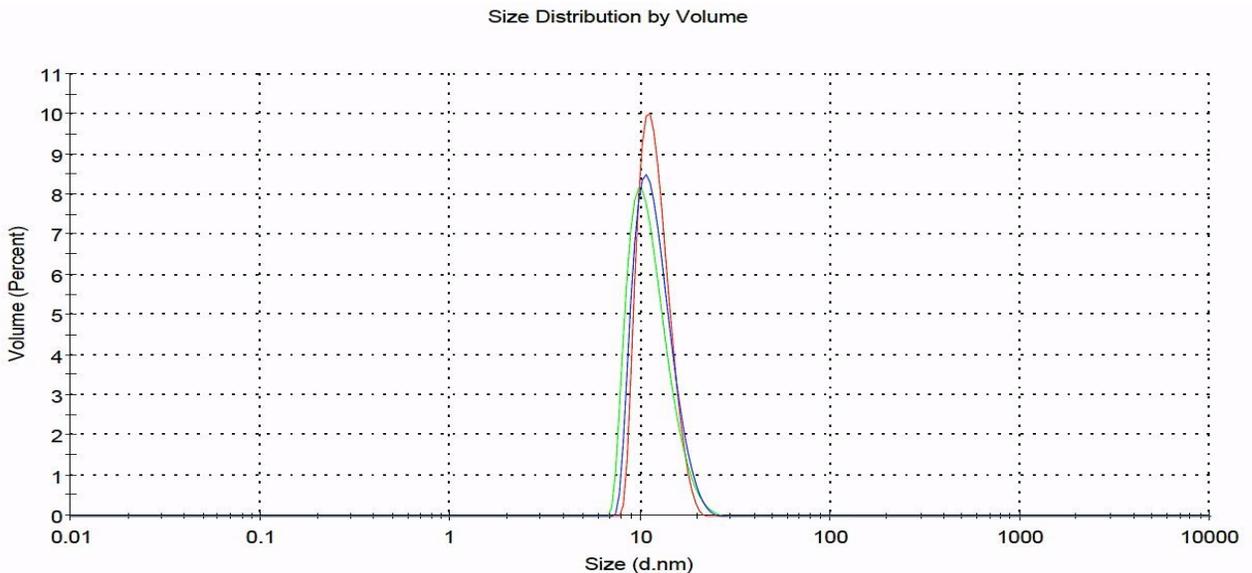


Figura 20. Diámetro hidrodinámico de la inulinasa medido a 25 °C en buffer de fosfatos 50 mM y pH 7.2.

Una vez confirmada la pureza y la posible estructura cuaternaria de la enzima se llevó a cabo el estudio del punto isoeléctrico de la misma, este parámetro es importante ya que permite saber que el valor de pH en el que la proteína tiene una carga neta igual a 0.

5.3.5. Punto isoeléctrico

Para determinar este valor se llevó a cabo un gel de dos dimensiones que se muestra en la Figura 21. Para calcular el punto isoeléctrico (P.I.) se tomó en cuenta que la tira de isoelectroenfoque era de un tamaño de 7 cm y que iba de un un valor de pH de 3 a 10, tomando en cuenta el esto el punto isoeléctrico fue de 4.6 para la subunidad de 90 kDa.



Figura 21. Gel de 2 dimensiones realizado para la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*. El gel se corrió por una hora a 120 V usando condiciones no reductoras .

En la literatura no se ha reportado ningún valor de punto isoeléctrico experimental para una inulinasa de esta levadura, solo se ha estimado su valor a partir de algunas secuencias reportadas, estos P.I. van de 4.56 a 4.89. El valor encontrado de manera experimental se encuentra dentro de los predichos por las secuencias reportadas y por el estimado en este trabajo. Una vez obtenido el punto isoeléctrico se realizó la determinación de glicosilación en la muestra.

5.3.6. Determinación de las glicosilaciones en la inulinasa por medio de la tinción de Schiff y ensayos de desglicosilación

Reportes en la literatura indican que las inulinasas provenientes de hongos filamentosos y de levaduras contienen glicosilaciones (Nagem, y otros 2004), en el caso particular de la inulinasa obtenida de *Kluyveromyces marxianus* existen reportes en donde el grado de glicosilación es alrededor del 25% (Rouwenhorst , y otros 1990). Debido a esto se decidió determinar el grado de glicosilación en la enzima obtenida, para esto primero se realizó una electroforesis SDS-PAGE un gel de poliacrilamida al 10 por ciento y una vez terminada la electroforesis se llevó a cabo la tinción de Schiff.

Al llevar a cabo esta tinción en las muestras se observó el color rosa sobre las bandas de la proteína pura, indicando que esta se encuentra glicosilada.

Con la finalidad de conocer el grado de glicosilación, se realizaron ensayos de desglicosilación usando diferentes enzimas que son capaces de hidrolizar el enlace glicosídico entre la proteína y el carbohidrato. Como primer paso estos ensayos se realizaron en condiciones nativas cuyo resultado se muestra en la figura 22. Se observa un decremento cercano a 10 kDa en el peso molecular de la subunidad pero no se logra hidrolizar por completo los carbohidratos unidos a la enzima.

Este fenómeno se puede deber a que algunos carbohidratos presentan algún tipo de impedimento para que las enzimas hidrolíticas los procesen, debido a esto se llevaron a cabo ensayos en condiciones desnaturizantes para retirar en su totalidad los azúcares presentes en la muestra. Estos ensayos en condiciones desnaturizantes consistieron en colocar la muestra en SDS al 5% masa/volumen para posteriormente remover este detergente con agua y triton antes de colocarse en contacto con las enzimas desglicosilantes. Estas enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico son capaces de actuar en presencia de triton. Una vez que se retiraron los carbohidratos el peso molecular de la subunidad de la enzima es de cerca de 65 kDa mientras que la inulinasa glicosilada es de cerca de 90 kDa, observándose así un porcentaje de desglicosilación cerca del 28 %. Este valor es cercano al ya reportado por el grupo de Rouwenhorst y colaboradores en 1990, ya que ellos reportan una inulinasa de una

cepa de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 de 94 kDa sin deglicosilar y 64 kDa deglicosilada. -

Una vez obtenido este resultado se usó solo la enzima β -N-Acetilglucosamidasasa como única enzima para deglicosidar la muestra, con esto se encontró que con solo esta enzima es suficiente para retirar el carbohidrato de la proteína. Este ensayo se llevó a cabo ya que la muestra analizada por Rouwenhorst fue deglicosilada únicamente usando la enzima β -N-Acetilglucosamidasasa. Con este ensayo se encontró un resultado similar al reportado para la cepa CBS 6556 la cual presenta acetilglucosamina con manosa unidas a la inulinasa.

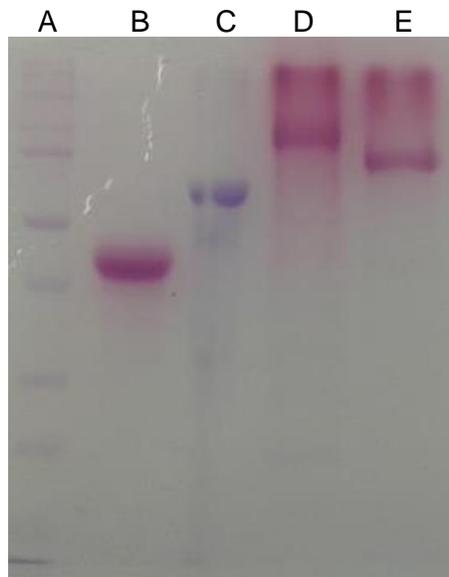


Figura 22. Ensayos de desglicosilación y tinción de Schiff, donde A marcador de peso molecular, B es el control positivo, C es la enzima deglicosilada (condiciones desnaturalizantes), D enzima sin desglicosilar y E enzima parcialmente deglicosilada (condiciones nativas)

5.3.7. Ensayos de estabilidad térmica

Con la finalidad de conocer la estabilidad térmica de la enzima se llevaron a cabo ensayos por dos métodos, el primero fue medir el radio hidrodinámico de la enzima sometida a diferentes temperaturas que fueron de 25°C a 70°C. En la Figura 23 se observa un proceso de desnaturalización de la enzima al aumentar la temperatura a más de 50°C ya que hay un aumento en el diámetro de la inulinasa. Durante el intervalo de temperatura entre 25°C y 50°C no se observa un cambio apreciable en el diámetro de la proteína por lo que podemos inferir que la proteína es estable hasta los 50°C.

Con estos valores obtenidos se planteó ver cómo era el comportamiento de la enzima, pero ahora desde la catálisis que lleva a cabo. Con esto en mente se midió la actividad enzimática residual que presentaba la proteína al estar sometida a incubación a diferentes temperaturas que fueron 40°C, 50°C y 60°C durante 24 horas.

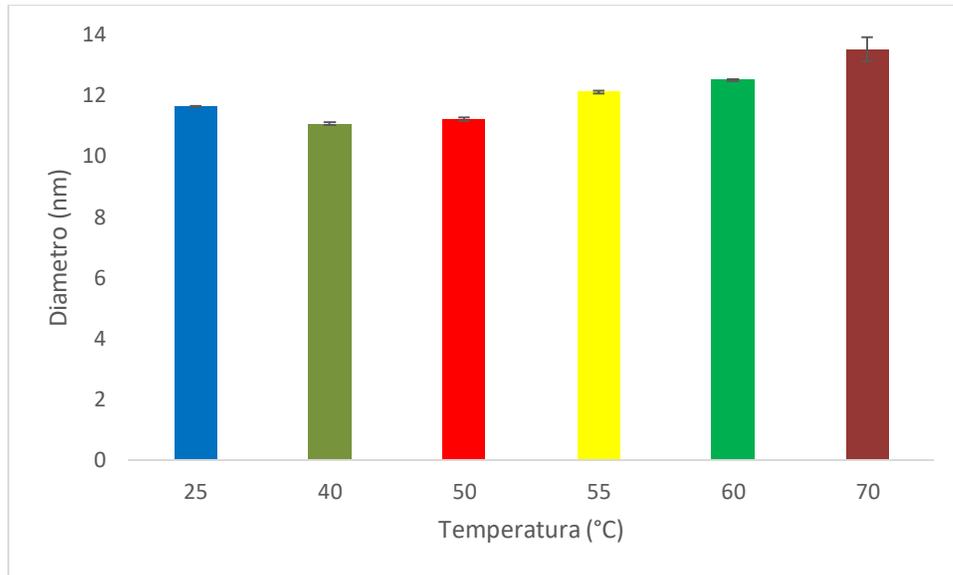


Figura 23. Diámetros hidrodinámicos de la inulinasa a diferentes temperaturas medidos en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2

En la Figura 24, se muestra la gráfica que representa la actividad residual de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* usando como sustrato a la inulina de agave, se observa que a la hora de incubación a 40 °C conserva alrededor del 90 por ciento de la actividad. Sin embargo, cuando se aumenta la temperatura 10° se pierde alrededor de 40 por ciento de la actividad original. Por otro lado, cuando la temperatura a la que se encuentra la inulinasa es 60°C por una hora, la actividad residual es cercana al 2 por ciento. Este resultado es de esperar ya que se puede apreciar que a los 10 minutos a esta temperatura hay un aumento en el radio hidrodinámico de 1.2 nm lo que significa un cambio a nivel estructural que afecta a su vez la catálisis de la proteína.

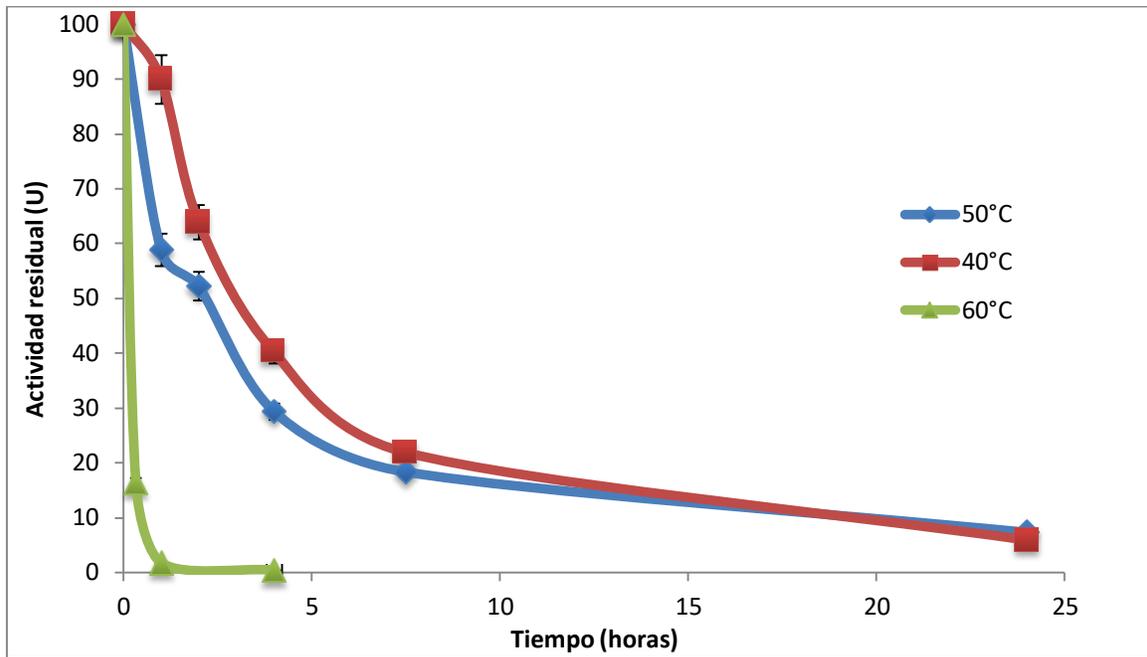


Figura 24. Actividad enzimática residual a diferentes temperaturas usando como sustrato a la agavina en buffer de fosfatos 50 mM pH 5.5

5.3.8. Caracterización cinética de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3

Se llevó a cabo la caracterización cinética de la inulinasa con la finalidad de ver que tan eficientes son hidrolizando los distintos sustratos empleados en este trabajo.

Como primer paso se llevó a cabo el ensayo de actividad enzimático monitoreando a distintos tiempos para conocer si estábamos en velocidad inicial a las condiciones (Figura 25).

La pendiente obtenida de la Figura 25 es la actividad de la inulinasa, esta pendiente se mantiene constante durante todo el tiempo del ensayo ya que el valor de la regresión lineal es cercano a uno (0.98) esto indica que esta reacción enzimática se encuentra en velocidad inicial a las condiciones del ensayo durante el intervalo de tiempo de trabajo.

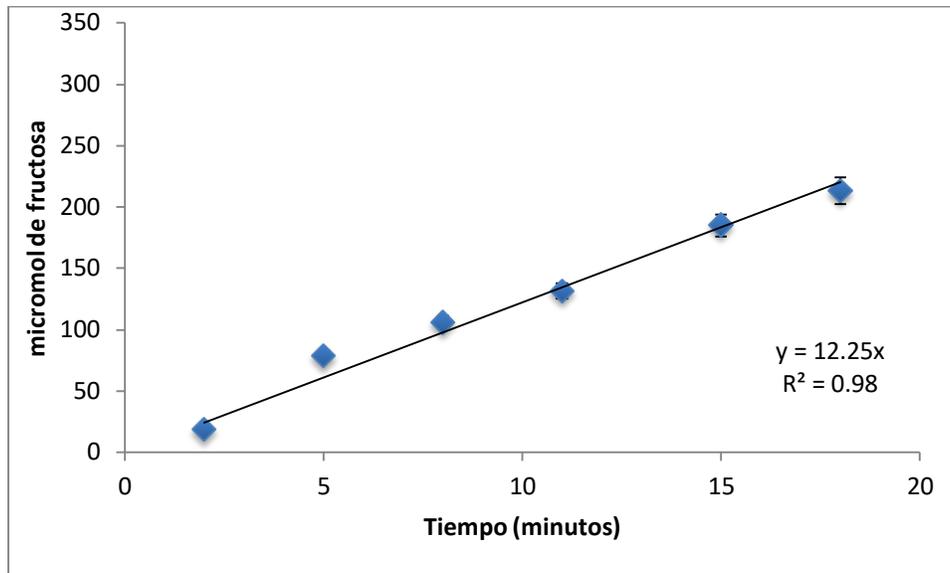


Figura 25. Curso temporal de la reacción de hidrólisis de la agavina a 50°C y pH 5.5

5.3.8.1. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

Para llevar a cabo estos ensayos primero se determinó cual era la mejor temperatura de reacción que fueron de 25°C a 70°C, estas reacciones se llevaron a cabo usando inulina de agave como sustrato. Se observa en la figura 26 que el máximo de actividad enzimática se obtiene cuando se trabaja a una temperatura de 50°C y si se sigue aumentando la temperatura se comienza a perder la actividad hasta un 90 por ciento de la actividad máxima como es el caso de la reacción a 70°C. Esta disminución de la actividad se debe a un proceso de desnaturalización como se observa en los ensayos de estabilidad térmica por dispersión dinámica de luz.

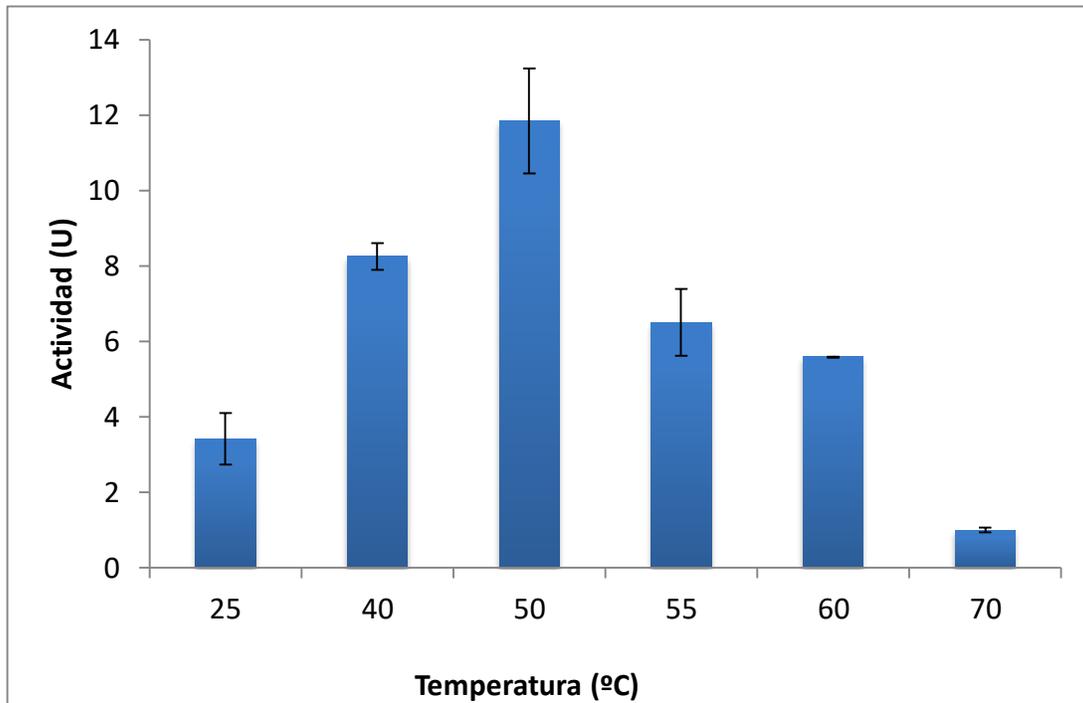


Figura 26. Actividad enzimática a diferentes temperaturas usando agavina como sustrato.

Una vez obtenido el mejor valor de temperatura que fue de 50°C se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática a diferentes valores de pH usando como buffer fosfatos a una concentración 50 mM en todos los casos (Figura 27).

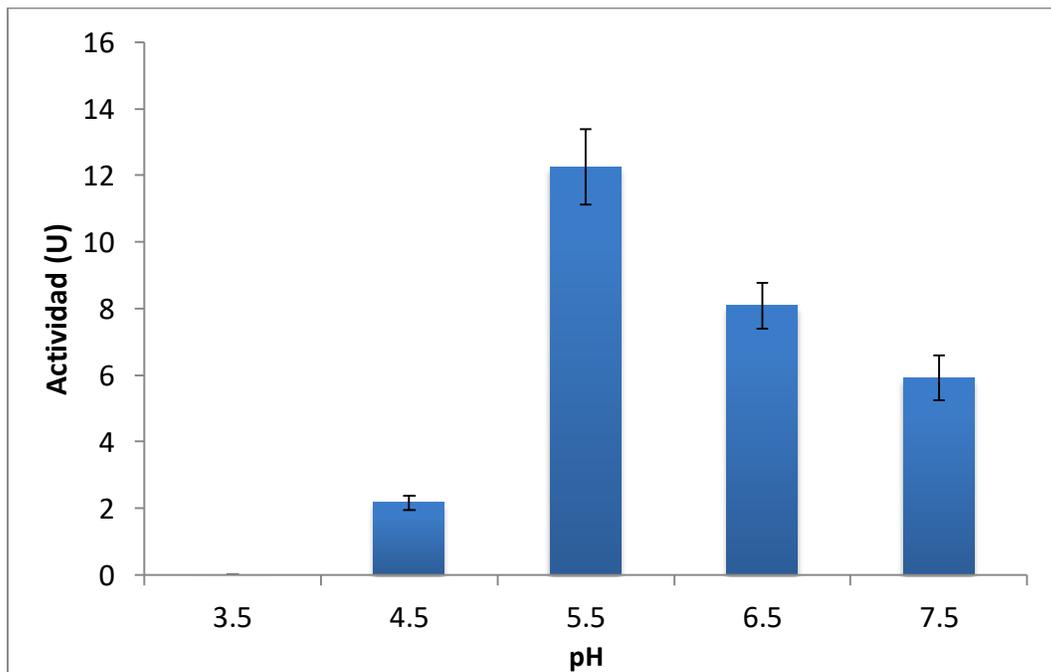


Figura 27. Actividad enzimática a diferentes valores de pH.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 27, se puede observar que la enzima es más activa a valores de pH ácidos que a valores cercanos a la neutralidad.

Los valores de pH y temperatura coinciden con algunos datos reportados que indican que las inulinasas de *K. marxianus* trabajan mejor a un temperatura entre 50 y 55°C y un pH de 5 aunque en estos trabajos se usó como sustrato residuos agroindustriales e inulina de achicoria (Mazzutti, y otros 2010) (Tovar-Castro, García-Garibay y Saucedo-Castañedo 2008).

Una vez obtenidos estos parámetros se realizaron ensayos con otros sustratos como la inulina de achicoria (enlace β -2,1), el levano (enlace β -2,6) y la sacarosa (actividad invertasa), con el fin de evaluar sobre que enlace presenta una mayor hidrólisis.

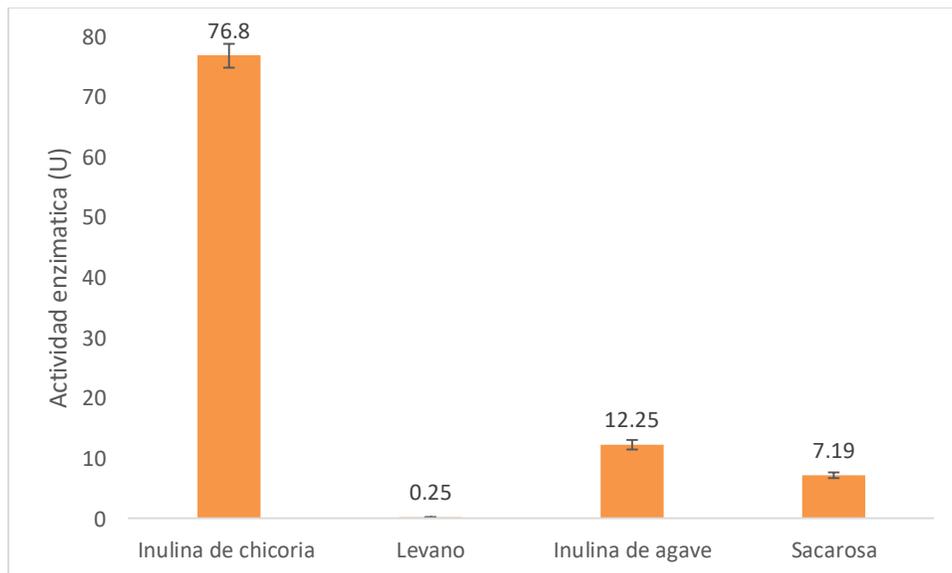


Figura 28. Actividad enzimática de 4 diferentes sustratos a pH 5.5 y temperatura de reacción de 50°C.

Como se observa en la figura 28, el sustrato que presenta una mayor actividad a temperatura de 50°C y pH 5.5 es la inulina de chicoria con un valor de 76.8 U, seguida por la inulina de agave con 12.25 U de actividad. El levano presenta la actividad más pequeña comparado con los otros polisacáridos con 0.25 U. Estos resultados muestran que la enzima, aunque es capaz de hidrolizar a la agavina la presencia de enlaces β -(2-6) disminuyen su actividad comparado cuando solo tiene que hidrolizar enlaces β -(2-1) como es el caso de la inulina de chicoria. En el caso de la hidrólisis de sacarosa, se ha reportado que en general la exo-inulinasas son capaces tanto de hidrolizar enlaces

β -(2-6) como de llevar a cabo la reacción de hidrolisis de la sacarosa (Rouwenhorst , Hensing, Verbakel, Scheffers, & Van Dijken, 1990, Arrizon, Morel, Gschaedler, & Monsan, 2011). Esto indica que la enzima tiene mejores características para hidrolizar la inulina lineal que otro tipo de carbohidratos.

Para discriminar que tipo de fructosilhidrolasa es, se llevó a cabo un cociente entre la actividad de invertasa y la actividad de inulinasa, si este cociente es menor que uno se le considera a la proteína como una inulinasa, en caso de ser mayor que uno es una invertasa. Para el caso de esta enzima el cociente es: $\frac{S}{I} = \frac{\text{Actividad invertasa}}{\text{Actividad de inulinasa}} = \frac{7.19}{76.8} = 0.09$ por lo cual esta proteína es una inulinasa.

5.3.8.2. Ensayos cinéticos de la inulinasa

Para poder llevar a cabo los ensayos cinéticos primero se determinaron las mejores condiciones de reacción para los sustratos a analizar que fueron la inulina de chicoria, inulina de agave y sacarosa. Los parámetros cinéticos para el levano no fueron determinados ya que la actividad enzimática obtenida fue muy baja. Las mejores condiciones para la inulina de agave fueron determinadas previamente en este trabajo y fueron temperatura 50°C y pH 5.5.

Para la inulina de chicoria primero se realizaron ensayos a diferentes temperaturas (40°C, 50°C y 60°C) para establecer cuál era la mejor, posteriormente ya con la temperatura establecida se usaron diferentes valores de pH (4.5, 5.5 y 6.5) para determinar el mejor pH. Se muestran los ensayos de temperatura y pH en la Figura 29.

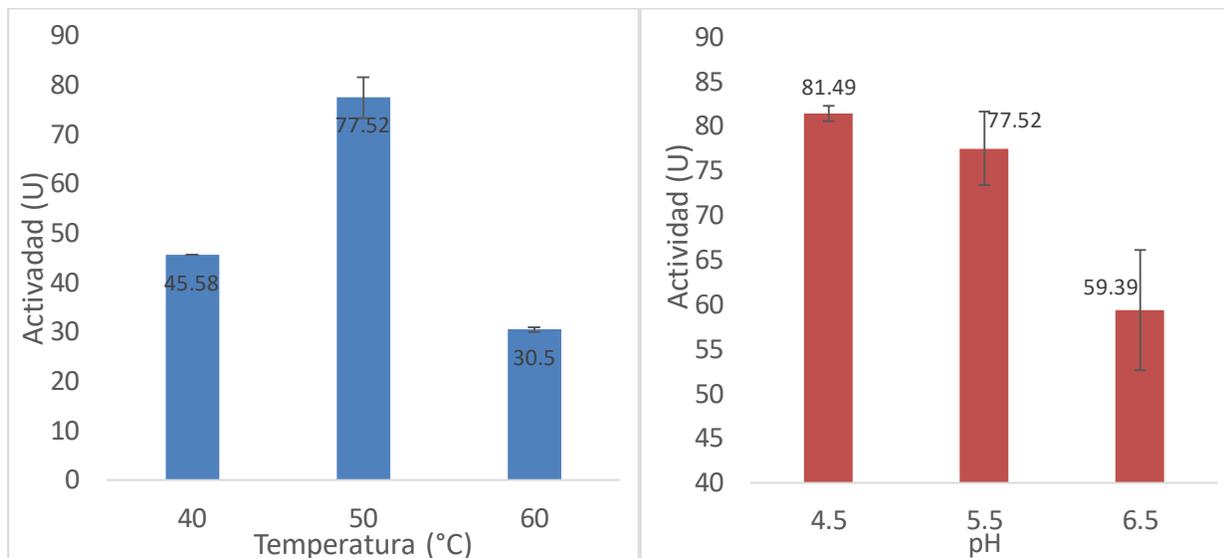


Figura 29 Actividad de la inulinasa a diferentes temperaturas y pHs usando como sustrato inulina de chicoria.

Se decidió trabajar con la temperatura de 50°C y el pH 4.5 como mejores condiciones de trabajo para la inulina de chicoria como sustrato. A pesar de estar muy cercanos los valores de actividad entre el pH 4.5 y 5.5 y de no haber diferencia marcada se decidió tomar como pH de trabajo 4.5 ya se reporta en bibliografía que la enzima producida por esta levadura tiene mejor actividad a pH cercanos a 4.5-5 (Treichel, y otros 2011).

Una vez obtenidos los valores de temperatura y pH para la inulina de chicoria, se procedió a determinar las mejores condiciones de trabajo para la actividad de invertasa. Para ello se realizó un proceso similar en el cual primero se determinó la mejor temperatura de reacción y posteriormente se ensayaron los distintos pH.

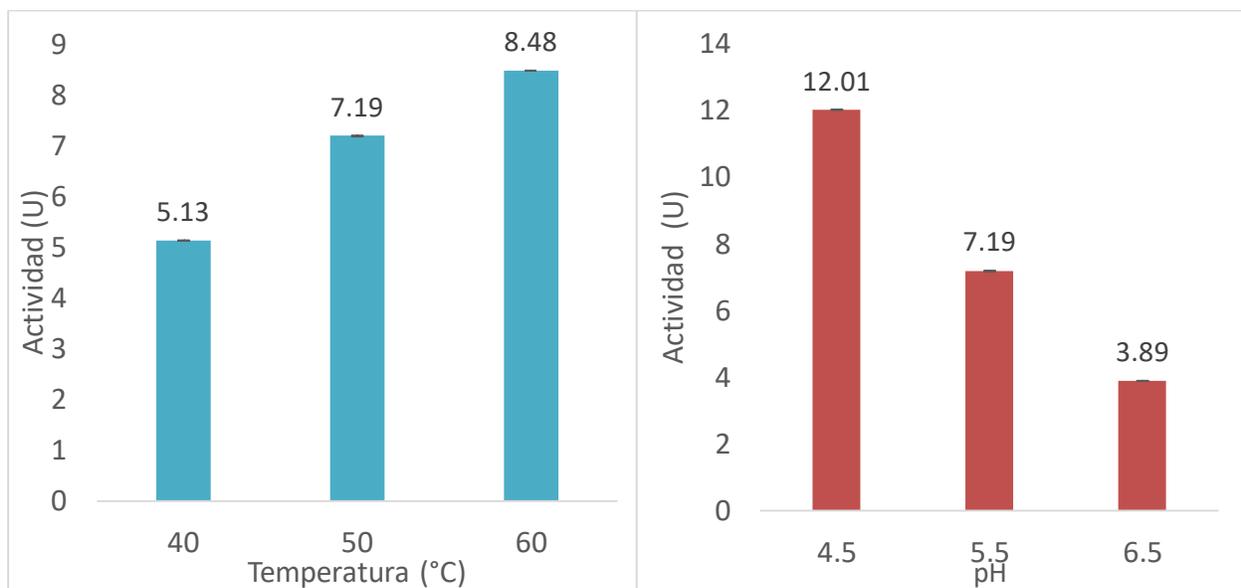


Figura 30. Actividad de la enzima a diferentes temperaturas y pHs usando como sustrato sacarosa.

Como se muestra en la Figura 30, la mejor temperatura de reacción fue de 60°C, con este dato se llevaron a cabo los ensayos variando el pH de la reacción entre los que destaco el pH 4.5 con una actividad superior a los demás valores. Estas condiciones de reacción (temperatura 60°C y pH 4.5) son similares a lo reportado por otros autores para inulinasas extraídas de esta levadura. (Kushi, Monti y Contiero 2000) (Treichel, y otros 2011) (Cruz-Guerrero, y otros 1995).

Tabla 8. Mejores condiciones de temperatura y pH para los sustratos empleados

Sustrato	Actividad máxima (U)	Mejor temperatura	Mejor pH
Agavina	12.25	50°C	5.5
Inulina de chicoria	81.49	50°C	4.5
Sacarosa	12.01	60°C	4.5

En la Tabla 8, se recopilan los datos con las mejores condiciones de reacción para cada sustrato, tomando en cuenta estos datos los parámetros cinéticos fueron determinados.

Para obtener los valores de concentración de los dos tipos de inulina se usó como referencia el peso molecular ya reportado en otros trabajos que para la inulina de chicoria es de 5000 Da (Leyva-Porras, y otros 2014) y para la inulina de agave es de 2960 Da (Toriz, Delgado y Zúñiga 2007). En la Figura 31 y 32 se muestra el comportamiento de la velocidad inicial con relación a la concentración de inulina de chicoria y de agave. Se observa que cuando se usa como sustrato la inulina de chicoria la catálisis tiene una mayor velocidad inicial a concentraciones similares, esto indica que la diferencia en los enlaces entre ambas inulinas juega un papel importante.

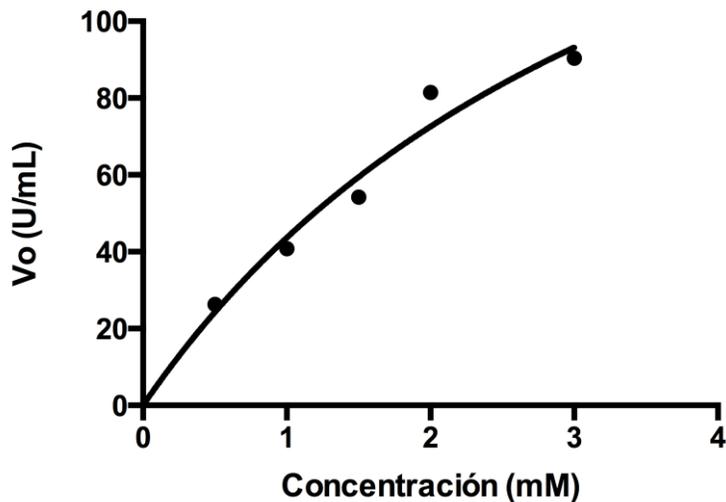


Figura 31. Cinética tipo Michaelis-Menten de la inulina de chicoria a pH 4.5 y temperatura de 50°C.

Usando el programa Prisma 6 se llevó a cabo el análisis de datos y obtención de los valores de velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten (K_m). En la figura 31 se muestra el comportamiento cinético entre la velocidad inicial y las distintas concentraciones de inulina de chicoria. El valor de velocidad máxima para la inulina de chicoria fue 215.3 U/mL, mientras que el valor de la K_m fue de 3.93 mM.

El comportamiento cinético para la inulina de agave se muestra en la Figura 32. A partir de estos datos se realizó el mismo procedimiento obteniendo un valor de velocidad máxima de 52.89 U/mL y una K_m de 11.79. Comparando ambas K_m (3.93 mM vs 11.79 mM) se observa que la enzima es más afín a la inulina de chicoria que a la inulina de agave ya que se requiere una cantidad menor de sustrato para llegar a la mitad de la velocidad máxima. El valor de K_m para la inulina de chicoria es más pequeño que el

valor reportado por (Arrizon, y otros 2011) que es de 7.16 mM, el de (Kushi, Monti y Contiero 2000) que es de 17.3 mM pero es similar al reportado por (Singh, Sook y Puri 2007) que es de 3.4 mM. Al comparar estos valores indican que la inulinasa proveniente de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 es una de las más afines a la inulina de achicoria que las enzimas reportadas los trabajos previamente mencionados. En lo que respecta a la inulina de agave el valor de K_m de este trabajo que es de 11.79 mM es ligeramente menor al reportado en el trabajo de (Arrizon, y otros 2011) que es de 12.9 mM.

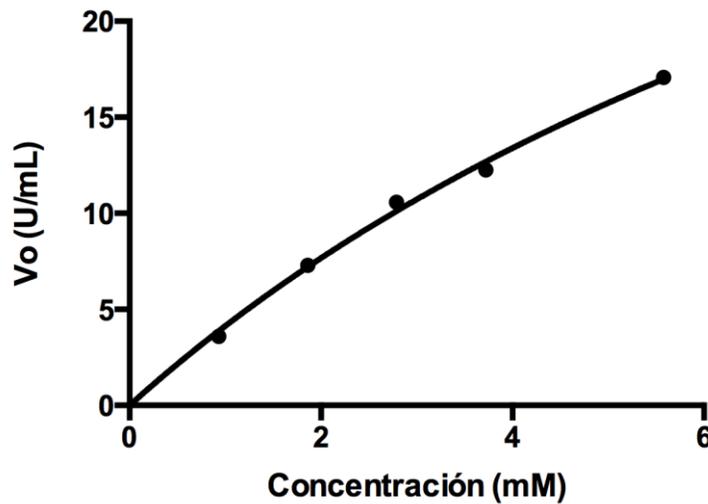


Figura 32. Cinética tipo Michaelis-Menten de la inulina de agave a un pH de 5.5 y una temperatura de 50°C.

Otro parámetro importante a calcular es la constante catalítica (K_{cat}), esta se calcula por medio de la siguiente ecuación $K_{cat} = \frac{V_{max}}{Enzima\ total}$ para ello se requiere tener la enzima pura y cuantificado, en el caso de este trabajo la cantidad de proteína que se colocó fue de 5.93 μg de proteína que fue determinada por el método de Bradford. Con ayuda del peso molecular previamente determinado que fue de 257 kDa se puede estimar la concentración de la enzima tomando en cuenta el volumen que se adicionó de enzima que fueron 17 μL .

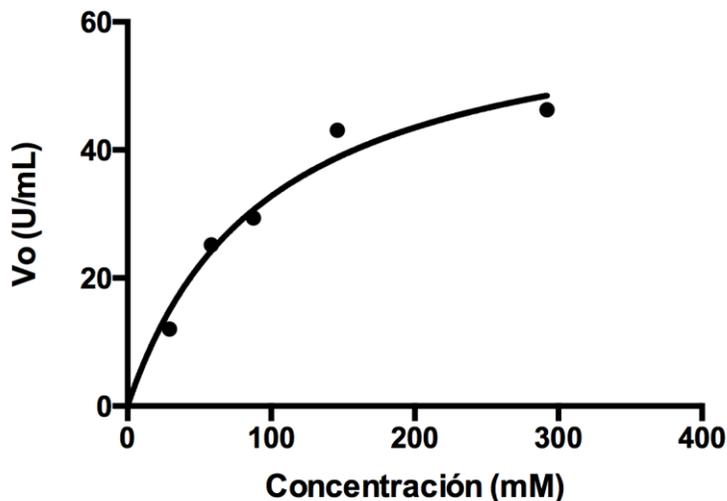


Figura 33. Cinética tipo Michaelis-Menten de la sacarosa a un pH de 4.5 y una temperatura de 60°C.

Tomando en cuenta todos estos datos se llevó a cabo el cálculo de la K_{cat} el cual fue de 1380.13 s^{-1} para la inulina de chicoria y de 339.04 s^{-1} para la inulina de agave. Estos valores indican que la enzima es capaz de procesar cerca del doble de moléculas de inulina de achicoria que de agave.

Por otro lado, el ensayo elaborado con sacarosa se muestra en la figura 33, se observa que tiene un comportamiento tipo Michaelis-Menten, a partir de estos datos se calculó de la misma forma que en los casos anteriores.

El valor de velocidad máxima para la sacarosa fue de 64.65 U/mL y el valor de la constante de Michaelis-Menten es de 97.30 mM de sacarosa, comparado con valores ya reportados en la bibliografía que son 13 mM (Treichel, y otros 2011) y 40.2 mM (Cruz-Guerrero, y otros 1995) la K_m de esta enzima es más grande, por lo cual es menos afín a este sustrato que las enzimas reportadas. La K_{cat} para este sustrato se calculó de la misma forma que los anteriores y el valor es de 414.42 s^{-1} .

En la Tabla 9, se muestra los datos del peso molecular, constante de Michaelis-Menten, constante catalítica y mejores condiciones para cada sustrato analizado, también se llevó a cabo el cálculo de la constante de especificidad (K_{cat}/K_m) para cada sustrato.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3

Sustrato	Peso molecular (g/mol)	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (s ⁻¹ *mM ⁻¹)	R
Inulina de chicoria	5000	3.93	1380.13	351.19	0.96
Inulina de agave	2690	11.79	339.04	28.76	0.99
Sacarosa	342	97.30	414.42	4.26	0.96

Al comparar las constantes de especificidad de los sustratos indican que la inulinasa extraída de la levadura *Kluyveromyces marxianus* ISO3 es más eficiente catalizando la hidrólisis de la inulina de achicoria que la de inulina de agave o sacarosa.

En 2010 Arrizon y colaboradores determinaron las constantes catalíticas para una inulinasa obtenida de *Kluyveromyces marxianus*. Ellos reportan un valor de K_{cat}/k_m de $0.90 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ para la inulina de agave mientras que en este trabajo se obtuvo un valor de 28.76. Esto indica que la enzima obtenida en este trabajo es 30 veces más eficiente en la hidrólisis de inulina de agave que la reportada por ese grupo.

Por otro lado, el valor de K_{cat}/k_m reportado por Arrizon para inulina de chicoria fue de $0.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ que comparado con el obtenido en este que fue de 351.19 $0.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ es 3500 veces más eficiente.

Estos resultados indican que esta enzima tiene una mejor eficiencia catalítica en la hidrólisis de inulina de agave y de achicoria que las inulinasas provenientes de *Kluyveromyces marxianus* reportadas en la literatura.

6. CONCLUSIONES

- Se logró identificar por técnicas moleculares al microorganismo con el que se está trabajando el cual es *Kluyveromyces marxianus*. Se obtuvo un valor de cobertura del 99 por ciento.
- En los ensayos con diferentes fuentes de carbono se encontró que se obtiene un mejor crecimiento cuando se usa glucosa como fuente de carbono y mayor producción de la enzima cuando se usa agavina.
- Se logró purificar la inulinasa proveniente de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 con un rendimiento del 4.01%
- Se encontró que la proteína tiene un porcentaje de glicosilación del 28 % y un punto isoeléctrico de 4.6.
- Se identificó por cromatografía en capa fina que la enzima solo produce fructosa y por lo tanto la enzima purificada es una exo-inulinasa.
- Se calcularon los parámetros cinéticos (Constante de Michaelis-Menten, constante catalítica) de la enzima pura los cuales fueron: sacarosa ($K_{cat}=414.42 \text{ s}^{-1} \text{ km}= 97.30 \text{ mM}$), inulina de achicoria ($K_{cat}=1380.13 \text{ s}^{-1} \text{ km}=3.93 \text{ mM}$) y agavina ($K_{cat}= 339.04 \text{ s}^{-1} \text{ km}=11.79 \text{ mM}$).
- La inulinasa producida por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 es 30 y 3500 veces más eficiente en la hidrólisis de agavina y achicoria respectivamente que las enzimas del mismo microorganismo reportadas en la literatura.

7. PERSPECTIVAS

Amplificar por medio de PCR la secuencia codificante de la inulinasa, para expresar la enzima de forma recombinante y comparar sus constantes catalíticas con la proteína silvestre.

Evaluar la actividad enzimática sobre inulina de otros tipos de agave.

Evaluar posibles efectos inhibidores de la enzima, así como posibles activadores.

Inmovilizar a la enzima para probar cuantos ciclos de reusó son posibles.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberto, F., Jordi, E., Henrissat, B., Czjzek, M. «Crystal Structure of Inactivated *Thermotoga Maritima* Invertase in Complex with the Trisaccharide Substrate Raffinose.» *Biochemical Journal*, 2006: 395-457.
- Almaraz-Abarca, N., E. Delgado-Alvarado, J. A. Ávila-Reyes, J. N. Uribe-soto, y L. S. González-Valdez. «The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae).» *Journal of biomaterials and nanobiotechnology* 4 (2013): 9-16.
- Arango, Oscar, Ginna Cuaran, y Juan Fajardo. «Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica.» *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 2008: 14-20.
- Arrizon, Javier, Sandrine Morel, Anne Gschaedler, y Pierre Monsan. «Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal.» *Bioresource Technology*, 2011: 3298-3303.
- Chi, Z. M., Z. Chi, T. Zhang, L. Liu, y L. Yue. «Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (2009): 211-220.
- Cimini, Sara, Luisa Di Paola, Alessandro Giuliani, Alessandra Ridolfi, y Laura De Gara. «GH32 family activity: a topological approach through protein contact networks.» *Plant Molecular Biology*, 2016: 401-410.
- Claessens, Guy, Andre Van Laere, y Maurice De Proft. «Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.).» *Journal of Plant Physiology*, 1990: 35-39.
- Cortés-Romero, Celso, Aíde Martínez-Hernández, Erika Mellado-Mojica, y Mercedes López. «Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from agave tequilana.» *PLOS one*, 2012: 1-13.
- CRT. CRT. 16 de Diciembre de 1993. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> (último acceso: 6 de Noviembre de 2017).
- Cruz-Guerrero, Alma, Ines García-Peña, Eduardo Barzana, Mariano García-Garibay, y Mariana Gomez-Ruíz. «*Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain.» *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995: 159-163.
- Davis, S., F. Dohleman, y F. Long. «The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock.» *Global Change Biology*, 2011: 68-78.
- Díaz-Montaño, D. M. «Continuous juice fermentation for producing bioethanol.» En *Biomass now-sustainable growth and use*. Guadalajara, 2013.

- Dorland, Lambertus, Johannis Kamerling, Johannes Vliegthart, y Mallur Satyanarayana. «Oligosaccharides isolated from Agave veracruz.» *Carbohydrate Research*, 1977: 275-284.
- Feng, Jun, y otros. «Construction of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for high purity levan production.» *Microbiology letters*, 2015: 1-7.
- Gombert, Andreas, José Madeira, María Cerdán, y María González-Siso. «*Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis .» *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016: 6193-6208.
- Gómez, Mario, y Fanny Acero. «Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal .» *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 2011: 74-82.
- Graciano-Fonseca, G., y E. Heinzle. «The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (2008): 339-354.
- Guillén, Amayelli. «Extracción y purificación de enzimas degradadoras de inulina (Inulinasas).» CDMX, Abril de 2015.
- Hai-Xiang, Zhou, Xin Fang-Hua, Chi Zhe, Liu Guang-Lei, y Chi Zhen-Ming. «Inulinase production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* with the disrupted MIG1 gene and the over-expressed inulinase gene.» *Process Biochemistry*, 2014: 1-8.
- Hothorn, Michael, Win Van den Ende, Willem Lammens, Vladimir Rybin, y Klaus Scheffzek. «Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010: 17427-17432.
- Irish, M., y G. Irish. *Agaves, Yuccas and related plants*. Portland: Timber Press, 2000.
- Kochhar, R., A. Gupta, y N. Kaur. «Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose.» *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27 (1999): 549-554.
- Kushi, R., R. Monti, y R. Contiero . «Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000: 63-69.
- Laloux, Olivier, Jean-Pol Cassart, Jean Delcour, Jozef Van Beeumen, y Jean Vandenhoute . «Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424.» *FEBS Letters*, 1991: 64-68.
- Lane, M., y J. P. Morrissey. «*Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow.» *Fungal Biology Reviews* 24 (2010): 17-26.
- Lertwattanasakul, Noppon, Nadchanok Rodrussamee, Savitree Limtong, Pornthap Thanonkeo, Tomoyuki Kosaka, y Mamoru Yamada. «Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitivity to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042.» *AMB Express*, 2011: 1-20.

- Leyva-Porras, César, Ana López-Pablos, Claudia Alvarez-Salas, y José Pérez-Urizar. «Physical properties of inulin and technological applications .» *Polysaccharides*, 2014: 1-22.
- Lopez, Mercedes, Norma Mancilla-Margalli, y Guillermo Mendoza-Diaz. «Molecular structure of fructans from agave tequilana Weber var. azul.» *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003: 7835-7840.
- Mancilla-Margalli, A., y M. G. López. «Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species.» *Journal of agricultural and food chemistry* 54, nº 20 (2006): 7832-7839.
- Marsella, Universidad de. *Carbohydrate active enzymes*. 2015. <http://www.cazy.org> (último acceso: 16 de Noviembre de 2015).
- Mazzutti, M, y otros. «Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation residues as substrates a comparative study.» *Applied biochemistry & biotechnology*, 2010: 682-693.
- Miller, G. L. «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.» *Analytical Chemistry* 31 (1959): 426-428.
- Nagem, R., y otros. «Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The enzyme fold and structural determinants of substrate recognition.» *Journal molecular Biology*, 2004: 471-480.
- Nandra, S., y I. Bhatia. «Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*.» *Phytochemistry*, 1979: 923-927.
- Nava-Cruz, Naivy, Miguel Medina-Morales, José Martínez, R. Rodríguez, y Cristóbal Aguilar. «Agave biotechnology: an overview.» *Journal Critical Reviews in Biotechnology*, 2015: 546-559.
- Nitsche, Saul, José Abrahao-Neto, y Andreas Karoly. «Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species.» *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011: 619-630.
- Olvera, C., E. Castillo, y A. López-Munguía. «Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa.» *Bioteología* 14 (2007): 327-345.
- Pandey, Kavita, Suresh Naik, y Babu Vakil. «Probiotics, prebiotics and synbiotics a review.» *Journal of food science and technology*, 2015: 1-11.
- Parsons, J., y J. Darling. «Maguey (*Agave* spp.) utilization in mesoamerican civilization: a case for precolumbian "pastoralism".» *Boletín de la sociedad botánica de México*, 2000: 81-91.
- Patel, S., y A. Goyal. «Functional oligosaccharides: production, properties and applications.» *World Journal of microbiology and biotechnology* 27 (2011): 1119-1128.
- Robert, Jessica. «Identificación y caracterización de cepas que emplean inulina ramificada como única fuente de carbono .» CDMX, Octubre de 2013.

- Rouwenhorst, Robert, Marco Hensing, John Verbakel, Alexander Scheffers, y Johannes Van Dijken. «Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556.» *Applied and environmental microbiology*, 1990: 3337-3345.
- Rouwenhorst, R. J., L. E. Visser, A. A. Van der Baan, W. A. Scheffers, y J. P. Van Dijken. «Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.» *Applied environmental microbiology* 54 (1988): 1131-1137.
- Sainz-Polo, M.A., Gonzalez-Perez, D., Gonzalez, B., Plou, F.J., Fernandez-Lobato, M., Sanz-Aparicio, J. «Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair GLN228/ASN254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis* beta-fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics.» *Journal of Biological Chemistry*, 2011: 19674-19686.
- Samygina, V.R., Popov, A.N., Cabo-Bilbao, A., Ochoa-Lizarralde, B., Goni-de-Cerio, F., Zhai, X., Molotkovsky, J.G., Patel, D.J., Brown, R.E., Malinina, L. «Enhanced selectivity for sulfatide by engineered human glycolipid transfer protein.» *Structure*, 2011: 1644-1654.
- Singh, R. S., B. S. Sooch, y M. Puri. «Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1.» *Bioresource technology* 98 (2007): 2518-2525.
- Singh, Ram, Rajesh Dhaliwal, y Munish Puri. «Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup.» *Journal of microbiology and biotechnology*, 2007: 733-738.
- Sokolenko, G. G., y N. A. Karpechenko. «Expresión de inulinase genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *kluyveromyces marxianus*.» *Microbiologiya* 84, nº 1 (2015): 37-42.
- Toriz, Guillermo, Ezequiel Delgado, y Virgilio Zúñiga. «A proposed chemical structure for fructans from blue agave plant (*Tequilana weber* var. azul) .» *e-Gnosis*, 2007: 1-5.
- Tovar-Castro, L, M García-Garibay, y G. Saucedo-Castañedo. «Lactase production by solid-state cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an effect of inoculum buffer, and nitrogen source.» *Applied biochemistry & biotechnology*, 2008: 610-617.
- Traub, Alfonso. «Achicoria: precursor de inulina.» *Ministerio de agricultura del gobierno de Chile*, 2014: 1-11.
- Treichel, H., y otros. «A review on the production and partial characterization of microbial inulinases.» *Global journal of biochemistry* 3 (2011): 1-13.
- Tuohy, K. M., G. C. Rouzaud, W. M. Bruck, y G. R. Gibson. «Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment.» *Current Pharmaceutical Design* 11 (2005): 75-90.
- Ulloa, J., H. Espinosa, G. Cruz, B. Ulloa, y J. Ramirez. «Los fructanos y su papel en la promoción de la salud.» *Fuente*, 2010: 57-62.

Van der Ende, Win, Willem Lammens, Andre Van Laere, Lindsey Schroeven, y Katrien Le Roy. «Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes.» *The FEBS Journal*, 2009: 5788-5798.

Verhaest , M., y otros. «Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor.» *New phytologist*, 2007: 90-100.

Vijin, I., y S. Smeekens. «Fructan: more than a reserve carbohydrate? .» *Plant Physiology* 120 (1999): 351-359.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, y J. Taylor. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. New York: Academic Press, 1990.