

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

---

**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**REGULACION DE LA SINTESIS Y EXCRECION DE  
ENZIMAS EXTRACELULARES DE *Kluyveromyces marxianus***



**TESIS**

**Que para obtener el grado académico de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOTECNOLOGIA)**

Presenta:  
Alma Elizabeth Cruz Guerrero

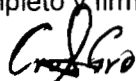
## JURADO:

Presidente: Dr. Eduardo Bárzana García  
Vocal: M. en C. J. Mariano García Garibay  
Vocal: M. en C. Alejandro Azaola Espinoza  
Secretario: M. en C. Lorena del C. Gómez Ruiz

Sitio donde se desarrolló el tema:

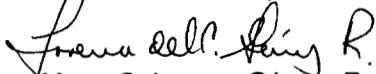
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Nombre completo y firma del sustentante:

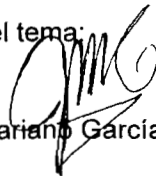


Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Nombre completo y firma de los asesores del tema:



M. en C. Lorena Gómez Ruiz



M. en C. Mariano García Garibay

**A MI MAMÁ**  
**con amor, por lo que**  
**este trabajo representa**

**Por su amistad y apoyo,  
con profundo agradecimiento  
a Lorena y Mariano.**

**A mis compañeros de laboratorio  
por todo su apoyo y amistad**

## **INDICE**

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>3. GENERALIDADES</b>	<b>3</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>6. METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>67</b>

## 1. RESUMEN

---

Se estudió la influencia del oxígeno disuelto y la temperatura de crecimiento en la síntesis de endo-poligalacturonasa producida por *Kluyveromyces marxianus*, encontrándose que a 3.3 mg de O.D. / l. la producción de endo-poligalacturonasa se reprimió y además, que la temperatura no ejerció ningún efecto sobre la síntesis de dicha enzima como se había reportado. Así mismo, también se realizaron estudios del efecto de la concentración de glucosa la cual presentó una inducción en la síntesis de la enzima tanto en condiciones anaerobias como aerobias en un rango de concentración de 0.2-2%. Con 2-desoxiglucosa se observó que la cepa más resistente fue la CDBBL-278 y se favoreció la producción de la endo-poligalacturonasa.

Se realizaron estudios de inducción y represión catabólica bajo diferentes fuentes de carbono en la síntesis de inulinasa producida por distintas cepas de *Kluyveromyces marxianus*, y se estableció que la inulina y el glicerol resultaron ser los mejores inductores de inulina, además la fructosa funciona como inductor a bajas concentraciones pero como represor a altas concentraciones, y finalmente se caracterizó a la cepa CDBBL-278 como hiperexcretora e hiperproductora de inulinasa.

## 2. INTRODUCCION

---

*Kluyveromyces marxianus* es una levadura de grado alimenticio que produce enzimas de interés industrial, tales como,  $\beta$ -galactosidasa (lactasa), endo-poligalacturonasa (pectinasa) y  $\beta$ -fructofuranosidasa (inulinasa). Dicha levadura ha sido ampliamente utilizada en la producción de proteína unicelular (García-Garibay y col. 1987., Reed y Nagodawithana, 1991), y también se utiliza para producir industrialmente la lactasa. Sin embargo, las otras enzimas, antes mencionadas, que produce esta levadura podrían tener un potencial económico. Por ejemplo, la endo-poligalacturonasa se ha probado en la clarificación de jugo de manzana (Gomez-Ruiz y col., 1988), maceración de tejidos vegetales (Kobayashi y Matsuo, 1979., Lim y col. 1980), y estabilización de la "nube" en jugo de naranja (Krop y Pilink, 1974). De igual forma, la utilización de inulinasas ha sido ampliamente estudiada para la producción de jarabes fructosados a partir de inulina, la cual es un polisacárido de fructosa que se obtiene de Alcachofa de Jerusalem (Giraud y Galzy, 1990, Vandame y Dericke, 1983). Esta enzima puede presentar un interés especial en México dado que el *Agave sp.* que se encuentra ampliamente distribuido en el país acumula cantidades importantes de inulina (Blanco-Sánchez, 1979).

Dado el potencial económico que podría tener la producción de inulinasa y endo-poligalacturonasa, es necesario realizar estudios para establecer las condiciones óptimas de producción. En el presente trabajo se pretende estudiar algunos de los mecanismos de regulación de la síntesis y excreción de enzimas extracelulares (inulinasa y pectinasa) de *Kluyveromyces marxianus* ya que no existe información suficiente. En este trabajo se estudiaron los efectos de inducción y represión en diferentes cepas de *K. marxianus* y el efecto de diferentes factores ambientales como oxígeno disuelto y temperatura.



### 3. GENERALIDADES

---

#### 3.1 ENZIMAS

Las enzimas presentan diversas ventajas sobre los catalizadores químicos. Una de las más importantes es su especificidad, no sólo para determinadas reacciones, sino también en su discriminación entre partes similares de moléculas (regioespecificidad) o entre isómeros ópticos (estereoespecificidad). Esta especificidad se limita a una sola molécula o a un grupo muy restringido de sustancias químicas relacionadas con ella, y excluye reacciones colaterales, con lo que se eliminan subproductos indeseables; esto se traduce en un incremento de la productividad. Además, el producto se genera sin contaminantes, lo que reduce los costos de recuperación y purificación. Aun más, ciertas reacciones estereoespecíficas (por ejemplo, la conversión de glucosa a fructosa), no pueden llevarse a cabo por los métodos químicos clásicos sin un gran consumo de tiempo y esfuerzo. Las enzimas catalizan las reacciones bajo condiciones moderadas de temperatura, presión y pH. Esto disminuye los requerimientos energéticos, y por tanto, los costos de capital por el uso de equipo resistente a la corrosión. Las altas velocidades de reacción y la estricta regulación catalítica de las reacciones enzimáticas permiten un incremento en la productividad, con costos de producción relativamente bajos, como resultado de costos indirectos y de mano de obra más económicos (Chaplin y Bucke, 1990).

Existen algunas desventajas en el uso de enzimas que no pueden ser ignoradas; en particular, el alto costo de su aislamiento y purificación, así como su naturaleza generalmente inestable cuando son removidas de su medio natural (Chaplin y Bucke, 1990).

Las enzimas se encuentran en cualquier organismo vivo: plantas, animales o microorganismos. Estos últimos son la fuente preferida a nivel industrial (Smith, 1988; Chaplin y Bucke, 1990), debido a que la producción presenta ventajas importantes que reditúan económicamente, tales como:

- 1) la síntesis de enzimas es más predecible y controlable;
- 2) se cuenta con un amplio espectro de características, tales como intervalos de pH, resistencia a altas temperaturas;
- 3) existe suficiente disponibilidad de materias primas con una composición relativamente constante;
- 4) su producción no está sujeta a variaciones estacionales, ni existe riesgo de escasez por cambios climáticos o situaciones geográficas,

- 5) la manipulación genética ha incrementado considerablemente las posibilidades de optimizar los rendimientos a través de mutaciones, de selección de cepas y de condiciones de crecimiento y más recientemente, mediante la tecnología del DNA recombinante.
- 6) diseño de enzimas mejoradas por ingeniería de proteínas.

Del centenar de enzimas que se utiliza en la industria, más de la mitad se obtienen a partir de hongos y levaduras, poco más de la tercera parte son de origen bacteriano y la porción restante se divide entre fuentes animales (8%) y vegetales (4%) (Chaplin y Bucke, 1990).

La tabla 3.1 muestra una estimación de la producción mundial y de los valores relativos de ventas de las principales enzimas de aplicación industrial. Se observa que la producción de pectinasas es relativamente baja en comparación con las tres primeras enzimas de la tabla, no obstante, el valor relativo de ventas de las pectinasas es el 10% del total, de donde se deduce el alto valor que poseen (Smith, 1988), por lo que es importante estudiar la producción de dicha enzima para disminuir los costos y de esta forma aumentar la productividad.

Como se mencionó, las levaduras constituyen un importante grupo en cuanto a la producción de diversas enzimas comerciales, aunque no específicamente en el rubro de las pectinasas e inulinasas. La investigación realizada hasta la fecha en el campo de las pectinasas e inulinasas de levaduras es relativamente escasa, lo que constituye una seria limitante para su aplicación en procesos industriales.

TABLA 3.1  
PRODUCCION MUNDIAL ANUAL DE ENZIMAS INDUSTRIALES

Enzima	Toneladas de enzima *	Valor relativo de ventas (%)
Proteasa de Bacillus	500	40
Glucoamilasa	300	14
Amilasa de Bacillus	300	12
Glucosa isomerasa	50	12
Amilasa fúngica	20	3
Pectinasa	20	10
Proteasa fúngica	10	1

\* Producción en 1986.  
(Smith, 1988)

### 3.2 LEVADURAS

Las levaduras son los agentes responsables de tres de nuestros más importantes alimentos -pan, vino y cerveza-, además éstas también producen etanol el cual es utilizado universalmente. Históricamente, se dice que los hombres aprendieron a manufacturar dichos productos por el año 6000 a.C., sin embargo, en esos tiempos todavía no se descubría la existencia de los microorganismos. Fué hasta el año de 1680 cuando van Leeuwenhoek descubrió diminutos animalitos en diferentes muestras; cuando examinó una gota de la fermentación de cerveza observó las levaduras, describiéndolas como pequeños cuerpos esféricos o elipsoidales. Después, en el año de 1837 Cagniard de la Tour observó que de las paredes de los diminutos animalitos (que se encontraban en las cubas de fermentación de cerveza) brotaban yemas como las que salen de las semillas al germinar, siendo esta la forma de multiplicarse de las levaduras. Investigaciones posteriores le dejaron convencido de que ningún cocimiento de cebada y lúpulo se convertía en cerveza de no estar presentes las levaduras, vivas y en pleno desarrollo, "A la acción de estas levaduras se debe la transformación de la cebada en alcohol". A partir de esta época fué cuando realmente se iniciaron investigaciones sobre la manera de actuar de las levaduras (Phaff y Miller, 1978, Kruif, 1981, Reed y Nagodawithana, 1991).

Las levaduras se usan para elaborar diferentes productos tales como bebidas alcohólicas, en panificación, y como fuente de proteína unicelular, es por esto que tienen gran importancia en biotecnología. Además, a partir de dichos microorganismos se producen enzimas que son importantes a nivel industrial (amilasas, proteasas, lactasa e invertasa) y otras con un gran potencial en la industria de alimentos (lipasas, pectinasas e inulinasas) (Reed y Nagodawithana, 1991, Verachtert y De Mot, 1990).

Las levaduras son un grupo de microorganismos que filogenéticamente pertenecen al reino fungi, y se agrupan principalmente en dos clases: Ascomycotina y Basidiomycotina (Kurtzman, 1991). Existen aproximadamente 60 géneros y 500 especies (Lachance, 1993); su forma predominante es la unicelular; su reproducción vegetativa, puede ser por gemación o por fisión (Kurtzman y Robnett, 1991).

Con base en la clasificación de levaduras, se sabe que el microorganismo *Kluyveromyces marxianus* es una levadura ascospórogena, pertenece al grupo de los Eumycota del tipo Hemiascomycetes que se encuentra dentro de la clase Ascomycotina. Es del orden Endomycetales; de la

familia Saccharomicetaceae y subfamilia Saccharomycetoideae; del género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*. Produce de 1 a 4 ascosporas, su forma va de reniforme a media luna, puede fermentar glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-xilosa e inulina. No asimila nitrato. Crece a 37 °C (Kreger-van Rij, 1984).

## 4. ANTECEDENTES

---

Através de los años *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* ha sido reclasificada taxonómicamente. En los 50's , Lodder y Kreger-van Rij la agruparon en el género *Saccharomyces* llamándola *S. fragilis* y *S. marxianus*, las cuales producían ascosporas lunadas en contraste con las ascosporas redondas del resto de las especies clasificadas bajo el mismo género. Posteriormente, en 1970 Lodder considera la forma de las ascosporas como fundamental y las reclasifica bajo el género *Kluyveromyces*, llamándolas, *K. fragilis* y *K. marxianus* respectivamente. En 1984, Kreger-van Rij considerando la infertilidad de las especies *K. fragilis* y *K. marxianus* decide fusionarlas en *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* (Reed y Nagodawithana, 1991).

*Kluyveromyces marxianus var. marxianus* es una levadura de grado alimenticio que ha sido utilizada para la producción de proteína unicelular a partir de suero de leche (Mayrath y Bayer, 1979, Reed y Nagodawithana, 1990). Además, ésta levadura produce varias enzimas de interés tecnológico, estas son: lactasa, la cual es producida a nivel industrial (Castillo, 1990), pectinasa (Phaff, 1966., Wimborne y Rickard, 1978) e inulinasa (Vandamme y Derycke, 1983., Giraud y Galzy, 1990).

### 4.1 ENZIMAS

#### **Inulinasa**

La habilidad de ciertas levaduras de fermentar la inulina se observó por primera vez en 1900 por Linder quién mostró que *K. marxianus var. marxianus* fermentaba la inulina. Estas observaciones se confirmaron y extendieron posteriormente en 1913 por Grafe y Vouk y en 1914 por Kluyver. Posteriormente en 1933 Sacceti establece que *K. marxianus* también fermenta la inulina (Snyder y Phaff, 1960).

La inulinasa ( $\beta$ -fructo fructano hidrolasa EC 3.2.1.7.) es la responsable de la degradación de la inulina liberando moléculas de fructosa de azúcares que presentan enlaces  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$  tales como: sacarosa, rafinosa, estaquiosa y oligosacáridos de inulina o levano (Barman, 1969, Grootwassink y Fleming, 1980). Esta enzima es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 450 kDa, consiste de 4 subunidades de proteína, y contiene 26 a 37% de carbohidrato (manosa) (Rouwenhorst y col., 1990).

La inulinasa tiene un pH óptimo entre 4.5 y 5.5; su temperatura óptima esta entre 50 y 55 °C y a 60 °C pierde rápidamente su actividad catalítica; se reportan valores de Km en inulina y sacarosa de 8 y 21 mM respectivamente. La actividad enzimática de esta enzima puede ser inhibida por  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y fenilhidrazina (Negoro, 1978., Vandamme y Dericke, 1983). Cruz-Guerrero y col. (1990) reportan que la inulinasa producida por *K. marxianus* var. *marxianus* CDBB-L-278 tiene un pH óptimo de 5 tanto en inulina como en sacarosa, su temperatura óptima en inulina es de 50 °C y para sacarosa de 70 °C, y valores de Km en inulina y sacarosa de 3 y 40 mM respectivamente.

La inulinasa puede tener diferentes aplicaciones: 1) Producción de fructosa. Dicho azúcar es importante dado que su poder edulcorante es mayor que el de la sacarosa y glucosa. La fructosa se puede obtener directamente de las frutas, por inversión de la sacarosa o por isomerización de glucosa, el cual es un proceso que involucra el uso de varias enzimas lo que conlleva a una elaboración muy costosa y laboriosa. Otra opción de obtener jarabes fructosados podría ser a partir de extractos vegetales con alto contenido de inulina, la cual es un polímero de fructosa, que es fácilmente hidrolizado por la inulinasa. Así por ejemplo, Byun y Nahm (1978) hidrolizaron los azúcares de la Alcachofa de Jerusalem con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*, Grootwassink y Fleming (1980) reportan que la hidrólisis enzimática presenta varias ventajas sobre la hidrólisis química, tales como, menor tiempo de reacción, mayor rendimiento y no hay desarrollo de colores ni sabores indeseables, 2) Producción de etanol. Pocas son las levaduras capaces de asimilar la inulina y tolerar una considerable concentración de alcohol, entre ellas se encuentra *Kluyveromyces marxianus* que tiene la capacidad de producir inulinasa con lo cual asimila la inulina y es capaz de producir alcohol en grandes cantidades, y 3) Producción de proteína unicelular (Verachtert y De Mot, 1990).

### **Poligalacturonasa**

*K. marxianus* (y su forma imperfecta *Candida pseudotropicalis*) es, entre las levaduras, la que mayor actividad pectinolítica presenta; produciendo únicamente la endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15); ésta se produce en forma extracelular y no requiere de metales como cofactores (Luh y Phaff, 1951., Makoto y Okamoto, 1957). La endo-poligalacturonasa de ésta levadura es específica para los ácidos poligalacturónicos y oligogalacturónicos, teniendo preferencia por las cadenas más grandes (Demain y Phaff, 1954); sin embargo, puede degradar la pectina limitadamente, con una velocidad y grado de hidrólisis que varían en relación inversa al grado de esterificación del sustrato con esteres metílicos (Luh y Phaff, 1954, Philliskish, 1979).

La pectinasa de *K. marxianus* es un sistema multienzimático formado por cuatro endo-poligalacturonasas, a las que se denominan enzima I enzima II, enzima III y enzima IV, sus propiedades se encuentran en la tabla 4.1.

TABLA 4.1  
PROPIEDADES DE ENDO-POLIGALACTURONASAS DE  
*Kluyveromyces marxianus*

Enzima	pI	M (daltones)	pH	T (°C)	Km (mg/ml)
Enzima I	6.1	46 000	4-5	50	0.31
Enzima II	6.1	50 000	4-5	50	0.23
Enzima III	5.8	30 000	4-5	50	0.50
Enzima IV	5.7	46 000	4-6	50	-

pI: punto isoeléctrico, M: peso molecular, T y pH son los óptimos, y los valores de Km dados son para ácido péctico.

Las cuatro enzimas son glicoproteínas, cuyo principal carbohidrato es la manosa; las cuatro son estables entre valores de pH de 3.5 y 6.0, y a temperaturas mayores que 50 °C, pero pierden la mayoría de su actividad a 70 °C. Para las cuatro enzimas, su acción sobre el ácido péctico es rompiéndolo al azar para generar ácidos oligalacturónicos (Lim y col., 1980, Barnby y col., 1990).

Actualmente las pectinasas comerciales son producidas por *Aspergillus niger*, sin embargo, mediante este proceso se obtiene una gran cantidad de enzimas y otros metabolitos que también son excretados por el microorganismo haciendo que la purificación de dichas enzimas sea muy costosa y finalmente se obtienen mezclas de diferentes pectinasas (principalmente pectinestearasa, poligalacturonasa y polimetilgalactouronasa) (Forgaty, 1983, Harsa y col., 1993).

El principal y más antiguo uso que se da a las pectinasas, es como coadyuvantes en la clarificación del jugo de manzana; también se utiliza en jugo de uva, vinos, sidras y vinagres con el mismo propósito. En lo que respecta a los estudios realizados sobre la posible utilización comercial de la endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* se tiene el trabajo de Kobayashi y Matsuo (1979), que la utilizaron para macerar el líber para la elaboración de pulpa de papel; otros autores han reportado que esta enzima es efectiva en su acción macerativa en tejidos de papa y zanahoria (Lim y col., 1980), y tan efectiva

como la poligalacturonasa de *Aspergillus kawachii* y mejor que las poligalacturonasas de zanahoria y tomate para macerar papa y ramio (Ozawa y col., 1961). En cuanto a su capacidad para clarificar, Luh y Phaff (1951) reportan que la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* fué capaz de hacerlo en una solución de 2% de pectina cítrica. Por otra parte, Gómez-Ruiz y col. (1988) reportan que la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* mostró ser tan efectiva en la clarificación de jugo de manzana, como la pectinasa comercial.

## 4.2 PRODUCCION Y REGULACION CATABOLICA DE ENZIMAS

El control de la expresión genética es un mecanismo básico en los organismos vivos. En los microorganismos, la glucosa y otras fuentes de carbono (rápidamente metabolizables) reprimen la expresión de genes de enzimas relacionadas con él metabolismo de otras fuentes de carbono. Este fenómeno se conoce como represión catabólica. El grado de represión causado por glucosa depende fuertemente de la enzima afectada y la cepa usada; en algunos casos la disminución en los niveles de la enzima causados por glucosa es paralela a la disminución de la concentración de mRNA, esto se puede deber a que la glucosa afecta la transcripción o la estabilidad del mRNA, o a ambas. Las levaduras están sujetas a represión catabólica pero los mecanismos de acción son poco claros, y los sistemas de represión catabólica más estudiados son en *Saccharomyces cerevisiae* (Elorza y col., 1977, Gancedo, 1992), aunque también existe otras levaduras de importancia biotecnológica que podrían ser estudiadas y tomadas como modelos.

La represión por glucosa es el principal sistema de regulación en levaduras en la expresión de un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. En presencia de glucosa, la síntesis de las enzimas de la gluconeogénesis, del ciclo de Krebs, la respiración y otras específicas para la asimilación de galactosa, maltosa y sacarosa son fuertemente reprimidas (Rose y col., 1991).

En 1987, Johnston realiza una recopilación de las investigaciones realizadas para lograr establecer un mecanismo de regulación para asimilación de galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*, y en general, se ha establecido que dicho modelo involucra diferentes genes que codifican varias enzimas: GAL1 (kinasa), GAL7 (transferasa), GAL10 (epimerasa) y GAL5 (mutasa). La melobiosa también es consumida por la levadura pero después de su hidrólisis a disacárido por la  $\alpha$ -galactosidasa (codificada en el gen MEL1). La galactosa



entra a la levadura mediante una permeasa específica (codificada en el gen GAL2). Los genes que codifican las enzimas de este modelo de regulación están agrupados en circuito: la expresión es inducida por el crecimiento en galactosa y reprimida durante el crecimiento en glucosa. El circuito responsable de la regulación de la expresión de los genes GAL está bien definido, el principal aporte del modelo fue establecido por Douglas y Hawthorne en los 60's y posteriormente fue refinado por subsecuentes trabajos. Los elementos esenciales del modelo de regulación de galactosa (GAL) son: los genes GAL1, GAL7, Y GAL10 los cuales están agrupados en el cromosoma II, pero separadamente se transcriben los promotores individuales; y los genes GAL2 y MEL1 están en el cromosoma XII. El gen GAL4 codifica la proteína que activa los 5 genes anteriores por el enlace de la misma en el sitio de cada gen. El gen GAL80 codifica una proteína que se une directamente con la proteína del gen GAL4 para prevenir de esta forma la activación de la transcripción. El inductor impide que la proteína del gen GAL80 inhiba la proteína del gen GAL4, mediante un enlace con la proteína GAL80. El inductor puede disociar la proteína GAL4 sin romper el complejo proteínico. En ausencia de galactosa la proteína del gen GAL80 se une a la proteína del gen GAL4 evitando así la expresión de los genes GAL1, -2, -7 y -10, y MEL1; durante el crecimiento en galactosa el inductor impide el funcionamiento del complejo de proteínas de los genes GAL80 y GAL4 obteniéndose la expresión de los cinco genes. El inductor es una pequeña molécula no identificada cuya síntesis probablemente es catalisada por el producto del gen GAL3 (Johnston, 1987).

Por otra parte, aunque las enzimas de la glucólisis son consideradas como constitutivas, existe evidencia de un cierto grado de inducción por la glucosa para diferentes enzimas en algunas especies de levaduras, por ejemplo en un híbrido de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces dozhanskii* la actividad de todas las enzimas de la glucólisis, excepto de la alcohol deshidrogenasa, aumentaron de 10 a 20 veces más en un medio de glucosa que en comparación con un medio de acetato. Sin embargo, en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* los efectos fueron mucho menores o ausentes, y en algunas cepas solo hubo un efecto en kinasas. Estudios sobre el control de crecimiento por glucosa y otras fuentes de carbono pueden ser una área de investigación a futuro muy interesante (Rose y Harrison, 1987).

### **Inulinasas**

*Kluyveromyces marxianus* es capaz de producir inulinasa utilizando diferentes fuentes de carbono, sin embargo, la biosíntesis de inulinasa se induce en presencia de inulina. Dicha enzima está sujeta a mecanismos de inducción y represión catabólica; así por ejemplo, cuando se cultiva ésta en

presencia de inulina o rafinosa se obtiene rendimientos muy elevados, mientras que cuando se utiliza como fuente de carbono fructosa, glucosa, galactosa y manitol a altas concentraciones los rendimientos son muy bajos (Vandame y Dericke, 1983, Verachert, 1990). De acuerdo con lo reportado por Grootwassink y Hewitt (1983 y 1984) en un cultivo continuo (condiciones de no represión catabólica) revelan que la fructosa (a bajas concentraciones) es el inductor fisiológico primario de la inulinasa, y que además, se pueden usar otras fuentes de carbono satisfactoriamente para la producción de la enzima. Así por ejemplo, con sacarosa se pueden obtener grandes rendimientos de inulinasa.

Grootwassink y Hewitt (1983) realizaron estudios sobre los factores ambientales y genéticos que regulan la formación de inulinasa en *Kluyveromyces marxianus* NCYC-1429 y una cepa mutante derivada de la misma, reportando que en cultivo por lotes y utilizando como fuente de carbono glucosa, fructosa y sacarosa, casi al final de la fermentación (a las 24 horas) se produce el 80% de la enzima, por lo que se puede decir que la alta concentración inicial (1%) de fuente de carbono causa represión catabólica. Mientras que cuando se usó la inulina como fuente de carbono, se observa un aumento gradual en la producción de la enzima alcanzándose 10 U/mg al final de la fase exponencial de crecimiento (24 horas). Posteriormente realizaron estudios en cultivo continuo para poder establecer que la glucosa, fructosa y sacarosa ejercen represión catabólica a una concentración de 1%, pero en concentraciones más bajas inducen la producción de la inulinasa. Así mismo, realizaron el aislamiento de una cepa mutante (por cultivo continuo) la cual compararon con su cepa original observando las siguientes producciones:

Fuente de <u>Carbono</u>	Inulinasa Total (U/mg)	
	<u>Cepa tipo</u>	<u>Cepa mutante</u>
Inulina	10	19
Sacarosa	2	9
Glucosa	2	7
Fructosa	2	6
Lactosa	1	11
Glicerol	3	32

concluyendo que se aisló una mutante constitutiva que también puede ser inducida por substratos específicos (inulina y glicerol) pero desreprimida a glucosa, fructosa y sacarosa.

Kirby y Davies (1970) reportan que la inulinasa producida por *Kluyveromyces fragilis* se encuentra asociada a la pared celular, en donde es retenida por una barrera permeable. En 1984, Workman y Day mencionan que

la barrera esta conformada por enlaces disulfuro. Sin embargo, la actividad enzimática puede ser detectada tanto en el caldo de fermentación como en las células (es decir, extra- e intracelularmente) (Grootwassink, 1980, Vandame y Dericke, 1983).

El cultivo de la levadura para producción de inulinasa se realiza en condiciones aerobias (2.5-40% de oxígeno disuelto) a una temperatura de 30-35°C y a un pH de 5.0 (Snyder y Phaff, 1962, Grootwassink y Fleming, 1980).

### **Poligalacturonasa**

Estudios realizados por Luh y Phaff (1951) sobre la regulación de la síntesis de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* indican que esta enzima es producida constitutivamente en condiciones de baja aireación. Posteriormente Wimborne y Rickard (1978) postulan que esta enzima es producida de forma parcialmente constitutiva, después de observar que la adición de pectina al medio de cultivo incrementa al doble la producción de la enzima. García-Garibay y col. (1987) realizaron estudios de producción de la pectinasa en medio con lactosa y en suero de leche con pectina observando un efecto de desrepresión en condiciones aerobias. Lo cual indica que la enzima puede ser inducida por la pectina en cultivo aerobio.

Wimborne y Rickard (1978) reportan que cuando la levadura es crecida en medio con pectina como fuente de carbono el crecimiento es muy pobre. Estudios similares fueron realizados por Vivar y col. (1991) observando que *K. marxianus* no usa como fuente de carbono la pectina, ácido poligalacturónico y ácido galacturónico; pero si utiliza la glucosa, galactosa y glicerol.

Vivar y col. (1990), realizaron estudios con *K. marxianus*, en los cuales se demostró que cuando se usa como fuente de carbono la glucosa, el ácido galacturónico y ácido poligalacturónico tienen un efecto inductor (casi igual a la pectina), mientras, que cuando se usa glicerol como fuente de carbono el ácido poligalacturónico y galactosa tienen un mayor efecto inductor que la pectina mientras que el ácido galacturónico no induce la producción de la enzima en estas condiciones. Federici (1985) realizó estudios con *Cryptococcus albidus* la cual produce una poligalacturonasa que puede ser inducida por ácido galacturónico y pectina.

La aireación a la que se efectúa la fermentación es un aspecto importante que afecta la producción de la enzima y la morfología de *Kluyveromyces marxianus*. García-Garibay y col. (1987) estudiaron la influencia del oxígeno en la producción de pectinasa, reportando que a niveles de alta aireación en

fermentador la producción de la enzima es completamente reprimida (en suero de leche y medio de lactosa) mientras que en condiciones anaerobias la enzima si es producida, también encontraron que la mayor productividad se da en condiciones microaerobias. Wimborne y Rickard (1978) en un estudio similar pero en medio de glucosa, encontraron este mismo efecto, estableciendo que la producción de la enzima se ve reprimida con un nivel de oxígeno disuelto del 60%, mientras que a 0% la enzima se desreprime. Sin embargo, se requiere de una investigación más amplia para determinar en que rango de saturación de oxígeno se desreprime la producción de endo-poligalacturonasa.

Vivar y col. (1990) estudiaron el efecto de la temperatura de crecimiento y el pH inicial del medio en la producción de endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*, encontrando que a mayor temperatura (en un rango de 30 a 45°C) mayor producción de enzima y que el pH inicial no fué determinante ni en el crecimiento ni en la producción de la enzima.

Otro aspecto importante a estudiar en la producción de la endo-poligalacturonasa es la represión catabólica que puede ejercer la glucosa, dado que, generalmente los estudios sobre la producción de dicha enzima se han realizado utilizando como fuente de carbono la glucosa. Esto se puede fundamentar en el hecho de que enzimas de levaduras y otros microorganismos se pueden ver reprimidas por altas concentraciones de glucosa. Así por ejemplo, la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* se reprime con 1% de glucosa mientras que a 0.1% se desreprime (Elorza y col., 1977). Así mismo, Federici (1985) reporta que la producción de poligalacturonasa por *Cryptococcus albidus* se ve reprimida a 0.2% de glucosa y sacarosa respectivamente.

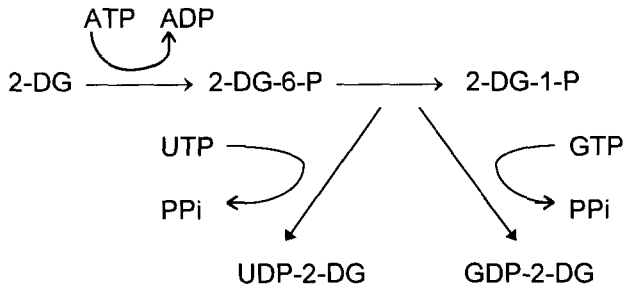
Para el estudio de regulación de la producción de la endo-poligalacturonasa por represión catabólica se usara la 2-desoxiglucosa la cual es un análogo no metabolizable de glucosa pero que si se transporta al interior de la levadura simulando que es consumido por el microorganismo (Royt y Macquillan, 1976).

### **4.3 EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA EN LEVADURAS**

La 2-desoxiglucosa es un análogo estructural de la glucosa. Este no puede ser metabolizado por la levaduras, y por tanto es un inhibidor competitivo para la asimilación de hexosas en sus diferentes caminos metabólicos (Van Den Broek y col., 1986). Este compuesto es un inhibidor letal en el crecimiento de levaduras; el primer efecto que puede verse es en la síntesis de glucanos y

manosa lo cual provoca lisis osmótica debido al debilitamiento de la pared celular (Rose y Harrison, 1987).

El mecanismo bioquímico se basa en la incorporación de la 2-desoxiglucosa dentro de nucleótidos con la posibilidad de entrar al metabolismo de la célula.



La inhibición de la síntesis de polisacáridos se debe al atrapamiento de 2-desoxiglucosa en nucleótidos y al efecto competitivo de nucleótidos que contienen dicho compuesto en las reacciones normales. A altas concentraciones de 2-desoxiglucosa se atrapa una cantidad sustancial de fosfato como 2-desoxiglucosa-6-fosfato (2-DG-6-P) y el contenido de ATP en la célula se disminuye en gran medida. Por lo que las levaduras mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa se han aislado debido a que no tienen la hexoquinasa o a que presentan una fosfatasa específica para la 2-desoxiglucosa-6-fosfato (Rose y Harrison, 1987, Biely y col., 1971).

Los efectos que provoca la 2-desoxiglucosa en la morfología de las levaduras pueden ser explicados por los cambios que se dan en su metabolismo; esto ha sido estudiado por varios autores para diferentes levaduras, entre las cuales se encuentra *Saccharomyces cerevisiae* y *K. marxianus*. Lo que se ha propuesto es:

1) Interferencia de la 2-desoxiglucosa en el transporte y fosforilación del sustrato, dando como resultado el bloqueo de la fosfato isomerasa o en algún otro paso de la glucólisis por los productos fosforilados.

2) Inhibición de glucólisis en las levaduras por acumulación de 2-desoxiglucosa-6-fosfato, la cual impide la entrada de azúcar a la célula.

3) La resistencia a 2-desoxiglucosa es debida a la presencia de una fosfatasa intracelular que previene la acumulación de 2-desoxiglucosa-6-fosfato (enzima constitutiva en una mutante de *S. cerevisiae*) ( Heredia y col., 1964).

4) Inhibe el crecimiento por disminución de las reservas celulares de uridín nucleótidos necesarios para la biosíntesis de polisacáridos, dicha disminución resulta de la acumulación de uridín-difosfato-2-desoxiglucosa (UDP-2-DG).

5) Se ha observado un efecto lítico en la pared celular que se desencadena con la 2-desoxiglucosa, y esto es debido a que dicho compuesto se incorpora o porque el UDP-2DG inhibe la inserción de glucosa en la pared celular (Byron, 1968).

Por otra parte, dado que la 2-desoxiglucosa es un análogo de la glucosa, ésta puede ser utilizada para simular la presencia de hexosas durante las fermentaciones, de tal forma que si la biosíntesis de alguna enzima está reprimida por la glucosa, la 2-desoxiglucosa ejercerá la misma función.

Se han realizado diferentes investigaciones para seleccionar levaduras mutantes desreprimidas a hexosas usando la 2-desoxiglucosa como un agente selectivo. Por ejemplo, mutantes de *Schwanniomyces castelli* para producción de amilasa (Dhawale e Ingledew, 1983), *S. carlsbergensis* para invertasa (Toda, 1976) y *S. cerevisiae* para maltasa (Zimmermann y Scheel, 1977).

Bajon y col. (1984) reportan el aislamiento de una levadura mutante de *Pichia polymorpha* que está desreprimida a la glucosa y es hiperproductora de inulinasa, dicho microorganismo fué aislado después de un tratamiento con etilmetanosulfonato (EMS) y seleccionado por su crecimiento en un medio de cultivo con 2-desoxiglucosa, reportando que un 0.01% de el agente selectivo como una concentración adecuada para permitir el crecimiento de esta levadura.

Grootwassink y Tsang (1985) estudiaron la posibilidad de aislar mutantes (utilizando N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, NTG) de *K. marxianus* desreprimidas a hexosas e hiperproductoras de inulinasa por dos métodos: 1) crecimiento de las mutantes en medios de cultivo con elevadas concentraciones de glucosa (4 u 8%) y además también una gran cantidad de inulina (4%). La selección de dichos microorganismos se realizó al identificar zonas claras (en placas de agar con inulina) alrededor de las colonias mutantes, o por el crecimiento en el mismo medio de cultivo líquido, 2) aislamiento de mutantes utilizando la 2-desoxiglucosa como agente selectivo, el cual se adiciona al medio de cultivo y se establece que los microorganismos capaces de crecer se

encuentran desreprimidos a hexosas, aunque dichos investigadores mencionan que las mutantes seleccionadas de esta manera no son muy estables.

Bourgui y col. (1986) realizaron el aislamiento de una cepa mutante de *K. marxianus* desreprimida e hiperproductora de inulinasa, este microorganismo fué aislado después de haber sido tratado con EMS y se seleccionó en un medio de cultivo que contenía 2-desoxiglucosa (0.05%). Además, realizaron estudios con diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa e inulina) para lograr establecer diferencias entre la cepa original y la mutante, con lo cual finalmente pudieron concluir que se aisló una cepa resistente a la 2-desoxiglucosa ligeramente hiperproductora e hiperexcretora de inulinasa, y además, dicha cepa fué menos sensible a la represión catabólica, pero no totalmente libre de ella.

## 5. OBJETIVOS

---

1) Estudiar el efecto de los factores ambientales (Oxígeno disuelto y Temperatura) en la regulación de la síntesis de endo-poligalacturonasa de *K. marxianus*.

2) Estudiar la influencia de la pectina en la síntesis de endo-poligalacturonasa de *K. marxianus*.

3) Realizar estudios de represión catabólica por glucosa en la producción de endo-poligalacturonasa de *K. marxianus*.

4) Estudiar la influencia de diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa en la síntesis de endo-poligalacturonasa y en la morfología de diferentes cepas de *K. marxianus*.

5) Realizar estudios de inducción y represión catabólica en la síntesis de inulinasa bajo diferentes fuentes de carbono.

6) Evaluar el uso de la 2-desoxiglucosa como agente selectivo de cepas desreprimidas productoras de inulinasa.



## 6. METODOLOGIA

---

### 6.1 PRODUCCION DE ENZIMAS

#### 6.1.1 Microorganismo

Para éste estudio se utilizaron cuatro cepas de *Kluyveromyces marxianus*, las cuales se seleccionaron de acuerdo a sus características como se menciona a continuación:

1) Cepa CDBBL-278: productora de pectinasa e inulinasa, proviene de la Colección de cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del IPN de México.

2) Cepa UCD-C-351: productora de pectinasa, proporcionada por el Dr. Bor S. Luh del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de California en Davis, California.

3) Cepa NCYC-587: productora de  $\beta$ -galactosidasa, ataca la pectina, con una temperatura óptima de crecimiento de 44 °C. Proviene de la Colección Nacional de Levaduras de Norwich, Reino Unido.

4) Cepa NCYC-1429: productora de inulinasa y lactasa, con una temperatura óptima de 42.4 °C. Proviene de la Colección Nacional de Levaduras de Norwich, Reino Unido.

#### 6.1.2 Medios de cultivo

Se describen los medios de acuerdo a la actividad en que se utilizaron:

6.1.2.1. Para estudios de las condiciones ambientales en la síntesis de Poligalacturonasa (Oxígeno Disuelto y Temperatura).

Se preparó con agua destilada con 0.1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05% de  $\text{MgSO}_4$ , 0.05%  $\text{KHPO}_4$ , 0.2% de extracto de levadura y 0.2% de glucosa.

6.1.2.2. Para estudiar el efecto de la Pectina en la síntesis de Poligalacturonasa.

Se preparó de la misma forma que el mencionado en 6.1.2.1. adicionando 0.8% de pectina.

6.1.2.3. Para estudiar el efecto de la Glucosa en la síntesis de Poligacturonasa.

Se preparó de la misma forma que el mencionado en 6.1.2.1, utilizando las siguientes concentraciones de glucosa: 0.2, 0.6, 1, 1.5, 2%.

6.1.2.4. Para el estudio del efecto de la 2-desoxiglucosa en la síntesis de Poligalacturonasa.

Se preparó de la misma forma que el mencionado en 6.1.2.1. adicionando las siguientes concentraciones de 2-desoxiglucosa: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6%, y se adicionó glucosa hasta obtener un 1% de fuente de carbono en total en cada caso.

6.1.2.5. Para la producción de Inulinasa

Se preparó en agua destilada con 1% de inulina y 0.5% de extracto de levadura.

6.1.2.6. Para el estudio del efecto de la 2-desoxiglucosa en la síntesis de Inulinasa.

Se preparó de la misma forma que el 6.1.2.5, adicionando 0.01, 0.05 y 0.1% de 2-desoxiglucosa.

6.1.2.7. Para estudiar las fuentes de carbono en Inulinasa

Se preparó de la misma forma que el 6.1.2.5 sustituyendo la inulina por una cantidad igual de glucosa, fructosa o glicerol según el caso.

6.1.2.8. Para el estudio de la represión e inducción de la síntesis de Inulinasa.

Se preparó en agua destilada con 0.67% de Yeast Nitrogen Base (Difco), 0.1% de Sulfato de Amonio y 0.25% de Fuente de Carbono (glucosa, fructosa, inulina o glicerol según el caso).

6.1.2.9. Para el estudio de cepas desreprimidas productoras de inulinasa.

El medio líquido se preparó en agua destilada con 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 4% de glucosa y 4% de inulina; para preparar el medio sólido se adicionó 2% de agar bacteriológico.

NOTA: Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.0 con soluciones diluidas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaOH. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C.

### **6.1.3 Condiciones de cultivo**

#### **6.1.3.1. Fermentador**

Se utilizó un fermentador New Brunswick BioFlo II C. El volumen de trabajo fué de 1000 ml y 0.4 vvm de aireación. La agitación, temperatura (T) y oxígeno disuelto (O.D.) se especifican para cada fermentación. Para controlar la espuma, en caso necesario, se adicionó 1 ml de antiespumante de silicón.

#### **6.1.3.2. En matraces**

Para los cultivos aerobios se utilizaron matraces erlenmeyer de 500 ml tapados con algodón. Los cultivos anaerobios se realizaron en matraces erlenmeyer de 500 ml y el medio se desoxigenó burbujeando nitrógeno durante 1 min, y tapando la boca del matraz con tapón de hule y Parafilm. En todos los casos, los matraces se incubaron a 30 °C con una agitación de 200 r.p.m. en un agitador con incubadora ambiental New Brunswick modelo G24. Los volúmenes de trabajo fueron de 50 ml.

## **6.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE endo-POLIGALACTURONASA E INULINASA**

La actividad enzimática se midió determinando el aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944) a partir de soluciones de ácido poligalacturónico para pectinasa, y de sacarosa para inulinasa, para lo cual fué necesario elaborar los reactivos que a continuación se mencionan:

#### **6.2.1. Reactivo 1**

Solución A: en 800 ml de agua destilada se disolvieron

- 25 g de carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 25 g de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- 20 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 200 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

Aforando a un litro

Solución B: en 200 ml de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y se disolvieron 30 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

Para preparar el reactivo se mezcló un ml de la solución B y 25 ml de la solución A.

#### **6.2.2. Reactivo 2.**

Solución A: en 450 ml de agua destilada se disolvió

- 21 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 25 g de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

Solución B: en 25 ml de agua destilada se disolvieron 3 g de arseniato de sodio Heptahidratado ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Se mezclaron lentamente y con agitación las soluciones y se aforaron a 500 ml. Posteriormente se calentó a 55 °C durante 30 minutos.

#### 6.2.3 Técnica

- Se colocó en un tubo de ensaye 1 ml de la muestra problema y se adicionó 1 ml del reactivo 1
- Fué incubado durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo
- Se retiró del baño de agua y se dejó enfriar
- Se agregó 1 ml del reactivo 2 y agitó vigorosamente
- Se agregó 17 ml de agua destilada y se agitó
- Se tomaron las lecturas en el espectrofotometro a 520 nm

#### 6.2.4 Curva patrón

Para realizar esta curva se preparon soluciones de 0.0004 g/ml de ácido galacturónico para la determinación de endo-poligacaturonasa o fructosa y glucosa para inulinasa, las cuales se diluyeron a diferentes concentraciones para cubrir un intervalo de 0 a 500 mg/ml.

#### 6.2.5 Determinación de actividad enzimática de Poligalacturonasa

Se utilizó como preparación enzimática el sobrenadante que se obtuvo después de centrifugar a 3500 r.p.m. durante 15 minutos el caldo de fermentación.

- 1) Se preparó una serie de 5 tubos de ensaye y se adicionó 1 ml del reactivo 1
- 2) Se colocaron 9.9 ml de solución de ácido poligalacturónico 0.1% (preparado en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0) y se incubó en un baño de agua a 30 °C, posteriormente se agregó 0.1 ml de la solución de enzima.
- 3) Se tomaron muestras de la mezcla de reacción de 1 ml a 1, 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Estas muestras se colocaron en cada uno de los tubos que contenían el reactivo 1 con lo cual se detuvo la reacción enzimática.
- 4) Una vez que se habían tomado todas las muestras se continuó con la técnica del método de Somogyi-Nelson.

#### 6.2.6 Determinación de actividad enzimática de Inulinasa

Esta actividad enzimática se determinó: a) en el caldo de fermentación con células (actividad total) y b) en el sobrenadante obtenido después de haber

centrifugado durante 15 minutos a 3500 r.p.m. el caldo de fermentación (actividad extracelular).

1) Se preparó una serie de 5 tubos de ensaye y se agregó 1 ml del reactivo 1

2) Se adicionaron 9 ml de solución de sacarosa al 4% (preparado en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0) y se incubó en un baño de agua a 50 °C, posteriormente se agregó 1 ml de la solución de enzima.

3) Se tomaron muestras de la mezcla de reacción de 1 ml a 1, 2, 3 y 4 minutos respectivamente. Estas muestras se colocaron en cada uno de los tubos que contenían el reactivo 1 con lo cual se detuvo la reacción enzimática.

4) Una vez que se habían tomado todas las muestras se continuó con la técnica del método de Somogyi-Nelson.

### **6.2.7 Definición de unidad**

Una unidad de endo-poligalacturonasa (UPg) se definió como la cantidad de enzima que produce un micromol de azúcar reductor por minuto, a 30 °C y pH 5.0.

Una unidad de inulinasa (UI) se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de azúcar reductor por minuto a 50 °C y pH 5.0.

## **6.3 DETERMINACION DE BIOMASA.**

### **6.3.1. Concentración de biomasa**

Se determinó midiendo la turbiedad a una longitud de onda de 650 nm y dicha lectura se correlacionó con una curva patrón de absorbancia vs. peso seco de levadura.

### **6.3.2 Curva patrón**

- Se inocularon matraces con medio para levadura y se colocaron en una incubadora con agitación a una temperatura de 30 °C y durante 18 horas.

- Del medio anterior se hicieron diluciones para determinar la turbiedad a 650 nm de cada una.

- Posteriormente se paso un volumen conocido de cada dilución a través de membranas de Millipore con poros de 0.45 µm de diámetro (previamente puestas a peso constante).

- La biomasa retenida en la membrana se lavó con agua destilada y desionizada y se seco en una estufa con vacío a 60 °C hasta peso constante.

## **6.4 DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO**

El oxígeno disuelto se midió mediante el método de Winkler (Franson, 1976, Douglas, 1992) para lo cual fué necesario preparar los reactivos que a continuación se mencionan.

### **6.4.1. Reactivos**

6.4.1.1. Sulfato de Manganeso: se pesaron 36.5g de  $MnSO_4$  y se disolvieron en agua destilada aforando a 100 ml.

6.4.1.2. Yoduro de Potasio-Hidroxido de Sodio: se pesaron 15 g de KI y se disolvieron en 25 ml de agua destilada, se añadieron 66 ml de NaOH al 50% y se aforó a 100 ml.

6.4.1.3. Almidón: se pesaron 2 g de almidón soluble y se disolvieron en 1000 ml de agua destilada hirviendo y se continuó su calentamiento hasta que la solución era transparente.

6.4.1.4. Tiosulfato de Sodio: se hirvió un litro de agua destilada durante 5 minutos y se añadieron 6.35 g de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  y 0.1 g de  $Na_2CO_3$ . Se agitó hasta disolución total y se guardó en frasco de vidrio en la oscuridad.

### **6.4.2. Técnica**

1) A una muestra de 250-300 ml se adicionaron 2 ml de la solución de sulfato de manganeso por debajo de la superficie y evitando que penetraran burbujas de aire.

2) Posteriormente se adicionó 1 ml de la solución de Yoduro de potasio-Hidróxido de sodio por debajo de la superficie evitando que penetraran burbujas de aire.

3) Se tapó la botella cuidando que no quedara retenido el aire, y se invirtió 15 veces.

4) Cuando el precipitado se había sedimentado 3 cm por debajo del tapón se adicionó 1 ml de  $H_2SO_4$  concentrado por debajo de la superficie.

5) Se tapó y mezcló hasta que el precipitado se redisolvió.

6) Se midieron 200 ml de la muestra y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 500 ml.

7) Se valoró con la solución de tiosulfato hasta que palideció el color del yodo y posteriormente se adicionaron 2 ml de la solución de almidón y se continuó valorando hasta la desaparición del color azul.

## **6.5. DETERMINACION DE VIABILIDAD DE LEVADURAS**

La viabilidad de las levaduras se determinó por tinción con azul de metileno para lo cual se preparó el siguiente reactivo:

Reactivo: se disolvió 0.01g de azul de metileno en 10 ml de agua destilada, se adicionaron 2 g de citrato de sodio y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Técnica: Se mezclaron cantidades iguales de la solución de tinción y de la suspensión de levaduras y se observaron al microscopio. Las células viables tienen la capacidad de reducir el azul de metileno y por tanto no se tiñen, mientras que las células no viables son teñidas (Martínez-Cruz, 1989).

## **6.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para determinar el efecto de las diferentes variables en la producción de las enzimas (endo-poligalacturonasa e inulinasa), se cuantificó la actividad enzimática y el crecimiento del microorganismo por duplicado en cada fermentación, la cual a su vez se hizo dos veces y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan por medio del paquete computacional SAS.

Las variables estudiadas fueron:

- 1) Para la producción de poligalacturonasa: concentración de oxígeno disuelto, temperatura, presencia de pectina, concentración de glucosa y 2-desoxiglucosa.
- 2) Para la producción de inulinasa: concentración de 2-desoxiglucosa y diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, inulina y glicerol).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO DISUELTO (O.D.) EN LA PRODUCCION DE ENDO-POLIGALACTURONASA.

Estos experimentos se realizaron en el fermentador a una temperatura de 30°C, y manteniendo la concentración de oxígeno disuelto en niveles constantes de 20, 40 y 60% durante la fase la fase exponencial, y se utilizó la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL-278 la cual ha sido previamente reportada como una buena productora de endo-poligalacturonasa (García-Garibay y col., 1987).

En la gráfica 7.1.1 se puede observar el crecimiento que presentó la levadura a un nivel de 60% de O.D. , obteniendo una velocidad específica de crecimiento de 0.46 hr<sup>-1</sup>. Es relevante que no hubo una producción de la endo-poligalacturonasa bajo estas condiciones de fermentación.

El crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* a 40 % de O.D. se puede observar en la gráfica 7.1.2 y presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.382 hr<sup>-1</sup>. La producción de la enzima se inició a las 2 horas y se mantuvo a lo largo de la fermentación en niveles que oscilan entre 0.20 y 0.32 UPg/ml.

En la gráfica 7.1.3, se observa el crecimiento y la producción de endo-poligalacturonasa a un nivel de 20% de O.D. Dicho crecimiento se caracterizó con una velocidad específica de crecimiento de 0.243 hr<sup>-1</sup>. Los niveles de producción oscilaron entre 0.20 y 0.29 UPg/ml.

La tabla 7.1.1 resume las condiciones y los resultados de las fermentaciones anteriores.

TABLA 7.1.1  
INFLUENCIA DEL OXIGENO DISUELTO EN LA PRODUCCION  
DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

Gráfica	O. D. (%)	$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	Act. Enz. Máx (UPg/ml)	B (mg/ml)
7.1.1	60	0.462	0	2.157
7.1.2	40	0.382	0.32	2.089
7.1.3	20	0.243	0.29	1.816

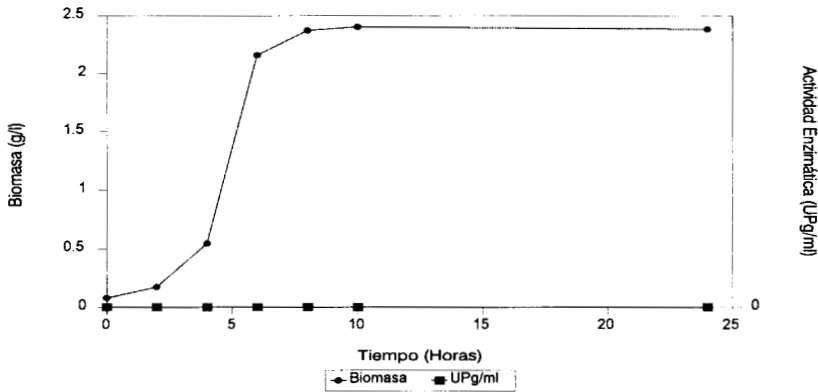
O.D.: Oxígeno Disuelto.,  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento.,

Act.Enz.Máx.: Actividad enzimática máxima., B: biomasa obtenida al final de la fase exponencial

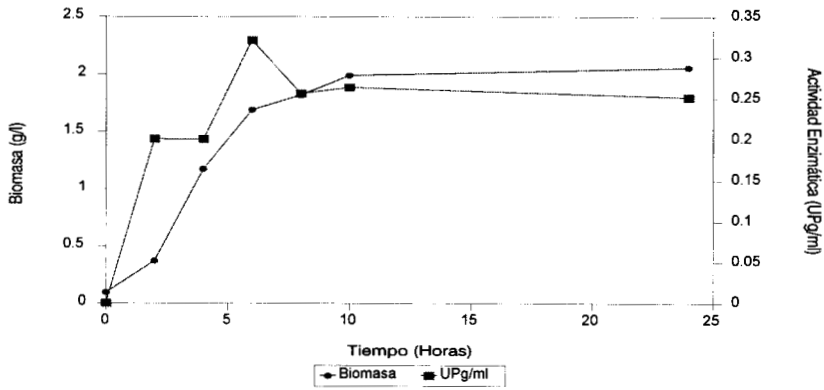


Comparando la producción de enzima obtenida (gráfica 7.1.4 y tabla 7.1.1) bajo los tres niveles de aireación probados podemos decir que a 60% de saturación de oxígeno disuelto se ve reprimida la producción de la enzima, esto coincide con lo reportado por Wimborne y Rickard (1978) en donde establecen que la producción de la enzima se ve reprimida a un nivel de oxígeno disuelto de 60%, mientras que a 0% la enzima se desreprime. Por otra parte, a 20 y 40% de oxígeno disuelto si hubo producción de endo-poligalacturonasa y fué significativamente diferente ( $p < 0.003$ ) siendo mayor a 20% de oxígeno disuelto., según el análisis estadístico.

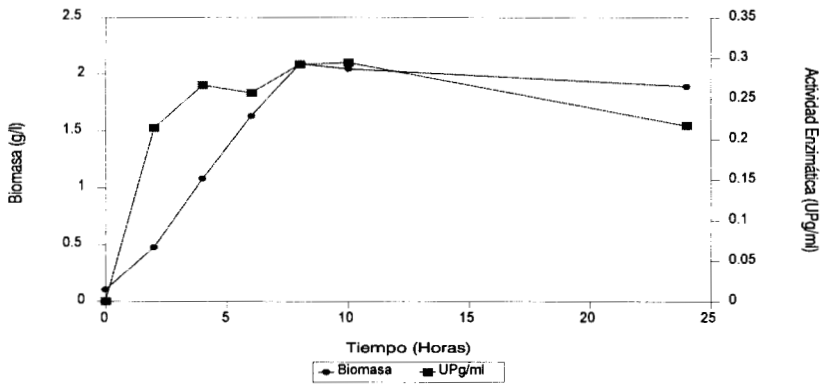
Por otra parte, analizando las velocidades de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* (gráfica 7.1.5) obtenidas bajo los diferentes niveles de saturación de oxígeno disuelto es claro que hay un aumento de la misma conforme se aumentó el oxígeno disuelto en el medio, sin embargo, el aumento en la velocidad es menor entre 40 y 60 % de O. D. por lo que se puede decir que los requerimientos de oxígeno para este microorganismo son más cercanos a los obtenidos a 60%.



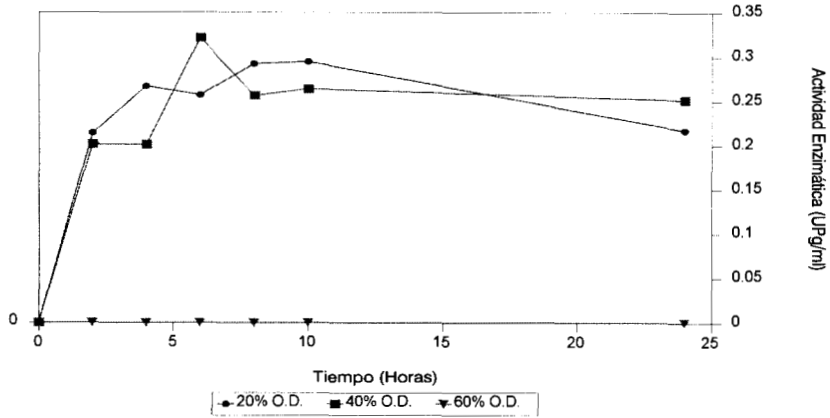
Gráfica 7.1.1 Curvas de crecimiento y de producción de endo-poligalacturonasa a 60% de O.D.



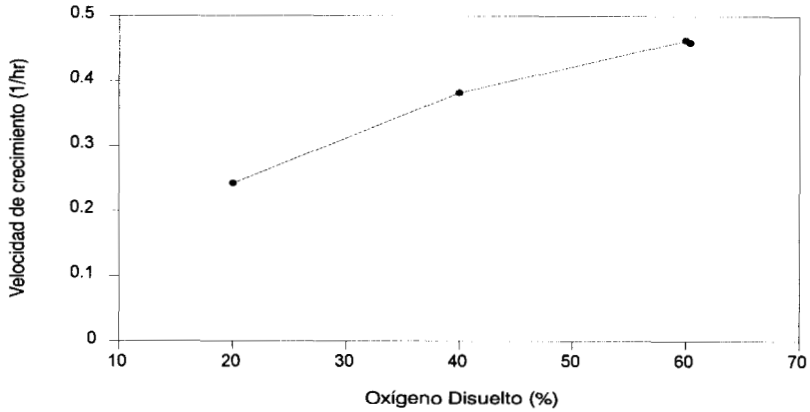
Gráfica 7.1.2 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa a 40% de O.D.



Gráfica 7.1.3 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa a 20% de O.D.



Gráfica 7.1.4 Comparación de producción de endo-poligalacturonasa a diferentes niveles de oxígeno disuelto a 30°C



Gráfica 7.1.5 Efecto del oxígeno disuelto en la velocidad de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* a 30°C

## 7.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO Y DEL OXIGENO DISUELTO EN EL MEDIO EN LA PRODUCCION DE ENDO-POLIGALACTURONASA.

Estos experimentos se realizaron en el fermentador a temperaturas de 30, 35, 40 y 45°C respectivamente, a un nivel de saturación de oxígeno de 60%.

El crecimiento de la levadura a 30°C se puede observar en la gráfica 7.1.1, y como se mencionó no hubo producción de endo-poligalacturonasa.

En la gráfica 7.2.1 se pueden observar la curva de crecimiento y de producción de endo-poligalacturonasa a 35°C; la producción de dicha enzima osciló entre 0.196 y 0.267 UPg/ml y se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.554 hr<sup>-1</sup>. De igual forma, en la gráfica 7.2.2 se reporta lo obtenido a 40°C, observándose que la producción de la enzima osciló entre valores de 0.103 y 0.242 UPg/ml, y una velocidad específica de crecimiento de 0.423 hr<sup>-1</sup>. Finalmente en la gráfica 7.2.3 se observa lo obtenido a 45°C en donde la producción de la enzima se encontró entre 0.205 y 0.292 UPg/ml y una velocidad de crecimiento específica de 0.366 hr<sup>-1</sup>.

En la tabla 7.2.1 se resumen los resultados obtenidos de las fermentaciones anteriores.

TABLA 7.2.1  
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO  
Y EN LA PRODUCCION DE ENDO-POLIGALACTURONASA

Gráfica	Temperatura (°C)	$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	Act. Enz. Máx (UPg/ml)	B (mg/ml)
7.2.1	30	0.463	0	2.157
7.2.2	35	0.554	0.267 <sup>b</sup>	2.167
7.2.3	40	0.423	0.243 <sup>c</sup>	2.060
7.2.4	45	0.366	0.292 <sup>a</sup>	1.612

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento., b: biomasa obtenida al final de la fase exponencial Act. Enz. Máx.: Actividad enzimática máxima. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ) y  $a > b > c$ .

En la gráfica 7.2.4 (tabla 7.2.1) se compara la actividad enzimática, y se puede notar que conforme va aumentando la temperatura de fermentación se incrementa la producción de la enzima, a 30°C no hubo actividad enzimática; a 35°C se obtienen valores por encima de 0.2 UPg/ml; a 40°C la producción

decrece para incrementarse notablemente a 45°C. De igual forma si comparamos las actividades específicas máximas a cada temperatura podemos decir que la mayor se obtuvo a 45°C (0.33UPg/g), mientras que a 35 y 40°C fueron más bajas (0.12 y 0.088 UPg/g) lo cual es importante ya que a pesar de que se tenía un menor crecimiento conforme aumentaba la temperatura las células fueron capaces de producir más endopoligalacturonasa. Con los datos obtenidos se puede pensar que la temperatura de crecimiento tiene un efecto inductor en la producción de la enzima como lo reporta Vivar y col. (1990), sin embargo, es necesario considerar la disolución del oxígeno en el medio a las diferentes temperaturas para poder discernir si realmente la temperatura ejerce un efecto en la producción de endopoligalacturonasa, por lo que fué necesario determinar experimentalmente el oxígeno disuelto en cada una de las fermentaciones por el método de Winkler (Franson, 1976) y se encontró lo reportado en la tabla 7.2.2.

TABLA 7.2.2  
CONCENTRACION DE OXIGENO DISUELTO EN EL  
MEDIO DE CULTIVO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura (°C)	Concentración de Oxígeno Disuelto (mg O. D./l)
30	3.3
35	3.0
40	2.7
45	2.4

mg O. D./l : miligramos de oxígeno disuelto por litro.

Como era de esperarse la concentración de oxígeno disuelto en cada una de las fermentaciones fué diferente (manteniéndose un 60% de saturación en cada caso), por lo que no se puede afirmar que la temperatura por si misma tenga un efecto inductor en la producción de la endo-poligalacturonasa., por lo cual se diseñaron otra serie de experimentos en los que se mantuvo constante la concentración de oxígeno disuelto (3.3 mg O. D./l) y nuevamente se trabajó con las diferentes temperaturas (30, 35, 40 y 45°C). Los resultados de las fermentaciones anteriores se resumen en la tabla 7.2.3.

TABLA 7.2.3  
 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL OXIGENO DISUELTO EN LA  
 PRODUCCION DE ENDOPOLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus*

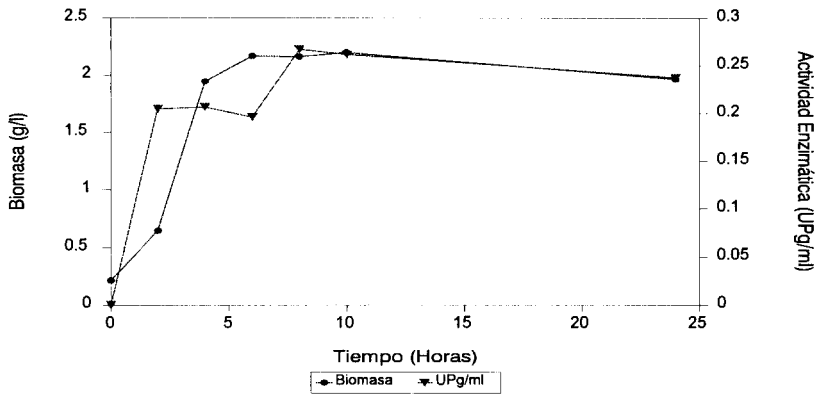
Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (%)	Oxígeno disuelto (mg O.D./l)	Act. Esp. Máx. (UPg/g)
30	20	1.1	0.15
30	40	2.2	0.19
30	60	3.3	0
35	60	3.0	0.12
35	65	3.3	0
40	60	2.7	0.13
40	75	3.3	0
45	60	2.4	0.33
45	85	3.3	0

Act. Esp. Máx.: Actividad específica máxima

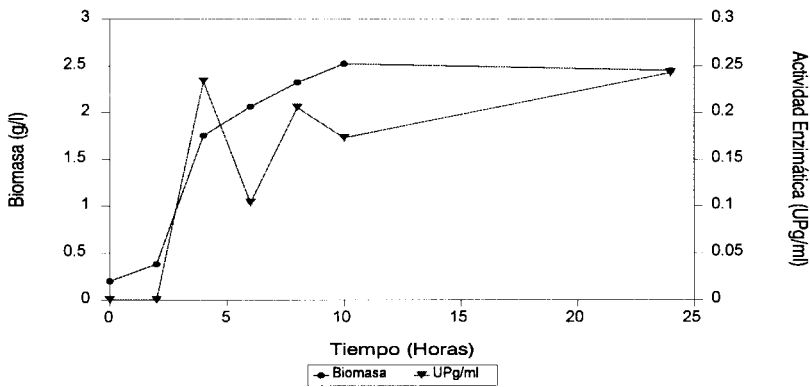
Como se puede observar en la tabla 7.2.3, cuando se mantuvo una concentración de 3.3 mg O.D./l en cualquiera de las diferentes temperaturas no hubo producción de endo-poligalacturonasa, por lo que podemos decir que la temperatura no ejerce un efecto inductor como lo reporta Vivar y col. (1990). Por otra parte, analizando los resultados para cada temperatura a los diferentes niveles de oxígeno disuelto podemos decir que éste ejerce un efecto inhibitor en la producción de la enzima, ya que en cualquiera de las temperaturas a una nivel de 3.3 mg O.D./l no se produjo la enzima, mientras que por debajo de dicha concentración siempre se obtuvo la endo-poligalacturonasa.

En lo que respecta al crecimiento obtenido bajo diferentes temperaturas a un 60% de oxígeno disuelto (gráfica 7.2.5), se observa que a 35°C se obtuvo la mayor velocidad específica de crecimiento, por lo que se podría considerar ésta como la temperatura óptima de crecimiento bajo las condiciones establecidas. Sin embargo, analizando las velocidades de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL-278 a diferentes temperaturas y a una concentración de 3.3. mg O.D./l (gráfica 7.2.6) podemos observar claramente que la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el intervalo de 35-40°C, y que a temperaturas menores o mayores la velocidad de crecimiento se ve disminuida. Esto implica que la reducción en la velocidad de crecimiento a 40°C observada con 60% de O.D., se debió a una limitación de oxígeno y no al incremento de temperatura por si misma. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Vivar y col. (1990), en donde reportan que dicho microorganismo presenta una temperatura óptima de crecimiento a 35°C en un medio de

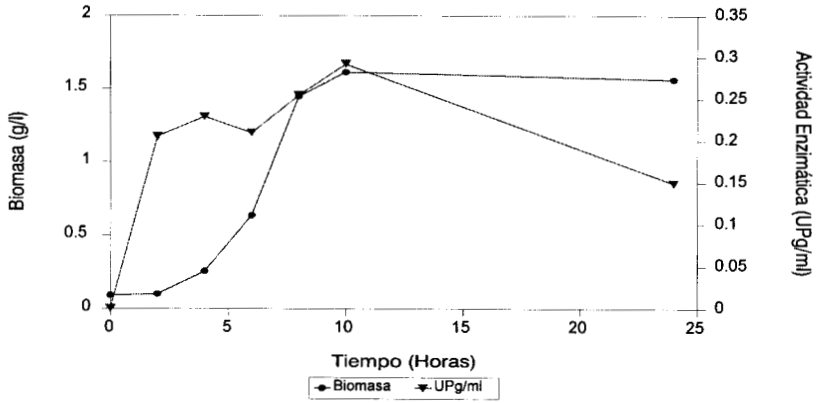
glucosa con pectina, considerando que en ese caso también hubo limitación de oxígeno.



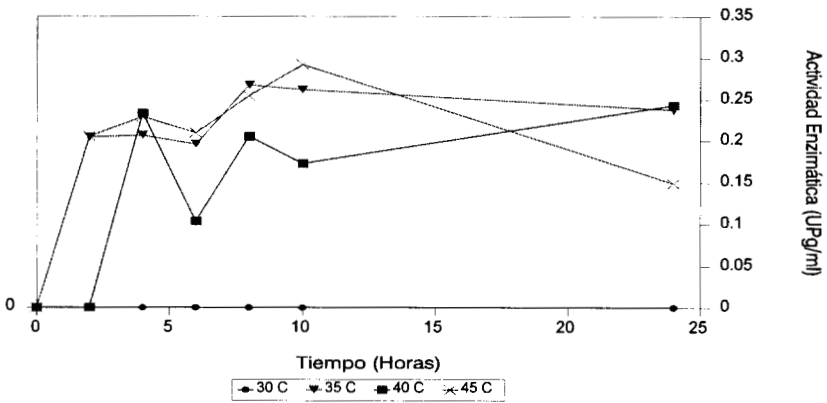
Gráfica 7.2.1 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa a 35°C



Gráfica 7.2.2 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa a 40°C

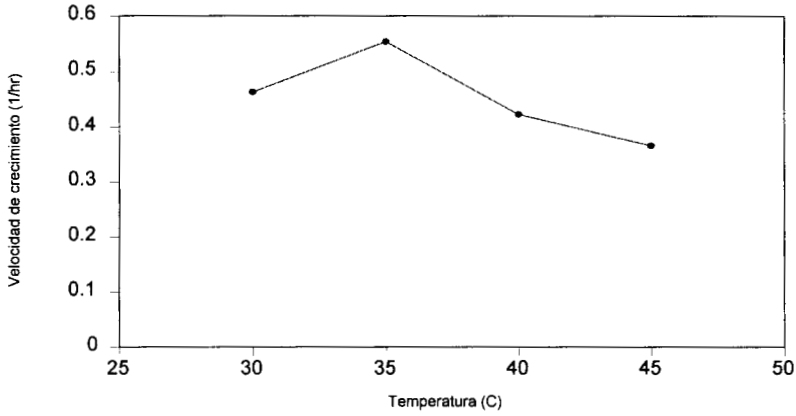


Gráfica 7.2.3 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa a 45°C

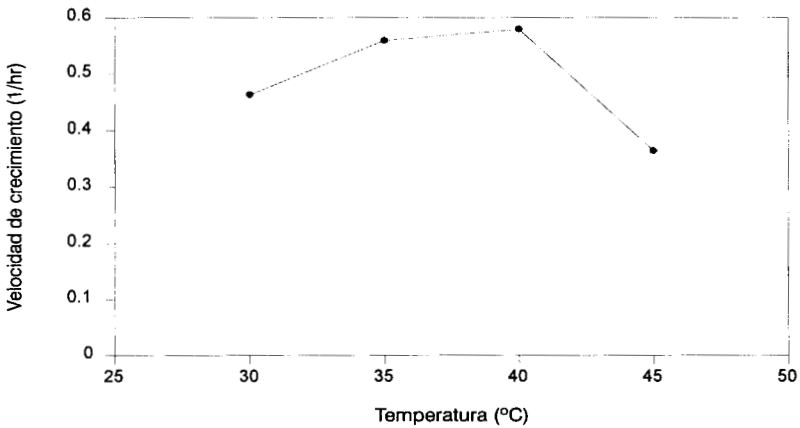


Gráfica 7.2.4 Comparación de producción de endo-poligalacturonasa a diferentes temperaturas a 60% de O.D.





Gráfica 7.2.5 Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* a 60% de O.D.



Gráfica 7.2.6 Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* a 3.3 mg O.D.//

### **7.3. INFLUENCIA DE LA PECTINA EN LA PRODUCCION DE ENDO-POLIGALACTURONASA.**

Con el propósito de ilustrar el efecto inductor de la pectina en la actividad enzimática a los diferentes niveles de oxígeno disuelto evaluados se realizaron los experimentos reportados en las gráficas 7.3.1, 7.3.2, y 7.3.3. El efecto más notable que se observó en la producción de endo-poligalacturonasa fué que en condiciones que se reportan en trabajos anteriores (Wimborne y Rickard, 1978). como totalmente inhibitorias (60% de oxígeno disuelto), al adicionar pectina al medio se obtuvo actividad enzimática a partir de la octava hora de fermentación, lo cual implica que dicho compuesto tiene la capacidad de desreprimir la producción de la enzima bajo condiciones de alta aireación (gráfica 7.3.1). García-Garibay y col., (1987) reportan producción de la enzima en medio lactosado con pectina iniciando la fermentación a 100% de O.D., sin embargo, este nivel de saturación no se mantuvo a lo largo de toda la fermentación, dado que durante la etapa de crecimiento exponencial el oxígeno disuelto disminuyó hasta cero y se recuperó al finalizar dicha etapa, por lo que no se puede establecer que la pectina fué el inductor principal de la endo-poligalacturonasa sino que pudo haber sido un efecto combinado con el nivel de saturación de oxígeno disuelto.

Para evaluar el efecto de la pectina en la producción de endo-poligalacturonasa se realizaron experimentos en el fermentador a 30°C a 20, 40 y 60% de oxígeno disuelto en un medio de glucosa y medio con glucosa mas pectina. Como se puede observar en la gráfica 7.3.1 a 60% de O. D. en el medio con pectina se obtuvo una actividad enzimática máxima de 0.3 UPg/ml, mientras que en medio sin pectina no hubo producción de endo-poligalacturonasa; para 40% de O. D. (gráfica 7.3.2) se observó que a todo lo largo de la fermentación la producción de enzima fué mayor en el medio de glucosa mas pectina que en el medio con glucosa solamente, y de igual forma se observó el mismo comportamiento a 20% de O. D. (gráfica 7.3.3). Para todos los casos (tabla 7.3.1) con 99% de confianza (ANDEVA) la actividad enzimática fué mayor en los medios con pectina, por lo que se puede concluir que a cualquiera de los niveles de saturación de oxígeno disuelto a 30°C la pectina ejerció un efecto positivo en la producción de endo-poligalacturonasa.

**TABLA 7.3.1**  
**INFLUENCIA DE LA PECTINA EN LA PRODUCCION**  
**DE ENDO-POLIGALACTURONASA**

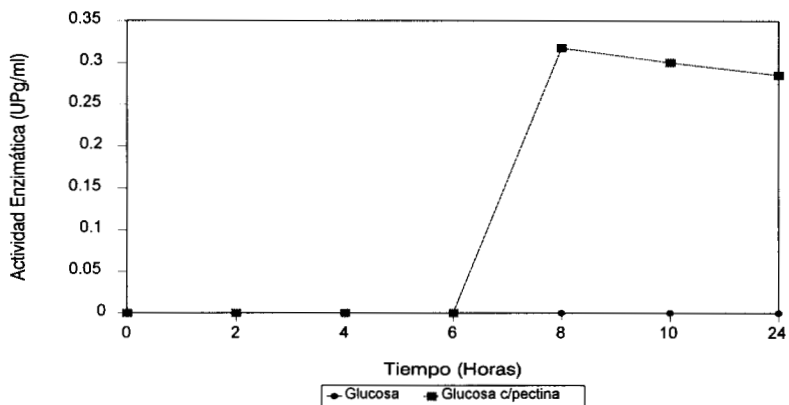
Gráfica	Medio de cultivo	O. D. (%)	Act. Enz. Máx. (UPg/ml)	Act. Esp. Máx. (UPg/g)
7.3.1	sin pectina	20	0.29	0.15
7.3.1	con pectina	20	0.43	0.24
7.3.2	sin pectina	40	0.32	0.19
7.3.2	con pectina	40	0.39	0.25
7.3.3	sin pectina	60	0	0
7.3.3	con pectina	60	0.35	0.14

O. D.: Oxígeno disuelto., Act. Enz. Máx.: Actividad enzimática máxima.,  
 Act. Esp. Máx.: Actividad específica máxima.

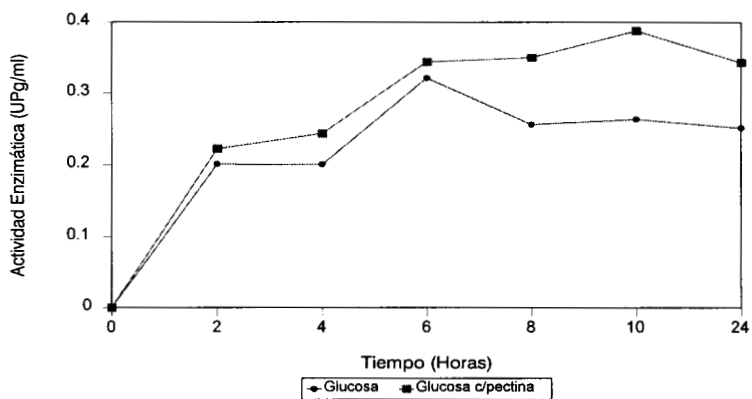
Analizando la tabla 7.3.1, se puede decir que la pectina ejerció un efecto similar en la producción de endo-poligalacturonasa al que se obtuvo con la disminución de oxígeno disuelto, ya que cuando se tiene un 60% de O. D. en medio con pectina se alcanzó una actividad específica máxima de 0.14 UPg/g y en la fermentación con 20% de O. D. sin pectina fué de 0.15 UPg/g. Además, también se puede observar que los niveles de 20 y 40% de O. D. presentaron un comportamiento similar en la producción de la enzima, contrastando con 60% de O. D. en donde sólo se obtuvo la enzima en el medio de glucosa mas pectina.

Por otra parte, con el objeto de saber si se tenía el mismo comportamiento al adicionar la pectina a diferentes temperaturas, se realizaron experimentos a 35, 40 y 45°C a un nivel de 60% de oxígeno disuelto.

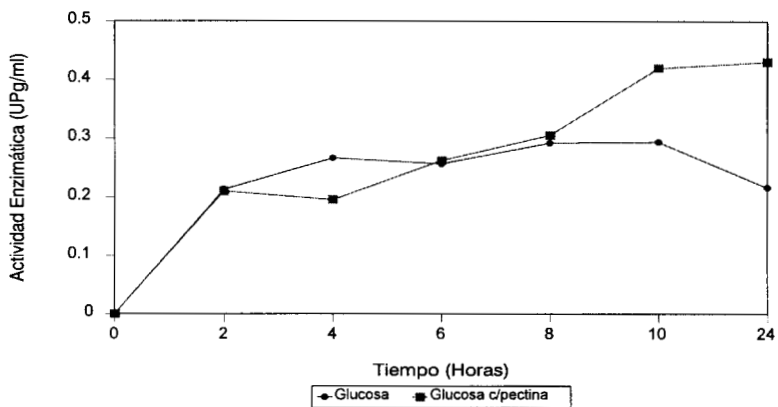
En las gráficas 7.3.4, 7.3.5 y 7.3.6 se puede ver claramente el efecto de la pectina como inductor en cada uno de los niveles de temperatura evaluados, ya que en cualquiera de los casos la producción de endo-poligalacturonasa fué mayor en el medio de glucosa más pectina que en el medio con glucosa solamente.



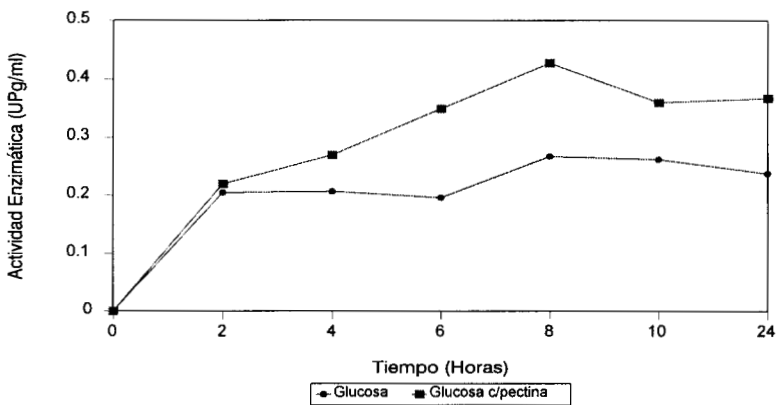
Gráfica 7.3.1 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 60% de O. D. y 30°C



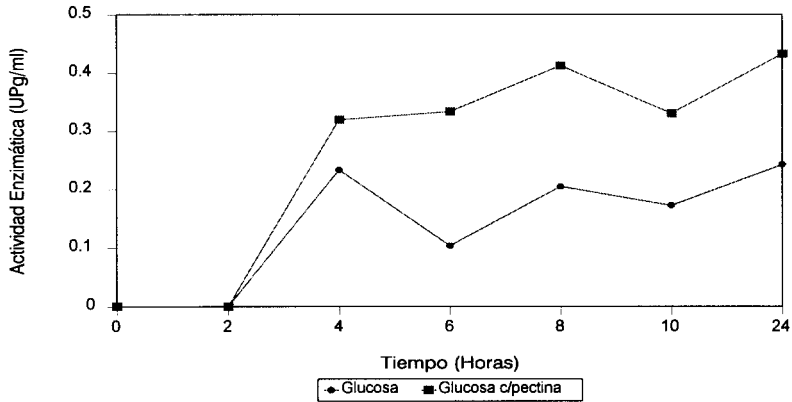
Gráfica 7.3.2 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 40% de O. D. y 30°C



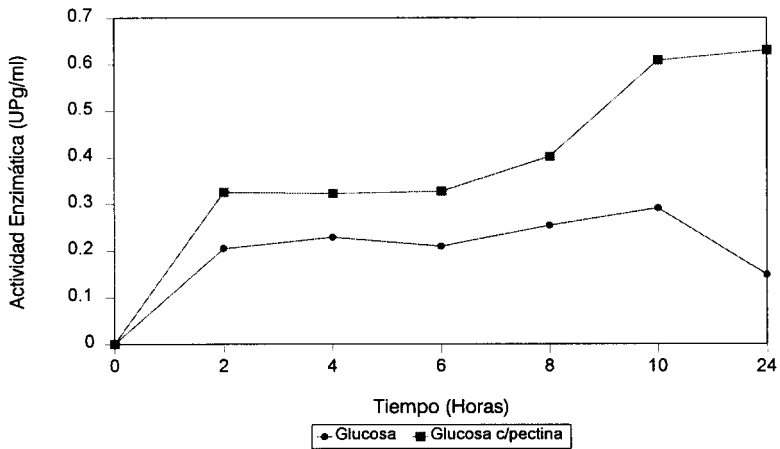
Gráfica 7.3.3 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 20% de O. D. y 30°C



Gráfica 7.3.4 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 60% O. D. y 35°C



Gráfica 7.3.5 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 60% O. D. y 40°C



Gráfica 7.3.6 Curvas de producción de endo-poligalacturonasa en medios sin pectina y con pectina a 60% y 45°C

#### 7.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

Con el propósito de estudiar la represión catabólica y/o inducción por glucosa en la producción de endo-poligalacturonasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* se realizaron fermentaciones en cultivo por lotes (en matraces) a diferentes concentraciones de glucosa y de aireación (aerobias y anaerobias), determinando la producción de la enzima a las 24 h.

La importancia de estudiar el efecto que puede tener la glucosa en la producción de endo-poligalacturonasa se fundamenta en el hecho de que generalmente los estudios sobre la producción de dicha enzima se han realizado utilizando como fuente de carbono la glucosa, y dado que se reportan estudios en los cuales la producción de otras enzimas (por ejemplo, inulinasa) a partir de *Kluyveromyces marxianus* se ve afectada por la glucosa (Grootwassink y Hewitt, 1983), es importante conocer el comportamiento de nuestra cepa ante dicho compuesto en la producción de endo-poligalacturonasa. Por otra parte, también se considera los niveles de aireación del medio de cultivo, debido a que García-Garibay y col. (1987) y Luh y Phaff (1951) reportan que en un medio glucosado bajo condiciones de anaerobiosis la enzima es producida constitutivamente por *Kluyveromyces marxianus*, y en condiciones aerobias se ve reprimida y se desreprime con la adición de pectina al medio.

Analizando los resultados obtenidos (tabla 7.4.1) se puede observar que bajo condiciones aerobias la producción de endo-poligalacturonasa aumentó conforme se incrementó la concentración de glucosa siendo significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ) excepto en la concentración de 0.2% en donde fué mayor, por lo que se puede decir, que la glucosa induce la producción de endo-poligalacturonasa bajo estas condiciones de aireación.

En condiciones anaerobias, se observa un aumento gradual en la actividad específica de endo-poligalacturonasa a medida que se incrementa la concentración de glucosa y son significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ), por lo que se puede decir, que la glucosa induce la producción de la enzima en condiciones anaerobias. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Rosane y Rose (1994) en donde establecen que a diferentes concentraciones de glucosa (0.2 y 1%) la producción de la enzima a partir de *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 se incrementa.

Por otra parte, cabe señalar que bajo condiciones anaerobias se produce en mayor proporción la endo-PG, coincidiendo con lo reportado por Garcia-Garibay y col. (1987) y Luh y Phaff (1951), dichos investigadores señalan que bajo condiciones anaerobias *Kluyveromyces marxianus* produce constitutivamente la endo-poligalacturonasa.

TABLA 7.4.1  
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

Conc. de Glucosa (%)	Actividad Específica Aerobia (UPg/mg)	Actividad Específica Anaerobia (UPg/mg)
0.2	0.1079 <sup>b</sup>	0.1499 <sup>d</sup>
0.6	0.0389 <sup>e</sup>	0.1476 <sup>d</sup>
1.0	0.0559 <sup>d</sup>	0.2138 <sup>c</sup>
1.5	0.0740 <sup>c</sup>	0.4307 <sup>b</sup>
2.0	0.1785 <sup>a</sup>	0.8162 <sup>a</sup>

Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ) y  $a > b > c > d$ .



## **7.5 EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ENDO-POLIGALACTURONASA Y EN LA MORFOLOGIA DE LA LEVADURA.**

Para investigar el efecto de la 2-desoxiglucosa (2-DG) se dividió el estudio en dos partes principalmente: 1) Efecto de 2-DG en cuatro cepas de *Kluyveromyces marxianus*, y 2) Efecto de diferentes concentraciones de 2-DG en la cepa de *K. marxianus* CDBBL-278.

### **7.5.1 Influencia de la 2-DG en diferentes cepas de *K. marxianus***

Se efectuaron fermentaciones en un medio de cultivo base (descrito en la metodología 6.1.2.4) con 0.2 y 0.4% de 2-desoxiglucosa (2-DG). Los cultivos se realizaron en matraces bajo condiciones aerobias.

Para este estudio se usaron cuatro cepas de *Kluyveromyces marxianus*, las cuales se menciona a continuación:

- 1) Cepa CDBBL-278: productora de pectinasa e inulinasa.
- 2) Cepa UCD-C-351: productora de pectinasa.
- 3) Cepa NCYC-587: productora de  $\beta$ -galactosidasa, hidroliza pectina.
- 4) Cepa NCYC-1429: productora de inulinasa y lactasa.

Para la realización de esta actividad se utilizaron dos medios de cultivo:

- Medio A: se usó el 7.1.2.1 reportado en la metodología, pero con una concentración de 1% de glucosa.
- Medio B: se usó el 7.1.2.4 reportado en la metodología a un nivel de 0.2 y 0.4% de 2-DG respectivamente.

Los resultados obtenidos usando un nivel de 0.2% de 2-DG se muestran en las gráficas 7.5.1-7.5.6.

Cepa 278: Esta levadura presentó una biomasa máxima de 5.758 y 5.53 g/l en el medio A y B respectivamente. La actividad específica máxima fue de 0.2982 y 0.688 UPg/mg. La gráfica 7.5.1 muestra el comportamiento durante la fermentación.

Cepa 351: Se obtuvo un crecimiento máximo de 6.94 y 6.65 g/l en el medio A y B respectivamente, y las actividades específicas máximas fueron de 0.1124 y 0.2206 UPg/mg. En la gráfica 7.5.2 se puede observar el crecimiento de la levadura y la producción de la endo-poligalacturonasa a lo largo de la fermentación.

Cepa 587: Esta levadura presentó una biomasa máxima de 7.051 y 6.50 g/l en el medio A y B respectivamente. La actividad específica máxima fué de 0.2139 y 0.1438 UPg/mg (gráfica 7.5.3).

Cepa 1429: Se obtuvo un crecimiento máximo de 5.91 y 6.05 g/l en el medio A y B respectivamente, y las actividades específicas máximas fueron de 0.1305 y 0.1095 UPg/mg. En la gráfica 7.5.4 se puede observar cual fué el comportamiento durante la fermentación.

Analizando los resultados obtenidos (tabla 7.5.1) se puede establecer que la 2-DG a un nivel de 0.2% no es tóxica para ninguna de las cepas estudiadas, dado que no hay diferencia significativa ( $p < 0.03$ ) en la tasa de crecimiento específica en cada uno de los medios de cultivo (Glucosa o 2-DG). Además, la 2-DG favorece la producción de la endo-poligalacturonasa en las cepas CDBBL-278 y UCD-C-351, mientras que este efecto no se observó en las otras dos cepas de levaduras. En las gráficas 7.5.5 y 7.5.6 se puede observar la producción de endo-poligalacturonasa durante la fermentación para cada una de las cepas en los dos medios de cultivo, y es evidente que la cepa CDBBL-278 es la mejor productora de dicha enzima. Además, en presencia de 2-DG se duplica la producción de endo-poligalacturonasa con las cepas CDBBL-278 y UCD-C-351.

Los resultados obtenidos usando un nivel de 0.4% de 2-DG (gráficas 7.5.7-7.5.11) son los siguientes:

Cepa 278: Esta levadura presentó una biomasa máxima de 6.425 y 6.26 g/l en el medio A y B respectivamente. La actividad específica máxima fué de 0.2762 y 0.484 UPg/mg. La gráfica 7.5.7 muestra el comportamiento durante la fermentación.

Cepa 351: Se obtuvo un crecimiento máximo de 7.47 y 4.82 g/l en el medio A y B respectivamente, y las actividades específicas máximas fueron de 0.1942 y 0.0412 UPg/mg. En la gráfica 7.5.8 se puede observar el crecimiento de la levadura y la producción de la endo-poligalacturonasa a lo largo de la fermentación.

Cepa 587: Esta levadura presentó una biomasa máxima de 7.029 y 6.53 g/l en el medio A y B respectivamente. La actividad específica máxima fué de 0.2932 y 0.3816 UPg/mg (gráfica 7.5.9).

Cepa 1429: Se obtuvo un crecimiento máximo de 7.18 y 4.24 g/l en el medio A y B respectivamente, y las actividades específicas máximas fueron de

0.0689 y 0.3858 UPg/mg. En la gráfica 7.5.10 se puede observar cual fué el comportamiento durante la fermentación.

Analizando los resultados obtenidos (tabla 7.5.2) se puede establecer que la 2-DG a una concentración de 0.4% no es tóxica para la cepa CDBBL-278 dado que no existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en su crecimiento, mientras que para las otras tres cepas si se observó un efecto negativo en su crecimiento ( $p < 0.03$ ).

Por otra parte, también se puede observar en la gráfica 7.5.11 que en presencia de 2-DG se duplica la producción de la enzima en la cepa CDBBL-278 y se mantiene mas o menos constante durante casi toda la fermentación, lo cual la diferencia de las cepas NCYC-587 y NCYC-1429 que fueron capaces de producir altos niveles de la enzima pero únicamente hacia el final de la fermentación.

Analizando los datos obtenidos durante el desarrollo de este experimento, se tiene que:

1) Las concentraciones de 2-DG usadas no afecta el crecimiento de la cepa CDBBL-278 pero sí favorecen la producción de endo-PG, obteniéndose niveles de la enzima similares en ambos casos.

2) En lo que respecta a la cepa UCD-C-351, se puede decir que el nivel de 0.2% de 2-DG favorece la producción de la endo-PG y no afecta el crecimiento de la levadura, mientras que a una concentración de 0.4%, tanto el crecimiento como la producción de la enzima se ven afectados.

3) Considerando los resultados obtenidos para la cepa NCYC-587 se puede establecer que un nivel de 0.2% de 2-DG no afecta el crecimiento del microorganismo, mientras que a 0.4% se observa un efecto negativo en el crecimiento. En lo que respecta a la producción de endo-PG ésta se ve marcadamente afectada a las concentraciones de 2-DG utilizadas.

4) Para la cepa NCYC-1429 se puede decir que la concentración de 0.2% de 2-DG no afecta el crecimiento de la levadura pero si la producción de endo-PG; mientras que a 0.4% el crecimiento se ve afectado pero la producción de la enzima se favorece.

Por lo tanto, considerando lo anterior se puede decir que la cepa más resistente a la 2-DG es la CDBBL-278 y además la adición de dicho compuesto

al medio de cultivo favorece la producción de la endo-PG, siendo ligeramente mayor a la concentración de 0.2%.

TABLA 7.5.1  
INFLUENCIA DE LA 2-DESOXIGLUCOSA (0.2%)  
EN CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus*

CEPA	A.E.M. Glucosa (UPg/g)	A.E.M. 2-DG (UPg/g)	$\mu$ Glucosa (hr <sup>-1</sup> )	$\mu$ 2-DG (hr <sup>-1</sup> )	ANDEVA Act. Enz.	ANDEVA $\mu$
CDBBL-278	0.2982	0.6883	0.0974	0.0939	Existe Diferencia	No Existe Diferencia
UCD-C-351	0.1124	0.2206	0.0503	0.0606	Existe Diferencia	No Existe Diferencia
NCYC-587	0.2139	0.1438	0.0667	0.0563	Existe Diferencia	No Existe Diferencia
NCYC-1429	0.1305	0.1095	0.0511	0.0586	Existe Diferencia	No Existe Diferencia

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento., Act. Enz.: Actividad Enzimática  
A.E.M.: Actividad específica máxima., ANDEVA: análisis de varianza

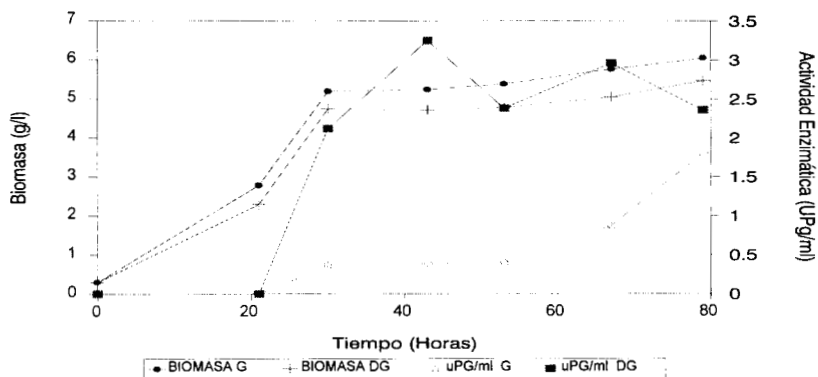
TABLA 7.5.2  
INFLUENCIA DE LA 2-DESOXIGLUCOSA (0.4%)  
EN CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus*

CEPA	A.E.M. Glucosa (UPg/g)	A.E.M. 2-DG (UPg/g)	$\mu$ Glucosa (hr <sup>-1</sup> )	$\mu$ 2-DG (hr <sup>-1</sup> )	ANDEVA Act. Enz.	ANDEVA $\mu$
CDBBL-278	0.2762	0.4834	0.0741	0.0696	Existe Diferencia	No Existe Diferencia
UCD-C-351	0.1942	0.0412	0.0626	0.0428	Existe Diferencia	Existe Diferencia
NCYC-587	0.2932	0.3816	0.0604	0.0549	Existe Diferencia	Existe Diferencia
NCYC-1429	0.0689	0.3858	0.0494	0.0354	Existe Diferencia	Existe Diferencia

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento., Act. Enz.: Actividad Enzimática (UPg/ml)  
A.E.M.: Actividad específica máxima., ANDEVA: análisis de varianza

## CEPA 278

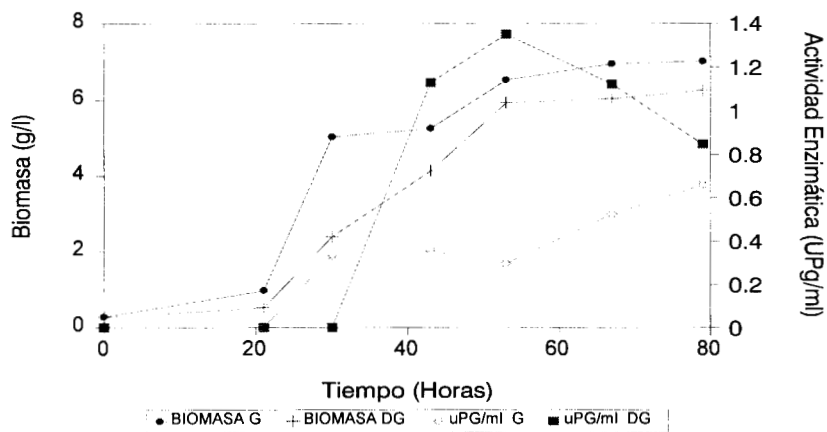
0.2% DG



Gráfica 7.5.1 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio de glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

## CEPA 351

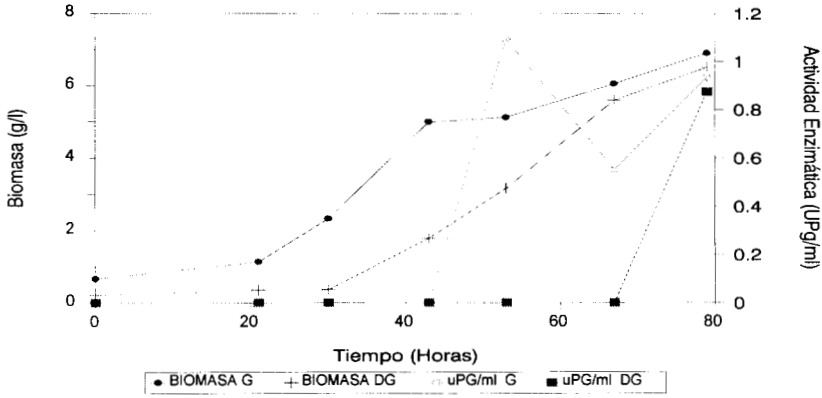
0.2% DG



Gráfica 7.5.2 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

# CEPA 587

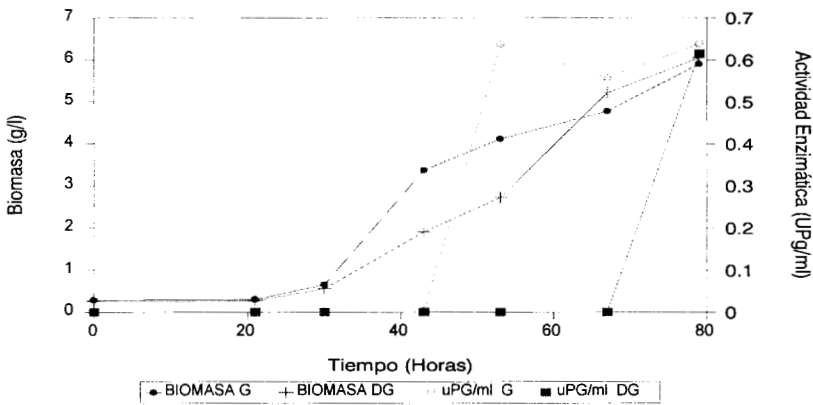
0.2% DG



Gráfica 7.5.3 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

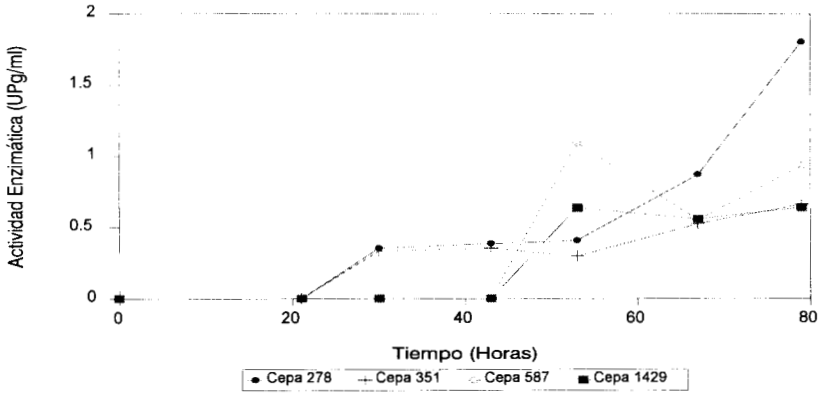
# CEPA 1429

0.2% DG



Gráfica 7.5.4 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

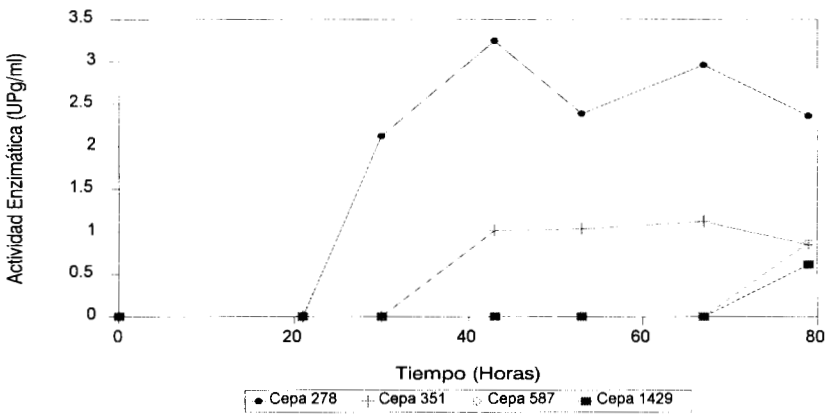
# ACTIVIDAD PECTINOLITICA



Gráfica 7.5.5 Comparación de cepas: curvas de producción de endopoligalacturonasa en medio con glucosa

# ACTIVIDAD PECTINOLITICA

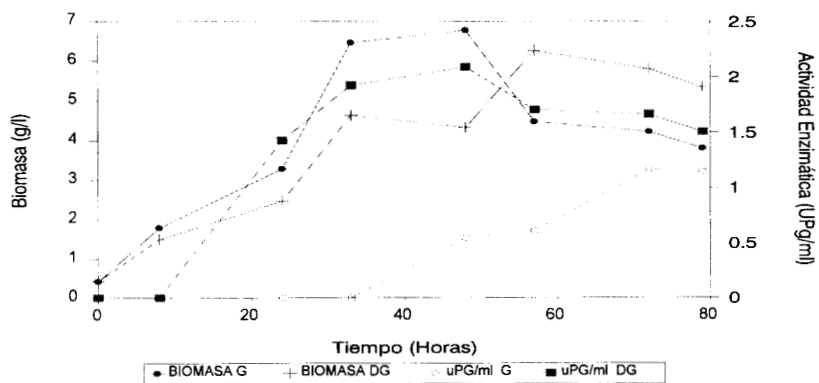
0.2% DG



Gráfica 7.5.6 Comparación de cepas: curvas de producción de endopoligalacturonasa en medio de glucosa con 2-DG

# CEPA 278

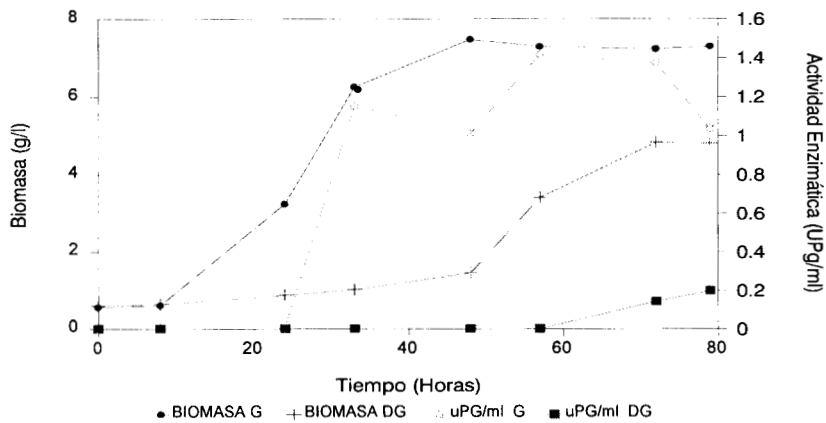
0.4% DG



Gráfica 7.5.7 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

# CEPA 351

0.4% DG



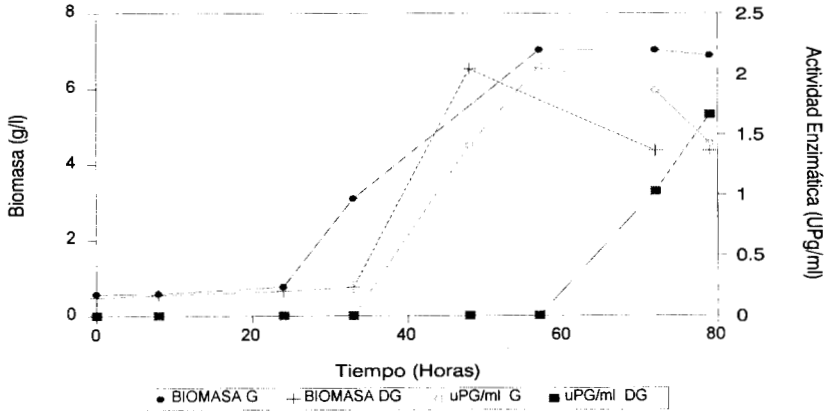
Gráfica 7.5.8 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)



222267

# CEPA 587

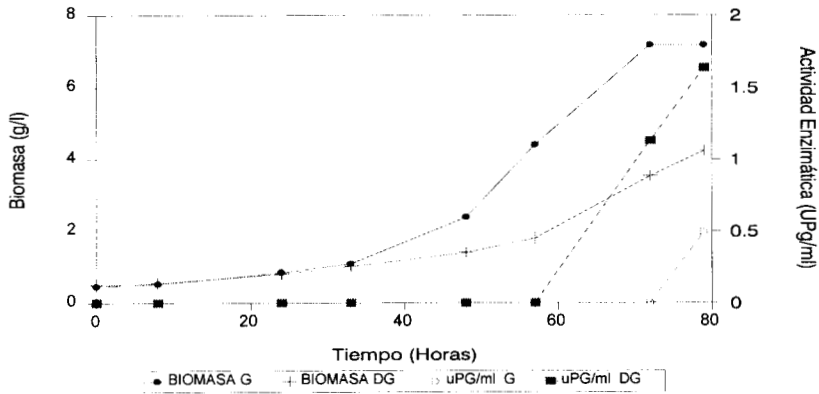
0.4% DG



Gráfica 7.5.9 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

# CEPA 1429

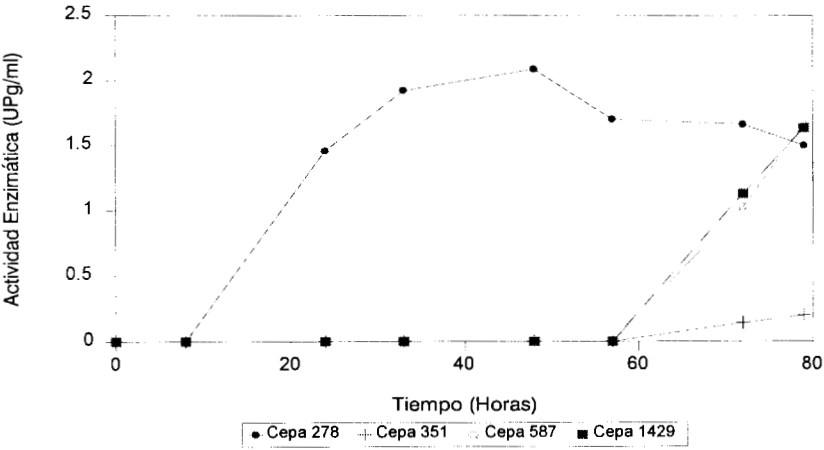
0.4% DG



Gráfica 7.5.10 Curvas de crecimiento y producción de endo-poligalacturonasa en medio con glucosa (G) y glucosa con 2-DG (DG)

# ACTIVIDAD PECTINOLITICA

0.4% DG



Gráfica 7.5.11 Comparación de cepas: curvas de producción de endopoligalacturonasa en medio de glucosa con 2-DG

### **7.5.2. Efecto de diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa en la producción de endo-poligalacturonasa**

Para el desarrollo de esta actividad se creció la cepa CDBBL-278 en un medio de cultivo base con diferentes concentraciones de 2-DG (medio 6.1.2.4.) en matraces bajo condiciones aerobias, por un tiempo de 24 y 48 hr.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.5.2.1. En lo que concierne a la producción de endo-poligalacturonasa a diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa, se puede observar que a 0.1% y sin utilizar ningún inductor se aumentó siete veces la producción de dicha enzima en comparación con una fermentación control, la cual se realizó utilizando glucosa al 1% sin la adición de 2-DG. También es importante resaltar que conforme se aumentó la concentración de 2-desoxiglucosa la producción de endo-poligalacturonasa se disminuyó, pero sin embargo, aún a 0.6% se duplicó la producción de dicha enzima (después de 48 horas de fermentación) en comparación con el control. Además dicha levadura es capaz de soportar elevadas concentraciones de 2-DG sin inhibir su crecimiento (como se mencionó en la sec. 7.5.1), lo cual es peculiar en esta cepa, ya que en general se reporta que a concentraciones muy pequeñas de 2-DG se inhibe en gran medida el crecimiento de levaduras, en particular, *Saccharomyces cerevisiae* es completamente inhibida a una concentración de 0.2% de 2-DG (Biely y col., 1971).

En lo que respecta a la morfología de la levadura crecida en presencia de 2-desoxiglucosa, se pudo observar una marcada diferencia en comparación con una levadura control (crecida en glucosa). La forma típica de esta levadura es elipsoideal alargada o ligeramente alargada, mientras que en presencia de 2-deoxiglucosa las células presentaron una forma esférica y forman aglomerados. Se han observado cambios morfológicos similares en células de *Saccharomyces cerevisiae* y protoplastos de algunas levaduras (Biely y col., 1971).

Los efectos que provoca la 2-desoxiglucosa en la morfología de las levaduras pueden ser explicados por los cambios que se dan en su metabolismo (sec. 4.3), esto ha sido reportado por varios autores para diferentes levaduras entre las cuales se encuentran *S.cerevisiae* y *K. fragilis* (Heredia y col., 1964., Biely y col., 1971).

TABLA 7.5.2.1  
EFECTO DE 2-DESOXIGLUCOSA EN LA PRODUCCION  
DE ENDO-POLIGALACTURONASA

Concentración de 2-desoxiglucosa (%)	Actividad Enzimática 24 hr. (UPg/ml)	Actividad Enzimática 48 hr. (UPg/ml)
0.0	0.435	0.435
0.1	3.051	3.686
0.2	3.118	3.246
0.3	1.636	2.087
0.4	1.428	2.089
0.5	1.001	1.078
0.6	0	0.997

## **7.6 SELECCION DE CEPAS DESREPRIMIDAS PRODUCTORAS DE INULINASA**

El propósito de estos experimentos fué establecer si *Kluyveromyces marxianus* CDBBL-278, la cual se reporta como una buena productora de inulinasa (Espinosa y col., 1992) era una cepa desreprimida. Para esto se planteó establecer una técnica de selección utilizando 2-desoxiglucosa como agente selectivo dado que algunos investigadores (Grootwassink y Tsang, 1985, Bajon y col., 1984 y Bourgui y col., 1986) reportan que dicho compuesto es adecuado para seleccionar mutantes desreprimidas. El estudio se dividió básicamente en dos partes: 1) Efecto de diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa en el crecimiento y en la producción de inulinasa y 2) Detección de cepas desreprimidas productoras de inulinasa.

### **7.6.1. Efecto de diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa en el crecimiento y la producción inulinasa**

Con el propósito de determinar una concentración de 2-desoxiglucosa (2-DG) que no afectara el crecimiento de la levadura se estableció estudiar niveles de 0.01, 0.05 y 0.1% de dicho compuesto, los cuales fueron adicionados al medio 6.1.2.8 en el que se usó como fuente de carbono la inulina. Dichos experimentos se realizaron en matraces bajo condiciones aerobias durante 24 horas.

En la tabla 7.6.1.1, se muestra la biomasa obtenida a los niveles de 2-desoxiglucosa con las diferentes cepas de levaduras, y como se puede apreciar claramente, la 2-desoxiglucosa afecta en distinto grado el crecimiento de cada una de las levaduras, así por ejemplo, a una concentración de 0.01% los porcentajes de disminución fueron 23, 57 y 88% para la cepa CDBBL-278, UCD-C-351 y NCYC-1429 respectivamente. Además, también es evidente que a concentraciones de 0.05 y 0.1% de 2-desoxiglucosa el crecimiento disminuyó drásticamente para cualquiera de las cepas utilizadas; por tanto, se decidió utilizar la concentración de 0.01% de 2-desoxiglucosa para la siguiente etapa de éste experimento, debido a que era la que permitía un buen desarrollo de los microorganismos.

En lo que respecta a la producción de la inulinasa (tabla 7.6.1.2), se observó una disminución drástica tanto para la inulinasa total como para la inulinasa extracelular para cualquiera de las cepas utilizadas. Sin embargo, cabe señalar que fué mayor el grado de disminución de la producción con las cepas NCYC-1429 y UCD-C-351. En general, la cepa CDBBL-278 produjo más

inulinasa en cualquiera de los medios de cultivo empleados en comparación con las otras cepas y además resultó ser la cepa más resistente a la 2-desoxiglucosa.

TABLA 7.6.1.1  
EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA EN EL  
CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus*.

Conc. de 2-DG (%)	<b>CDBBL-278</b> Biomasa (g/l)	<b>UCD-C-351</b> Biomasa (g/l)	<b>NCYC-1429</b> Biomasa (g/l)
0	1.44	1.66	1.31
0.01	1.11	0.71	0.15
0.05	0.07	0.11	0.04
0.1	0.04	0.06	0.03

TABLA 7.6.1.2  
EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA EN LA PRODUCCION  
DE INULINASA EN CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus*

Conc. de 2-DG	<b>CDBBL-278</b> Act. Enz. (UI/ ml)	<b>UCD-C-351</b> Act. Enz. (UI/ ml)	<b>NCYC-1429</b> Act. Enz. (UI/ml)
<b>INULINASA TOTAL</b>			
0	68.40	56.20	30.35
0.01	9.45	2.69	0.78
0.05	1.24	0.66	0.45
0.1	1.29	0.66	0.29
<b>INULINASA EXTRACELULAR</b>			
0	34.78	26.10	21.56
0.01	4.78	1.94	0.47
0.05	1.21	0.52	0.26
0.1	0.94	0.43	0.23

Act. Enz.: Actividad enzimática

## 7.6.2 Detección de cepas desreprimidas productoras de inulina.

El desarrollo de este experimento se efectuó con dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* (NCYC-1429 considerada como reprimida de acuerdo a lo reportado por Grootwassink y Tsang en 1985 y la CDBBL-278) bajo condiciones de represión catabólica utilizando los medios de cultivo 6.1.2.9 (sólido y líquido) los cuales contenían 4% de glucosa y 4% de inulina, y el medio 6.1.2.6. utilizando como fuente de carbono la inulina y adicionado con 0.01% de 2-desoxiglucosa.

Los resultados obtenidos para ambas cepas en el medio sólido, medio líquido y medio con 2-desoxiglucosa se muestran en la tabla 7.6.2.1. Tanto el crecimiento como la producción de inulina extracelular se determinó a las 24 horas como lo reportado por Grootwassink y Tsang (1985). De acuerdo con el criterio de selección de estos autores, los resultados sugieren que la cepa CDBBL-278 esta desreprimida debido a que produce inulina en presencia de glucosa, mientras que la cepa NCYC-1429 no es capaz de producir inulina bajo estas condiciones. Además, la cepa CDBBL-278 fue capaz de crecer y producir inulina en presencia de 2-desoxiglucosa, mientras que la cepa NCYC-1429 no presentó el mismo comportamiento. Grootwassink y Tsang (1985) obtuvieron una mutante derivada de la cepa NCYC-1429 capaz de crecer y producir inulina bajo las mismas condiciones que se probaron en este experimento; considerando lo anterior establecieron que era una cepa mutante hiperproductora y desreprimida. Bourgi y col. (1986) consideraron la capacidad de crecer en un medio con 2-desoxiglucosa mas inulina como un criterio para seleccionar una cepa hiperproductora desreprimida de *K. marxianus*. Evaluando los criterios que establecen dichos autores se podría pensar que la cepa NCYC-1429 dado que creció en un medio que contenía 2-desoxiglucosa es una cepa desreprimida, lo cual es bien sabido que no es cierto, por lo que se puede decir que el uso de la 2-desoxiglucosa como agente selectivo no es adecuado.

TABLA 7.6.2.1.  
CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE INULINASA EXTRACELULAR  
CON DOS CEPAS DE *K. marxianus*.

CEPA	PRODUCCION DE INULINASA			CRECIMIENTO		
	Sólido	Líquido	Con 2-DG	Sólido	Líquido	Con 2-DG
<b>CDBBL-278</b>	+	+	+	+	+	+
<b>NCYC-1429</b>	-	-	-	+	+	+

+ crecimiento o producción de inulina - crecimiento o producción de inulina no detectado

## 7.7 EVALUACION DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN DOS CEPAS PRODUCTORAS DE INULINASA.

El objetivo de este experimento fué el evaluar que efecto presentaban diferentes fuentes de carbono en la producción de inulinasa en dos cepas de *Kluyveromyces marxianus*, la NCYC-1429 considerada como una cepa tipo (Grootwassink y Hewitt, 1983) y la CDBBL-278 la cual se reporta como una buena productora de inulinasa (Espinosa y col., 1992). Para llevar a cabo este estudio, se diseñó un experimento de manera que se realizaron fermentaciones en matraces bajo condiciones aerobias durante 24 horas utilizando como fuentes de carbono inulina, glicerol, fructosa y glucosa a una concentración de 1% respectivamente. Los medios se prepararon según lo establecidos en la metodología (6.1.2.7).

Como se puede observar en la tabla 7.7.1, para la cepa CDBBL-278 existe un marcado efecto del glicerol en la producción de la inulinasa, esto es, comparándolo con lo obtenido en inulina (es el inductor ideal) se obtiene casi el 50% de enzima, sin embargo, se puede ver que existe una mayor proporción de enzima intracelular (91%) cuando se usa glicerol como fuente de carbono que con inulina (67%). Por otra parte, también se puede ver que la fructosa y glucosa presentan el mismo efecto inductor el cual es mínimo (3%) en comparación con la inulina.

En lo que respecta a la cepa NCYC-1429, se observó un comportamiento similar entre inulina y glicerol, pero con niveles de producción menores a la cepa CDBBL-278, mientras que en glucosa se observó una mayor producción y en fructosa niveles similares.

Comparando ambas levaduras se puede decir que la cepa CDBBL-278 produce en mayor proporción la inulinasa (3:1) en inulina y glicerol, mientras que en fructosa se tiene una relación 1:1 y en glucosa de 0.7:1. Además, cabe señalar que la relación en inulina para la enzima extracelular es aún mayor (5:1) que las mencionadas anteriormente, siendo esto muy importante, ya que podemos caracterizar a la cepa CDBBL-278 como hiperexcretora de endopoligalacturonasa.

Otra conclusión importante, se obtiene de comparar las relaciones obtenidas entre la cepa CDBBL-278 y NCYC-1429 para inulina y glicerol las cuales son 3.3:1 y 3.6:1 respectivamente, y las reportadas por Grootwassink y Hewitt (1983) para su cepa tipo (NCYC-1429) y una hiperproductora que son de 1.9:1 y 10:1 para cada sustrato respectivamente, Bourgi y col. (1986) reportan que su cepa mutante hiperproductora fue capaz de producir solo 1.5 veces más



actividad de inulinasa que su cepa tipo. De acuerdo con estos criterios se puede decir que la

cepa CDBBL-278 es hiperproductora de inulinasa en inulina, sin embargo, en glicerol no se puede evaluar de la misma manera, dado que la relación obtenida con respecto a la cepa NCYC-1429 fue menor que lo reportado.

TABLA 7.7.1  
INFLUENCIA DE LAS FUENTES DE CARBONO EN LA  
PRODUCCION DE INULINASA

Fuente de Carbono	Cepa CDBBL-278 Actividad Específica (UI/mg)	Cepa NCYC-1429 Actividad Específica (UI/mg)
Inulina		
T	18.57	5.64
E	6.17	1.27
Glicerol		
T	9.97	2.77
E	0.88	0.53
Fructosa		
T	0.59	0.61
E	0.076	0.09
Glucosa		
T	0.78	1.02
E	0.11	0.22

T: Actividad enzimática total., E: Actividad enzimática extracelular.

En una segunda etapa, se evaluaron nuevamente las diferentes fuentes de carbono pero en una concentración menor, con el fin de establecer si dichos substratos ocasionaban algún efecto de represión catabólica y/o inducción en la producción de inulinasa. Para llevar a cabo este estudio se realizaron fermentaciones en matraces bajo condiciones aerobias durante 24 horas utilizando inulina, glicerol, fructosa y glucosa en una concentración de 0.25% respectivamente (medio 6.1.2.8.), a partir de dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* (CDBBL-278 y NCYC-1429).

En la gráfica 7.7.1 se pueden observar las cinéticas de producción de inulinasa total con la cepa CDBBL-278 obtenidas a partir de diferentes fuentes de carbono. Las actividades específicas máximas (UI/mg) obtenidas fueron 52.84 (inulina), 17.04 (glicerol), 8.06 (fructosa) y 4.32 (glucosa). Como se puede apreciar claramente la inulina resultó ser el mejor inductor de la enzima, lo cual concuerda con lo reportado por varios autores (Grootwassink y Hewitt, 1983), mientras que con glicerol se obtuvieron niveles de producción mayores que con glucosa o fructosa.

En la gráfica 7.7.2 se muestran las cinéticas de producción de inulinasa extracelular obtenidas a partir de la cepa CDBBL-278 utilizando diferentes fuentes de carbono. Las actividades específicas máximas (UI/mg) obtenidas fueron 25.54 (inulina), 7.27 (glicerol), 3.66 (fructosa) y 3.9 (glucosa). Como se puede apreciar la producción de enzima extracelular bajo diferentes fuentes de carbono sigue el mismo comportamiento que la producción de inulinasa total (gráf. 7.7.1).

Comparando la producción de enzima total y extracelular podemos decir, que en general la producción conserva una relación 2:1 en cualquiera de las fuentes de carbono utilizadas.

En la gráfica 7.7.3 se muestran las cinéticas de producción de inulinasa total obtenidas a partir de la cepa NCYC-1429, encontrando actividades específicas máximas (UI/mg) de 23.14 (inulina), 8.48 (glicerol), 4.24 (fructosa) y 1.99 (glucosa). De igual forma que para la cepa CDBBL-278, la inulina resultó ser el mejor inductor para la síntesis de inulinasa y con glicerol se obtuvieron niveles más altos que con fructosa o glucosa.

En la gráfica 7.7.4 se muestran las cinéticas de producción de inulinasa extracelular obtenida a partir de la cepa NCYC-1429, reportando actividades específicas máximas (UI/mg) de 16.43 (inulina), 2.51 (glicerol), 2.42 (fructosa) y 1.38 (glucosa). Se puede apreciar claramente que sigue el mismo patrón de producción de inulinasa total.

Si comparamos los niveles de producción de las distintas cepas, podemos ver evidentemente que son mayores con la cepa CDBBL-278 en cualquiera de las fuentes de carbono utilizadas. Mas específicamente, las relaciones entre la producción total de ambas cepas son:

Inulina	2:1
Glicerol	2:1
Fructosa	2.5:1
Glucosa	2:1

Con el objeto de comparar la producción de inulinasa a diferentes concentraciones de fuentes de carbono (0.25 y 1%) se consideraron los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio y se resumen en la tabla 7.7.2.

Analizando la tabla 7.7.2, podemos asegurar que a concentraciones bajas de fuentes de carbono (0.25%) se obtuvo una mayor síntesis de inulinasa en comparación con la obtenida a una concentración de 1%, por lo que podemos concluir que a concentraciones altas (1%) se ejerce una represión en la síntesis de la enzima; así mismo, a concentraciones bajas (0.25%) de fuente de carbono también se favoreció la excreción de inulinasa en ambas cepas.

Por otra parte, también se puede observar que la relación entre la producción de inulinasa de cada cepa a una concentración de 0.25% de fructosa aumentó en comparación con la obtenida a una concentración de 1%, por lo que se puede decir que dicho compuesto resulta ser inductor (a bajas concentraciones) y represor (a altas concentraciones) de la síntesis de inulinasa, lo cual concuerda con lo reportado por Grootwassink y Fleming (1983).

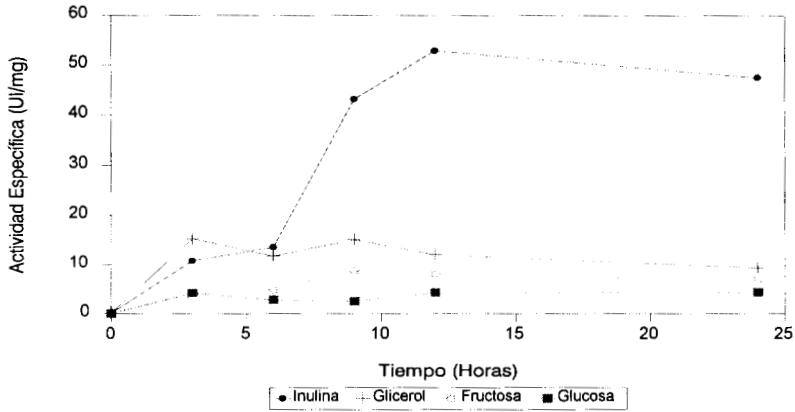
La producción de inulinasa ha sido reportada como inducible por varios autores (Grootwassink y Hewit, 1983, Bourgi y col., 1986), sin embargo, debido a la considerable producción que se obtuvo cuando fue usado el glicerol como fuente de carbono el cual no puede ser considerado como inductor pero tampoco ejerce represión catabólica, se puede concluir que la inulinasa es una enzima parcialmente constitutiva para las cepas en estudio.

Finalmente, se puede decir, que la cepa CDBBL-278 presentó una mayor producción de inulinasa (total y extracelular) en cualquiera de las concentraciones y de las fuentes de carbono probadas por lo que se puede caracterizar como hiperproductora e hiperexcretora.

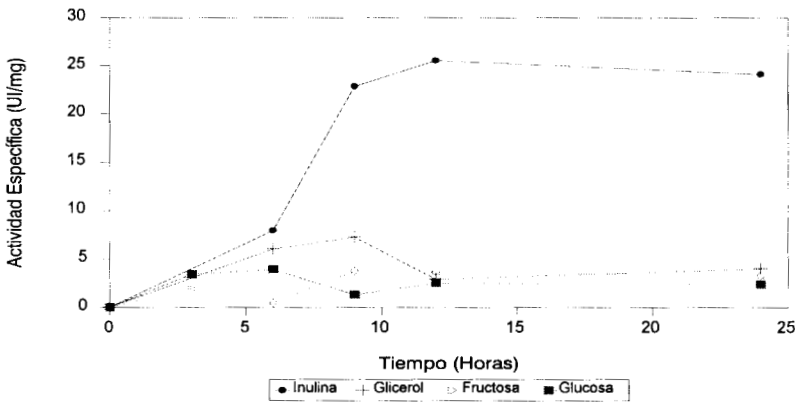
TABLA 7.7.2  
 INDUCCION Y REPRESION CATABOLICA  
 EN LA SINTESIS DE INULINASA  
 (\*Actividad Especifica a 24 Hr.)

Fuente de Carbono	Conc. 0.25%	Conc. 0.25%	Conc. 1%	Conc. 1%
	<b>CDBBL-278</b>	<b>NCYC-1429</b>	<b>CDBBL-278</b>	<b>NCYC-1429</b>
Inulina				
T	52.84	23.13	18.57	5.64
E	25.54	16.43	6.17	1.27
Glicerol				
T	9.28	4.71	9.97	2.77
E	4.02	2.50	0.88	0.53
Fructosa				
T	8.07	3.17	0.59	0.60
E	3.66	2.43	0.08	0.09
Glucosa				
T	4.33	1.99	0.78	1.02
E	2.40	1.39	0.11	0.22

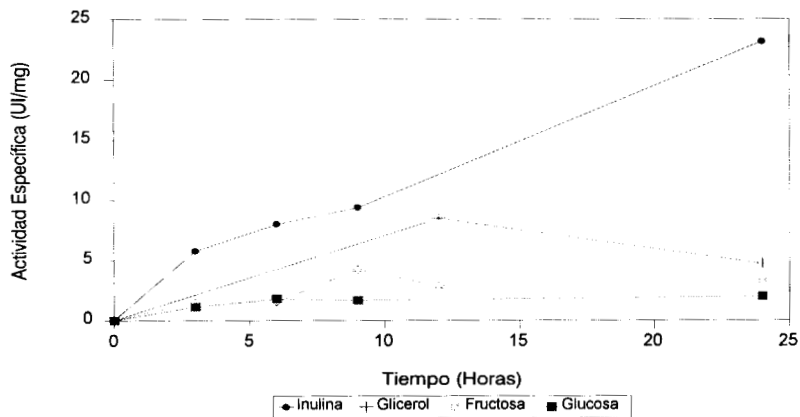
T: Actividad enzimática total., E: Actividad enzimática extracelular



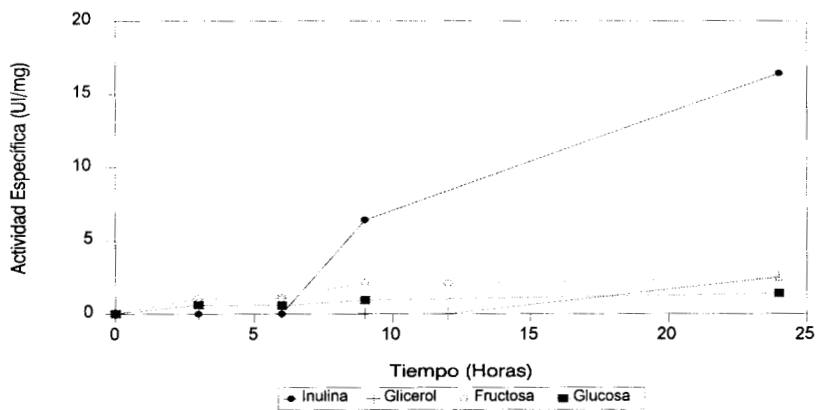
Gráfica 7.7.1 Comparación de fuentes de carbono: curvas de producción de inulinasa total a partir de la cepa CDBBL-278



Gráfica 7.7.2 Comparación de fuentes de carbono: curvas de producción de inulinasa extracelular a partir de la cepa CDBBL-278



Gráfica 7.7.3 Comparación de fuentes de carbono: curvas de producción de inulinasa total a partir de la cepa NCYC-1429



Gráfica 7.7.4 Comparación de fuentes de carbono: curvas de producción de inulinasa extracelular a partir de la cepa NCYC-1429

## 8. CONCLUSIONES

---

Con base en los resultados obtenidos durante la elaboración del presente trabajo , se puede concluir lo siguiente:

- 1) *Kluyveromyces marxianus* es una levadura de gran potencial tecnológico por su capacidad de producir enzimas de interés industrial como la endo-poligalacturonasa y la inulinasa, además de la lactasa. Las dos primeras son además extracelulares, lo cual facilita grandemente su recuperación.
- 2) A 60% de oxígeno disuelto se ve reprimida la producción de endo-poligalacturonasa, mientras que a 40 y 20% si hubo producción de dicha enzima siendo mayor en el primero.
- 3) La temperatura no ejerció un efecto inductor en la síntesis de endo-poligalacturonasa a una concentración de 3.3 mg de O.D./l en cualquiera de las diferentes temperaturas estudiadas (30, 35, 40 y 45 °C).
- 4) La pectina presentó un efecto como inductor en la producción de endo-poligalacturonasa tanto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto como a diferentes temperaturas, además dicho compuesto ejerció un efecto similar en la producción de la enzima al que se obtuvo con la disminución del oxígeno disuelto.
- 5) La glucosa indujo la producción de endo-poligalacturonasa en un intervalo de concentraciones de 0.2-2%.
- 6) De los estudios realizados con 2-desoxiglucosa en la producción de endo-poligalacturonasa se puede decir que la cepa mas resistente a dicho compuesto resultó ser la CDBBL-278. Además, utilizando la 2-desoxiglucosa se incrementó la producción de endo-poligalacturonasa e inclusive a concentraciones elevadas (0.6%) todavía se duplicó la actividad enzimática.
- 7) La 2-desoxiglucosa disminuyó drásticamente la síntesis de inulinasa tanto total como extracelular, sin embargo, en este caso la cepa CDBBL-278 resultó ser la menos afectada tanto en su crecimiento como en la producción de la inulinasa.
- 8) La 2-desoxiglucosa no puede ser utilizada como un agente selectivo para detectar cepas desreprimidas productoras de inulinasa.

- 9) La inulina fue el mejor inductor de inulinasa.
- 10) La fructosa resultó ser inductor a bajas concentraciones (0.25%) y represor a altas concentraciones (1%) de la síntesis de inulinasa.
- 11) La cepa CDBBL-278 se caracterizó como hiperproductora e hiperexcretora de inulinasa en inulina.
- 12) La levadura CDBBL-278 resultó ser una cepa particularmente interesante debido a su alta capacidad productora de las dos enzimas extracelulares, y por su alta resistencia a la 2-desoxiglucosa
- 13) Los fenómenos de regulación en la producción y/o excreción de la pectinasa en esta levadura son complejos y prácticamente no han sido estudiados. Las razones por las cuales el oxígeno disuelto y la 2-desoxiglucosa afectan tan fuertemente esta regulación deben estudiarse a profundidad. Es posible que estos comportamientos tengan alguna relación con la producción de un zimógeno inactivo, el cual se procesa al ser excretado para generar una pectinasa activa. Esto implica el hecho de que Espinosa y col. (1992) no hayan encontrado actividad pectinolítica intracelular. En este caso, la 2-desoxiglucosa podría estar facilitando la excreción del zimógeno por cambios en la membrana y/o pared celular ( lo que explicaría los cambios en la morfología) lo cual resulta en una mayor actividad de endo-poligalacturonasa



## 9. BIBLIOGRAFIA

---

Bajon, A., Giraud, J., Galzy, P. (1984). Isolation of inulinase desrepressed mutant of *Pichia polymorpha* for the production of fructose. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 128-133.

Barman, T. (1969). *Handbook Enzymology*. Springer-Veerlag Inc. Nueva York.

Barnby, F., Morpeth, F., Pyle, D. (1990). Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 12(Nov): 891-897.

Biely, P., Kratky, Z., Kovarik, J., Bauer, J. (1971). Effect of 2-deoxyglucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. *J. Bacteriol.* 107(1): 121-129.

Blanco-Sánchez, G. (1979). Obtención de fructosa a partir de la hidrolisis de inulina de Agave por diversos métodos. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México.

Bourgi, J., Giraud, J., Galzy, P. (1986). Isolation of a *Kluyveromyces fragilis* mutant hyperproducer inulinase for etanol production from Jerusalem artichoke. *J. Ferment. Technol.* 64(3): 239-243.

Byron, F. (1968). Lysis of yeast cell walls induced by 2-deoxyglucose at their sites of glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 95(3): 1169-1172.

Byun, S., Nahm, B. (1978). Production of fructose from Jerusalem Artichoke by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.* 43: 1871-1875.

Call, H. Emeis, C. (1983). Characterisation of an endopolygalacturonase of the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Biochem.* 7(2): 59-85.

Castillo, F. (1990). Lactose metabolism by yeast. En *Yeast: Biotechnology and Biocatalyst*. Verachtert, H. y De Mot R. (Ed.) Marcel Dekker. Nueva York.

Chaplin, M., Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Gran Bretaña.

Cruz-Guerrero, A., Bárzana, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1990). Caracterización de beta-fructofuranosidasa de *Kluyveromyces marxianus*. VIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. I.P.N. México.

Demain, A. Phaff, H. (1954). Hydrolysis of the oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. J. Biol. Chem. 210: 381-393.

Dhawale, M., Ingledew, W. (1983). Starch hydrolysis by desrepressed mutants of *Schwanniomyces castelli*. Biotechnol. Lett. 5: 185-190.

Douglas, A. Skook. (1992). Fundamentos de Química Analítica. Ed. Reverté. España. 437-445.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28(3): 350-356.

Elorza, M., Villanueva, J., Sentandreu, R. (1977). The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 475: 103-112.

Espinosa, P., Barzaná, E., García-Garibay, M., y Gómez-Ruiz, L. (1992). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectin or inulinase. Biotechnol. Lett. 14(11): 1053-1058.

Federici, F. (1985). Production, purification and partial characterization of an endo-polygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Antonie van Leeuwenhoek. 51: 139-150.

Forgaty, W. (1983). Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science. Londres.

Frances, M., Barnby, F., Morpeth, F., Pyle, D. (1990). Endopolygalacturonasa production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. Enzyme Microb. Technol. 12. (Nov): 891-897.

Franson, M. (1976). Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. 14<sup>a</sup> ed. 441-455.

Gancedo, J. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206: 207-313.

García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Bárzana, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 9(6): 411-416.

Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Bárzana, E. (1988). Utilisation of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in clarification of apple juice. *J. Food. Sci.* 53:1236-1240.

Giraud, J., Galzy, P. (1990). Inulin conversion by yeast. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. (Veracherter, H.). Marcel Dekker. Nueva York. 225-296.

Grootwassink, J., Fleming, S. (1980). Non-specific  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 45-53.

Grootwassink, J., Hewitt, G. (1983). Inducible and Constitutive formation of inulinase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 31-41.

Grootwassink, J., Hewitt, G. (1984). Simultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultured of *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 263-270.

Grootwassink, J., Tsang, E., (1985). Visual detection of  $\beta$ -fructofuranosidase (inulinase) regulatory mutants of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.* 7(3): 179-184.

Harsa, S., Zaror, C., Pyle, D. (1993). Production of polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Ferment. Proc. Biochem.* 28:187-195.

Heredia, C., De la Fuente, G., Sols, A. (1964). Mechanisms of inhibition of growth and fermentation in Baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 86: 216-223.

Heredia, C., Sols, A. (1964). Resistance to 2-deoxyglucose in a yeast mutant. *Biochim. Biophys. Acta.* 86: 224-228

Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51(4): 458-476.

Kirby, D., Davies, R. (1970). Thiol induced release of invertase from cell walls of *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 201: 261-266.

Kobayashi, Y., Matsuo, R. (1979). Biochemical Pulping III. Macerating activity of endo-polygalacturonase produced by *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 43(6): 1369-1370.

Kreger-van Rij, N. (1984). *The yeasts a taxonomic study.* 3ª ed. Elsevier. Amsterdam. 233-238.

Krop, J., Pilink, W. (1974). Cloud loss studies in citrus juice: cloud stabilisation by a yeast-polygalacturonase. *Lebensm-Wiss. Technol.* 7(2):121-124.

Kruif, P. (1981). *Cazadores de microbios.* 7a. ed. EPOCA. México.

Kurtzman, C. Robnett, C. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast* 7: 61-72.

Lanchance, M. (1993). *Kluyveromyces: systematics since 1970.* *Antonie van Leeuwenhoek.* 63: 95-104.

Lim, J., Yamasaki, Y., Suzuki, Y., Ozawa, J. (1980). Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 44(3): 473-480.

Luh, B., Phaff, H. (1951). Polygalacturonase of certain yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 212-227.

Luh, B., Phaff, H. (1954). Properties of yeast polygalacturonase. *Arch. Biochem. Biophys.* 48: 23-37.

Makoto, F., Okamoto, T. (1957). Yeast Pectic Enzymes. *Chem. Abst.* 51, 16686h.

Martinez-Cruz, J. (compiladora). *Methods for determination yeast viability. Tercer curso Internacional de tópicos sobre taxonomía, conservación y genética de levaduras y su aplicación en biotecnología.* UNAM-Cuernavaca, Mor. 16-27 Oct. 1989.

Mayrath, J., Bayer, K. (1979). Biomass from whey. En Economic Microbiology. vol. 4. Rose, A. (Ed.) Academic Press. Londres.

Negoro, H. (1978). Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. Ferment. Technol. 56: 102-107.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153(2): 375-380.

Ozawa, J., Okamoto, K., Hayashi, T. (1961). Pectin poligalacturonase of *Saccharomyces fragilis*. Chemical Abstracts. 55: 2799d.

Phaff, H. (1966).  $\alpha(1-4)$  polygalacturonide glycanohydrolase (endo-polygalacturonase) from *Saccharomyces fragilis*. Meth. Enzymol. 8: 636-641.

Phaff, H. Miller, M. (1978). The life of the yeasts. Harvard University Press, Cambridge Mass.

Philliskish, G., Yates, H. (1979). A method of producing ethyl alcohol. Chem. Abst. 90. P150301w.

Reed, G., Nagodawithana, T. (1991). Yeast Technology. 2a. ed. AVI. Nueva York.

Rosane, F., Rose, A. (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J. Appl. Bacteriol. 76(1):62-67.

Rose, A.H., Harrison, J.S. (1987). The Yeasts. Academic Press. 2ª de. Inglaterra. vol. 1, 3 y 4.

Rose, M., Albig, W., Entian, K. (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. Eur. J. Biochem. 203: 511-518.

Rouwenhorst, R., Hensing, M., Verbakel, J., Van Dijken, J. (1990). Estructure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* cbs 6556. Appl. Environ. Microbiol. 56(11): 3337-3345.

Royt, P., Macquillan, A. (1976). Evidence for an inducible glucose transport system in *Kluyveromyces lactis*. Biochim. Biophys. Acta. 426: 302-318.

Smith, J. (1988). Enzyme Technology. In: Biotechnology. Edward Arnold. Inglaterra.

Snyder, H., Phaff, H. (1960). Studies on  $\beta$ -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. Antonie van Leeuwenhoek. 26: 433- 452.

Snyder, H., Phaff, H. (1962). The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* of inulin. J. Biol. Chem. 237:2438-2441.

Toda, K. (1976). Dual control of invertase biosynthesis in chemostat culture. Biotechnol. Bioeng. 18:1103-1115.

Vandame, E., Derycke, D. (1983). Microbial Inulinases: fermentation process, properties and applications. Adv. in Appl. Microbiol. 29: 139-176.

Van Den Broek, P. J., Schuddemat, J. Van Leeuwen, C., y van Steveninck. (1986). Characterisation of 2-deoxyglucose and 6-deoxyglucose transport in *Kluyveromyces marxianus* evidence for two different transport mechanisms. Biochim. Biophys. Acta. 860:626-631.

Verachtert, H. y De Mot, R. (1990). Yeast, Biotechnology and Biocatalysis. Marcel Dekker. Nueva York.

Vivar, E., Bárzana, E. Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. (1990). Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de la poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*. VIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. I.P.N. México.

Wang, D., Cooney. Ch., Demain, A., Dunnill, P., Humprey, A., Lilly, M. (1979). Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons Inc. E.U.A.

Wimborne, M., Rickard, P. (1978). Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis*. Cult. in Contr. Envirom. Biotechnol. Bioeng. 20: 231-242.

Workman, W., Day, D. (1984). The cell wall associate inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. Antonie van Leeuwenhoek. 50: 349-353.