



Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*

Inulinase production by yeast *Kluyveromyces marxianus*

Augusto Castillo Calderón^{1,*}, Rolando Chamy Maggi²

¹ Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria s/n, Urb. Bellamar, Chimbote, Perú.

² Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Av. Brasil 2950, Valparaíso, Chile.

Recibido 04 agosto 2010; aceptado 22 octubre 2010

Resumen

En este trabajo se han revisado los principales avances alcanzados en los últimos veinte años, en el estudio de la fermentación de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de la enzima inulinasa a partir de inulina pura y fuentes de inulina y la determinación de las propiedades y características de la enzima. Con el propósito de recopilar y esclarecer el mayor conocimiento de ésta área, la investigación de ésta materia ha sido dividida en tres partes: sustratos fuentes de inulina; producción microbiana de inulinasa y caracterización y propiedades de la inulinasa. Se discute la información existente sobre los microorganismos capaces de producir inulinasa los que han sido publicados con datos de rendimiento y en particular las condiciones de fermentación de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de inulinasa a partir de varias fuentes vegetales de inulina. Se concluye que si bien es cierto existen cepas de *Kluyveromyces marxianus* capaces de producir satisfactoriamente inulinasa, la investigación para una fuente vegetal de inulina económicamente interesante todavía está en curso.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*, inulinasa, inulina.

Abstract

In this work the principal advances have been checked reached in the last twenty years, in the study of the fermentation of strains of *Kluyveromyces marxianus* for the production of the enzyme inulinase from inulin pure and sources of inulin and the determination of the properties and characteristics of the enzyme. With the aim of gathering and clarifying the greater knowledge of this one area, the investigation of this matter has been divided into three principal parts; substrate sources of inulin; microbial production of inulinase and characterization and properties of the inulinase. There is discussed the existing information about the microorganisms capable of producing inulinase those who have been brought by information of performance and especially the conditions of fermentation of strains of *Kluyveromyces marxianus* for the production of inulinase from several vegetable sources of inulin. One concludes that though it is true there exist strains of *Kluyveromyces marxianus* capable of producing satisfactorily inulinase, the investigation for a vegetable source of inulin economically interesting still is in process.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, inulinase, inulin.

1. Introducción

La inulinasa es una enzima caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1.5 a 2 veces la sacarosa

(Ricca *et al.*, 2007). De ahí el interés por su estudio para producirla, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos, siendo las levaduras *Kluyveromyces marxianus* las más estudiadas. Recientemente se han publicado estudios de producción de inulinasa por fermentación de

* Autor para correspondencia

E-mail: acascal2002@yahoo.es (A. Castillo)

Kluyveromyces marxianus en extractos de yacón, de espárragos y de tubérculos de dalia, con altos rendimientos de actividad enzimática (Cazetta *et al.*, 2005; Singh y Bhermi, 2008; Singh *et al.*, 2007b). Por tanto es necesario determinar recientes evidencias de mejoramiento de la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, ya sea descubriendo nuevas cepas salvajes de esta levadura, obteniendo otras por inserción molecular u optimizando los componentes del medio de cultivo con nutrientes tanto sintéticos orgánicos e inorgánicos y sustratos complejos como el extracto de yacón y evaluando las condiciones del cultivo microbiano como son la temperatura, el pH y la velocidad de agitación.

Este trabajo tiene como objetivo determinar el avance científico y tecnológico de la fermentación de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de inulinasa logrados en los últimos veinte años, desde la información a nivel de laboratorio como a escala piloto, que motiven realizar estudios de factibilidad de instalación de plantas de producción de enzimas, en el país. En tal sentido, el trabajo comprendió el estudio de las materias primas fuentes de inulina, microorganismos productores de inulinasa, con énfasis a la producción por fermentación de cepas *Kluyveromyces marxianus* y la determinación de las características y propiedades de la enzima.

2. Sustratos fuente de inulina

La inulina es el componente base de un sustrato empleado como fuente de carbono para la producción microbiana de inulinasa, sea como inulina pura o como extracto de materiales vegetales o materias primas renovables (Cazetta *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Sangeetha *et al.*, 2005; Singh y Bhermi, 2008).

La inulina es un fructano, un polisacárido almacenado en muchas plantas y consiste de

una cadena lineal de enlaces β (2-1) fructosil-fructosa; al final de la cadena está presente una unidad de glucosa a través de un enlace tipo sacarosa. En la inulina de origen vegetal, las unidades de fructosas enlazados a la glucosa terminal puede variar desde algunas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un polifructano con grado de polimerización (DP) mayor a 30 unidades (Pedreschi *et al.*, 2003; Ricca *et al.*, 2007; Seminario *et al.*, 2003).

La hidrólisis completa de la inulina genera fructosa y glucosa con un grado de concentración proporcional al DP inicial del polisacárido. El DP y la ramificación dependen del origen vegetal de la inulina. Comercialmente existe inulina de achicoria, dalia y alcachofa Jerusalem, con un DP promedio de 28 (Ricca *et al.*, 2007). Se han publicado que las propiedades de la inulina no solo dependen del tipo de planta sino también del manejo agronómico y almacenamiento que se haya dado, como son los casos de las raíces de achicoria, espárragos y yacón (Graefe *et al.*, 2004; Irvin y Hurst, 1993; Siomos *et al.*, 2010).

Una propiedad limitante del uso de inulina es su baja solubilidad en agua (6% a 10 °C y 35 % a 90 °C). Sin embargo el proceso de extracción a partir de vegetales es sencillo, tal como lo demuestran la producción de extracto de yacón y concentrado de inulina de raíces de achicoria y dalia y turiones de espárragos (Leite *et al.*, 2007; Ricca *et al.*, 2007; Singh y Bhermi, 2008; Kango, 2008).

Ricca *et al.* (2007) muestran los contenidos de inulina de la cebolla, alcachofa, ajo, plátano, y achicoria, observándose los que tienen mayor contenido del polisacárido son la alcachofa Jerusalem y la achicoria con 19 y 20 % peso respectivamente (base húmeda). Los rendimientos en inulina de las raíces y tubérculos son altos.

Sin embargo, la mayoría de las materias primas investigadas son costosas o tienen

limitada disponibilidad, a excepción del espárrago que contiene inulina sobre el 15% y su producción anual mundial es superior a la achicoria, la alcachofa Jerusalem y la dalia. Por lo que generalmente, la factibilidad de escalamiento para la producción de una enzima está basada en el alto rendimiento del microorganismo y la disponibilidad y lo barato que signifiquen las materias primas (Singh y Bhermi, 2008).

Se aprecia que estas fuentes de inulina han recibido especial atención en la investigación como materias primas renovables, para la producción de bioetanol, inulo oligosacáridos y jarabe de fructosa. El mejor procedimiento promisorio para la obtención de jarabe de fructosa desde inulina y materiales vegetales que contienen inulina, incluye el uso de la enzima inulinasa microbiana que por tratamiento hidrolítico en un solo paso, se obtienen rendimientos de hasta 95% de fructosa pura (Chi *et al.*, 2009; Ricca *et al.*, 2007).

3. Enzimas inulasa

La enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces β -D-(2-1)- fructosídicos en la inulina originando fructosa y glucosa se le denomina inulasa o β -D-(2-1)- fructano fructohidrolasa (E.C. 3.2.1.7), comúnmente conocida como inulinasa, perteneciendo al grupo de clasificación de enzimas hidrolasas glicosidasas (Kushi *et al.*, 2000; Laloux *et al.*, 1991).

Las enzimas inulinasas se pueden dividir en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas catalizan la remoción de unidades de fructosa desde el inicio hasta el final de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa. Las endoinulinasas catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la molécula de inulina, originando inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa sin actividad invertasa para hidrolizar el residuo de sacarosa (Rouwenhorst *et al.*, 1990).

La inulinasa puede ser obtenida a partir de especies vegetales y de muchos microorganismos, siendo los últimos capaces de producir suficiente enzima para aplicaciones industriales. Por esta razón en éstas tres últimas décadas se han realizado esfuerzos significativos por encontrar u obtener la mejor fuente microbiana para la producción de inulinasa, incluyendo hongos filamentosos (Otha *et al.*, 2004), levaduras (Rouwenhorst *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009) y bacterias (Zherebtsov *et al.*, 2003; Ricca *et al.*, 2007).

4. Microorganismos productores de inulinasa

La evaluación de la producción de una enzima por fermentación microbiana se determina por los parámetros de rendimientos (unidad de actividad/ml de caldo de cultivo o unidad de actividad/mg de células) de la enzima obtenida y por las propiedades de la enzima que dependen del tipo de microorganismo empleado, del modo de fermentación, del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Greasham y Inamine, 1986; Hensing *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2007).

Muchas cepas de mohos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasa y varios de ellos han sido cultivados con éxito y la enzima extraída, concentrada y purificada, como lo reportado en sendas publicaciones de revisión (Chi *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 1999; Otha *et al.*, 2004; Ricca *et al.*, 2007). Estos trabajos muestran cronológicamente nuevos conocimientos sobre el mejoramiento de la producción de inulinasas, caracterización de nuevas inulinasas, clonación y expresión de genes de inulinasas y sus respectivas aplicaciones. También se confirmó que los microorganismos más comúnmente utilizados son las cepas de mohos como el *Aspergillus* sp y cepas de levadura como *Kluyveromyces* sp, aunque las cepas de levadura producen

más inulinasa que las cepas de hongos y bacterias.

Entre las levaduras, además de *Kluyveromyces marxianus* que tienen alto potencial para producir inulinasa con altos rendimientos aceptables comercialmente, se han publicado últimamente que, se han seleccionado y mutado nuevas cepas como *Geotrichum candidum* (Mughal *et al.*, 2009); la levadura marina *Pichia guilliermondii* (Yu *et al.*, 2009) y se han clonado genes de inulinasa INU1 de *Pichia guilliermondii* en *Pichia pastoris* X-33 (Zhang *et al.*, 2009) alcanzándose rendimientos de: 71,85 U/ml en 48 h de cultivo; 127.7 U/ml en 120 h y 286.8 U/ml en 120 h de fermentación respectivamente, siendo estos valores los más altos publicados a la fecha, aunque esto involucra mayores tiempos de fermentación.

Considerando que los mayores esfuerzos están dirigidos a producir inulinasa para aplicarlos en la producción de jarabe enriquecido de fructosa, como un edulcorante de bajo poder calórico, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* que tienen el *status* de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) en los Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente, son preferidos para la producción de inulinasa con fines alimentarios y biotecnológicos (Lane y Morrissey, 2010).

Además de ser la inulinasa una enzima nativa de la levadura lechera *Kluyveromyces marxianus*, es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener la mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microbio eucariote, termotolerante, con habilidad para crecer sobre los 52 °C, capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves, como la lactosa e inulina y una alta capacidad secretoria de enzimas líticas, hacen de éste microorganismo líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos. *Kluyveromyces marxianus* es una especie que incorpora muchos sinónimos, se describe como una levadura homotálica,

hemiascomyceto, es filogenéticamente relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* y es una especie hermana de la mejor conocida *Kluyveromyces lactis* (Lane y Morrissey, 2010). Una fotografía de *Kluyveromyces marxianus* se muestra en la figura 1.

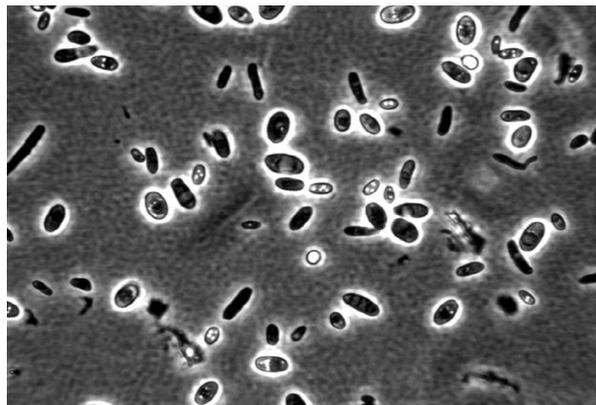


Figura 1. Células de levadura *Kluyveromyces marxianus* creciendo en glucosa, bajo condiciones aeróbicas, cultivadas en matraces *shaker* a 45 °C y 120 rpm (Madeira, 2004).

5. Producción de inulinasa por cepas de *Kluyveromyces marxianus*

Según Pandey *et al.* (1999), los mejores resultados de producción de inulinasa son dados por los mohos *Aspergillus niger* (75 U/ml) y *A. niger* A42 (4600 U/g). También algunas cepas mutantes de levaduras, como *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556, exhibieron rendimientos de 3000 U/ml; mientras que las bacterias no mostraron comparables rendimientos de inulinasa.

Las levaduras tienen la ventaja sobre los mohos de tener una mayor velocidad de generación celular y adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de cultivo, y en esto las cepas de *Kluyveromyces marxianus* han sido últimamente más estudiadas. Cruz-Guerrero *et al.* (1995) demostraron que la *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 fue una levadura híper productora de inulinasa parcialmente constitutiva y, aunque la cepa mostró tener una alta resistencia al 2-desoxiglucosa, la

producción de inulinasa fue reprimida catabólicamente, al confirmarse que en una fermentación en un medio de 4 % de glucosa y 4 % de inulina, la inulinasa comenzó a producirse cuando los niveles de glucosa fueron lo suficientemente bajos, alcanzándose un rendimiento de 82 U/ml al término de las 24 horas.

También una levadura de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* fue evaluada primero en cultivo continuo en medios con diferentes fuentes de carbono, en que los más altos rendimientos de inulinasa fueron obtenidos con sacarosa como sustrato limitante, resultando valores de 107 U/ml para una velocidad de dilución de 0.05 h^{-1} y 0.81 U/ml para un valor de 0.45 h^{-1} , precisándose que los niveles de actividad de inulinasa en cultivos con sacarosa fueron fuertemente dependientes de la velocidad de dilución y la levadura regulada por el azúcar residual en el cultivo continuo. Después en cultivos en matraces de 250 ml, 50 ml de medio a 30 °C, velocidad de agitación 200 rpm, después de 72 horas y de las respectivas etapas de purificación se alcanzaron actividades específicas con inulina de 170 U/mg, la más alta, respecto con fructosa 94.2 U/mg, o con glucosa 59.5 U/mg o con sacarosa 35.5 U/mg (Kushi *et al.*, 2000).

Kalil *et al.* (2001) en un estudio de optimización de la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 determinaron que las condiciones de cultivo fueron: 14 g/l de sacarosa, 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 1 g/l de K_2HPO_4 y pH 3.5. La actividad enzimática fue de 127 U/ml. El K_2HPO_4 tuvo un efecto positivo débil sobre la actividad enzimática aunque estadísticamente fue significativa.

Desde un punto de vista industrial es importante señalar que la inulina proveniente de materias primas vegetales es considerada como la mayor fuente de carbono, más que la inulina pura, como ha sido comprobado en estudios reportados y que se describen a continuación.

Se ha evaluado la fermentación de *Kluyveromyces* sp. Y-85 en un medio optimizado usando como fuente de carbono extracto de alcachofa, la experiencia primero fue realizada en matraces a 30 °C por 24 horas, alcanzándose el máximo rendimiento de 59.5 U/ml de medio compuesto por 8.0% de extracto de alcachofa; 2% de úrea; 0.2% extracto de carne y 4% de licor dulce de maíz. Posteriormente se evaluó el efecto de la aireación variando los volúmenes de medio sobre la producción de inulinasa, infiriendo que el oxígeno no influyó mucho en el rendimiento. Esta propiedad sería muy importante para el caso de una producción industrial, en cuanto se ahorraría costos de producción (Wei *et al.*, 1998).

Con el medio optimizado se escaló la fermentación en un fermentador de 15 litros, con un volumen de medio de 7 L, inóculo 5% (v/v), a 30 °C, aireación 1.5 vvm y velocidad de agitación 400 rpm, alcanzándose un rendimiento promedio de 67.6 U/ml. Las cinéticas de fermentación muestran que la síntesis de inulinasa se inhibió por la alta concentración de carbohidrato reductor (> 2 g/l) en el medio de cultivo. Cuando la experiencia se realizó en un fermentador de torre de 1000 L se obtuvo un rendimiento máximo de 68.9 U/ml, el más alto reportado a la fecha (Wei *et al.*, 1998).

Se ha publicado la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* en extracto de yacón al 30 % (v/v), habiendo mostrado esta levadura un alto potencial de producción (4.1 U/ml a las 16 horas de incubación) y su gran capacidad de adaptación en diferentes sustratos y su gran crecimiento a diferentes valores de pH (pH 3,5 fue el óptimo) y en amplios rangos de temperatura (20 a 40 °C) (Cazetta *et al.*, 2005).

Xion *et al.* (2007) determinaron un medio de cultivo adecuado para obtener el mayor rendimiento de inulinasa por *Kluyveromyces* S120. El medio de fermentación estuvo compuesto de 12.72 % de inulina, 10.76% de

licor de maceración de maíz como fuente de nitrógeno y 1.61% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, empleando salvado de trigo como sustrato sólido, alcanzándose un máximo rendimiento de inulinasa de 409.8 U/g de sustrato seco inicial, constituyéndose el valor más alto publicado en la literatura de esa fecha. En la cinética de fermentación se observa que el máximo rendimiento lo alcanzó después de las 96 horas de cultivo. Debido al decaimiento del crecimiento celular después de 84 h o la degradación parcial de inulinasa por enzimas proteolíticas, la producción de inulinasa decayó después de 96 h; por lo que sugirieron que la inulinasa producida por *Kluyveromyces* S120 pudo ser un ejemplo de un producto asociado al crecimiento.

Singh y Bhermi (2008) obtuvieron una alta actividad de inulinasa (50.2 U/ml) a partir de la fermentación *K. marxianus* YS-1 usando extracto pulverizado de raíz de espárrago (con 4 % de inulina), en un reactor de 1.5 Litros, bajo agitación de 1200 rpm y 0.75 vvm a 30 °C y después de 60 horas de fermentación, por lo que se concluyó utilizar esta fuente como materia prima, por ser abundante y barato. Además se demostró por fermentación de *K. marxianus* YS-1 en matraces Erlenmeyer sobre el extracto de espárrago conteniendo un máximo de 1.54% de inulina, que los métodos de extracción de inulina desde los tubérculos de raíz de espárragos, ejercieron también efecto sobre el rendimiento de inulinasa.

Se ha demostrado que el tipo de sustrato tiene efecto sobre la naturaleza extra e intracelular de la enzima. Esta propiedad depende principalmente de la clase de microorganismo empleado, particularmente, la mayoría de hongos produce enzima extracelular, mientras que las levaduras producen ambas, tanto en el medio de cultivo como en el interior de la célula (Rouwenhorst *et al.*, 1990).

Singh *et al.* (2007b), en un estudio de optimización de medio y parámetros de proceso para la producción de inulinasa a partir de una nueva cepa de *Kluyveromyces*

marxianus YS-1 en matraces, demostraron que el rendimiento de enzima aumentó con el incremento del pH inicial del medio hasta un valor de 6.5 a una producción máxima de enzima de 24.5 U/ml y de ahí el rendimiento declinó. Se recomendó trabajar a un intervalo de pH inicial de 6.4 a 6.5 y temperatura de 30°C para una producción óptima con esta cepa. En este estudio también se evaluó el efecto de la aireación y agitación sobre la producción de inulinasa. La velocidad de agitación de 150 rpm y una aireación de 1 vvm ha sido reportada como óptima para cultivos en matraces. La variación de la velocidad de agitación no solo afecta la disponibilidad de oxígeno, si no también ejerce influencia sobre la disponibilidad de otros nutrientes en el medio. Por tanto la aireación y agitación son factores críticos para *K. marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática.

Cuando *K. marxianus* NRRL Y-7571 creció en un cultivo sólido conteniendo bagazo de caña de azúcar como soporte y fuente de carbono y suplementado con licor de maíz como fuente de nitrógeno, la concentración de inulinasa extracelular alcanzó el valor de 391.9 U/g de bagazo seco fermentado (Bender *et al.*, 2006). Cuando se usó salvado de soja el tiempo de fermentación para alcanzar la actividad máxima decreció de 96 a 24 h y la productividad máxima alcanzada por *K. marxianus* NRRL Y-7571 fue de 8.87 U/ g.h (Mazutti *et al.*, 2006).

Mazutti *et al.* (2010) evaluaron la cinética del crecimiento celular y producción de inulinasa por *K. marxianus* NRRL Y-7571 en un reactor de lecho empacado con bagazo de caña, melaza de caña, licor de maíz y salvado de soja por efecto de la temperatura del aire de ingreso y el caudal volumétrico de aire, los mismos que correspondieron a valores óptimos de 30 °C y 3 m³/h, alcanzando una actividad promedio de 463 U/g de sólido seco. Concluyeron que estos resultados pueden ser usados para el escalamiento y optimización de la configuración de

bioreactores de lecho empacado para la producción de inulina.

Una lista resumen de cepas de *K. marxianus* productoras de inulina se reporta en la tabla 1, notándose que ellas producen inulina con una alta actividad enzimática. Para mejorar los resultados mostrados es importante evitar los efectos de represión por glucosa sobre la

producción de inulina y utilizar fuentes naturales de inulina como extractos de yacón, espárragos y alcachofas. Por tanto la factibilidad del escalamiento para la producción enzimática industrial está basada grandemente en el alto rendimiento del microorganismo, el sustrato base a emplear y el diseño del proceso de fermentación.

Tabla 1

Cepas de *Kluyveromyces marxianus* y rendimientos en inulina.

Microorganismo	Tipo de cultivo	Rendimiento U/ml	Referencia
<i>Kluyveromyces sp.</i> Y-85	Líquido	59.5	Wei <i>et al.</i> , 1998
<i>K. marxianus</i>	Líquido	43.7	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	Líquido	260	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 52466	Líquido	0.418	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> CDBB-L-278	Líquido	82	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 1995
<i>K. marxianus var. marxianus</i> CBS 6556	Líquido	3000	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> UCD(FST) 55-82	Líquido	212	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	Continuo	107	Kushi <i>et al.</i> , 2000
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Líquido	121	Silva-Santisteban y Filho, 2005
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	Líquido	4.1	Cazzeta <i>et al.</i> , 2005
<i>K. marxianus</i> (A1 y A2)	Líquido	32	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 2006
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	3 91.9 U/g	Bender <i>et al.</i> , 2006
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Líquido	8.87 U/g.h	Mazutti <i>et al.</i> , 2006
<i>Kluyveromyces</i> S120	Sólido	409.8 U/g	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	24.5	Singh <i>et al.</i> , 2007b
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	50.2	Singh y Bhermi, 2008
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	463 U/g	Mazutti <i>et al.</i> , 2010

6. Caracterización y propiedades de la inulina

La inulina (E.C. 3.2.1.7) es una enzima miembro de la familia de glicósido hidrolasa 32(GH32), la cual catalisa la hidrólisis de inulina a fructosa. La purificación de inulina microbiana extracelular es hecha por métodos convencionales de centrifugación, ultrafiltración, precipitación con solventes o sales, cromatografía de intercambio iónico y de permeación en gel, mientras que las inulina intracelular requiere disrupción celular antes de practicar los métodos reportados para las enzimas extracelulares (Kushi *et al.*, 2000).

El proceso de extracción de la inulina, además de determinar el rendimiento y si la enzima es extracelular o intracelular, determina otras características como su peso molecular (MW), su modo de acción sobre la molécula de inulina, su actividad hidrolítica sobre la sacarosa, respuesta a los cambios de pH y temperatura, propiedades cinéticas y efecto de la concentración de sustrato (Chi *et al.*, 2009).

Se ha reportado diferentes valores de MW dependiendo de la fuente de microorganismo, del método de determinación, así por ejemplo para la *K. marxianus var. bulgáricus* varía de

57 a 77 KDa (Kushi *et al.*, 2000) y para *K. marxianus* CBS 6556 se determinó un valor de 64 KDa (Rouwenhorst *et al.*, 1990).

Se ha determinado que las inulinasas pueden ejercer dos modos de acción diferentes sobre la molécula de inulina, una acción extrema y una acción interna, correspondiendo dos clases de inulinasas llamadas exo-inulinasas y endo-inulinasas respectivamente. Las exo-inulinasas (74 KDa, pH 5.1 – 7.0) empiezan con la separación de la primera molécula de D-fructosa y va hasta el último enlace para liberar glucosa de la unidad de sacarosa y la endo-inulina (64 KDa) actúa sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacáridos (inulotriosa, inulotetrosa y inulopentosa) pero sin actividad invertasa. Estas propiedades dependen del origen microbiano de la enzima. De este punto de vista la mejor cepa sería la que tenga ambas propiedades, como el caso del *A. ficuum* (Pandey *et al.*, 1999), dado que una mezcla de endo y exo inulina puede resultar en una mejor conversión de inulina a fructosa que solo utilizar enzimas puras aisladas, dado que las endo-inulinasas romperían las moléculas de inulina en muchos oligosacáridos, aumentando así los puntos de ataque para las exo-inulinasas, con el consecuente incremento de la velocidad de reacción de inulina a fructosa.

Por tanto queda probado que las exo-inulinasas también ejercen actividad catalítica sobre la sacarosa, desdoblándola en glucosa y fructosa, es decir tienen actividad de invertasa. Se afirma que la actividad invertasa es mayor en enzimas producidas por levaduras que en aquellas obtenidas a partir de mohos (Ricca *et al.*, 2007). Notoriamente una actividad invertasa de inulina es deseable. Laloux *et al.* (1991) sostienen que las inulinasas poseen sitios catalíticos comunes, pero diferentes sitios de enlace para la hidrólisis de inulina y sacarosa.

La actividad y estabilidad depende de la respuesta de la enzima a los cambios de temperatura y pH. Los valores de temperatura

y pH dependen del tipo de microorganismo usado como fuente, generalmente se da valores más altos para bacterias y levaduras que mohos. Así se tienen los rangos de valores de pH, para mohos 4.5 – 7.0, para levaduras 4.4- 6.5 y para las bacterias 4.8 – 7.0 (Ricca *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2007b), determinaron que la exo-inulina de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 exhibió considerable actividad a un valor de pH óptimo de 5.5 en que mantuvo estable su actividad catalítica al 100% durante 3 h a la temperatura óptima de 50 °C. Se observa que todavía existe la necesidad de investigar la actividad y estabilidad de la inulina contra la temperatura, así como los modelamientos y simulación de procesos o cinética de desactivación de la enzima.

Por otra parte se han evaluado los parámetros cinéticos de inulinasas provenientes de diferentes fuentes de microorganismos en torno a solo un valor de temperatura óptima. Kushi *et al.* (2000) determinaron los valores de los parámetros cinéticos aparentes K_m y V_{max} de la inulina purificada por HPLC de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 en presencia de inulina y sacarosa siendo 86.9 mg/ml y 53.7 U/mg de proteína y 4.58 mg/ml y 441.0 U/mg de proteína a 55 °C y pH 4.4 óptimos, respectivamente, demostrando que la enzima producida es una exo-inulina con más alta afinidad y reactividad por la sacarosa que por la inulina. De Paula *et al.* (2008) también determinaron los valores de los parámetros cinéticos de un caldo crudo exento de células conteniendo inulina de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 siendo de K_m igual a 61.83 mM y V_{max} igual a 37.60 U/mg de proteína a 55 °C y pH 3.5 óptimos.

7. Inmovilización

Un medio crudo libre de células de un cultivo de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 fue inmovilizado en gelatina tratado con glutaraldehído resultando con una

actividad de inulinasa del 82.20 %. Sus parámetros cinéticos fueron de K_m igual a 149.28 mM y V_{max} igual a 31.45 U/mg de proteína a 55 °C y pH 3.5 óptimos. La inulinasa inmovilizada actuó con una eficiencia de conversión de sacarosa del 58.12 % en un reactor continuo de lecho fijo operando por 33 días (de Paula *et al.*, 2008). Células de *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa, fueron inmovilizadas en alginato de bario tratado con glutaraldehído, manteniéndose una actividad residual del 85 % y una eficiencia del sistema (η) de 0.79 para un diámetro de partícula de 1.43 mm. El coeficiente de difusión (D_E) de la inulina hacia el interior del soporte fue de $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ mientras que el módulo de Thiele (ϕ) fue cercano a 1, confirmándose que el factor limitante del sistema fue la resistencia difusional del sustrato. Sus parámetros cinéticos fueron de K_m igual a 0.522 mM y V_{max} igual a $113.7 \mu\text{mol min}^{-1}$ de proteína (Barranco-Florido *et al.*, 2001).

Pratima y Argyrios (1985a) inmovilizaron células *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa en una matriz de gelatina de poro abierto tratado con glutaraldehído, manteniéndose una actividad residual mayor al 90 %. El procedimiento de inmovilización no alteró el valor del pH que fue de 6.0 tanto para las células libres como para las inmovilizadas. La temperatura de hidrólisis de la inulina fue 10° C más alto para las células inmovilizadas. Los valores de K_m fueron de 8 y 9.52 mM para las células libres e inmovilizadas respectivamente. Estas células inmovilizadas conservaron su actividad hasta por 30 días cuando se le conservó a 4° C.

También Pratima y Argyrios (1985b) evaluaron la producción por lotes y en continuo de jarabe de fructosa a partir de alcachofa Jerusalem con células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa, en una matriz de gelatina de poro abierto tratado con glutaraldehído. En el reactor por lotes la

hidrólisis fue del 93 % alcanzándose una concentración de fructosa de 42 g/l al término de 3 horas. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando las células inmovilizadas se reusaron durante 10 lotes. Cuando se operó el reactor continuo con 65.7 g/l de células inmovilizadas se obtuvo un aproximado del 100 % de hidrólisis, a velocidades de dilución menores a 1.26 h^{-1} .

8. Conclusiones

En este estudio de revisión, se han determinado a la actualidad, un conjunto cepas de *Kluyveromyces marxianus* con gran potencial biotecnológico para producir inulinasa, pero la investigación para una fuente vegetal de inulina económicamente interesante todavía está en curso. Desde un punto de vista industrial, el uso de inulina de vegetales como materia prima para la producción de inulinasa por fermentación, se vislumbra como promisorio, sobre todo para el espárrago por ser uno de los cultivos de mayor producción mundial, respecto a las materias primas comerciales actuales y de alto contenido de inulina. Para propósitos de escalamiento del bioproceso será necesario tener en cuenta que, la aireación y agitación son factores críticos para la fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática. Se ha visto que hay necesidad de investigar la actividad y estabilidad de la inulinasa frente a la temperatura, modelando y simulando la cinética de desactivación. Los parámetros cinéticos de la inulinasa están en función al tipo de microorganismo, las condiciones ambientales de la fermentación y del modo de acción de la enzima.

Referencias

- Barranco-Florido, E.; García- Garibay, M.; Gómez-Ruíz, L.; Azaola, A. 2001. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochem*, 37: 513-519.
- Bender, J.; Mazutti, M. Treichel, H.; Di Luccio, M. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*

- NRRL Y - 7571 using solid state fermentation. Appl Biochem Biotechnol, 32:951-958.
- Cazetta, M.; Martins, P.; Monti, R.; Contiero, J. 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. Journal of Food Engineering, 66: 301-305.
- Chen, X.; Wang, J.; Li, D. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. Biochem. Eng. J. 34: 179-184.
- Chi, Z.; Chi, Z.; Zhang, T.; Liu, G. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. J Appl Glycosci, 51: 247-254.
- Cruz-Guerrero, A.; García-Peña, I.; Barzana, E.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruíz, L. 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. J. Ferment. Bioeng, 80 : 159-163.
- Cruz-Guerrero, A.; Olvera, J.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruíz, L. 2006. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. Isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. World J. Microbiol Biotechnol, 22 :115-117.
- de Paula, F.; Cazetta, M.; Monti, R.; Contiero, J. 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. Food Chemistry, 111: 691-695.
- Graefe, S.; Hermann, M.; Manrique, I.; Golombek, S.; Buerkert, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacón roots in the Peruvian Andes. Field Crops Research, 86: 157-165.
- Greasham, R.; Inamine, E.. 1986. Nutritional Improvement of Processes. En Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, (Ed. Demain & Solomon); pp 59-65. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hensing, M.; Vrouwenvelder, J.; Hellinga, C.; Van Dijken, J.; Pronk, J. 1995. Use of chemostat data for modelling extracellular inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high cell density fed batch process. Journal of Fermentation and Bioengineering, 79: 54 – 58.
- Irving, D.; Hurst, P. 1993. Respiration, soluble carbohydrates and enzymes of carbohydrate metabolism in tips of harvested asparagus spears. Plant Science, 94: 89-97.
- Kalil, S.; Suzan, R.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. 2001. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. Appl Biochem Biotechnol, 94:257-264.
- Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. Journal of food Engineering, 85: 473 – 478.
- Kushi, R.; Monti, R.; Contiero, J. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 25: 63-69.
- Laloux, O.; Cassart, J.; Delcour, J.; Van Beeumen, J.; Vandenhoute, J. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* ATCC 12424. FEBS LETTERS, 289: 64 – 68.
- Lane, M.; Morrissey, J. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews, doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.
- Leite, J.; Murr, F.; Martinelli, P. Dal, I.; Park, K. 2007. Optimization of a physical concentration process for inulin. Journal of Food Engineering, 80: 832-838.
- Liu, Y.; Liu, Q.; Tay, J. 2005. Initial conditions-dependent growth kinetics in microbial batch culture. Process Biochemistry, 40:155-160.
- Madeira, E. 2004. Kinetic analysis of *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. Louisiana State University. Disponible en: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-04152004-161117/unrestricted/Reeves_thesis.pdf.
- Mazutti, M.; Bender, J.; M. Treichel, H. y Di Luccio. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme Microb Technol, 39:56-59.
- Mazutti, M.; Zobot, G.; Boni, G.; Skovronski, A.; de Oliveira, D.; Di Luccio, M.; Rodrigues, M.; Treichel, H.; Maugeri, F. 2010. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. Food Chemistry, 120: 163-173.
- Mughal, M.; Ali, S.; Ashiq, M.; Talish, A. 2009. Kinetics of an extracellular exo-inulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using two-factorial design. Bioresour Technol, 100: 3657-3662.
- Otha, K.; Akimoto, H.; Moriyama S. 2004. Fungal Inulinases: Enzymology, Molecular Biology and Biotechnology, 51: 247-254.
- Pandey, A.; Soccol, C.; Selvakumar, P.; Soccol, V.; Krieger, N.; Fontana, J. 1999. Recent Developments in Microbial Inulinases. Appl Biochem Biotechnol, 81: 35-52.
- Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean Yacón Root (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 5278-5284.
- Pratima, B.; Argyrios, M. 1985a. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. Enzyme Microb Technol, 7 (8): 373-376.
- Pratima, B.; Argyrios, M. 1985b. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 2. Application for high fructose syrup production. Enzyme Microb Technol, 7 (9): 459-461.
- Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S.; Dorio, G. 2007. The State of the Art in the Production of Fructose from inulin Enzymatic Hydrolysis. Crit Rev Biotechnol, 27: 129-145.
- Rocha, J.; Catana, R.; Ferreira, B.; Cabral, J.; Fernandes, P. 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry, 95:77-82.
- Rouwenhorst, R. Hensing, M.; Verbakel, J.; Scheffers, W.; Van Dijken, J. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Appl. Environ. Microbiol.54(5):1131-1137.
- Rouwenhorst, R.; Hensing, M.; Verbakel, J.; Scheffers, W.; Van Dijken, J. 1990. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology, 56: 3337-3345.
- Sangeetha, P.; Armes, M.; Prapulla, S. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. Trends in Food Science & Technology, 16: 442-457.

- Seminario, J.; Valderrama, M.; Manrique, I. 2003. El Yacón fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. CIP y COSUDE, Lima Perú, 60p.
- Silva-Santisteban, B.; Filho F. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb Technol*, 36:717-724.
- Singh, R.; Bhermi, H. 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-I using root tubers of *Asparagus officinalis*. *Bioresource Technology*, 99: 7418 – 7423.
- Singh, R.; Dhaliwal, R.; Puri, M. 2007a. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *J Microbiol Biotechnol*, 17(5): 733-738.
- Singh, R.; Singh, B.; Puri, M. 2007b. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-I. *Bioresource Technology*, 98: 2518 – 2525.
- Siomos, A.; Gerasopoulos, D.; Tsouvaltzis, P.; Koukounaras, A. 2010. Effects of heat treatment on atmospheric composition and color of peeled white asparagus in modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11 (1): 118-122.
- Wei, W.; Zheng, Z.; Liu, Y.; Zhu, X. 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces sp.* Y-85 and scaling – up fermentation. *J. Ferment. Bioeng*, 86 (4): 395 -399.
- Xiong, Ch.; Jinhua, W.; Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid.state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34: 179 – 184.
- Yu, X.; Guo, N.; Chi, Z.; Gong, F. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochem Eng J*, 43: 266-271.
- Zhang, T.; Gong, F.; Peng, Y.; Chi, Z. 2009. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. *Process Biochem*, doi:10.1016/j.procbio.2009.07.008.
- Zherebtsov, N.; Abramova, I.; Shelamova, S.; Popova, T. 2003. Identification of Catalytically Active Groups in Inulinase from *Bacillus polymyxa* 722. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (6): 544-548.