

Aislamiento e identificación de *Hanseniaspora uvarum* y su empleo en la producción de inulinazas a partir del jugo de agave

Julio Silva-Mendoza^a, Jesús Alberto Gómez-Treviño^a, Leonardo Chávez-Guerro^b, Mónica Noel Sánchez-González^c, María Elena Cantú-Cárdenas^{a*}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Universidad s/n, Ciudad universitaria, C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, México.

^bUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Av. Universidad s/n, Ciudad universitaria, C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, México.

^cUniversidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química, Periférico Norte, Km 33.5, Tablaje Catastral, C.P. 13615, Mérida, México.

*e-mail: maria.cantucd@uanl.edu.mx

Recibido: 05 de Enero de 2024, Aceptado: 01 de Marzo de 2024

Resumen

Las hojas de agave desechadas durante la producción de bebidas tradicionales mexicanas contienen una alta cantidad de fructanos que se pueden aprovechar, para ello, se necesitan de enzimas capaces de hidrolizarlos y convertirlos a azúcares simples. En este trabajo se aislaron levaduras de una muestra de aguamiel de agave, identificadas molecularmente como especies de *Rhodotorula* y *Hanseniaspora*. Las levaduras fueron empleadas para producir inulinazas mediante fermentación sumergida con jugo extraído de las hojas de *Agave salmiana* (*A. salmiana*) como fuente de carbono y nutrientes. La levadura identificada como *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*) presentó la mayor actividad enzimática, alcanzando una actividad de 180.5 U/mL a condiciones de trabajo de 40°C y pH de 5.

Palabras clave: agave; hidrólisis enzimática; levaduras; inulinazas

Abstract

Discarded agave leaves from the production of traditional Mexican beverages contain a high amount of fructans that can be utilized. To achieve this, enzymes capable of hydrolyzing them into simple sugars are required. In this study, the yeast strains were isolated from a sample of agave sap, molecularly identified as species of *Rhodotorula* and *Hanseniaspora*. The yeasts were used to produce inulinases through submerged fermentation using juice extracted from the leaves of *Agave salmiana* (*A. salmiana*) as the source of carbon and nutrients. The yeast identified as *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*) exhibited the highest enzymatic activity, reaching an activity of 180.5 U/mL under working conditions of 40°C and a pH of 5.

Keywords: agave; enzymatic hydrolysis; yeasts; inulinases

1. Introducción

Las inulinas; también conocidas como fructanos, son un tipo de polisacáridos lineales constituidos por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -1,2 que al hidrolizarse generan fructooligosacáridos (2 a 60 unidades de fructosa) o monómeros de fructosa [1, 2]. Los fructooligosacáridos son considerados como prebióticos y carbohidratos dulces no cariogénicos, por lo que se emplean en las industrias farmacéuticas, biotecnológicas y alimentarias [3, 4]. La fructosa por otro lado puede ser empleada como edulcorante en alimentos y medicamentos, ya que no provoca una respuesta de insulina evitando la vía metabólica de la glucosa [5]. Además, la fructosa es un azúcar simple que puede ser fermentada por varios microorganismos y se puede aprovechar para la producción de biocombustibles como

bioetanol y biodiesel [6 – 8].

La inulina se encuentra presente en bulbos, tubérculos y raíces tuberosas de muchas plantas como alcachofa, achicoria, espárragos, dalia, agaves, entre otras [9 – 11]. Las especies de agave contienen un tipo de inulina conocida comúnmente como agavina, la cual es esencial para la producción del tequila y otras bebidas alcohólicas [12]. La agavina se encuentra presente tanto en la piña como en las hojas de los agaves, sin embargo, solo la piña es aprovechada para la elaboración de bebidas alcohólicas y otros productos; como la miel de agave, mientras que las hojas son descartadas [13].

Para la obtención de fructooligosacáridos y fructosa a partir de la inulina, ésta suele hidrolizarse químicamente con ácidos fuertes, sin embargo, se producen moléculas

que pueden inhibir a los microorganismos fermentadores, esto se puede evitar empleando enzimas hidrolíticas, las cuales no generan estas moléculas inhibitorias [14]. La hidrólisis enzimática de la inulina puede llevarse a cabo por el empleo de inulinasas, un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces β -1,2. De acuerdo con su selectividad y modo de acción, las enzimas pueden dividirse en endoinulinasas (E.C. 3.2.1.7) que rompen los enlaces internos de la inulina liberando fructooligosacáridos, y exoinulinasas (E.C. 3.2.1.80) que escinden la fructosa del extremo no reductor liberando los monómeros [2, 10].

Las inulinasas son producidas por animales, plantas y microorganismos, siendo las microbianas producidas industrialmente gracias a sus ventajas de fácil manejo y alta productividad [15]. Algunos hongos y levaduras producen inulinasas tanto por fermentación sumergida como por fermentación en estado sólido [10, 16 – 19]. Dentro de los principales géneros productores se encuentran *Aspergillus*, *Penicillium*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula* [17, 20]. Sin embargo, no se descarta su presencia en otras especies, por lo que es necesario seguir buscando nuevos microorganismos productores de estas enzimas que puedan resultar con una mayor actividad inulinítica.

Como se mencionó anteriormente, las hojas de agave son un residuo generado durante la elaboración de bebidas alcohólicas [13]. En ocasiones suelen usarse para la elaboración de platillos mexicanos, como la barbacoa de pozo, sin embargo, debido a que son ricas en polisacáridos (fructanos) éstos podrían aprovecharse, mediante un proceso enzimático, para la obtención de productos de alto valor, como los azúcares fermentables [21].

El objetivo de este trabajo fue aislar microorganismos inuliníticos a partir del aguamiel de agave, una bebida artesanal rica en fructanos, con una alta actividad enzimática, capaces de hidrolizar a fructosa los fructanos presentes en las hojas de *Agave salmiana*.

2. Parte experimental

2.1 Reactivos y materiales

Los reactivos con los que se trabajó se adquirieron a través de Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ) y fueron grado analítico. Los medios de cultivo fueron de la marca BD Bioxon y la inulina comercial se adquirió en Agaviotica.

2.2 Aislamiento de microorganismos

Las levaduras fueron aisladas a partir de una muestra de aguamiel artesanal mediante la técnica de dilución y siembra en placa empleando agar patata dextrosa (APD) para el aislamiento y para la conservación se emplearon tubos de cultivo con 5 mL de agar Sabouraud dextrosa (ASD). Se determinó la morfología de las levaduras aisladas mediante microscopía óptica.

2.3 Obtención del jugo de las hojas de agave.

Las hojas de *A. salmiana* se cortaron desde la base del tallo, se lavaron y posteriormente se les removió la corteza. Para facilitar la extracción del jugo, las hojas fueron sujetas a un proceso de congelación-descongelación previo a ser exprimidas manualmente. Finalmente, el jugo se filtró (Whatman #5, tamaño de poro 2.5 μ m.) para eliminar restos de fibras de agave y otras partículas.

2.4 Preparación de inóculos

Las levaduras se inocularon en tubos con 5 mL de APD y se incubaron por un día a 28 °C. Posteriormente, se empleó solución salina estéril (NaCl al 0.85% p/v) para recuperar las células y ajustarlas a una concentración de 1×10^7 células mL⁻¹ mediante el conteo de levaduras en una cámara de Neubauer.

2.5 Identificación de levaduras productoras de inulinasas.

Se evaluó la capacidad de las levaduras aisladas de utilizar el jugo de agave como fuente de carbono y de producir inulinasas. Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 30 mL de medio estéril preparado con inulina comercial (50 g/L), peptona (10 g/L) y extracto de levadura (10 g/L). Los medios de cultivo se inocularon con 1 mL de las suspensiones celulares preparadas en la sección 2.4, posteriormente se incubaron a 30°C, 150 rpm por 4 días. El contenido de cada matraz se transfirió a tubos cónicos de 50 mL los cuales se centrifugaron a 4,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue considerado como el extracto enzimático crudo y usado para la evaluación de la actividad enzimática, para ello se prepararon tubos Eppendorf de 2 mL con 500 μ L del extracto enzimático, 500 μ L buffer de acetatos (200 mM) pH 5 y 10 mg de inulina comercial. Las condiciones de la hidrólisis enzimática fueron por 20 minutos, 150 rpm, a 37°C. Los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis fueron medidos por el método de Miller [22].

2.6 Identificación molecular de las levaduras aisladas

Para la identificación molecular se analizó la secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del DNAr 5.8S. El DNAr de la levadura se extrajo mediante el método fenol-cloroformo. Para la amplificación se utilizaron los primers ITS1 5' > 3' TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 5' > 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC y el kit de MyTaqTM DNA Polymerase de BioLine®. Las condiciones de la reacción de la PCR fueron conforme al protocolo recomendado por el fabricante. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados por Psomagen (<http://macrogenusa.com>). Para analizar las secuencias se utilizó la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7 Producción enzimática por fermentación sumergida

Se evaluó la producción de las inulinasas a diferentes días (1 – 4 días), para ello se prepararon matraces

Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de jugo de agave estéril suplementado con las siguientes sales: KH_2PO_4 (1.4 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g/L) y CaCl_2 (0.3 g/L), el pH se ajustó a 5 con HCl 0.1 N. Los matraces se inocularon con 500 μL de una suspensión celular ajustada a una Densidad óptica (DO) de 0.5 medida a una longitud de onda 630 nm. Las condiciones de incubación fueron de 28 °C a 150 rpm. El extracto enzimático crudo se recuperó cada día como se describió en la sección 2.5

2.8 Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de los extractos recolectados recuperados de las fermentaciones a diferentes tiempos (1 – 4 días). Las reacciones de hidrólisis se realizaron en tubos Eppendorf de 2 mL los cuales contenían 300 μL del extracto enzimático, 13 mg de inulina comercial y 1 mL de buffer de acetatos (200 mM) de pH 5. Las condiciones de hidrólisis fueron de 40 °C por 10 minutos, sin agitación. Los azúcares reductores liberados fueron determinados por el método de Miller. Se evaluó la influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad inulinasa. Para evaluar el efecto de la temperatura, los experimentos se realizaron en un rango de 30 a 90 °C, con aumentos de 5°. Para el pH se utilizaron 4 buffers distintos, preparados a 200 mM variando el rango de pH de 3 a 10 (Tabla 1). Una Unidad de Actividad (UA) se define como la cantidad de extracto enzimático que libera un μmol de fructosa por minuto por cada mililitro de medio. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 1. Buffers preparados para evaluar la influencia del pH en la actividad enzimática de las inulinasas.

Buffer	pH
Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ - NaCl - HCl)	3 y 4
Acetatos ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - HCl)	5 y 6
Fosfatos (KH_2PO_4 - K_2HPO_4)	7 y 8
Boratos (H_3BO_3 - KCl - NaOH)	9 y 10

3. Resultados y discusión

3.1 Aislamiento de microorganismos

El aguamiel es una bebida artesanal elaborada en México desde hace siglos a partir de agaves como *A. salmiana* y *Agave furcroydes* (*A. furcroydes*) [23]. El aguamiel contiene fructosanos, minerales y proteínas, lo que propicia un medio ideal para el crecimiento de microorganismos como bacterias y levaduras [24, 25]. De la muestra (Figura 1a) se lograron aislar 5 levaduras, las cuales se observaron al microscopio con una tinción simple con cristal violeta y se observaron dos tipos de morfologías. La levadura L1 presentó forma esférica (Fig. 1b), mientras que las demás levaduras (L2 – L5) presentaron formas apiculadas (Fig. 1c), lo que concuerda con las formas típicas de levaduras.

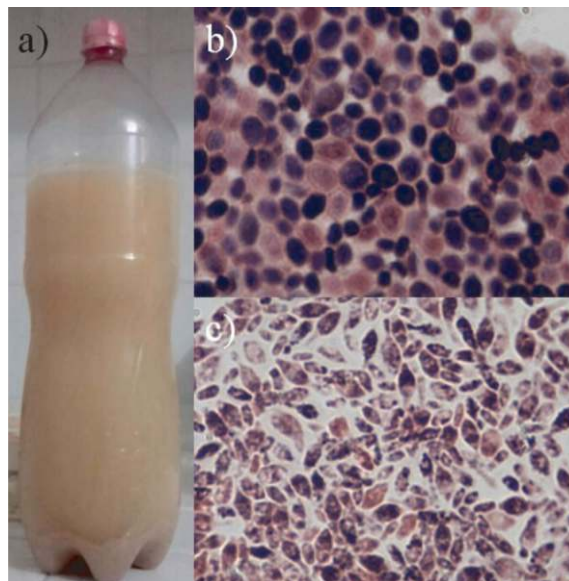


Figura 1. A) Bebida de aguamiel de agave e imágenes de microscopía óptica (100X) de levaduras aisladas, con morfologías esféricas (b) y apiculadas (c).

3.2. Evaluación de los microorganismos.

Las levaduras fueron crecidas en medio que contenía inulina como fuente de carbono. Todas las levaduras fueron capaces de crecer en el medio (Figura 2). Cuando se evaluó la actividad enzimática del sobrenadante se corroboró que todas las levaduras presentaron actividad inulinasa, sin embargo, la levadura L1 presentó menor capacidad de hidrólisis, mientras que las levaduras L2 y L3 presentaron mayor actividad (Tabla 2).



Figura 2. Crecimiento de las distintas levaduras aisladas por fermentación sumergida empleando el jugo de *A. salmiana* como fuente de carbono [el Control (-) es medio de cultivo sin inocular].

Tabla 2. Azúcares liberados mediante hidrólisis enzimática de inulina comercial

Levadura	mg/mL de azúcares liberados
L1	0.51 ± 0.03
L2	1.00 ± 0.05
L3	0.98 ± 0.02
L4	0.90 ± 0.03
L5	0.88 ± 0.04

Con el análisis BLAST se determinó que las cinco levaduras pertenecen a dos especies diferentes: *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*) y *Hanseniaspora uvarum* (Tabla 3). Estas levaduras son comúnmente encontradas en los magueyes, además,

coinciden con las morfologías observadas en el microscopio [23, 24]. Al igual que en la actividad enzimática (Tabla 2), las levaduras L2 y L3 presentaron un % de identidad similar, mayor al 99.50%, coincidiendo con una levadura ya reportada (Número de acceso: MK267742.1, Tabla 3), por lo que pueden considerarse como la misma levadura, con lo cual, se decidió trabajar con ésta para la producción de las enzimas.

Tabla 3. Resultados del análisis BLAST indicando alineamientos significativos en relación con las levaduras aisladas

Levadura	Levadura identificada	% de identidad	Número de acceso
L1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99.82	MN170556.1
L2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.52	MK267742.1
L3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.56	MK267742.1
L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.80	KF728823.1
L5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	96.47	KF728823.1

3.3 Determinación de la actividad inulinasa

La producción de las enzimas se llevó a cabo durante cuatro días. La mayor actividad enzimática se alcanzó en el primer día, disminuyendo conforme transcurrían los días, por tanto, se considera que no es necesario extender el tiempo de fermentación ya que la actividad empieza a disminuir (Figura 3). El extracto crudo del primer día fue empleado para evaluar el efecto del pH y la temperatura, donde se observó mayor actividad a 40 °C y pH de 5, disminuyendo rápidamente la actividad al variar estos factores (Figuras 3b y 3c). Para determinar la mayor actividad inulinasa, se midió la actividad enzimática a las condiciones óptimas de temperatura y pH encontradas, resultando en una actividad de 180.5 U/mL.

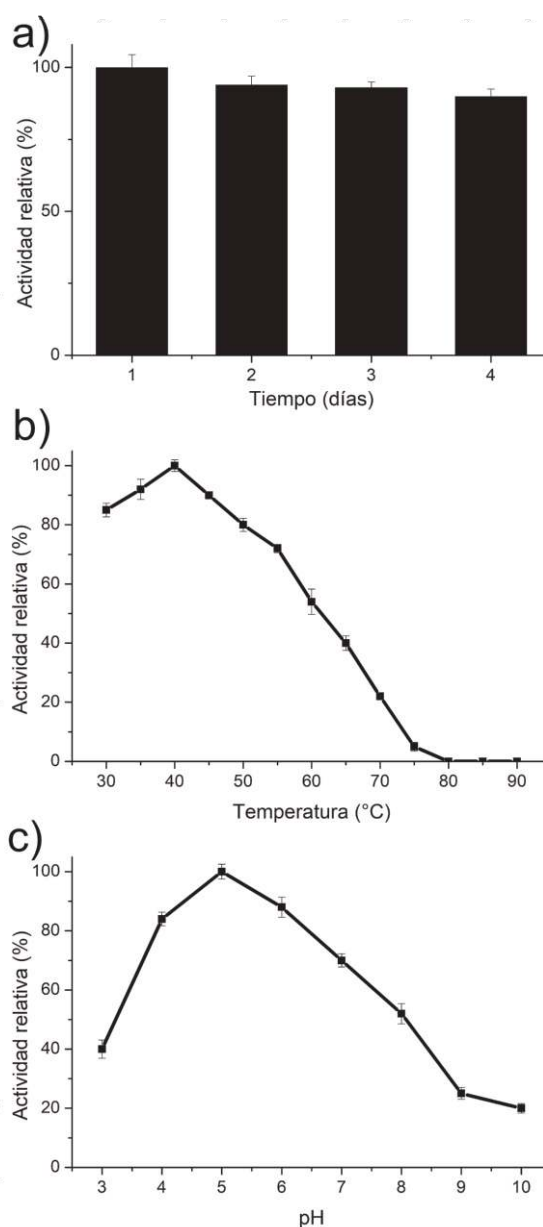


Figura 3. Porcentaje de actividad relativa de inulinasas para determinar parámetros de: (a) tiempo, (b) efecto de la temperatura y (c) pH.

Se han evaluado diversas especies del género *Hanseniaspora* por su gran capacidad de producir etanol y generar aromas en la producción de vinos [26, 27]. Sin embargo, no se encontró evidencia de su empleo en la producción de inulinasas, sin embargo, se observó que su actividad enzimática es alta comparada con la reportada para otros microorganismos (Tabla 4). Además, en los reportes mostrados en la Tabla 4 se realizaron diseños de experimentos para optimizar las condiciones de cultivo y aumentar la actividad enzimática. En este trabajo no se evaluaron diferentes condiciones de crecimiento para la

levadura, por lo que se va a considerar la realización de un diseño de experimentos en un futuro trabajo para aumentar el rendimiento y la actividad enzimática reportadas en el presente estudio.

Tabla 4. Actividad inulinasa (UA/mL) producidas por diferentes microorganismos

Microorganismo	Actividad (UA/mL)	Referencia
<i>Aspergillus terreus</i> URM4658	15.08	de Oliveira <i>et al.</i> 2022 ¹⁰
<i>Rhizopus oryzae</i>	348.36	Yazici <i>et al.</i> 2021 ⁵
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3.54	de Araujo Riveiro <i>et al.</i> 2021 ¹⁷
<i>Aspergillus niger</i>	185	Gou <i>et al.</i> 2015 ¹⁸
<i>Kluyveromyces marxianus</i> MTCC 3995.	56	Jain <i>et al.</i> 2012 ¹⁹

Tamang *et al.* 2016 reportaron la presencia de especies de *Hanseniaspora* como parte de los principales géneros de levaduras iniciadoras en la elaboración de alimentos fermentados y bebidas alcohólicas [28]. Esto explicaría la elevada actividad enzimática, ya que al ser una de las levaduras iniciadoras del proceso de fermentación, participaría en la liberación de azúcares fermentables derivados de la inulina, los cuales son luego utilizados por otros microorganismos en los siguientes pasos de la producción de alimentos y bebidas fermentadas.

4. Conclusiones

En este trabajo se aislaron varias levaduras del aguamiel de agave, una bebida prehispánica consumida en todo México. Por medio de un análisis BLAST se encontró que las levaduras pertenecen a los géneros *Hanseniaspora* y *Rhodotorula*, especies comúnmente presentes en las plantas de agave y que participan activamente en las primeras etapas de la fermentación durante la elaboración de bebidas alcohólicas y alimentos fermentados artesanalmente, impartiendo olores agradables, facilitando la hidrólisis de los fructanos y generando pequeñas cantidades de etanol.

Este trabajo es el primer reporte sobre la actividad enzimática del tipo inulinasa de la levadura *Hanseniaspora uvarum*, la cual presentó una actividad de 180.5 U/mL a condiciones de 40 °C y pH 5 (buffer de acetatos) demostrando mayor actividad que la reportada para otras especies de levaduras como *Rhodotorula* y *Kluyveromyces*. *H. uvarum* resultó una levadura prometedora para la producción de inulinasa, por lo que en un futuro trabajo se realizará una caracterización más profunda, así como también la evaluación de las condiciones de cultivo que favorezcan una mayor producción de enzimas, así como su factibilidad para producir etanol y poder emplearse en la producción de biocombustibles.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Químicas y a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la UANL, así como a la Facultad de Ingeniería Química de la UADY por su colaboración para el uso de equipos e infraestructura. JSM agradece al CONAHCYT por la beca otorgada (Número de CVU: 514440)

6. Referencias

- Corrado, I.; Cascelli, N.; Ntasi, G. *et al.* Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 616908.
- Li, X.; Zhang, Q.; Wang, W. *et al.* Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 679720.
- De la Rosa, O.; Flores-Gallegos, A.C.; Muñiz-Márquez, D. *et al.* Foods. 2022, 11, 1786.
- Olveira, G.; González-Molero, I. Endocrinol. Nutr. 2016, 63: 482 – 494.
- Yazici, S.O.; Sahin, S.; Biyik, H.H. *et al.* J Food Sci Technol. 2021, 58(2):739 – 751.
- Cavelius, P.; Engelhart-Straub, S.; Mehler, N. *et al.* PLoS Biol. 2023, 21(3), e3002063.
- Favaro, L.; Jansen, T.; van Zyl, W.H. Crit Rev Biotechnol. 2019, 39 (6), 800 – 816.
- Celińska, E.; Nicaud, J.M.; Białas, W. Appl Microbiol Biotechnol. 2021, 105, 975 – 989.
- Singh, R.; Singh, T.; Larroche, C. Bioresour. Technol. 2019, 273, 641 – 653.
- de Oliveira, R.L.; da Silva, S.P. Molecules 2022, 27 (19), 6418.
- Jackson, P.P.J.; Wijeyesekera, A.; Rastall, R.A. Food Sci Nutr. 2022, 11: 17 – 38.
- Salomé-Abarca, L.F.; Márquez-López, R.E.; López, M.G. Sci Rep. 2023, 13 (1), 19888.
- Alducin-Martínez, C.; Ruiz-Mondragón, K.Y.; Jiménez-Barrón, O. *et al.* Plants (Basel) 2022, 12(1), 124.
- Corrado, I.; Cascelli, N.; Ntasi, G. *et al.* Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 616908.
- Singh, R.S.; Chauhan, K.; Kennedy, J.F. Int. J. Biol. Macromol. 2017, 96, 312 – 322.
- Yazici, S.O.; Sahin, S.; Biyik, H.H. *et al.* J Food Sci Technol. 2021, 58 (2), 739 – 751.
- de Araujo-Ribeiro, G.C.; Fernandes, P.; Silva, D.A.A. *et al.* Food Sci Biotechnol. 2021, 30 (7), 959 – 969.
- Gou, Y.; Li, J.; Zhu, J. *et al.* Braz J Microbiol. 2015, 46 (3), 911 – 920.
- Jain, S.C.; Jain, P.C.; Kango, N. Braz J Microbiol. 2012, 43 (1), 62 – 69.
- Das, D.; Bhat, R.; Selvaraj, R. Ann. Microbiol. 2019, 69, 201 – 209.
- García-Mendoza, A.; Nieto-Sotelo, J.; Sánchez-Teyer L. *et al.* AGARED—Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves. CONACYT, CIATEJ, AGARED; Guadalajara, Mexico: 2017. Panorama del Aprovechamiento de los Agaves en Mexico.
- Miller, G.L. Anal. Chem. 1959, 31 (3), 426 – 428.
- Escalante, A.; López-Soto, D.R.; Velázquez-Gutiérrez, J.E. *et al.* Front Microbiol. 2016, 7, 1026.

24. Lappe-Oliveras, P.; Moreno-Terrazas, R.; Arrizón-Gaviño J. et al. FEMS Yeast Res. 2008, 8, 1037 – 1052.
25. Enríquez-Salazar, I.M.; Veana, F.; Aguilar, C.N et al. Food Sci Biotechnol 2017, 26, 1003 – 1011.
26. Lleixà, J.; Martín, V.; Portillo, M.C. et al. Front. Microbiol. 2016, 7, 338.
27. Zhang, B.Q.; Shen, J.Y.; Duan, C.Q. et al. Front. Microbiol. 2018, 9, 2303.
28. Tamang, J.P.; Watanabe, K. y Holzapfel, W.H. Front. Microbiol. 2016, 7.