Ciencia Nicolaita 94:74-80; Agosto de 2025 https://doi.org/10.35830/cn.vi94.816

Producción de inulinasas por *Kluyveromyces marxianus*

Production of inulinases by *Kluyveromyces marxianus*

Alejandra Guadalupe Méndez González, Yadira Belmonte Izquierdo, Juan Carlos González Hernández*

Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Morelia, Avenida Tecnológico 1500, Morelia, Mich., 58120, México.

Historial
Manuscrito recibido: 4 de agosto de 2024
Manuscrito aceptado: 13 de mayo de 2025
Manuscrito publicado: agosto 2025

***Autor para correspondencia**
Juan Carlos González Hernández
juan.gh@morelia.tecnm.mx
ORCID: 0000-0003-2558-5108

Resumen

Los microorganismos son una fuente potencial de enzimas capaces de degradar polisacáridos complejos de más de 10 unidades en azúcares sencillos como la fructosa y la glucosa, además tienen la capacidad de producir oligosacáridos o polímeros a partir de monómeros. Particularmente, algunos microorganismos producen fructooligosacáridos (FOS), oligosacáridos de fructosa que van de las 3 a las 12 unidades, los cuales son el alimento de las bifidobacterias y los lactobacilos, bacterias benéficas que habitan en el colon. Los FOS se utilizan en la industria farmacéutica y alimentaria como aditivos en alimentos funcionales. Existen levaduras que poseen actividad enzimática inulinasa (hidrolizan polímeros y producen FOS) o bien actividad fructosiltransferasa (producen FOS a partir de la sacarosa). *K. marxianus* es una levadura con potencial para producir FOS mediante la selección de cepas, la preparación de un medio de cultivo adecuado, las condiciones óptimas de fermentación y la recolección de enzimas. Al seguir esta práctica es posible la obtención de dichas enzimas de manera efectiva y sostenible, contribuyendo a la creación de productos más saludables y a la optimización de procesos industriales.

Palabras clave: Enzimas, fructosiltransferasas, hidrólisis, inulinasas, *K. marxianus*.

Abstract

Microorganisms are a potential source of enzymes capable of degrading complex sugars of more than 10 monomer units into simple sugars such as fructose and glucose, and they also have the capacity to produce oligosaccharides or polymers from monomers. In particular, some microorganisms produce fructooligosaccharides (FOS), which are fructose oligosaccharides ranging from 3 to 12 units. These are the foods of bifidobacteria and lactobacilli, which are beneficial bacteria that inhabit the colon. FOS are used in the pharmaceutical and food industries as additives in functional foods. There are yeasts that have inulinase enzymatic activity (hydrolyze polymers and produce FOS) or fructosyltransferase activity (produce FOS from sucrose). *K. marxianus* is a yeast with the potential to produce FOS through strain selection, preparation of an appropriate culture medium, optimal fermentation conditions and enzyme harvesting. By following this practice, it is possible to obtain these enzymes in an effective and sustainable manner, contributing to the creation of healthier products and the optimization of industrial processes.

Keywords: Enzymes, fructosyltransferases, hydrolysis, inulinases, *K. marxianus*.

Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras

Las levaduras son organismos unicelulares esenciales en la fabricación de alimentos y bebidas, tienen diversas aplicaciones biotecnológicas, su velocidad de reproducción suele ser mayor a otros microorganismos y son capaces de adaptarse con facilidad a cambios de temperatura y crecer utilizando diversos sustratos. Particularmente, *K. marxianus*, es una levadura que se obtiene de frutas o bebidas fermentadas, la cual destaca por su capacidad para producir inulinasas, β-galactosidasas y β-glucosidasas. A diferencia de *Saccharomyces*, *K. marxianus* no solo fermenta y oxida azúcares, sino que también hidroliza enlaces de manera eficiente (Mendoza-Gardeazábal, 2013; Fonseca *et al*., 2008). Aunque los estudios sobre *K. marxianus* suelen centrarse en sus aplicaciones potenciales, tales como el procesamiento

Copyright © Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo • ISSN 2007-7068

del suero de leche, la fermentación de azúcares y la producción de alcohol, aún se desconocen muchos aspectos sobre su bioquímica y metabolismo (Mendoza-Gardeazábal, 2013). Las principales aplicaciones industriales de esta levadura se ilustran en la **Figura 1.**

K. marxianus se cultiva en sustratos y condiciones específicas, dependiendo del bioproducto que se desee obtener. Una aplicación potencial es la producción de FOS, en levaduras se ha reportado el uso de dos sustratos principales, la sacarosa (disacárido de glucosa y fructosa) y la inulina. La inulina es un azúcar no digerible por los humanos, que se encuentra en las raíces y los tubérculos como la alcachofa de Jerusalén y la achicoria, la cual es una fuente valiosa de edulcorantes bajos en calorías debido a su alto contenido de fructosa (Kalil *et al.,* 2001). La inulina es un polímero de fructosas con una unidad de glucosa terminal, debido a su estructura al incorporarse en un producto alimenticio, este se considera un alimento funcional. Además, la inulina tiene aplicaciones en la industria alimentaria por sus propiedades organolépticas y su capacidad para mejorar la conservación de los alimentos (Olvera *et al.*, 2007; Madrigal y Sangronis, 2007).

La producción de FOS mediante levaduras se realiza por inulinasas, enzimas con actividad fructosiltransferasa (FTasas), particularmente las β-fructofuranosidasas (FFasas) (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023). Los FOS no se absorben por el sistema digestivo humano, por lo cual actúan como prebióticos en el colon, alimentando a bifidobacterias y lactobacilos. Este efecto promueve la salud intestinal al estimular el sistema inmunológico, contribuyendo en la prevención de infecciones y en la absorción de minerales, además de reducir el riesgo de cáncer colon-rectal (Olvera *et al.,* 2007). Los beneficios del consumo de FOS y su impacto en la salud digestiva se muestran en la **Figura 2.**

K. marxianus es una levadura conocida por su alta capacidad para producir inulinasas, sin embargo, su capacidad para producir FFasas aún no ha sido explorada. La **Figura 3** ilustra la producción de FOS mediante las inulinasas producidas por *K. marxianus*. Primeramente, las inulinasas escinden la inulina como sustrato formando FOS, podría darse el caso de producción de FFasas al utilizar un medio rico en sacarosa (Rodríguez-Vázquez, 2018).

Las inulinasas contribuyen en la producción de diversos compuestos como etanol, acetona, butanol y sorbitol, los cuales tienen una gran aplicación en la industria alimenticia (Singh y Singh, 2010). Por su parte, las enzimas con actividad FTasa son utilizadas para producir alimentos como prebióticos, edulcorantes y alimentos bajos en calorías (Rodríguez-Vázquez, 2018). En la **Figura 4** se muestran los productos que se producen a partir de estas enzimas.

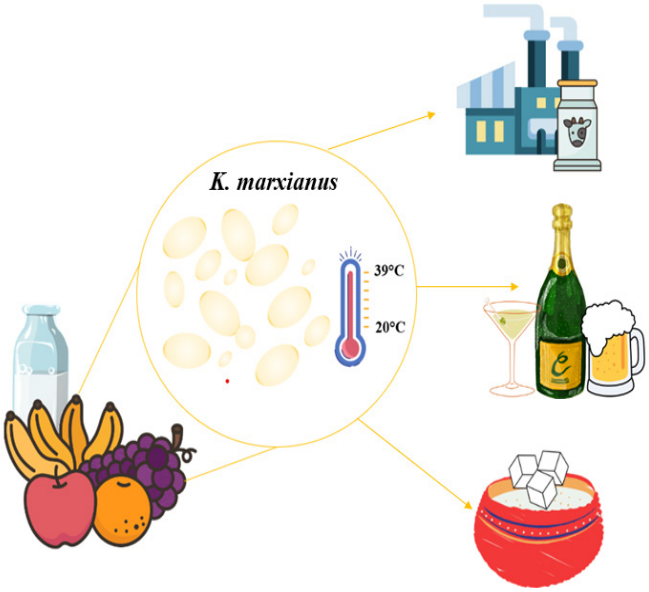

Figura 1. *K. marxianus* y sus aplicaciones biotecnológicas. La imagen ilustra la versatilidad de esta levadura en la fermentación de diversos sustratos. Se destaca su capacidad de crecer a altas temperaturas y su uso en la industria láctea, la producción de bebidas alcohólicas, la obtención de azúcares y bioproductos. Además, se muestran algunas fuentes naturales de obtención de esta levadura, tales como las frutas y la leche.

K. marxianus

K. marxianus es una levadura filogenéticamente relacionada con *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee un alto potencial para producir inulinasas (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010). Las aplicaciones biotecnológicas de *K. marxianus* destacan debido a su capacidad de crecer en diversos sustratos y a altas temperaturas (superiores a 52 °C), mayores tasas de crecimiento específicas y una menor tendencia a producir etanol cuando se expone a exceso de azúcares (Fonseca *et al*., 2008). *K. marxianus* es capaz de sintetizar una gran variedad de azúcares como la lactosa, la inulina y la sacarosa, convirtiéndose en la levadura líder para la mejora de productos y procesos actuales (Rodríguez-Vázquez, 2018; Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

Enzimas inulinasas

Las inulinasas hidrolizan la inulina en unidades monoméricas. La longitud de la cadena de inulina varía según factores específicos de la planta de origen, como su procedencia, condiciones de crecimiento, edad y méto-

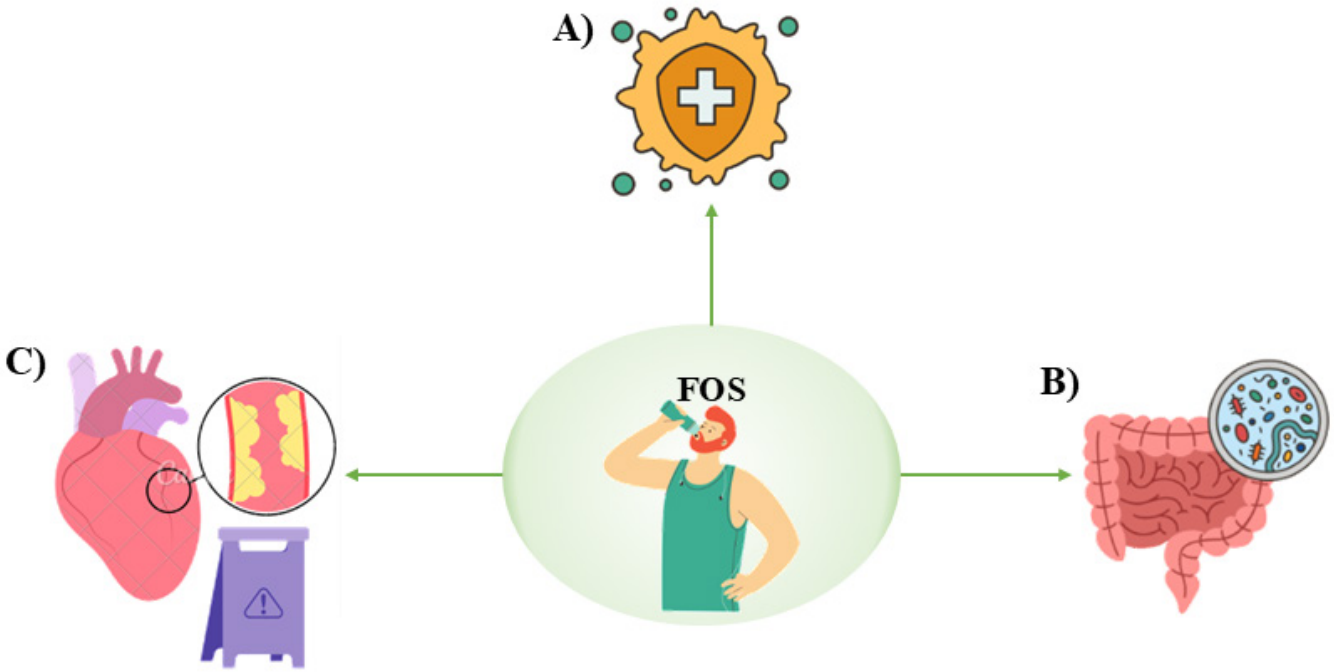

Figura 2. Beneficios del consumo de FOS. La imagen ilustra los efectos positivos de los fructooligosacáridos (FOS) en la salud. **A**) Estimulan el sistema inmunitario (representado por un escudo protector). **B**) Modifican la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias benéficas. **C**) Contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares al reducir el riesgo de obstrucciones arteriales.

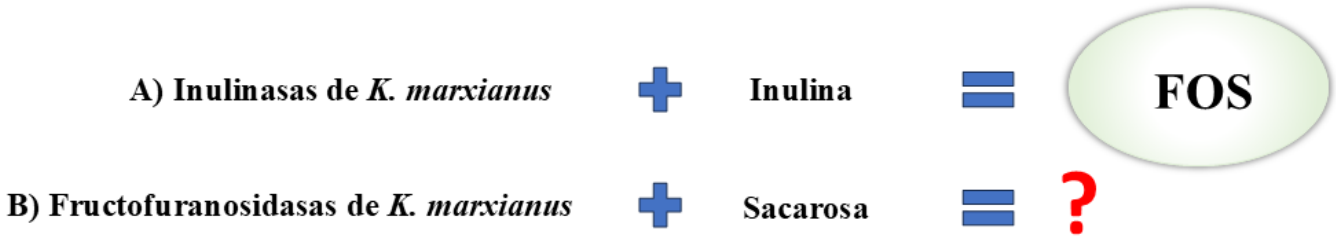

Figura 3. Representación simplificada de la producción de fructooligosacáridos (FOS) mediante: A) Inulinasas de *K. marxianus* que actúan sobre la inulina, produciendo FOS. B) Área de oportunidad para evaluar las FFasas de *K. marxianus* en un medio rico en sacarosa en la producción de FOS.

do de almacenamiento. Estas enzimas se han producido mediante fermentaciones utilizando diversos sustratos y microorganismos. La acción hidrolítica de las inulinasas sobre la inulina produce fructosa y FOS como productos principales (Singh y Singh, 2017). Además, es importante resaltar que existen dos tipos de inulinasas, las endoinulinasas y las exoinulinasas. La **Figura 5** ilustra la estructura tridimensional de la endoinulinasa INU1 de *K. marxianus* DMKU3-1042.

Producción de inulinasas mediante *K. marxianus*

K. marxianus produce una gran concentración de inulinasa. La inulina es degradada por dos tipos de inulinasas: las endoinulinasas y las exoinulinasas. Las exoinulinasas liberan la unidad terminal de fructosa de la molécula de inulina, mientras que las endoinulinasas actúan de manera aleatoria en el interior de la molécula, rompiendo los enlaces glucosídicos y produciendo FOS (Singh y Singh, 2017; **Figura 6**).

La producción de enzimas se ve influenciada por factores como pH del medio, aireación y temperatura de la fermentación. Las enzimas inulinasas provenientes de levaduras de acuerdo con algunos estudios tienen una temperatura óptima de crecimiento de 45 °C, y un crecimiento estable a 50 °C, pH entre 4.4 y 6.5 para exoinulinasas y endoinulinasas, respectivamente (Singh y Singh, 2010). Algunos sustratos y condiciones utilizadas para la producción de enzimas inulinasas se presentan en la **Tabla 1.**

En la producción de inulinasas el aumento en la can-

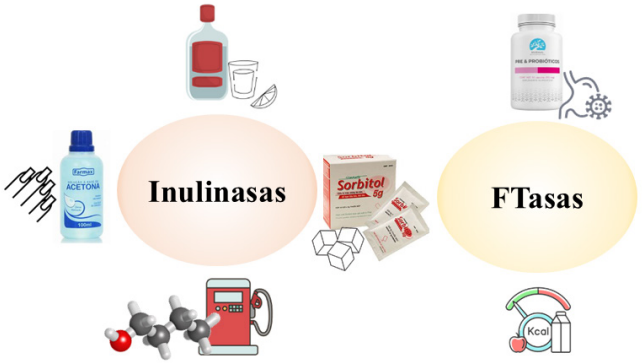

Figura 4. Productos obtenidos por enzimas inulinasas y FTasas, y sus aplicaciones en la industria. La imagen muestra cómo las inulinasas permiten la producción de sorbitol, bioetanol, acetona y alcohol etílico, con aplicaciones en los sectores alimentario, químico y energético. Por otro lado, las FTasas se asocian con la generación de prebióticos y compuestos bajos en calorías, usados en alimentos funcionales. En comparación con las diversas cepas de hongos y bacterias, las levaduras cuentan con una gran eficiencia para producir enzimas.

Figura 5. Estructura tridimensional de la endoinulinasa INU1 de *K. marxianus* DMKU3-1042 (código PDB 6J0T). Su estructura ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X. El sitio activo de la enzima se localiza en una cavidad accesible, rodeada por residuos de aminoácidos clave que facilitan la catálisis. Entre estos, destacan residuos de ácido glutámico y ácido aspártico. Esta configuración estructural permite a INU1 reconocer y degradar eficientemente la inulina en moléculas de menor tamaño (PDB, 2019).

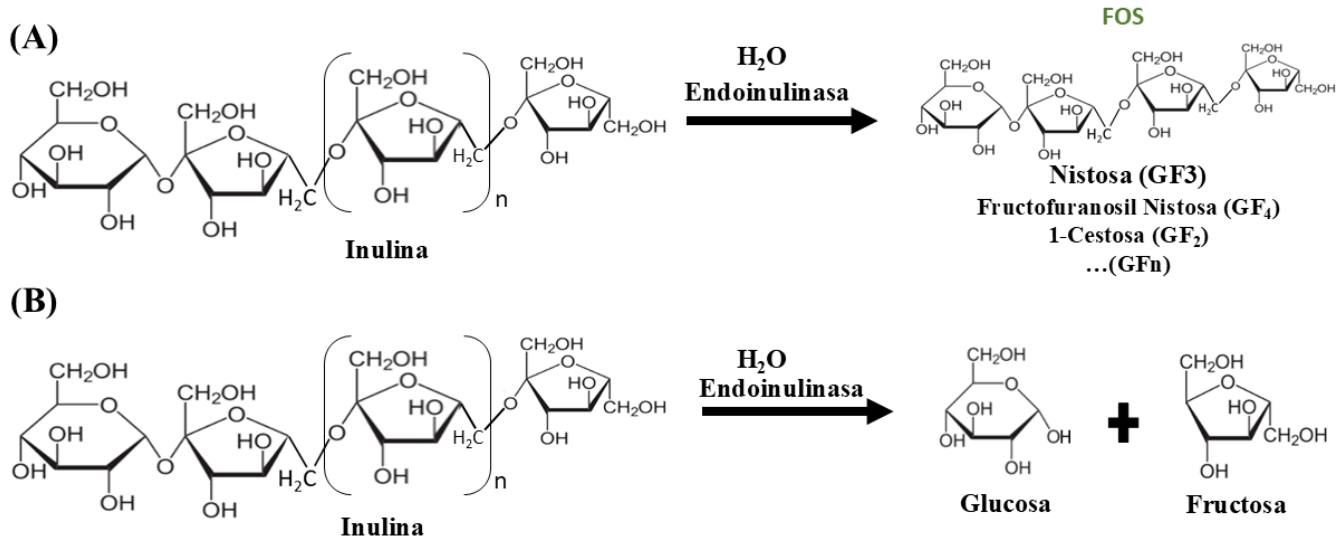

Figura 6. Mecanismo de acción de las inulinasas al utilizar inulina como sustrato. **(A)** La endoinulinasa reconoce la estructura de la inulina y se une al sustrato a través del sitio activo, se produce una hidrólisis, rompiendo la cadena y liberando FOS, este proceso continúa hasta que la inulina se fragmenta en múltiples unidades de FOS. **(B)** Por su parte, la exoinulinasa hidroliza la inulina desde sus extremos no reductores, liberando moléculas de fructosa secuencialmente, el proceso se repite hasta que toda la inulina se ha convertido en fructosa, lo que es ideal para la producción de jarabes ricos en fructosa.

Tabla 1. Condiciones fermentativas para la producción de inulinasas por *K. marxianus* y para la síntesis de FOS (Tomado y modificado de: Castillo y Chamy, 2010; Hernández-Colomé, 2019; León-Lira, 2021).

Levadura	Enzima			Condiciones de cultivo			Producto			Referencias
	Nombre	Actividad enzimática	Unidad	Cultivo	Componentes	g/L	Condiciones	FOS	g/L	
K. marxianus var. bulgaricus	Inulinasa	170	U/mg	Líquido	Inulina	20 ml/L	Agitación = 200 rpm T = 30°C t = 72 h	n.d	n.d	Castillo y Chamy, 2010
	Inulinasa	4.1	U/mL	Líquido	Extracto de yacón	30	pH = 3.5 T = 20-40°C t = 16 h	n.d	n.d	
K. marxianus YS-1	Inulinasa	50.2	U/mL	Líquido	Extracto pulverizado de raíz de espárrago (4% de inulina)	1.54	Agitación = 1200 rpm pH = 6.5 T = 30°C t = 60 h aireación: 0.75 vvm	n.d	n.d	
K. marxianus	Inulinasa	23	U/mL	Líquido	Fructanos de agave tequilana	20	Agitación = 240 rpm pH = 5.5 T = 30°C t = 45 h aireación: 0.3 vvm	n.d	n.d	Hernández- Colomé, 2019
					Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	3.6				
					Fosfato dibásico de amonio $(NH_4)_2HPO_4$	0.073				
					Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	7.4				
					Extracto de levadura	15				
K. marxianus AZ8	Inulinasa (exoinulinasa)	n.d	n.d	Líquido	Sacarosa	10	Agitación = 500 rpm pH = 5 T = 50°C t = 24 h	Kestosa Difructosa Nistosa Trifructosa, Fructosilnistosa Tetrafructosa Pentafructosa	n.e	León-Lira, 2021
		3983	U/mg	Líquido	Sacarosa	45	Agitación = 500 rpm pH = 6 T = 60°C t = 30 min	Kestosa Difructosa Nistosa Trifructosa, Fructosilnistosa	n.e	

n.e: no especificado; n.d: no determinado

tidad de sustrato y el pH reduce la actividad enzimática, mientras que un incremento en el extracto de levadura, peptona y fosfato dipotásico (K_2HPO_4) la promueve (Cazetta *et al.,* 2005). Para las levaduras, el pH óptimo oscila entre 4.4 y 6.5, aunque algunos estudios con extractos de yacón indican actividad enzimática desde pH entre 3.5 y 4.0, estable hasta pH de 6.5 y nula a pH de 10.5 (Kalil *et al.,* 2001; Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010). *K. marxianus* es especialmente valorado por su alta producción de inulinasa, crucial para la conversión de inulina en fructosa, logrando hasta un 95% de fructosa en la hidrólisis completa (Fonseca *et al.,* 2008; Kalil *et al.*, 2001). La actividad enzimática depende del pH y la temperatura, variando con el tipo de sustrato y la enzima utilizada (Rouwenhorst *et al.*,1998). Para obtener cantidades considerables de inulinasas a gran escala, se debe considerar el rendimiento de los microorganismos seleccionados, la disponibilidad de la materia prima y el costo de producción (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

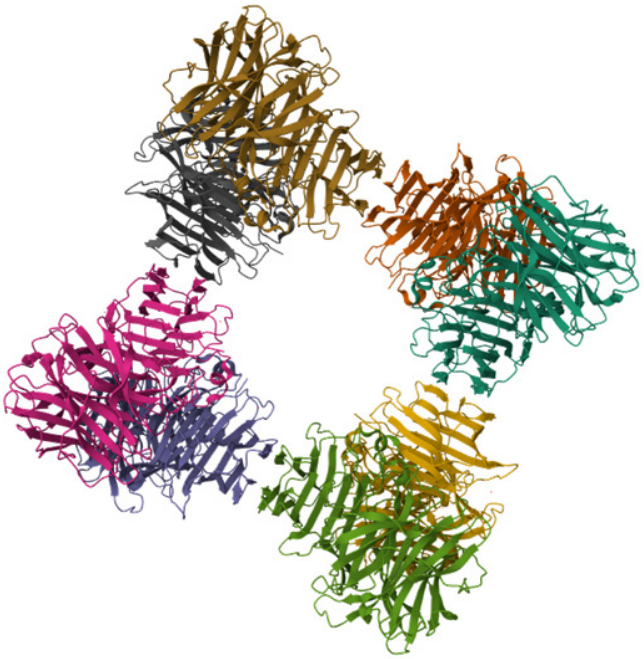

Figura 7. Estructura cristalina de la enzima invertasa o FFasa de *S. cerevisiae* S288C (PDB: 4EQV). La imagen muestra la organización cuaternaria de la proteína en su forma oligomérica, con cada subunidad representada en diferentes colores mediante un modelo de cintas (*ribbon model*). La invertasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, desempeñando un papel esencial en el metabolismo de los carbohidratos en *S. cerevisiae* (PDB, 2013). En la **Figura 8** se muestra la reacción de las enzimas FFasas entre moléculas de sacarosa para la producción de FOS.

Enzimas con actividad fructosiltransferasa: β-fructofuranosidasa o invertasa (FFasa)

La síntesis de FOS mediante enzimas con actividad fructosiltransferasas (FTasas) consiste en una transfructosilación, es decir la transferencia de residuos terminales fructosilo hacia una molécula de sacarosa. Diversos estudios han demostrado la existencia de dos enzimas con actividad fructosiltransferasa: fructosiltransferasas (FTasas) y β-fructofuranosidasas (FFasas) que son capaces de producir FOS. En las levaduras se ha reportado que las enzimas FFasas utilizan la sacarosa como sustrato para producir FOS, hidrolizando los enlaces de su estructura para transferir el residuo fructosil a otra molécula de sacarosa (**Figura 8**). Las FFasas se conocen también como invertasas y a altas concentraciones de sacarosa estas enzimas muestran actividad transfructosilante (Belmonte-Izquierdo, *et al*. 2023). Las FFasas son enzimas extracelulares, se considera que las de origen microbiano son de mayor tamaño en comparación con las de origen vegetal, y que presentan actividad en pH cercanos a 5 y 6.5, así como una temperatura óptima cercana a 45°C (Chacón-Villalobos, 2006). Para obtener una actividad óptima de fructosilación es necesario considerar las variables de tiempo, temperatura, y el sustrato (Peña-Suasnabar y Zavaleta, 2020). Además, las FFasas requieren la presencia de iones como Ca, Mg, Co y Li, sin embargo, su actividad se ve inhibida en presencia de minerales como Pb, Hg, Al y Ag, así como por elevadas concentraciones de glucosa (Chacón-Villalobos, 2006).

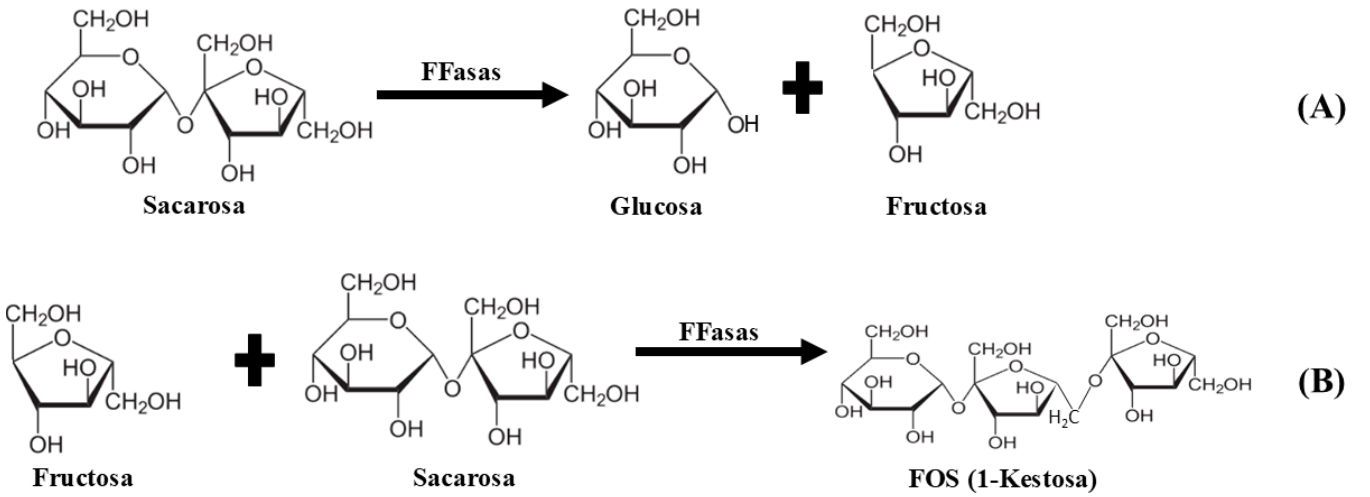

Figura 8. Mecanismo de transfructosilación catalizado por la enzima FFasa o también conocida como invertasa con acción fructosiltransferasa (FTasa), mostrando tres etapas en la conversión de sacarosa en fructooligosacáridos (FOS). **(A)** Hidrólisis de la sacarosa: la FFasa rompe la sacarosa, liberando glucosa y un residuo de fructosa activado. **(B)** Transferencia de fructosa: el residuo de fructosa se transfiere a otra molécula de sacarosa, formando FOS como 1-kestosa.

Actualmente, en la revisión realizada no se encontraron estudios de FFasas de *K. marxianus* en la producción de FOS. Así mismo no se dispone de una estructura cristalina específica de una FFasa de *K. marxianus* en el *Protein Data Bank* (PDB). Sin embargo, la estructura cristalina de una FFasa de *S. cerevisiae* S288C puede observarse en la **Figura 7.**

Conclusiones

En este trabajo se ha recopilado y analizado información relevante sobre la capacidad que posee la levadura *K. marxianus* para producir enzimas inulinasas y el área de oportunidad para investigar sobre la actividad transfructosilante de sus enzimas FFasas, con miras a la obtención de fructooligosacáridos (FOS). Diversas investigaciones han señalado que los FOS son prebióticos, gran alternativa para combatir el problema de salud pública actual, reforzando el sistema inmune y previniendo enfermedades del sistema colon-rectal, lo que contribuye a tener una vida saludable. Lo anterior debido a que los prebióticos viajan por el tracto digestivo, pero no son absorbidos a través del intestino delgado, lo cual permite potencializar el crecimiento de algunas de las colonias de bifidobacterias y lactobacilos, los cuales habitan en el intestino grueso y hasta el recto. Para una caracterización más precisa de las condiciones óptimas de crecimiento de *K. marxianus*, así como su impacto en la producción de FOS se requiere de estudios experimentales que evalúen variables como temperatura, pH, agitación y nutrientes. La información recopilada en este trabajo destaca el valor de los microorganismos en la obtención de bioproductos de interés biotecnológico.

Referencias

Belmonte-Izquierdo Y., Salomé-Abarca L.F., González-Hernández J.C., López M.G. (2023). Fructooligosaccharides (FOS) Production by Microorganisms with Fructosyltransferase Activity. *Fermentation* 9(11):968. doi:10.3390/fermentation9110968.

Castillo-Calderón A., Chamy-Maggi R. (2010). Producción de inulinasas por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria* 1(3-4):235-245. doi:10.17268/sci.agropecu.2010.04.07.

Chacón-Villalobos, A. (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS). *Agronomía mesoamericana* 17 (2):265-286.

Cazetta M.L., Martins M.M., 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. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.03.022

Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Microbiol Biotechnol* 79:339-354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6

Hernández-Colomé I. (2019). Producción de fructanasas en reactor por lotes repetidos con células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* a partir de fructanos de *Agave tequilana* (Tesis de maestría, Universidad de Guadalajara). URL:https://hdl.handle.net/20.500.12104/83813

Kalil S.J., Suzan R., Maugeri F., Rodrigues M.I. (2001). Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* Using Factorial Design. *Biochemistry and Biotechnology* 94(3):257-264. doi:10.1385/abab:94:3:257

León-Lira G. (2021). Producción de fructooligosacáridos (FOS) catalizada por la exoinulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 (Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México). URL: https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000812124

Mendoza-Gardeazábal A.S. (2013). Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo prebiótico (Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). URL:http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1862/TESIS%20SEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Madrigal L., Sangronis E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4):387-396.

Olvera C., Castillo E., López-Munguía A. (2007) Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología* 14:327-345.

Peña-Suasnabar C., Zavaleta A.I. (2020). Optimización de la producción de fructooligosacáridos a partir del extracto de algarrobo utilizando fructosiltransferasas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 86(2):192-204.

Protein Data Bank (2019). Crystal structure of endo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. RCSB PDB. URL: https://www.rcsb.org/structure/6J0T

Protein Data Bank (2013). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. RCSB PDB. URL: https://www.rcsb.org/3d-view/4EQV/1.

Rodríguez-Vázquez R.L. (2018). Producción de extractos microbianos con actividad fructanasa para la síntesis de fructooligosacáridos (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional).

Rouwenhorst R., Visser L.E., Van Der Baan A.A., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. (1998). Production, Distribution, and Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Microbiology* 54(5):1131-1137. doi:10.1128/aem.54.5.1131-1137.1988

Singh R.S., Singh R.P. (2017) 18 - Inulinases. *In*: Pandey A, Negi S, Soccol CR (eds). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp 423-446. doi:B978-0-444-63662-1.00018-X

Singh R.S. y Singh R.P. (2010). Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technology and. Biotechnology* 48(4):435-450.