



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**OBTENCIÓN DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL
CON UNA ENZIMA OXIDO REDUCTASA DE ORIGEN NO MICROBIANO**

Tesis presentada por:

MARÍA GUADALUPE MORALES CABRAL

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química como
requisito parcial para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Dirigida por:

Dra. Ma. Del Carmen Chavez Parga

Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GENERALIDADES	1
1.2. CONSUMO NACIONAL E INTERNACIONAL DEL XILITOL (DEMANDA)	1
1.3. DESCRIPCIÓN DEL XILITOL, USOS Y BENEFICIOS.....	3
1.3.1. XILITOL.....	3
1.3.2. USOS DEL XILITOL	6
1.3.3. BENEFICIOS PARA LA SALUD.....	7
1.4. HIPÓTESIS	8
1.5. OBJETIVOS.....	8
1.5.1. OBJETIVO GENERAL.....	8
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.6. JUSTIFICACIÓN	8
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DEL XILITOL	9
2.1.1. MÉTODO QUÍMICO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL.....	9
2.1.2. MÉTODO FERMENTATIVO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL.....	13
2.1.3. MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL ENZIMÁTICO	15
2.2. ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS	16
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	18
3.1. REALIZACIÓN DE UN ANÁLISIS PROTEÓMICO	19
3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO	20
3.3. REALIZACIÓN DE ENSAYOS PARA DETERMINAR SI LA ENZIMA PRODUCE XILITOL.	21
3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	21
3.5. IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	23

3.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONADO	24
3.5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO	25
3.6. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES BÁSICAS DE TRABAJO DE LA ENZIMA	26
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	27
4.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO	27
4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO	28
4.3. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PARA DETERMINAR SI LA ENZIMA PRODUCE XILITOL.	30
4.3.1. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	30
4.3.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE MILLER	31
4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	32
4.5. IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	34
4.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL FRACCIONADO	34
4.5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO	41
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Demanda global de edulcorantes en millones de toneladas métricas. Según datos de la OIA (MECAS, 2012)	2
Tabla 1.2 Resumen de los valores de importación de xilitol en México en los últimos años en dólares y pesos mexicanos (valores tomados de la Balanza Comercial para Importaciones de Mercancías en México, INEGI)	3
Tabla 1.3 Características y propiedades fisicoquímicas del xilitol (modificado de Mussatto, 2012)	5
Tabla 1.4 Principales usos médicos y nutricionales del xilitol (Modificado de Mussatto, 2012)	6
Tabla 1.5 Resumen de aplicaciones médicas del xilitol (Silva et al., 2012)	7
Tabla 2.1 Resumen de productos obtenidos de la hidrolización de materiales orgánicos (modificada de Mpabanga et al., 2012)	10
Tabla 2.2 Microorganismos empleados en la producción de xilitol (Chen et al., 2010; Sampaio et al., 2003; Ghindea et al., 2010; Sasaki, et al., 2012)	14
Tabla 2.3 Ventajas y desventajas de los diferentes modos de producción de xilitol (modificado de De Freitas Branco et al., 2012)	16
Tabla 3.1 Matriz codificada de diseño de experimentos para la enzima de cristalino de bovino	24
Tabla 3.2 Matriz codificada de diseño de experimentos para la enzima de cristalino de rata	24
Tabla 3.3 Matriz codificada de diseño de experimentos del diseño central compuesto con la enzima de cristalino de bovino	25
Tabla 4.1a. Comparativo de alineación de secuencias proteicas de enzimas Xilosa Reductasas (XR) capaces de producir xilitol con estructuras similares http://www.ncbi.nlm.nih.gov, 2014	27
Tabla 4.1b. Comparativo de alineación de secuencias nucleotídicas de enzimas Xilosa Reductasas (XR) capaces de producir xilitol con estructuras similares http://www.ncbi.nlm.nih.gov, 2014	27
Tabla 4.2 Fraccionamiento salino de proteínas de un extracto libre de células de ojo de bobino con sulfato de amonio	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de las rutas metabólicas en la transformación de D-xilosa a D-xilulosa siendo XR xilosa-reductasa NADPH dependiente y XDH xilosa deshidrogenasa NAD dependiente (Chen et al., 2010).....	4
Figura 1.2 Estructura química del xilitol en su forma plana (a) y tridimensional (b) (Mussatto, 2012)	4
Figura 2.1 Proceso de producción de xilitol por hidrogenación química (modificado de Tiago, 2014).....	9
Figura 2.2 Producción de xilitol de residuos hemicelulósicos a través de reducción química o por fermentación con microorganismos (adaptado y modificado de Chen et al., 2010).....	12
Figura 2.3 Proceso fermentativo de producción de xilitol. (Modificado de Tiago, 2014).....	13
Figura 2.4 Representación esquemática de la reacción enzimática para producción de xilitol (modificado de De Freitas Branco et al., 2012)	15
Figura 2.5 Aldo-Keto-Reductasas (AKR).....	17
Figura 3.1 Cuadro representativo de las etapas metodológicas a seguir para el desarrollo del proyecto	19
Figura 4.1 Actividad enzimática de la AKR en el fraccionamiento salino y la estabilidad de la enzima con respecto al tiempo. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes. EC = extracto libre de células	29
Figura 4.2 Efecto del tipo de sustrato en la actividad enzimática de la fracción que precipitó al 40 % con sulfato de amonio con cristalino de bovino. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes	29
Figura 4.3 Curva de calibración para la determinación de proteína.....	31
Figura 4.4 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores (xilosa final)	32
Figura 4.5 Actividad enzimática de aldosa reductasa de dos diferentes orígenes en presencia de xilosa y NADPH. La actividad de AKR se confirmó con naringinina 0.001 M. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes. EC = extracto	33
Figura 4.6 Actividad enzimática de la enzima de bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones.....	34

Figura 4.7 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	35
Figura 4.8 Actividad enzimática de la enzima de rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	36
Figura 4.9 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	37
Figura 4.10 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de rata y bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	37
Figura 4.11 Contenido final de xilosa con enzima de bovino y rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	38
Figura 4.12 Diagrama de pareto de efectos de la temperatura, pH y concentración inicial de xilosa en la producción de xilitol (a) y en la concentración final de xilosa (b) con enzima de bovino	39
Figura 4.13 Diagrama de pareto de efectos de la temperatura, pH y concentración inicial de xilosa en la producción de xilitol (a) y en la concentración final de xilosa (b) con enzima de rata	40
Figura 4.14 Actividad enzimática de la enzima de bovino para los diferentes tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones	42
Figura 4.15 Xilitol producido en $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el diseño central compuesto para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones	42
Figura 4.16 Contenido final de xilosa con enzima de bovino para los diferentes tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de cuatro mediciones	43
Figura 4.17 Gráfico de contorno (a) y gráfico de superficie (b) de la producción de xilitol vs el pH y la temperatura para los tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones	44
Figura 4.18 Gráfico de contorno (a) y gráfico de superficie (b) de la concentración final de xilosa vs el pH y la temperatura para los tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones	45

NOMENCLATURA

$\Delta\left(\frac{Abs}{min}\right)$	Velocidad inicial de trabajo de la enzima (pendiente de la curva)
[Xilosa]	Concentración de xilosa
ε	Coefficiente de extinción molar del NADPH (6.22 mmol ⁻¹ cm ⁻¹)
AE	Actividad específica de la enzima (U/mg)
b	Espesor de la celda de medición (cm)
DP	Xilitol producido (g/L)
$-DS$	Xilosa consumida (g/L)
ECX	Eficiencia de conversión de xilosa (min, %) en un tiempo de reacción específico (t,min)
Pt Ctral	Punto central del diseño de experimentos
$Q_p,$	Productividad volumétrica del xilitol (g/Lmin)
T	Temperatura (°C)
TTN	Número de conversión total en un tiempo de reacción específico (t,min)
U	Actividad enzimática
V_f	Volumen final en la celda de reacción (3 mL)
V_i	Volumen inicial de extracto enzimático (60 μ L)

DEDICATORIA

Para

Miguel ☼

Úrsula ♥

Luna ○◐

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar.”

Thomas Chalmers (1780-1847)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia por todo el apoyo y amor recibido durante este trayecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por confiar en mí y brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

A mis asesores la Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, el Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco y al Maestro Alberto Flores García por las facilidades y asesoría en el desarrollo de éste proyecto.

Al Dr. José Herrera de la Facultad de Veterinaria por facilitarnos los ojos de bovino indispensables para el trabajo experimental.

A mis compañeros de maestría Luis Alberto, José Antonio, Carlos, José Francisco, Javier y Omar, por toda la paciencia y ayuda que me brindaron durante las clases.

A mis compañeros de laboratorio Alejandra, Rocío, Dulce, Roberto, Celeste, Nayeli, Erandini, Araceli, Rosy, Enrique, Frida y Fernanda, por todas las enseñanzas, el tiempo y paciencia que me dedicaron siempre.

Al CONACYT por el apoyo económico recibido durante estos dos años de estudio.

Las palabras son pocas cuando de agradecer se trata.

Eternamente agradecida

RESUMEN

OBTENCIÓN DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL CON UNA ENZIMA OXIDO REDUCTASA DE ORIGEN NO MICROBIANO

El xilitol es un azúcar natural que, debido a su propiedad edulcorante con un menor aporte calórico, es utilizado en la actualidad como sustituto de la sacarosa, además de ser un edulcorante que aporta beneficios para la salud humana primordialmente en los dientes pues al ser un azúcar no fermentable no causa caries y no deja sabor amargo. Sin embargo, a pesar de este beneficio la producción no alcanza a satisfacer la demanda de este edulcorante tanto a nivel nacional como internacional.

La producción de xilitol se realiza mediante procesos químicos costosos donde la xilosa (azúcar derivado de los residuos hemicelulósicos) es la mejor fuente de carbono y se transforma en xilitol por medio de un costoso proceso de hidrogenación catalítica a grandes presiones y temperaturas. Actualmente, los estudios se enfocan en encontrar alternativas económicas para la producción de xilitol como por ejemplo la fermentación microbiana. El proceso fermentativo destaca por ser económico pero con algunas desventajas como la generación de subproductos dañinos al crecimiento de los microorganismos, principalmente furfuraldehídos, alcoholes y algunos ácidos débiles, de aquí la importancia de generar nuevas alternativas de producción.

Se considera que algunos microorganismos producen xilitol como un producto intermedio durante el metabolismo de la xilosa, dado que en el metabolismo microbiano existen las enzimas necesarias para transformar la xilosa a xilitol, se asume que al utilizar una enzima con características similares en su conformación peptídica aunque de origen distinto generará el mismo producto.

El presente proyecto demostró que una enzima de origen distinto al microbiano de fácil obtención *in vitro* como la enzima oxido reductasa de origen bovino, transformó la xilosa en xilitol; así mismo se establecieron las condiciones óptimas de proceso de la enzima durante la producción de xilitol como pH y temperatura óptimos con lo cual se propone un método enzimático de bajo costo con tiempos de producción reducidos.

Palabras clave: enzimas, óxido reductasa, producción, xilitol

ABSTRACT

Xylitol is a natural sugar, its sweetening property with less caloric intake is currently available for use as a substitute for sucrose, besides is a sweetener that provides benefits to human health, primarily on teeth (does not cause caries) and is a not fermentable sugar or leaves bitter taste.

Xylitol production is performed by expensive chemical processes where xylose (hemicellulose derived from sugar residues) is the best carbon source and transformed into xylitol by a costly process of catalytic hydrogenation at high pressures and temperatures. Nowadays, studies are focusing on find economic alternatives for the production of xylitol such as microbial fermentation. The fermentative process is known for being economical but has some disadvantages such as the generation of harmful by-products to the growth of microorganisms, among others.

Some microorganisms produce xylitol as an intermediate during xylose metabolism, since there is necessary to transform the xylose to xylitol enzymes in the microbial metabolism, it is assumed that by using an enzyme with similar characteristics in the peptide conformation although of different origin generate the same product.

This work presents the results of a survey made in order to demonstrate that nonmicrobial enzyme obtained in vitro easily from bovine crystalline transformed xylose to xylitol; in addition, the optimum process conditions of the enzyme during production of xylitol as pH and temperature optima were obtained with an enzymatic method of low cost and reduced production times.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

La información del xilitol que sustenta la siguiente propuesta es en primer término la demanda doméstica e internacional. Asimismo, es importante conocer su metabolismo, descripción molecular, usos y beneficios, así como una comparación de los métodos de producción industrial. En segundo término recordar conceptos tales como el de enzima óxido reductasa y la comparación de estas enzimas con la Xilosa Reductasa (XR) microbiana es importante. También, relatar la bioquímica e importancia de la gran familia enzimática de las aldosa reductasas (AKR) son conceptos que se utilizarán en el establecimiento del propósito tecnológico de esta propuesta de proyecto. En la propuesta se presentan los elementos necesarios para definir y darle seguimiento al mismo. En primer término los materiales y métodos que se requieren para desarrollar el proyecto, desde la obtención del extracto enzimático hasta la cuantificación de la actividad enzimática. Asimismo, considerar un diseño experimental de tipo central compuesto para obtener las condiciones óptimas de trabajo de la enzima. Para estas acciones se requiere de una capacitación técnica e intelectual para manejar los métodos, técnicas y lenguaje necesarios para el desarrollo del proyecto. Los resultados incluyen la validación de técnicas y ensayos preliminares, actividad enzimática a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de sustrato en los extractos enzimáticos de bovino y rata analizados mediante un diseño factorial fraccionado para identificar las variables de mayor influencia en la actividad enzimática y producción de xilitol, con base a estos resultados se presenta la correspondiente optimización de variables de pH y temperatura con un diseño central compuesto.

1.2. CONSUMO NACIONAL E INTERNACIONAL DEL XILITOL (DEMANDA)

Actualmente la demanda de endulzantes a nivel mundial es grande, de acuerdo a la Organización Internacional de Azúcar (OIA) en su manual sobre edulcorantes alternativos (MECAS, 2012) es el azúcar convencional el que domina el mercado, seguido de los edulcorantes de alta intensidad (EAI) y posteriormente el jarabe de alta

fructosa (JAF), esta información exhibe un panorama en el que se establece la necesidad de que se generen nuevas alternativas para satisfacer este demandante mercado. El xilitol es un endulzante que se ubica dentro de los polioles que como se aprecia en la tabla 1.1 solo cubren la demanda en un 0.5% del mercado global.

Tabla 1.1 Demanda global de edulcorantes en millones de toneladas métricas. Según datos de la OIA (MECAS, 2012)

	1985	1990	1995	2000	2005	2009	2010	2011
Azúcar	91.5	101.5	108.9	117.2	136.4	148.4	151.6	154.9
EAI	7.2	8.5	11.5	12.9	16.4	17.0	17.6	18.1
JAF	6.2	7.6	9.7	11.7	12.0	12.1	13.2	13.7
Polioles	0.5	0.6	0.7	0.7	0.8	0.8	0.9	1.0
Total	105.4	118.2	130.8	142.5	165.6	178.3	183.3	187.7
Cuota azúcar (%)	86.8	85.9	83.3	82.2	82.3	83.2	82.7	82.5
Cuota polioles (%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Debido a la escasez de datos de dominio público, es difícil determinar el consumo global de polioles como sustitutos del azúcar. De acuerdo con el *International Starch Institute*, la producción mundial de xilitol para 2010 se estimó en 200,000 toneladas, la de manitol en 180,000 toneladas y la de maltitol en 160,000 toneladas; en contraste, la producción mundial de sorbitol (el poliol más utilizado por ser el más económico) alcanzó aproximadamente a las 800,000 toneladas. De la revisión hecha por el Comité de Evaluación de Mercado, Consumo y Estadística (MECAS, 2012) se destaca que Danisco es el principal proveedor mundial de xilitol bajo la marca XIVIA, cuyo uso en alimentación está autorizado en más de 50 países.

En años recientes en México la importación de xilitol se incrementó (Tabla 1.2) y según los datos reportados por el INEGI en su boletín de Balanza Comercial para Importaciones de Mercancías de México, puede inferirse que la demanda también ha aumentado, caso contrario a las exportaciones ya que para el año de 2011 se reportan exportaciones de 4005 Kg (con valor de USD 11 815), mientras que para los años subsecuentes no se reportan datos.

Tabla 1.2 Resumen de los valores de importación de xilitol en México en los últimos años en dólares y pesos mexicanos (valores tomados de la Balanza Comercial para Importaciones de Mercancías en México, INEGI)

Año	Importación		
	Kg	USD	Pesos
2013	801 816	2 731 554	34 705 464
2012	786 896	2 632 253	34 612 573
2011	783 960	2 328 260	28 976 825

Como se observa en la tabla la demanda de azúcares en nuestro país es grande y se ha incrementado con los años representando un amplio mercado, es así que la perspectiva de crecimiento en este tipo de producción es alentadora. Además, al no existir exportaciones se infiere que en México la producción de xilitol es escasa, y representa un área de oportunidad que, económicamente hablando, no debe desaprovecharse.

1.3. DESCRIPCIÓN DEL XILITOL, USOS Y BENEFICIOS.

1.3.1.XILITOL

El xilitol es un compuesto de origen natural cuya fórmula molecular es $C_5H_{12}O_5$. El xilitol se considera un endulzante “libre de azúcar” y miembro de la familia de los polioles, la cual también incluye otros edulcorantes que ya forman parte de la dieta común como lo son el sorbitol, manitol y maltitol.

El xilitol se obtiene por dos métodos uno mediante hidrólisis catalítica y el otro por fermentación. En este último, el metabolismo que sigue la D-xilosa en microorganismos tal como las levaduras se muestra en la figura 1.1. En la mayoría de las levaduras y hongos la conversión de D-xilosa a D-xilulosa requiere de dos pasos; una reducción seguida de una oxidación. En levaduras la D-xilosa se reduce primero a D-xilitol ya sea por la enzima xilosa reductasa NADH o NADPH-dependiente, el xilitol resultante se segrega u oxida a D-xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa NAD o NADP-dependiente.

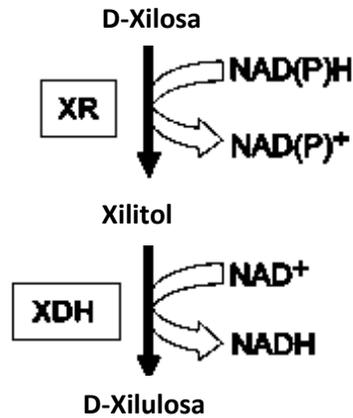


Figura 1.1. Representación esquemática de las rutas metabólicas en la transformación de D-xilosa a D-xilulosa siendo XR xilosa-reductasa NADPH dependiente y XDH xilosa deshidrogenasa NAD dependiente (Chen et al., 2010)

Estas dos reacciones son las etapas limitantes de la velocidad en la fermentación de D-xilosa y producción de D-xilitol (Sasaki *et al.*, 2012). La molécula del xilitol, figura 1.2, tienen una estructura abierta con cinco grupos hidroxilo (-OH) cada uno conectado a un átomo de carbono (Mussatto, 2012).

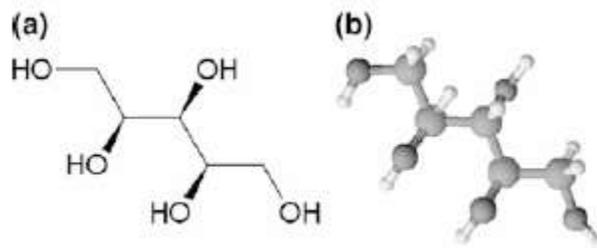


Figura 1.2 Estructura química del xilitol en su forma plana (a) y tridimensional (b) (Mussatto, 2012)

Dentro de las propiedades fisicoquímicas del xilitol se encuentran que en su estado cristalino en polvo es similar al azúcar común así como en sabor pero con 40% menos calorías que la sacarosa (Tiago, 2014), no carameliza y los jarabes de xilitol son

menos viscosos que los jarabes de sacarosa. Con el xilitol no se producen las reacciones de Maillard responsables del oscurecimiento no enzimático en algunos compuestos alimenticios, se disuelve rápidamente y no produce sabor indeseable por el contrario, debido a su alto calor endotérmico (34.8 cal/g) proporciona un sabor refrescante, dando una sensación de frescura, esto es una ventaja para la elaboración de sabores herbales, condimentados o mentolados.

Tabla 1.3 Características y propiedades fisicoquímicas del xilitol (modificado de Mussatto, 2012)

Propiedades	Características/valores
<i>Fórmula empírica</i>	C ₅ H ₁₂ O ₅
<i>Nombre químico</i>	1,2,3,4,5 Pentahidroxi pentano
<i>Sinónimos</i>	Xilosa hidrogenada; xilita
<i>Peso molecular</i>	152.15 g/mol
<i>Azúcares clase/subclase</i>	Monosacáridos/monosacáridos hidrogenados
<i>Forma genérica</i>	Pentitol
<i>Apariencia</i>	Polvo cristalino
<i>Color</i>	Blanco
<i>Sabor</i>	Dulce
<i>Olor</i>	Inoloro
<i>Punto de fusión</i>	92-96°C
<i>Punto de ebullición</i>	216°C (1atm)
<i>pH (en solución acuosa 10%)</i>	5-7
<i>Densidad</i>	1.03 g/mL (solución acuosa 10%)
<i>Solubilidad en agua a 20°C</i>	64.2 g/100 g de solución
<i>Solubilidad en metanol</i>	6.0 g/100 g de solución de metanol 96%
<i>Solubilidad en etanol</i>	1.2 g/100 g de solución de etanol 96%
<i>Viscosidad a 20°C</i>	1.23 cp (en solución acuosa 10%)
<i>Higroscopía</i>	Más que la sacarosa, menos que el sorbitol
<i>Calor (endotérmico)</i>	34.8 cal/g
<i>Dulzura relativa</i>	Similar a la sacarosa, mayor que el sorbitol
<i>Valor calórico</i>	2.4 cal/g
<i>Estabilidad</i>	Estable a 120°C (no carameliza)
<i>Índice de refracción a 25°C</i>	1.35 (en solución acuosa 10%)
<i>Rotación específica</i>	Inactiva ópticamente
<i>Calor de combustión</i>	.96 J/g

La molécula de xilitol muestra gran solubilidad en agua, parcialmente soluble en alcohol: 1.2 g/100 g, en etanol al 96% y 6.0 g/100 g en metanol 96%. En la tabla 1.3 se muestran las características del xilitol. El pH no afecta su estabilidad y se utiliza en un

amplio intervalo desde 1 hasta 11, debido a ésta propiedad fisicoquímica este endulzante actúa como conservador de productos alimenticios aun en bajas

1.3.2.USOS DEL XILITOL

El xilitol tiene un amplia gama de aplicaciones debido a su poder edulcorante, principalmente en las industrias alimentaria y farmacéutica (Tabla 1.4). Por su fuerte estabilidad química y microbiológica, para algunos usos presenta ventajas respecto a la sacarosa. Este edulcorante se comenzó a emplear como aditivo desde la década de los 60's. Sin embargo se incrementó su uso en los últimos años y actualmente es ingrediente de productos alimenticios y recreacionales tales como, goma de mascar, jaleas, chocolates, postres congelados, galletas, pasteles, helados y algunas bebidas (Mussatto, 2012).

El xilitol también posee propiedades antioxidantes, humectantes, estabilizantes y reductoras del punto de congelación, siendo esto una ventaja en la elaboración de helados, haciéndolos de consistencia más cremosa y suave (Mussatto, 2012). Además de todas las ventajas nutricionales y de proceso para algunos alimentos, también el xilitol tiene algunos usos de tipo médico, el más conocido es su uso anticaries, en la tabla 1.4 se enlistan algunos de estos usos, los cuales incluyen prevención contra osteoporosis, efecto antitumoral y como edulcorante empleado por diabéticos.

Tabla 1.4 Principales usos médicos y nutricionales del xilitol (Modificado de Mussatto, 2012)

Usos del xilitol
Edulcorante No- y anticarcinogénico
Como edulcorante en dietas para diabéticos
Estudios como agente anti-ulceroso
Prevención de osteoporosis
Conservación de células rojas de la sangre
Efecto antitumoral
Prevención de arritmias cardiacas
Caries dental
Infecciones respiratorias

La Comunidad Económica Europea reconoce el uso seguro del xilitol desde 1984, y la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos lo clasifica como una molécula Generalmente Reconocido como Seguro (por sus siglas en inglés, GRAS) desde 1986 y “Seguro Dentalmente” desde 1994 (Tiago, 2014).

1.3.3.BENEFICIOS PARA LA SALUD

Además de los amplios usos que se le han encontrado, el xilitol ha demostrado ser un producto que ayuda en el tratamiento de ciertas enfermedades como la diabetes, anemia, lesiones renales, previene la caries, la otitis media, osteoporosis, infecciones respiratorias y procesos inflamatorios (Mussatto y Roberto, 2002), los efectos médicos y de salud se resumen en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5 Resumen de aplicaciones médicas del xilitol (Silva et al., 2012)

Aplicaciones médicas	Referencias
Otitis media aguda	Uhari <i>et al.</i> (1996), Kontiokari <i>et al.</i> (1995, 1998), Danhauer <i>et al.</i> (2010)
Fibrosis quística	Welsh and Zabner (2004), Durairaj <i>et al.</i> (2007)
Prevención y tratamiento de caries	Amaechi <i>et al.</i> (1998), Iwata <i>et al.</i> (2003), Sano <i>et al.</i> (2007), Silva <i>et al.</i> (2010b), Hildebrant <i>et al.</i> (2010)
Nutrición parenteral	Ylikahri (1979), Georgieff and Oehmke (1990), Georgieff <i>et al.</i> (1991)
Dieta de calorías controlada	Shafer <i>et al.</i> (1987), King <i>et al.</i> (2005), Amo <i>et al.</i> (2011), Islam (2011)
Diabetes	Valero <i>et al.</i> (2011)
Dermatitis atópica	Katsuyama <i>et al.</i> (2005a, b)
Leishmaniasis	Ferreira <i>et al.</i> (2008)
Heridas	Ammons <i>et al.</i> (2009, 2011), Korponyai <i>et al.</i> (2011)
Propiedades antiedad	Mattila <i>et al.</i> (2005)
Usos gastrointestinales	Naaber <i>et al.</i> (1996), Silva <i>et al.</i> (2010a, 2011)
Protesis	Sanróman <i>et al.</i> (1991), Bruggeman <i>et al.</i> (2010)
La anemia hemolítica	Wang <i>et al.</i> (1971), Ukab <i>et al.</i> (1981), Ylikahri (1979)
Osteoporosis	Mattila <i>et al.</i> (1998, 1999)
Procesos inflamatorios	Takahashi <i>et al.</i> (1999, 2000), Ackermann <i>et al.</i> (2004), Han <i>et al.</i> (2005), Ferreira <i>et al.</i> (2011)
Reducción de la presión intraocular	Franz <i>et al.</i> (1996)
Acción antipirética	Jerry y Alonso (2005)

1.4. HIPÓTESIS

El xilitol se obtendrá *in vitro* con una enzima óxido reductora no microbiana con secuencia de proteínas similar a la Aldosa Reductasa microbiana.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1.OBJETIVO GENERAL

Obtener un método enzimático para la producción de xilitol con una enzima óxido reductasa de origen no microbiano.

1.5.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer si la enzima óxido reductora no microbiana es capaz de producir xilitol.
2. Determinar la actividad enzimática de la enzima óxido reductora no microbiana mediante espectrofotometría.
3. Optimizar *in vitro* las condiciones básicas del proceso de producción enzimática de xilitol.

1.6. JUSTIFICACIÓN

La insuficiente producción de xilitol se debe principalmente a los costosos métodos químicos y fermentativos con subproductos indeseables que lo convierten en un producto caro. Sin embargo, con herramientas de proteómica y bioquímica fundamental es posible encontrar una enzima óxido reductora que, *in vitro*, convierta xilosa en xilitol. Para con ello establecer las mejores condiciones de catálisis enzimática en la obtención de este poliol sin el complejo manejo de microorganismos y reactivos químicos.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DEL XILITOL

Son pocos los métodos para la producción del xilitol, de entre los cuales destacan el método por hidrogenación química, el método fermentativo y en fechas recientes el biotecnológico. Hasta ahora, los procesos de producción biotecnológicos no logran superar las ventajas de la hidrogenación química aun cuando es un proceso caro debido a los altos costos de proceso.

2.1.1. MÉTODO QUÍMICO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL

La hidrogenación química, figura 2.1, es uno de los principales métodos industriales para la obtención del xilitol. Este método es empleado en Finlandia desde hace varias décadas donde la D-xilosa se reduce a xilitol por medio de alta presión con metales como catalizadores.

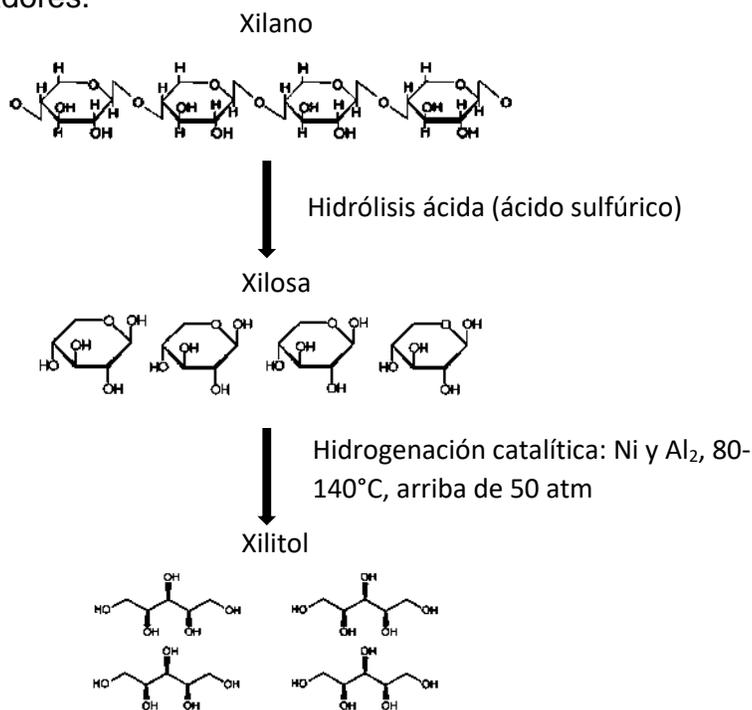


Figura 2.1 Proceso de producción de xilitol por hidrogenación química (modificado de Tiago, 2014)

El proceso por medio de la vía química se resume en los siguientes pasos: 1) hidrólisis ácida, 2) purificación del hidrolizado de manera que se deje únicamente la xilosa pura, 3) hidrogenación catalítica de la xilosa pura en xilitol (en este punto se emplean diversos catalizadores, para el caso de la figura se emplea Ni-Al₂), 4) purificación de la solución de xilitol obtenida y 5) cristalización del xilitol. El proceso se realiza a altas presiones y altas temperaturas, esto implica el uso de equipos sofisticados y costosos para su elaboración, con el consecuente caro precio de venta en el mercado (Tiago, 2014).

La **hidrolización** es una parte del proceso vital e importante que utiliza catalizadores con los cuales los materiales hemicelulósicos liberan los azúcares que se aprovechan en la reducción química para producir el xilitol, en la tabla 2.1 se muestra un resumen de los elementos liberados mediante hidrolización ácida (Mpabanga *et al.*, 2012), así como las condiciones utilizadas y con diferentes materiales orgánicos iniciales (Martínez *et al.*, 2002).

Tabla 2.1 Resumen de productos obtenidos de la hidrolización de materiales orgánicos (modificada de Mpabanga *et al.*, 2012)

Material lignocelulósico	Condiciones de hidrólisis	Inhibidores derivados de la pared celular vegetal (g / l)	Recuperación Azúcares (g / l) o (g / g)	Referencias
Rastrojo de maíz	2.13% H ₂ SO ₄ 180 min 121°C S:L=1:10	Ácido acético, 1.48; Furanos, 0.56; Fenólicos 0.08	Xilosa, 9.09; Glucosa 2.13; arabinosa, 1.01	Cao <i>et al.</i> (2009)
Madera suave	2% HCl+0.5% FeCl ₂ (v/v), 170°C, 30 min	Ácido acético, 5.3; furfural, 2.2	Azúcares monoméricos, 37.5 g/l	Qian <i>et al.</i> (2006)
Paja de arroz	1.5% H ₂ SO ₄ , 130°C, 30 min, S:L=1:10	Acetato, 1.43; HMF, 0.15; furfural, 0.25	Xilosa, 9.09; Glucosa 2.13; arabinosa, 1.01	Back y Kwon (2007)
<i>Eucalyptus globulus</i>	H ₂ SO ₄ (0.65%), 157°C, 20 min, S:L=8.6:1	Furfural, 0.26; 5-HMF, 0.07; Ácido acético, 3.41	Xilosa, 12.34; Glucosa 0.63; arabinosa	Virrareal <i>et al.</i> (2006)
<i>Saccharum spontaneum</i>	160°C, 15 min y 1.5% H ₂ SO ₄ S:L=1:10	Azucars reductores totales, 32.15±0.25	Furfuraes 1.54±0.04; fenólicos	Chandel <i>et al.</i> (2011b)

			2.01±0.08	
Álamo	Tratamiento AFEX + hidrólisis ácida	2-ácido furóico, 0.3 microgramos/g; 3,4-HBA, 2.5; Ácido salicílico, 56; siringaldehído, 6.0; ácido ferúlico, 4.7	Xilosa, 11.36; Glucosa 2.0; arabinosa, 0.49	Balan <i>et al.</i> (2009)
Picea	Dióxido de sulfuro (1Kg), 40 Kg virutas de madera, 203°C, 5 min +hidrólisis enzimática	Fenólicos, 0.44±0.05; furfural, 1.0±0.1; HMF, 3.3±0.2; Ácido acético, 5.0±0.4; Ácido levulínico, 0.2±0.1; ácido fórmico 0.7±0.1	Xilosa, 9.2±0.1; Glucosa 82.4±2.9; Galactosa, 3.8±0.3; Manosa 26.4±0.7; arabinosa, 2.9±0.2	Alriksson <i>et al.</i> (2001)

De la hidrólisis del material lignocelulósico por métodos químicos se tiene como resultado azúcares como la D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa, D-manosa y D-xilosa. Este último azúcar es el más abundante en la fracción hemicelulósica, el principal inconveniente en la hidrólisis de hemicelulosas para la producción de xilitol es el alto costo así como la necesidad de purificar y separar los azúcares previo al proceso, sobre todo para procesos fermentativos, donde algunos subproductos de la fermentación son dañinos para los microorganismos productores de xilitol (Mpabanga *et al.*, 2012).

La xilosa es la mejor fuente de carbono para la producción de xilitol (Tiago, 2014), y es además el segundo monosacárido más común en la naturaleza que aparece en la fracción hemicelulósica de materiales herbáceos principalmente de los hidrolizados se obtienen además de los azúcares hemicelulósicos ácidos fenólicos o alifáticos, furfuraldehídos, y otros ácidos débiles los cuales actúan como potenciales inhibidores de la producción por microorganismos (Gírio *et al.*, 2012), estos hidrolizados sirven como materia prima para la producción de xilitol ya sea por medios químicos o bioquímicos. En la figura 2.2, se muestra el proceso de producción de xilitol por vía química y fermentativa a partir de estos hidrolizados.

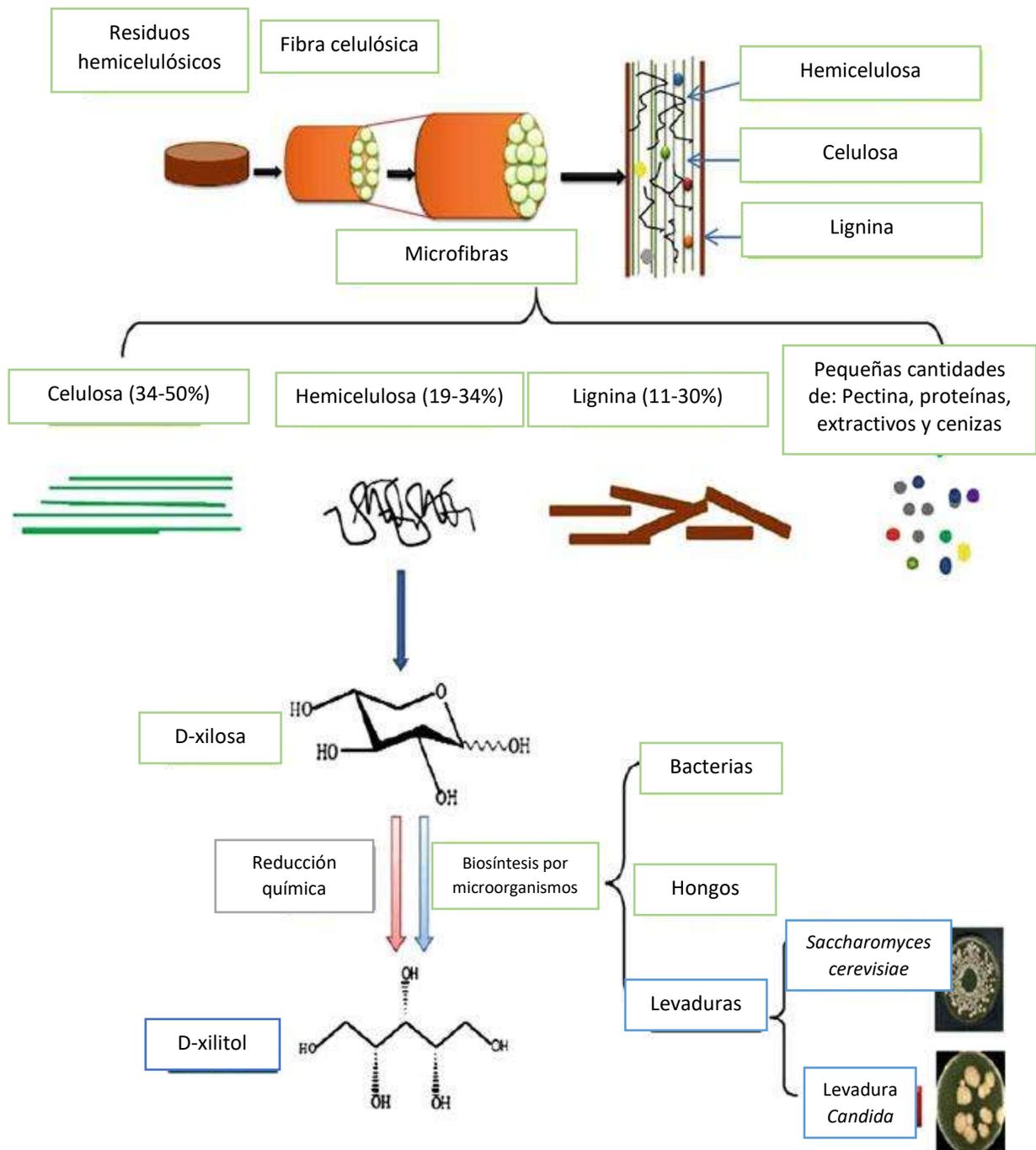


Figura 2.2 Producción de xilitol de residuos hemicelulósicos a través de reducción química o por fermentación con microorganismos (adaptado y modificado de Chen et al., 2010)

Una vez obtenido el hidrolizado se **purifica** para eliminar las impurezas, para ello se emplean métodos físicos, químicos e incluso biológicos, son cuantiosos los métodos empleados para eliminar los inhibidores, esto depende de la naturaleza del inhibidor, entre los cuales están procesos enzimáticos, tratamientos físicos, químicos, resinas de intercambio iónico, con solventes orgánicos, evaporación y extracción, tratamientos químicos con agentes alcalinos (NaOH, CaO, Ca(OH)₂ y tratamientos fisicoquímicos con carbón activado (Tiago 2014, Mpabanga *et al.*, 2012).

Hidrogenación catalítica, en esta parte del proceso tiene un metal como catalizador con gas hidrógeno a alta presión y temperatura para ello es sumamente indispensable partir de sustratos puros para finalmente purificar el xilitol mediante cromatografía, aumentándose considerablemente los costos (Mpabanga *et al.*, 2012).

2.1.2.MÉTODO FERMENTATIVO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL

Actualmente los estudios para encontrar nuevas alternativas se enfocan a la producción de xilitol mediante fermentación microbiana, principalmente levaduras de entre las cuales las que más destacan son del género *Candida*, pues son las que dan mayores rendimientos. Sin embargo, en la actualidad aún se realizan diversos estudios dedicados exclusivamente a aislar cepas productoras de xilitol (Vanegas, 2004).

El proceso fermentativo con microorganismos se resume en la figura 2.3, al igual que en el proceso de hidrogenación química se parte de residuos hemicelulósicos, que se hidrolizan para descomponerse en azúcares, igualmente se liberan componentes secundarios, que en éste caso son de suma importancia ya que en ocasiones resultan tóxicos para los microorganismos que se emplean para la fermentación, inhiben su crecimiento y por lo tanto la producción de xilitol. Los inhibidores y la forma de purificar el sustrato son los mismos que se abordan en el método químico.

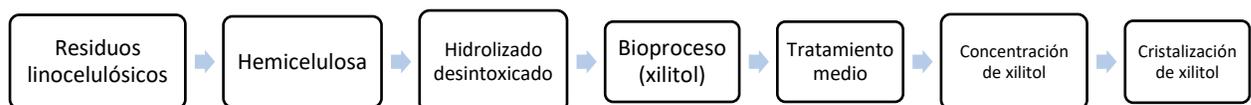


Figura 2.3 Proceso fermentativo de producción de xilitol. (Modificado de Tiago, 2014)

Son diversos los estudios realizados para encontrar un microorganismo que proporcione buenos rendimientos con bajos costos de producción, en la tabla 2.2 se muestra un resumen de microorganismos empleados para producir xilitol, los cuales van desde levaduras, hongos y bacterias, donde claramente el campo de las levaduras es el más estudiado.

Tabla 2.2 Microorganismos empleados en la producción de xilitol (Chen et al., 2010; Sampaio et al., 2003; Ghindea et al., 2010; Sasaki, et al., 2012)

Levaduras	Hongos	Bacterias
<i>Petromyces albertensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Enterobacter liquifaciens</i>
<i>C. maltosa</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>C. moggi</i>	<i>P. expansum</i>	
<i>C. tropicalis</i> HXP2	<i>P. griseoroseum</i>	
<i>Debaromyces hansenii</i> UFV-170	<i>P. roqueforti</i>	
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>P. purpurogenum</i>	
<i>Pachysolen tannophilus</i>	<i>P. janthinellum</i>	
<i>Pichia caribica</i>	<i>P. chrysogenum</i>	
<i>C guilliermondii</i> FTI-20037118	<i>P. italicum</i>	
<i>C. intermedia</i>	<i>P. crustosum</i>	

Los estudios a diferentes condiciones fermentativas de producción como son: concentración de oxígeno, pH, temperatura, concentración de sales, composición del medio e inóculo, concluyen que las condiciones más influyentes son la temperatura, la agitación y el pH, se concluye a partir de un estudio con 17 cultivos de bacterias que la *Corynebacterium* es la de mayor producción; incluso se destaca que hay estudios con *E. coli* modificadas genéticamente (Cirino, et al., 2006 e Iverson et al., 2013). A partir de estos trabajos experimentales se demuestra que los microorganismos poseen enzimas que catalizan la reacción (Goli et al., 2012).

2.1.3.MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL ENZIMÁTICO

El proceso enzimático es una alternativa biotecnológica reciente la cual alcanza un 100% de conversión de los azúcares, esto es de suma importancia ya que durante el proceso fermentativo no se aprovecha todo el azúcar pues parte de la xilosa se emplea para el crecimiento celular de los microorganismos.

Este proceso consiste básicamente en la reducción de la xilosa a xilitol por medio de una enzima óxido reductora (xilosa reductasa) asistida por la coenzima NADPH en su forma reducida (De Freitas Branco *et al.*, 2012). En este proceso las enzimas se incorporan como un catalizador químico que mejora la producción y aunque el proceso de producción enzimática de xilitol ofrece múltiples ventajas por encima del fermentativo, también se ha visto que tiene menos rendimientos y requiere de un control más preciso.

En la figura 2.4 se muestra una representación del mecanismo de reacción de xilitol en un sistema de regeneración de coenzima NADP, claramente se ve una similitud al proceso observado en la figura 1.1 referente a las rutas metabólicas que siguen los microorganismos para la producción de xilitol. Es este paso el que consideramos de suma relevancia para la propuesta de este trabajo (Goli *et al.*, 2012).

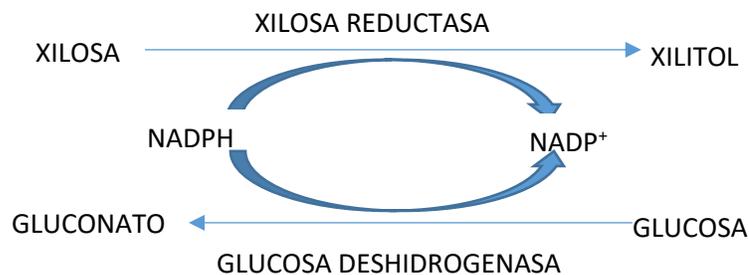


Figura 2.4 Representación esquemática de la reacción enzimática para producción de xilitol (modificado de De Freitas Branco *et al.*, 2012)

En la tabla 2.3 se muestran las ventajas y desventajas antes mencionadas de los diferentes métodos utilizados para la producción de xilitol, en ella se observa que el proceso enzimático ofrece mayores ventajas que desventajas, siendo el costo la principal desventaja a combatir.

Tabla 2.3 Ventajas y desventajas de los diferentes modos de producción de xilitol (modificado de De Freitas Branco et al., 2012)

Tipo de proceso	Ventajas	Desventajas
Químico	Optimizado Alta productividad	Altos costos de instalación Uso de fuentes naturales
Microbiológico	Bajo costo Sustentable	Baja productividad
Enzimático	Sustentable Máxima eficiencia Alta productividad	Costo

El proceso de producción de xilitol con enzimas es bastante atractivo pues implica una mayor eficiencia y altas productividades como se observa en la tabla anterior. Para esto se propone la utilización de una enzima oxidorreductasa de fácil acceso con el mismo sitio activo que las generadas durante la fermentación que sea capaz de producir xilitol a partir de xilosa.

El principal reto de este trabajo es demostrar que es posible la producción de xilitol mediante reacción enzimática y con esto disminuir los costos de producción, aumentar rendimientos y de ser posible la eficiencia del proceso.

2.2. ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS

La producción enzimática de xilitol tiene muchas ventajas sobre el proceso fermentativo, los recientes estudios muestran que se obtienen menores rendimientos y se requiere un mayor control de proceso puesto que emplean enzimas de extracción microbiana, principalmente levaduras que asimilan la D-xilosa a través de dos reacciones, una con XR (xiloreductasa, EC1.1.1.21) y XDH (xilitol deshidrogenasa, EC 1.1.1.9). Así, la xilosa se reduce a xilitol mediante una reacción de conversión catalítica con XR, en este proceso las enzimas funcionan como catalizadores para mejorar la producción (De Freitas *et al.*, 2011).

Enzima Xilosa Reductasa (XR)

La enzima xilosa reductasa (oxidorreductasa) pertenece a la superfamilia de las aldo-keto reductasas, siendo oxidorreductasa NADPH dependiente. Esta enzima se

encuentra en algunos microorganismos y es importante en el metabolismo microbiano que cataliza a la xilosa y la transforma en xilitol con ayuda de la coenzima NADPH como donante de electrones. El peso molecular varía de 30-70 kDa dependiendo del microorganismo que lo produce (De Freitas *et al.*, 2011). En la figura 2.5 se muestra la estructura representativa de las enzimas Aldo-Keto-Reductasas (AKR).

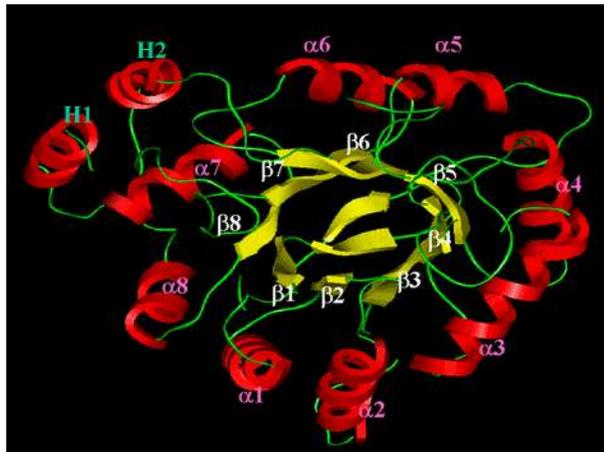


Figura 2.5 Aldo-Keto-Reductasas (AKR)

Enzimas AKR de importancia

La enzima AKR1B5, es una aldosa reductasa también llamada “*bovine 20a-HSD*” y cuya especie es *Bos taurus*, es de origen bovino, se obtiene de los cristalinos de los toros. La enzima AKR1B4 es una enzima que proviene de la rata de especie *Rattus norvegicus*, que se obtiene del cristalino de las ratas, es la enzima de mayor estudio y que sirve de referencia para las demás enzimas, así como la enzima AKR1B1, ésta es una enzima AKR de la especie *Homo sapiens*, que se obtiene de la placenta de los seres humanos, también llamada Aldosa Reductasa EC 1.1.1.21, que es la enzima aislada de algunos microorganismos que se han utilizado para la producción de xilitol.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La propuesta metodológica consiste en:

1. Realización de un análisis proteómico para determinar la enzima óxido reductora con la que se hará esta investigación.
2. Realización de las pruebas que ayuden a determinar si la enzima es capaz de producir xilitol con los sustratos de xilosa y glucosa, los cuales son azúcares que se pueden obtener de residuos orgánicos mediante un hidrolizado ácido.
3. Obtención de un extracto enzimático enriquecido de una enzima óxido reductasa mediante precipitación de la enzima con saturación salina, de acuerdo a lo sugerido en Hayman *et al.*, 1964.
4. Determinación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría en una longitud de onda de 340 nm, que es la técnica sugerida en la mayoría de los trabajos, además de ser la más económica y fácil de emplear.
5. Implementación del diseño experimental central para los diferentes tratamientos experimentales.
6. Establecimiento de las condiciones básicas de trabajo de la enzima como son temperatura, pH, concentración de sustrato, para la reacción enzimática de conversión de xilosa a xilitol mediante un diseño experimental central compuesto para determinar las condiciones a las cuales se obtengan mejores rendimientos de xilitol.
7. Establecimiento de las condiciones óptimas del proceso de producción enzimática de xilitol.

La metodología experimental a seguir incluye los pasos del esquema de la figura 3.1. Desde el análisis proteómico para identificar si la enzima de origen no microbiano es similar a la microbiana y por tanto capaz de producir xilitol, la técnica para la obtención del extracto enzimático crudo, la estrategia para la determinación de la actividad enzimática y finalmente el diseño de experimentos para la obtención de las condiciones óptimas de trabajo de la enzima.

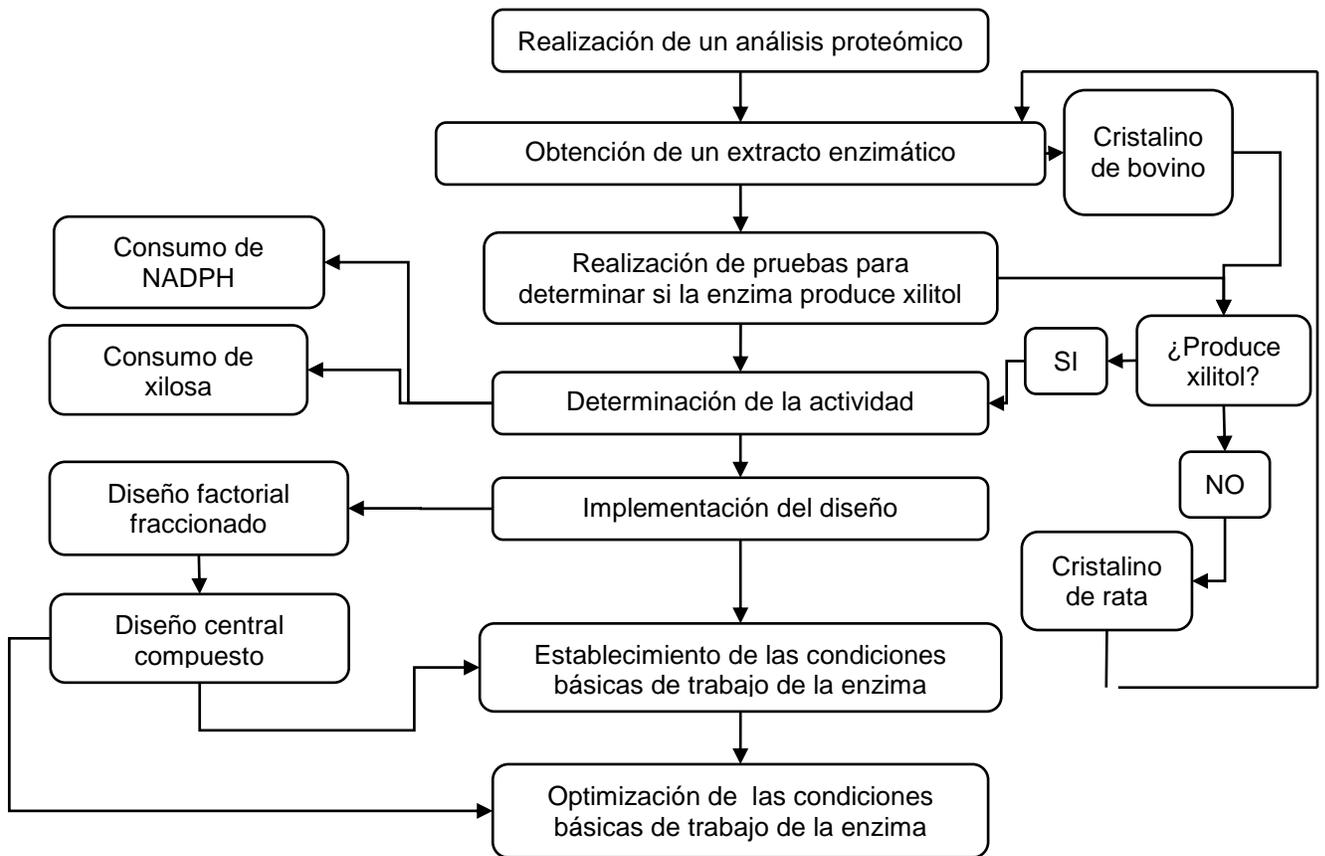


Figura 3.1 Cuadro representativo de las etapas metodológicas a seguir para el desarrollo del proyecto

3.1. REALIZACIÓN DE UN ANÁLISIS PROTEÓMICO

El análisis proteómico se realizó en la base de datos de la “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) fuente de información en biología molecular útil para comparar dos enzimas de orígenes distintos (enzima del cristalino de bovino, AKR1B5 y enzima del cristalino de rata, AKR1B4) con la enzima de origen microbiano (AKR1B1) e identificar similitudes entre éstas.

3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO

La obtención y conservación de cristalinós se realizó siguiendo el método desarrollado por Hayman y Kinoshita (1965), los cristalinós se extrajeron de ojos de bovino donados por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.M.S.N.H. una vez extraídos del animal se colocan en disolución de buffer de fosfatos de potasio y 2-mercaptoetanol. Los cristalinós se conservaron en congelación hasta el momento de su uso.

El extracto enzimático de cristalino de bovino se obtuvo siguiendo el método descrito por Hayman y Kinoshita (1965), consiste en la homogenización de los cristalinós en presencia de buffer de fosfatos e inhibidores de proteasas en un homogeneizador de Potter, la muestra se centrifugó a 10 000 x g ($x\text{ g}=\text{RFC}$ *Relative Centrifugal Force*) durante 15 min, el material insoluble se desechó mientras que al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ para llegar a una saturación del 40 % (p/v), se agitó por 1 h seguido de una centrifugación a 4 500 x g, a temperatura de 4 °C, recuperándose el precipitado; posteriormente el sobrenadante se saturó a 50 y 75 % (p/v) siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para tener en cada uno de los precipitados una enzima con mayor pureza. Finalmente, cada uno de los precipitados recuperados se dializó en disolución buffer de fosfatos de potasio, durante 72 h. Todo el procedimiento se llevó a cabo en presencia de hielo aproximadamente 4°C para evitar la degradación de la enzima.

El extracto enzimático de cristalino de rata se obtuvo siguiendo el mismo método sin llegar a la precipitación, consistió en la homogenización de los cristalinós en presencia de buffer de fosfatos e inhibidores de proteasas en un homogeneizador manual, la muestra se centrifugó a 10 000 x g durante 15 min, el material insoluble se desechó y el sobrenadante se recuperó como extracto crudo de enzima utilizándose éste para los ensayos enzimáticos.

3.3. REALIZACIÓN DE ENSAYOS PARA DETERMINAR SI LA ENZIMA PRODUCE XILITOL

La actividad enzimática se midió mediante dos métodos, el primero se basa en la determinación de la cantidad de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) consumido en la reacción, es proporcional a la actividad de la enzima presente. La medición de la cantidad de proteína presente se llevó a cabo por el método de cuantificación de proteínas de Lowry (1951).

El segundo es una medida indirecta de la actividad enzimática en función al agotamiento de xilosa (el consumo de xilosa es directamente proporcional a la aparición de xilitol) durante la reacción, con el método de cuantificación de azúcares reductores de Miller (1959). En ambos métodos se utilizó la espectrofotometría para medir la cantidad de luz absorbida por las proteínas, azúcares y sustrato. La reacción se detuvo al mantener la muestra durante 5 min en agua caliente a 80 °C para desnaturalizar la enzima.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se realizó un ensayo para verificar que la enzima posee actividad enzimática en condiciones ya establecidas. La unidad internacional de actividad enzimática se define como el cambio en la absorbencia de 0.001 unidades por minuto, la prueba se realizó mediante un sondeo en el espectrofotómetro a 340 nm durante dos min con la enzima y un inhibidor específico para la aldosa reductasa denominado naringinina. La actividad se calculó a partir de la pendiente de la curva de absorbencia vs tiempo, usando el coeficiente de extinción molar aparente del NADPH de $6.22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la siguiente ecuación:

$$U = \frac{\Delta\left(\frac{Abs}{min}\right) * Vf}{Vi * \epsilon * b} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde:

$\Delta\left(\frac{Abs}{min}\right)$ = velocidad inicial de trabajo de la enzima (pendiente de la curva)

V_f =Volumen final en la celda de reacción (3 mL)

V_i =Volumen inicial de extracto enzimático (30 o 60 μ L)

ϵ =Coeficiente de extinción molar del NADPH (6.22 $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b =Espesor de la celda de medición (1 cm)

Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato (NADPH) en un minuto de reacción, bajo condiciones previamente determinadas.

La actividad enzimática específica se calculó al dividir la actividad enzimática entre los miligramos de proteína.

$$AE = \frac{U}{\text{mg proteína}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Otros parámetros de proceso que se determinan para establecer la actividad enzimática de acuerdo a De Freitas (2011) son:

- Eficiencia de conversión de xilosa (ECX, %) en un tiempo de reacción específico (t,min):

$$\frac{\text{Xilitol producido } (DP, \frac{g}{L})}{\text{Xilosa consumida } (-DS, \frac{g}{L})} \quad \text{Ec. 3.3}$$

- Productividad volumétrica (Q_p , g/Lmin)

$$\frac{\text{Xilitol producido } (DP, \frac{g}{L})}{\text{tiempo } (t, \text{min})} \quad \text{Ec. 3.4}$$

- Número de conversión total (TTN) en un tiempo de reacción específico (t,min);

$$\frac{\text{Xilitol producido } (DP, \text{ mM})}{\text{NADPH } (-\text{NADPH}, \text{ mM})} \quad \text{Ec. 3.5}$$

En el caso de las ecuaciones 3, 4 y 5 es indispensable la determinación de xilitol producido, la cual se planteó realizar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.5. IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se aplica un diseño factorial fraccionado para identificar las variables de mayor influencia durante la producción enzimática de xilitol. La segunda etapa implica el desarrollo de una metodología de superficie de respuesta para la optimización de las variables de mayor influencia.

El diseño factorial permite identificar los factores que tienen efectos significativos sobre las respuestas de nuestro sistema y la magnitud de estos efectos. En un diseño factorial, el número total de experimentos a realizar vendrá dado por el número de factores, los niveles atribuidos a cada factor y el grado de incertidumbre que asociemos al modelo.

Diseños factoriales completos (2^k)

Un diseño factorial completo permite evaluar el efecto de los factores principales y sus interacciones. Los diseños más comunes utilizan dos niveles para cada factor, denominados "nivel bajo" y "nivel alto", y el número total de experimentos a realizar es 2^k , siendo k el número de factores.

Diseños factoriales fraccionados (2^{k-p})

Cuando el número de factores es grande, la cantidad de experimentos a realizar en un diseño factorial completo puede resultar inmanejable. Para estos casos, se utilizan los diseños factoriales fraccionados, en los cuales el experimentador selecciona un subconjunto de ensayos del total de combinaciones posibles, a cambio de una incertidumbre en la información que obtenemos del sistema. Los ensayos se escogen de forma que se confundan los efectos de los factores principales con algunas de las interacciones. Esta estrategia presupone que la probabilidad de que los efectos principales influyan en el sistema es superior al de algunas de las interacciones.

3.5.1.DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONADO

Consistió en la evaluación de tres factores (Temperatura, pH y concentración inicial de sustrato) en dos niveles con cuatro puntos centrales realizándose por separado para dos enzimas oxido reductasas de orígenes distintos, en la primera se utilizó el cristalino de bovino tabla 3.1 y la segunda se empleó el cristalino de ratas tipo Wistar, tabla 3.2.

Tabla 3.1 Matriz codificada de diseño de experimentos para la enzima de cristalino de bovino

a)

Ensayo	Temperatura	pH	[Xilosa]
E1	+	-	-
E2	-	+	-
E3	0	0	0
E4	0	0	0
E5	-	-	+
E6	+	+	+
E7	0	0	0
E8	0	0	0

Tabla 3.2 Matriz codificada de diseño de experimentos para la enzima de cristalino de rata

a)

Corrida	Temperatura	pH	[Xilosa]
E1	+	-	-
E2	-	+	-
E3	0	0	0
E4	0	0	0
E5	-	-	+
E6	+	+	+
E7	0	0	0
E8	0	0	0

3.5.2.DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO

El diseño central compuesto se realizó para optimizar las condiciones de trabajo de la enzima en las variables de temperatura y pH que fueron los factores que mayor influencia significativa tuvieron sobre ambas enzimas. El tipo de diseño es un diseño factorial 2^2 con 5 puntos centrales y 2 puntos axiales.

La matriz experimental que proporciona el programa Matlab 17.0 se representa en la tabla 3.3 en su forma codificada y decodificada sin aleatorizar para los dos factores de relevancia, dando como resultado un total de 13 ensayos con 5 puntos centrales y puntos axiales.

Tabla 3.3 Matriz codificada de diseño de experimentos del diseño central compuesto con la enzima de cristalino de bovino

a)

Ensayo	Temperatura	pH
E1	-1	-1
E2	+1	-1
E3	-1	+1
E4	+1	+1
E5	$-\sqrt{2}$	0
E6	$+\sqrt{2}$	0
E7	0	$-\sqrt{2}$
E8	0	$+\sqrt{2}$
E9	0	0
E10	0	0
E11	0	0
E12	0	0
E13	0	0

3.6. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES BÁSICAS DE TRABAJO DE LA ENZIMA

Posterior a la identificación de las variables de mayor influencia y su optimización mediante el diseño de superficie de respuesta se lleva a cabo la confirmación de las mismas a través de un evento experimental que corrobore lo teórico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO

En la tabla siguiente (4.1a) se muestra una comparación de las tres diferentes enzimas de la familia de las Aldo-Ceto-Reductasas (AKR), las tres enzimas poseen una alineación en sus secuencias de proteínas similares, mayor al 90 % para todos los casos, lo cual deja ver que su estructura es similar entre ellas, esto es de suma importancia ya que se ha demostrado que la enzima AKR1B1 produce xilitol, y al ser similares se puede suponer que la enzima AKR1B5 también lo hará pues al comparar sus secuencias nucleotídicas (Tabla 4.1b) tienen una alineación similar al ser idénticas en un 83 y 88% lo que hace sospechar que tienen una alineación del sitio activo similar en sus cadenas peptídicas a la Xilosa Reductasa (XR) fúngica, esto demuestra que es posible utilizar la enzima AKR1B5 para la producción de xilitol.

Tabla 4.1a. Comparativo de alineación de secuencias proteicas de enzimas Xilosa Reductasas (XR) capaces de producir xilitol con estructuras similares
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2014

Enzima	Identidad		Similaridad	
	Coincidencias	%	Coincidencias	%
AKR1B5 vs AKR1B1	273/315	87	297/315	94
AKR1B5 vs AKR1B4	265/314	84	289/314	92
AKR1B4 vs AKR1B1	270/315	86	294/315	93

Tabla 4.1b. Comparativo de alineación de secuencias nucleotídicas de enzimas Xilosa Reductasas (XR) capaces de producir xilitol con estructuras similares
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2014

Genes	Identidad	
	Coincidencias	%
AKR1B5 vs AKR1B1	823/938	88
AKR1B5 vs AKR1B4	802/965	83

4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO

La precipitación de la enzima se realizó con las sales de amonio, así, existe una mayor certeza de trabajar con la enzima deseada, los valores de la tabla 4.2 muestran que la actividad enzimática es mayor en la fracción al 50 % de sulfato de amonio, sin embargo, es en ésta donde se tiene el menor rendimiento. Es notable que conforma aumenta la saturación de la enzima se disminuye el volumen de ésta, a la saturación de 40 % se obtuvo un mayor rendimiento, razón por la que se decidió emplear ésta saturación para futuros experimentos.

Tabla 4.2 Fraccionamiento salino de proteínas de un extracto libre de células de ojo de bobino con sulfato de amonio

Saturación con Sulfato de amonio (%)	Volumen (mL)	Rendimiento (%)	Proteína (mg/mL)	Actividad enzimática (U/mg)
0	---	100	14.97	49.68
40	12.5	32.47	17.77	7.79
50	1.5	3.89	1.85	103.37
75	3	7.79	2.98	5.37

Los resultados de la actividad enzimática después de la precipitación se aprecian gráficamente en la figura 4.1 donde se representaron los valores de la actividad enzimática en U/mg de proteína, se realizó un comparativo en dos diferentes momentos (con un mes de diferencia) para verificar si la enzima se degrada y en qué medida, notándose que al 50 % de precipitación la degradación es mayor a pesar de ser la que mayor actividad reportaba inicialmente, esto es de gran interés porque da pauta a establecer los experimentos posteriores, por fines prácticos se utilizó la enzima precipitada con 40 % de sulfato de amonio, siendo ésta la de mayor rendimiento y con poca degradación con el tiempo. Para indagar sobre la especificidad de la enzima y confirmar que se trata de la aldosa reductasa de interés, los ensayos se realizaron con el sustrato que tiene mayor especificidad con la enzima (gliceraldehído) así como con un inhibidor concreto para la misma, todos los ensayos se realizaron a 4 °C.

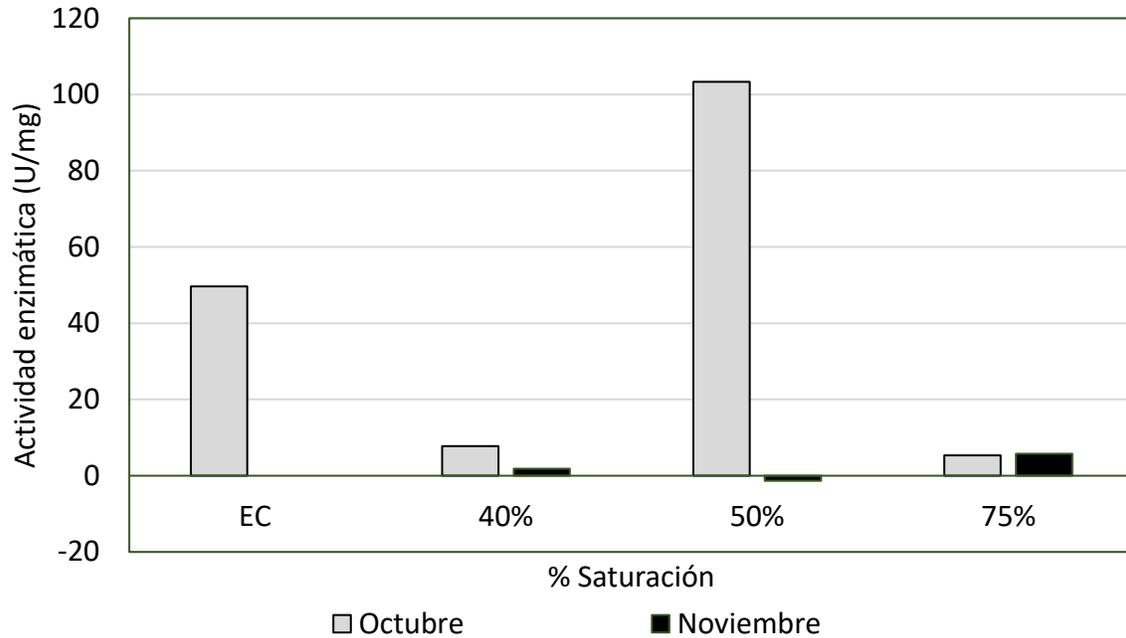


Figura 4.1 Actividad enzimática de la AKR en el fraccionamiento salino y la estabilidad de la enzima con respecto al tiempo. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes. EC = extracto libre de células

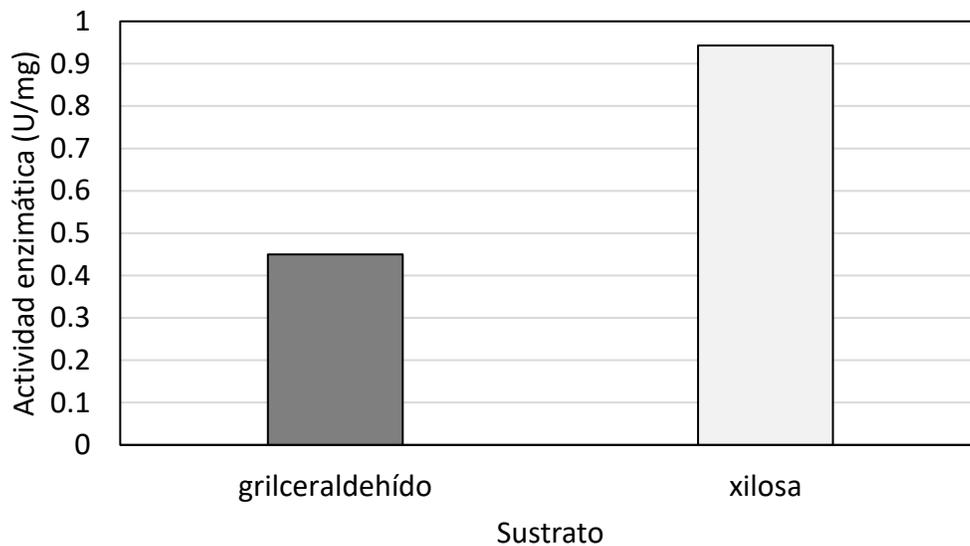


Figura 4.2 Efecto del tipo de sustrato en la actividad enzimática de la fracción que precipitó al 40 % con sulfato de amonio con cristalino de bovino. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes

En la figura 4.2 se observa el efecto del tipo de sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima de bovino con saturación del 40 %, se muestra es capaz de trabajar con el sustrato que reporta tener una mayor afinidad denominado gliceraldehído y con xilosa, presentó mayor actividad enzimática con el sustrato de interés. A partir de estos resultados se confirma lo expresado en el análisis proteómico acerca de la similitud de las enzimas y su posibilidad de producir xilitol.

4.3. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PARA DETERMINAR SI LA ENZIMA PRODUCE XILITOL

Para la determinación de la actividad enzimática es necesario la utilización de herramientas que nos permitan determinar la cantidad de proteína presente durante la reacción enzimática, así como la cantidad de azúcares reductores presentes al final de la reacción, empleándose el método de Lowry para la primera y el método de Miller (DNS) para la segunda.

4.3.1. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

La curva obtenida durante la verificación de la técnica para determinación de proteínas está en la figura 4.3, en ella se puede observar que el coeficiente de determinación (R^2) es mayor de 0.95, es decir que más del 95% de los datos se aproximan a una línea recta, los resultados de la regresión se promediaron para tener la relación que permita calcular la cantidad de proteína (enzima) presente en cada momento experimental. La relación obtenida es $[Proteína] = 0.07345 * (Abs) + 0.005028$.

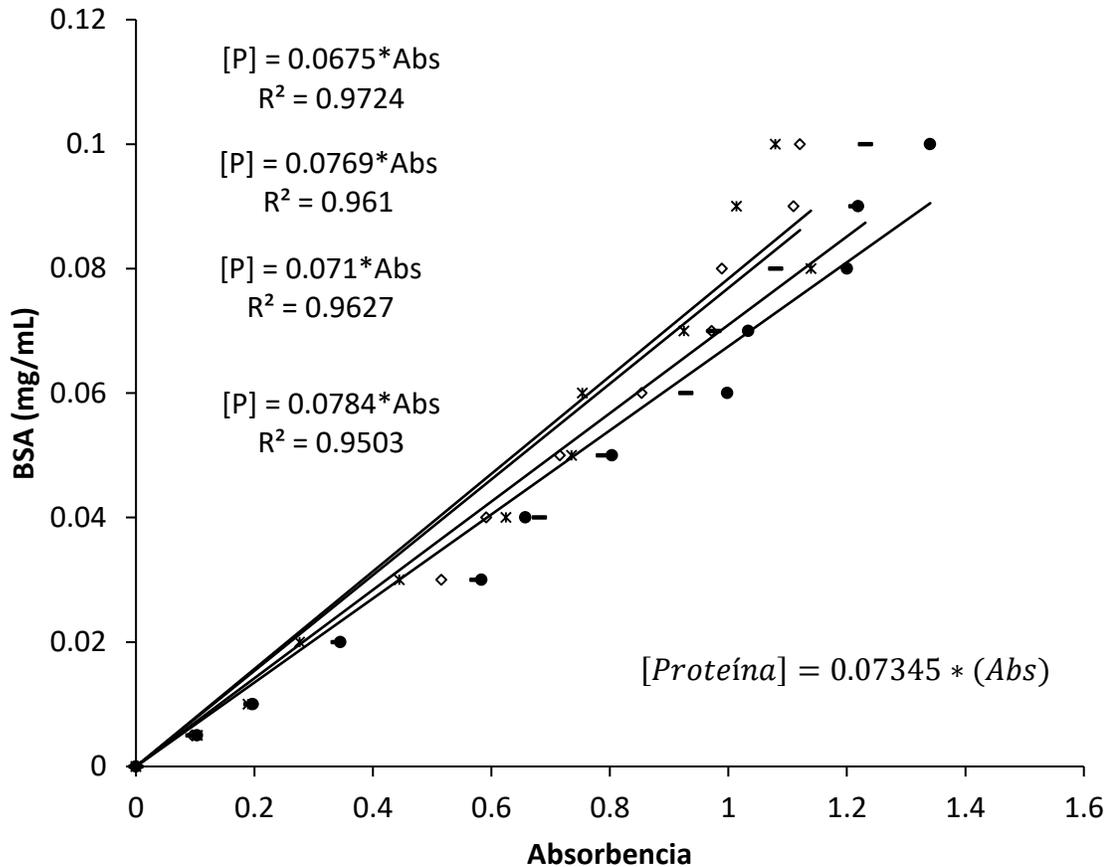


Figura 4.3 Curva de calibración para la determinación de proteína

4.3.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE MILLER

La curva de calibración de azúcares reductores (figura 4.4) que permitirá determinar la concentración de xilosa presente al final de la reacción enzimática se presenta a continuación, en ella se puede observar como los datos se ajustan a la tendencia de una línea recta, donde la relación empírica es $[Azúcar\ reductor] = 0.1030 * (Abs) + 0.0221$.

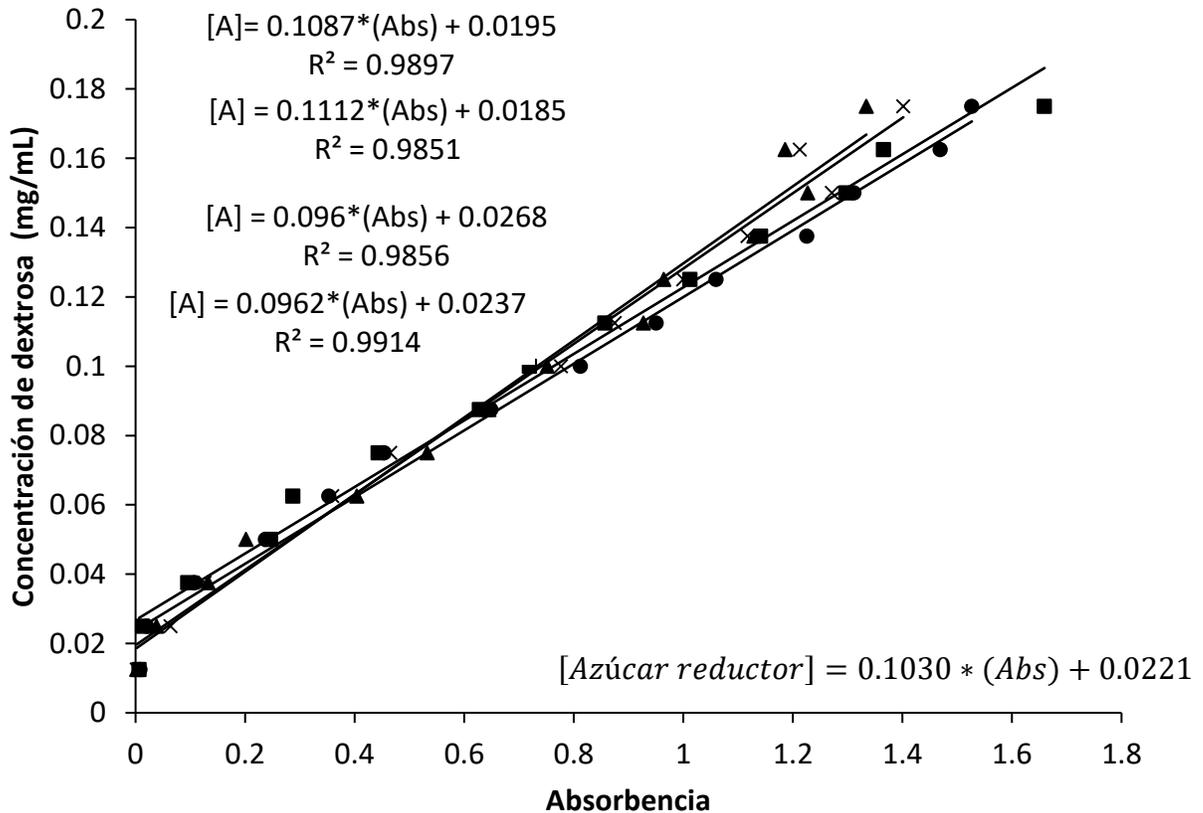


Figura 4.4 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores (xilosa final)

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Con la finalidad de determinar si la enzima produce xilitol se realizó un ensayo enzimático en presencia de xilosa con los extractos crudos (EC) de las dos aldosas reductasas, la de cristalino de bovino y la de rata (figura 4.5) encontrándose que la enzima de bovino posee una actividad enzimática específica mayor que la de rata. Es notable como la actividad enzimática disminuye en presencia de inhibidor, indica que en efecto se trata de la enzima de interés; al existir actividad con este sustrato la enzima extraída del cristalino de bovino es capaz de consumir xilosa y por ende producir xilitol.

Los resultados muestran que la actividad catalítica de la enzima de bovino es superior numéricamente a la de cristalino de rata, eso denota que aunque son enzimas

estructuralmente diferentes son similares entre sí pues tienen actividad sobre el mismo sustrato, sin embargo, ésta se encuentra en un nivel numérico diferente.

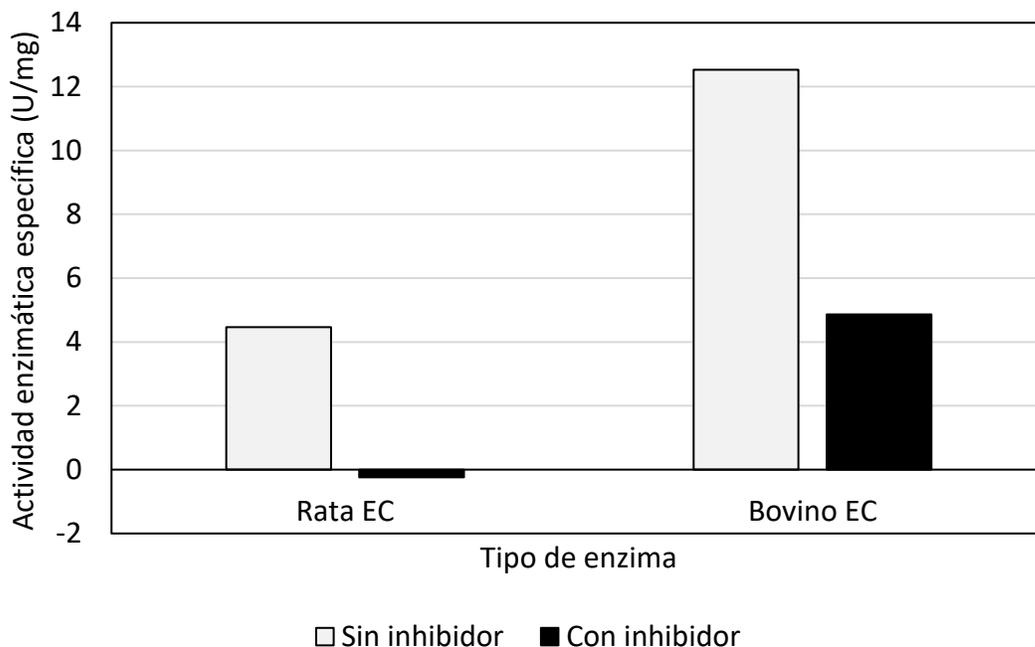


Figura 4.5 Actividad enzimática de aldosa reductasa de dos diferentes orígenes en presencia de xilosa y NADPH. La actividad de AKR se confirmó con naringinina 0.001 M. Los valores son el promedio de dos mediciones con extractos diferentes. EC = extract

El efecto del inhibidor sobre la actividad catalítica es importante con este se demuestra que se trata de una enzima Aldosa Reductasa, Beltrán (2014) demostró que este inhibidor posee inhibición competitiva, aquí el inhibidor se une a la enzima reversiblemente en el mismo sitio que el sustrato, por tanto inhibidor y sustrato compiten por el mismo sitio. En ambas enzimas existe el efecto del inhibidor y esa competencia, en consecuencia se intuye que el sitio activo se encuentra en un sitio similar.

4.5. IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

4.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL FRACCIONADO

Del diseño experimental fraccionado se obtuvieron los siguientes resultados mostrándose los promedios de dos repeticiones y error estándar de la actividad enzimática específica (AE) para la AR de bovino con xilosa como sustrato.

Los resultados de actividad enzimática con enzima de bovino y rata para los diferentes tratamientos se aprecian gráficamente como se muestra en las figuras 4.6 y 4.8 respectivamente.

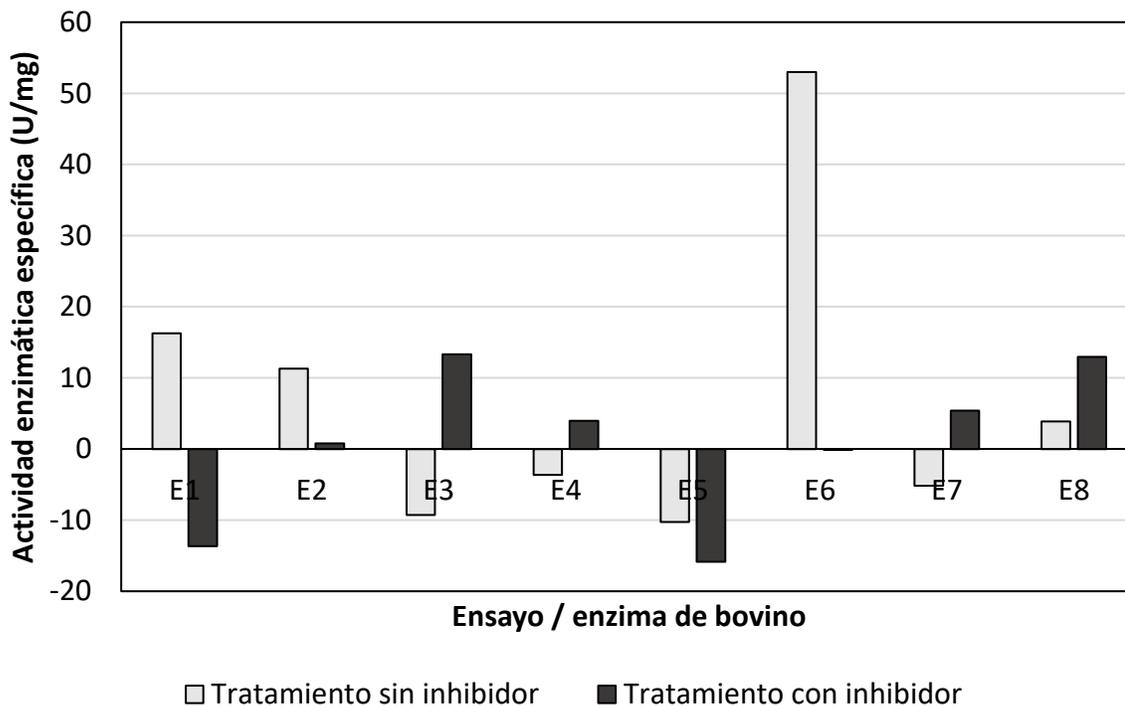


Figura 4.6 Actividad enzimática de la enzima de bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

En la figura 4.6 se muestran los resultados para enzima de bovino, se sospecha que la temperatura tiene cierta influencia sobre la actividad enzimática. La enzima de

rata presenta comportamiento similar al tener las mayores actividades en estos ensayos y la menor actividad con el ensayo 5.

La actividad enzimática específica se reporta en U/mg, U se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato a 1 μmol de producto en un minuto de reacción, es decir, que por cada μmol de sustrato se producen un μmol de xilitol, dado que el contenido de proteína se conoce para todas las reacciones es posible calcular la cantidad de xilitol producido. Los datos se expresan de manera gráfica como se observa en la figura 4.7 correspondiente a los micromoles de xilitol producidos por minuto para cada uno de los tratamientos.

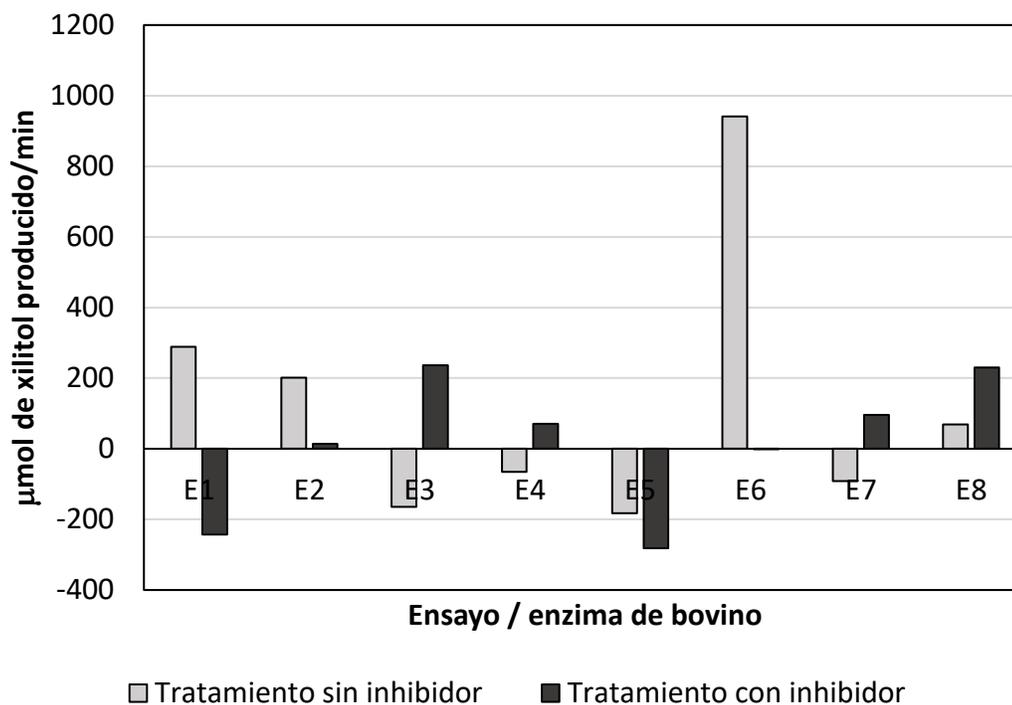


Figura 4.7 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

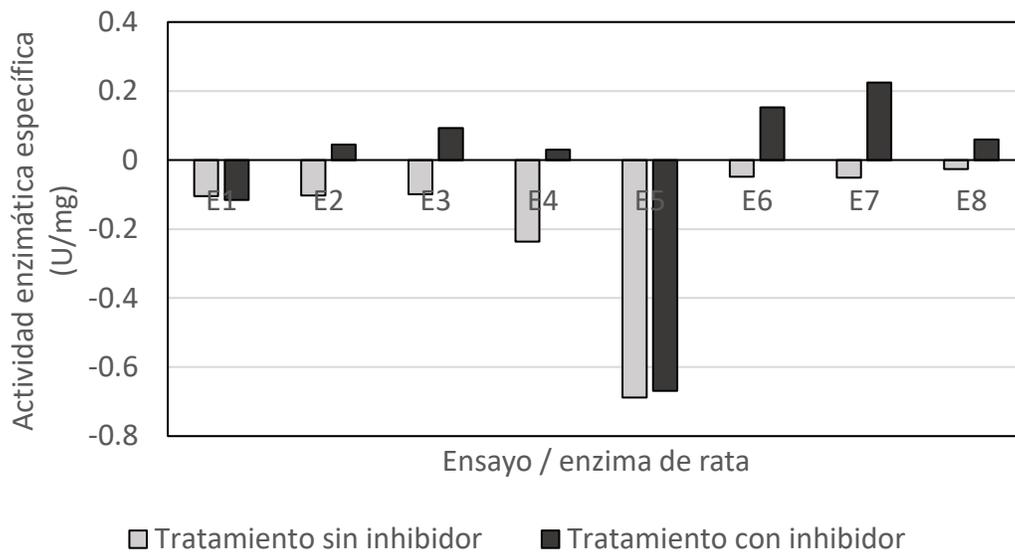


Figura 4.8 Actividad enzimática de la enzima de rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

La enzima que se extrajo de los cristalinos de rata posee una actividad enzimática menor comparada con la enzima de bovino, la principal razón a la que se atribuye este comportamiento es al contenido de proteína, la enzima de rata tiene en promedio 7.67 mg/mL mientras que la de bovino contiene 17.77 mg/mL, este resultado refleja inmediatamente una mayor actividad con el sustrato de interés independientemente de la temperatura, pH y concentración inicial de xilosa. Este comportamiento se refleja en la cantidad de xilitol producido ya que con la enzima de bovino se tienen cerca de 1 000 $\mu\text{mol}/\text{min}$ mientras que con la enzima de rata difícilmente se llega a los tres $\mu\text{mol}/\text{min}$. Así se alienta y justifica el uso de la enzima de bovino para la obtención de xilitol y para la optimización de las condiciones de trabajo de la enzima para éste propósito.

La cantidad de xilitol producido con la enzima de rata se observa en el gráfico correspondiente a la figura 4.9, similar al de la actividad enzimática.

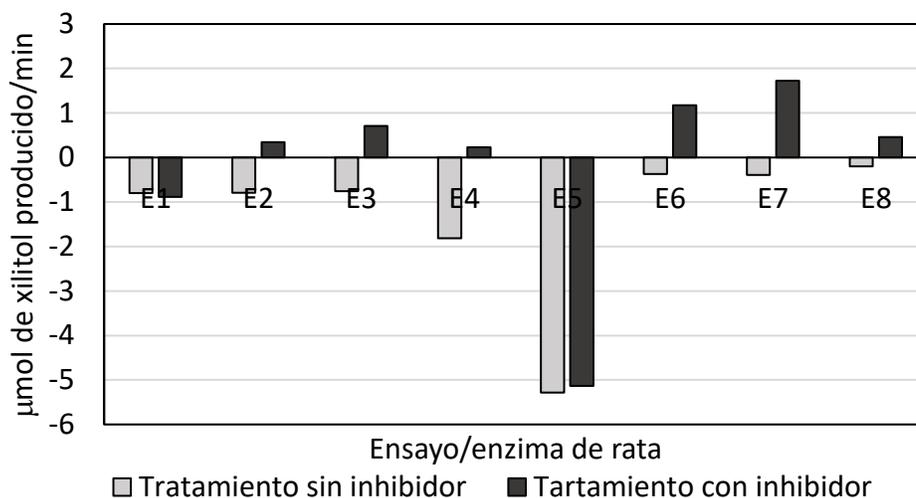


Figura 4.9 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

En la figura 4.10 se presenta la producción de xilitol con las enzimas que se extrajeron del cristalino de bovino y rata en los tratamientos de los diseños experimentales factorial fraccionado, es notable como la cantidad de xilitol que se produce con la enzima de bovino es superior a la de rata, equiparable a la actividad enzimática reportada con ambas enzimas.

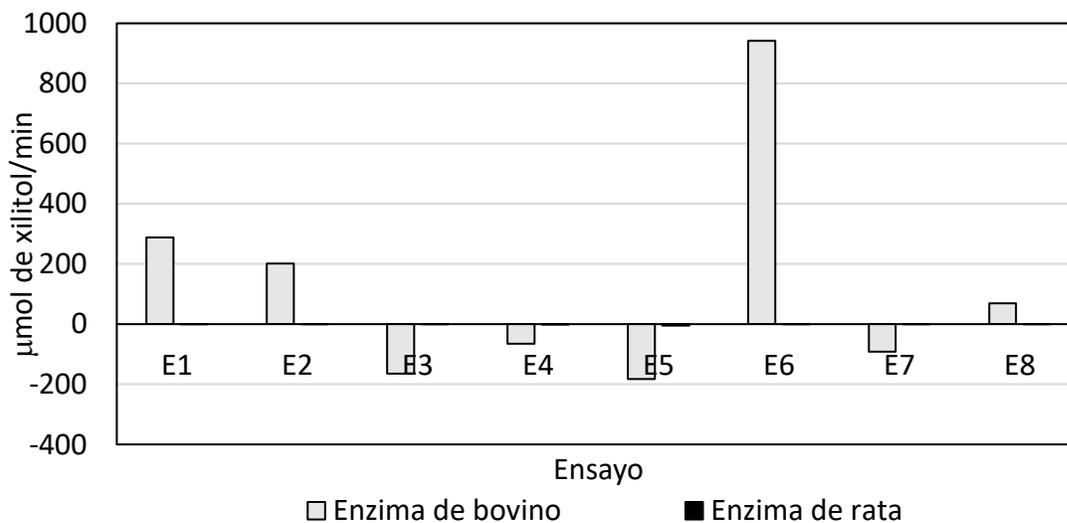


Figura 4.10 Producción de xilitol en $\mu\text{mol}/\text{min}$ con enzima de rata y bovino para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

El contenido de xilosa al final de la experimentación nos permitió sospechar la cantidad de xilitol producido, entre mayor contenido de xilosa se tiene menor será la producción de xilitol. Estos resultados se pueden representar gráficamente como se muestra en la figura 4.11 donde se observa que la concentración final de xilosa es primordialmente mayor cuando se utiliza enzima de rata, siendo congruente con los resultados de actividad enzimática donde se observó una menor actividad enzimática.

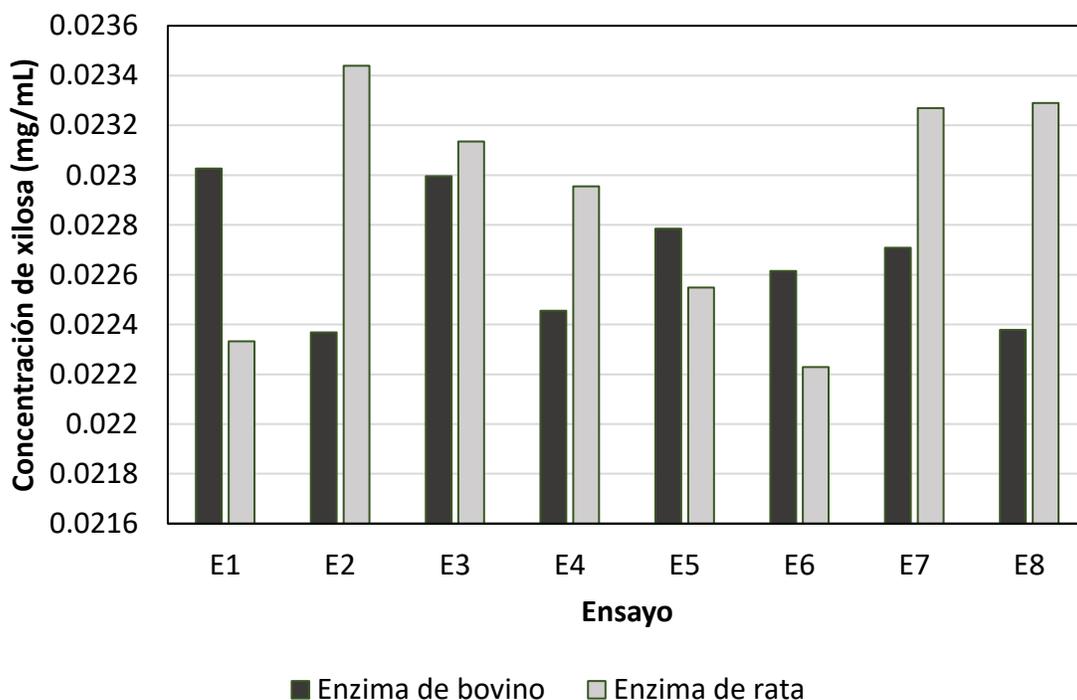


Figura 4.11 Contenido final de xilosa con enzima de bovino y rata para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

Los valores anteriores se utilizaron para realizar el análisis estadístico mediante el software Minitab 17. Como se muestra en la figura 4.12 correspondiente a el diagrama de pareto para los efectos de las tres variables independientes sobre la temperatura y el pH utilizando la enzima de bovino, los tres factores empleados presentan influencia sobre la producción de xilitol, siendo la temperatura y el pH los de mayor influencia numérica, sin embargo en la concentración final de xilosa, es posible apreciar que tanto la temperatura como el pH tienen una mayor influencia sobre esta variable de respuesta a pesar de que ésta no parece ser significativa estadísticamente.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es U, $\alpha = 0.05$)

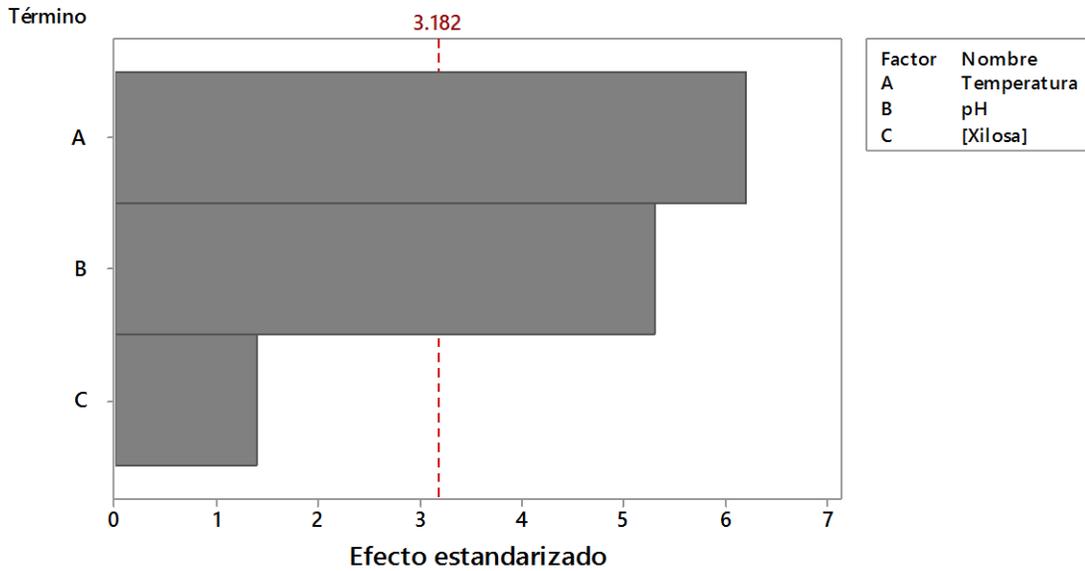


Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es Xilosa, $\alpha = 0.05$)

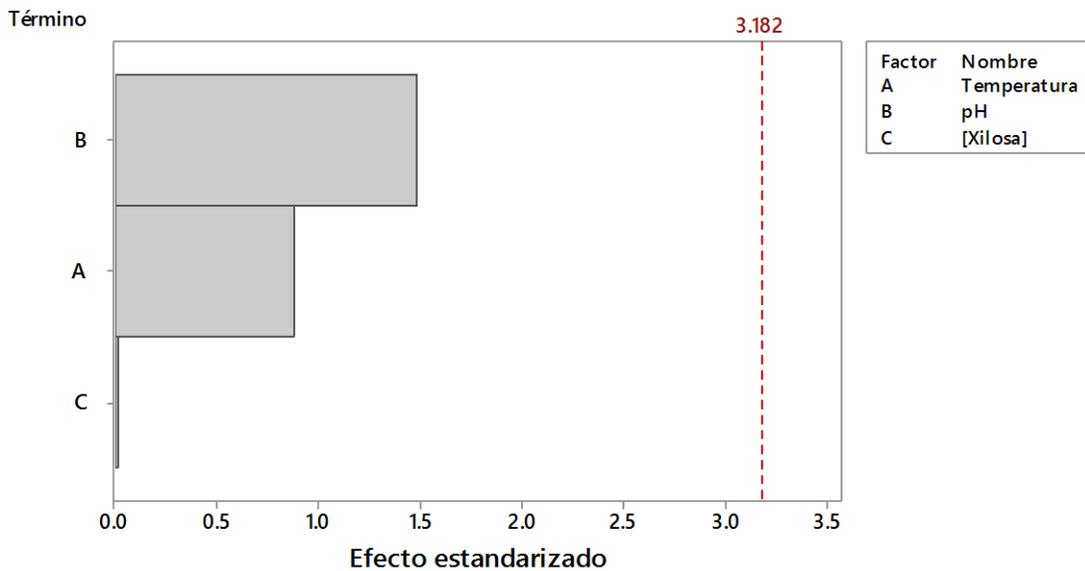


Figura 4.12 Diagrama de Pareto de efectos de la temperatura, pH y concentración inicial de xilosa en la producción de xilitol (a) y en la concentración final de xilosa (b) con enzima de bovino

En el análisis de los resultados para la enzima de cristalino de rata (figura 4.13) encontramos que al igual que en la enzima de bovino la actividad enzimática se influencia por los tres factores modificados con mayor significancia por la temperatura y pH, la concentración final de xilosa posee un comportamiento similar.

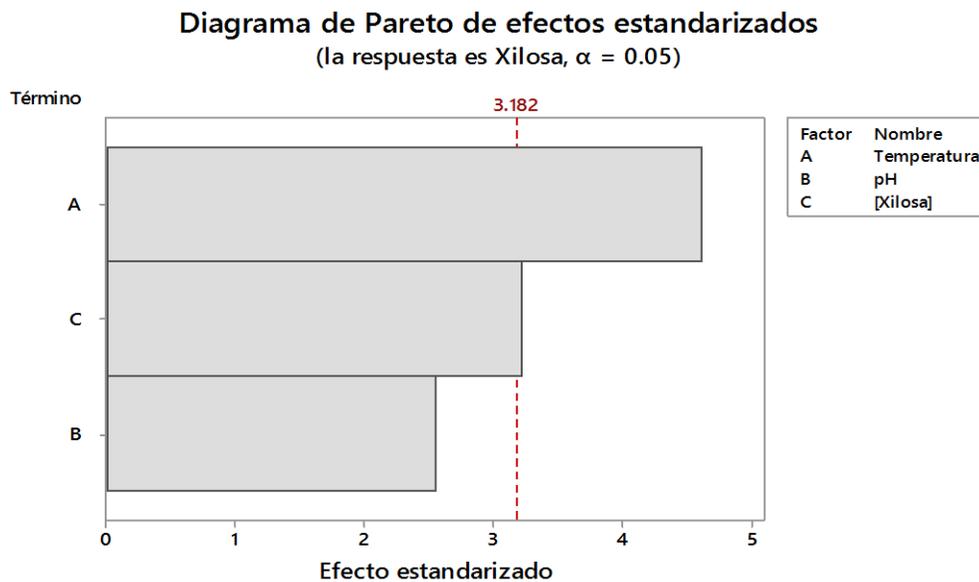
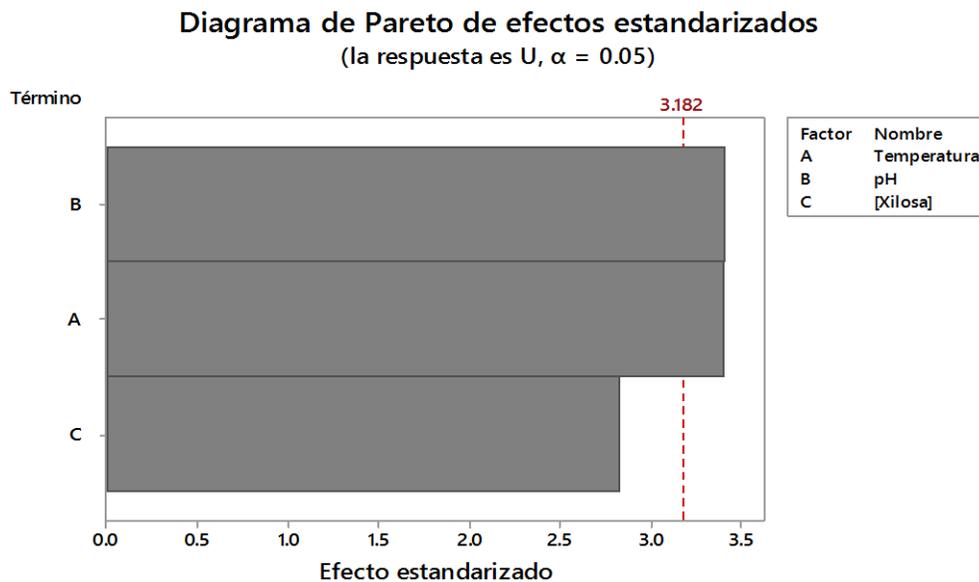


Figura 4.13 Diagrama de pareto de efectos de la temperatura, pH y concentración inicial de xilosa en la producción de xilitol (a) y en la concentración final de xilosa (b) con enzima de rata

Se debe destacar que en la variable de respuesta de concentración final de xilosa se tienen dos comportamientos diferentes dependiendo del origen de enzima, con la enzima de bovino ninguno de los factores parece tener significancia mientras que en la de rata la temperatura y la concentración inicial de sustrato tienen significancia sobre la concentración final, esto se le atribuye principalmente a que la concentración de proteína en la mezcla de reacción es diferente en cada caso, la enzima de bovino empleada tiene un contenido de proteína de 17.77 mg/mL y la de rata solo tiene 7.67 mg/mL, da la apreciación de que el contenido de sustrato inicial presente se consume de manera distinta en cada caso.

4.5.2.DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO

Los resultados de actividad enzimática de la matriz experimental del diseño experimental compuesto para ver el efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática se reportan a continuación.

La figura 4.14 muestra de manera gráfica los resultados obtenidos en la medición de la actividad enzimática de la enzima de bovino a diferentes condiciones de pH y temperatura de acuerdo al diseño experimental compuesto propuesto, estos resultados indican que la enzima posee una excelente actividad que aumenta o disminuye conforme se modifiquen las condiciones antes mencionadas, se utilizó como control a la enzima a condiciones de mayor estabilidad que son 4 °C y un pH de 6.8, aquí la enzima tiene 65 U/mg sin embargo con el ensayo 9 la actividad aumenta considerablemente, lo mismo se observa con el ensayo 11. La actividad con el inhibidor disminuyó, indicativo de que se trata de la enzima de interés para el proyecto. Las actividades menores se encuentran en los tratamientos 4, 8 y 10 intuyéndose una dependencia fuerte con el pH de la muestra. James *et al.* (1986) demostró que la coenzima se degenera rápidamente a pH ácidos y temperaturas altas (el tiempo de vida media del NADPH a 41 °C y pH 6 es de 55 min, este valor disminuye al disminuir el pH y aumentar la temperatura).

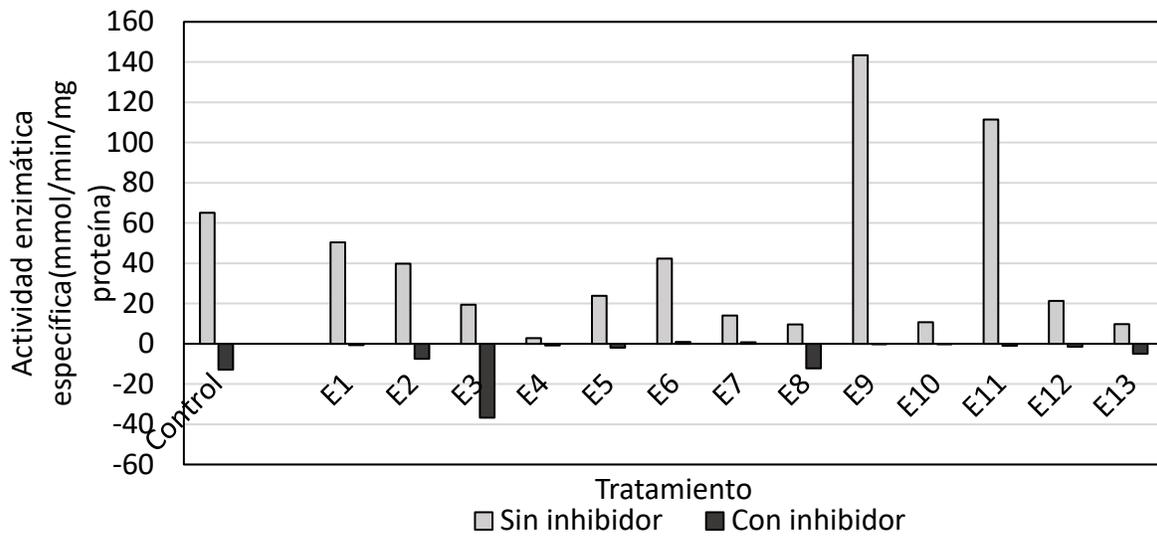


Figura 4.14 Actividad enzimática de la enzima de bovino para los diferentes tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones

La figura que representa la producción de xilitol de manera gráfica se encuentra expresada en la figura 4.15 en la que se muestran los valores de xilitol que se produjeron a las diferentes condiciones empleadas durante la experimentación.

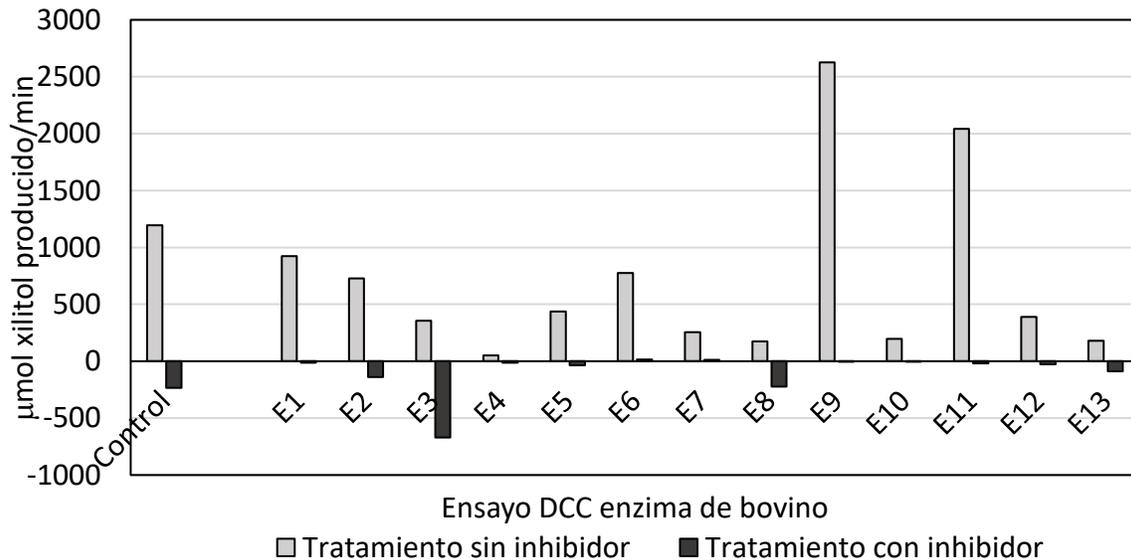


Figura 4.15 Xilitol producido en $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el diseño central compuesto para los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de dos mediciones

La cantidad de xilitol que se produjo por minuto durante los ensayos es relevante y superior a la que se obtuvo en el anterior diseño experimental, casi tres veces mayor, indica que es posible acercarse a determinar las condiciones óptimas de trabajo de la enzima, también se observa la inhibición de la enzima demostrando que se trata de la enzima de interés. Los resultados que indican indirectamente actividad de la enzima y su producción de xilitol están en función a la xilosa consumida, los resultados de los diferentes ensayos del diseño experimental compuesto a pesar de ser similares demuestran que la enzima trabaja con este sustrato, el contenido final de xilosa es diferente para todos los casos presentando un mayor consumo en los ensayos 6, 9, 11, 12 y 13.

Los resultados de concentración final de xilosa después de la reacción enzimática con inhibidor y sin inhibidor muestran que existe consumo de xilosa, importante para nuestro proyecto pues significa que la xilosa se consume por la enzima dando la pauta a que se genere el xilitol deseado, el control con inhibidor indica que se trata de la enzima de interés al haber menos consumo con éste para la mayoría de los casos, el comparativo de estos resultados se representan en un gráfico de barras como sigue:

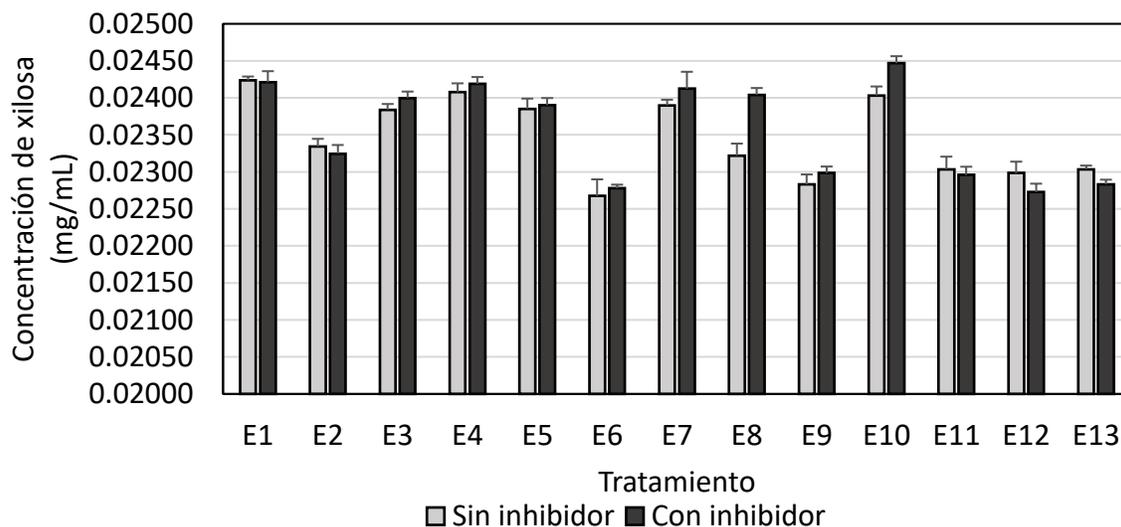


Figura 4.16 Contenido final de xilosa con enzima de bovino para los diferentes tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de cuatro mediciones

Para el análisis del Diseño Central Compuesto se utilizó el programa Minitab 17, con la variable de respuesta de Actividad Enzimática los resultados se quedan inconclusos, como se observa en el gráfico 4.17.

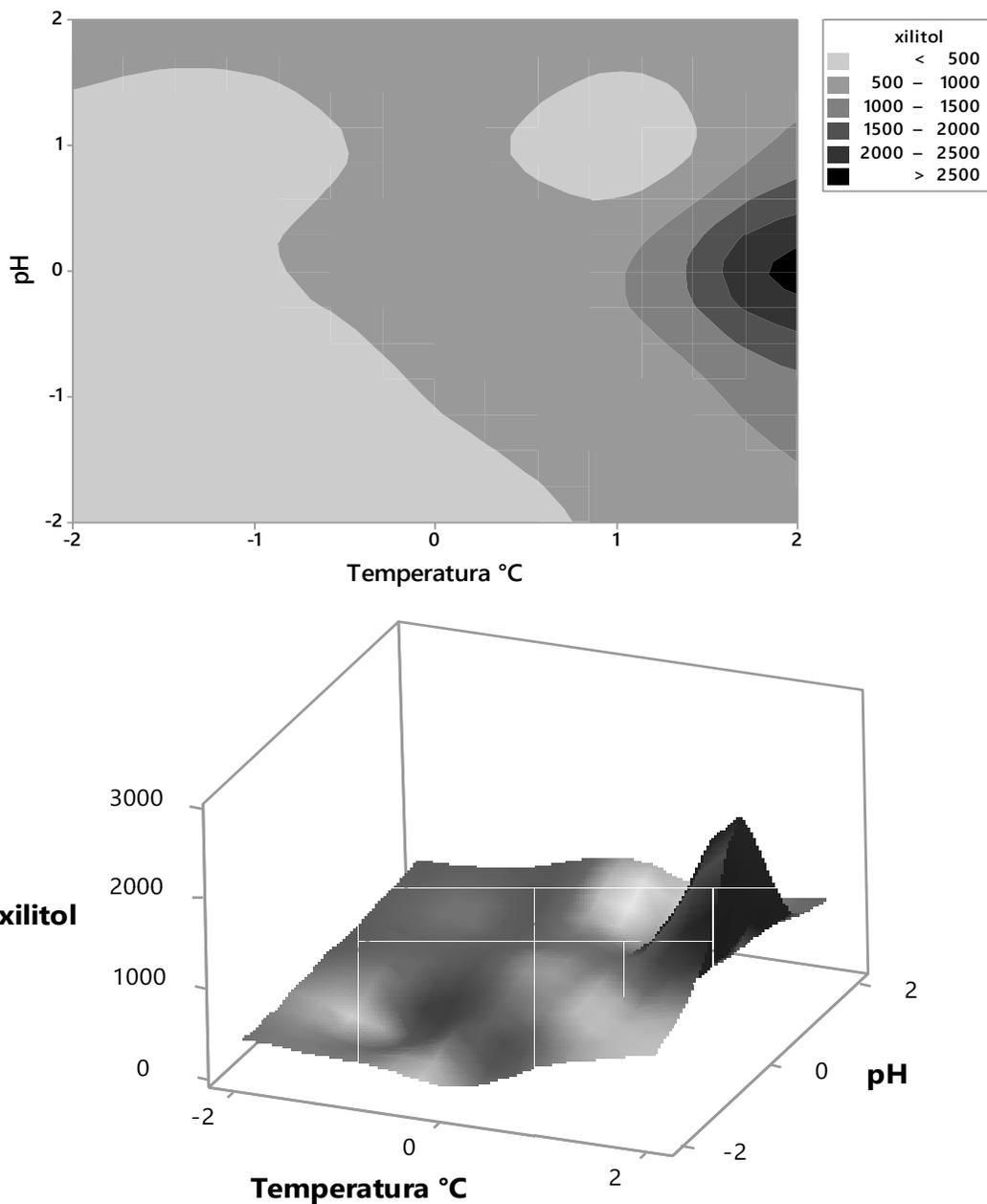


Figura 4.17 Gráfico de contorno (a) y gráfico de superficie (b) de la producción de xilitol vs el pH y la temperatura para los tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones

El análisis de superficie de respuesta para la concentración final de xilosa se muestra en los siguientes gráficos donde se observa una región mínima para esta variable, indica que al haber menor concentración de azúcar inicial se supone una mayor cantidad de xilitol que se produjo durante la reacción.

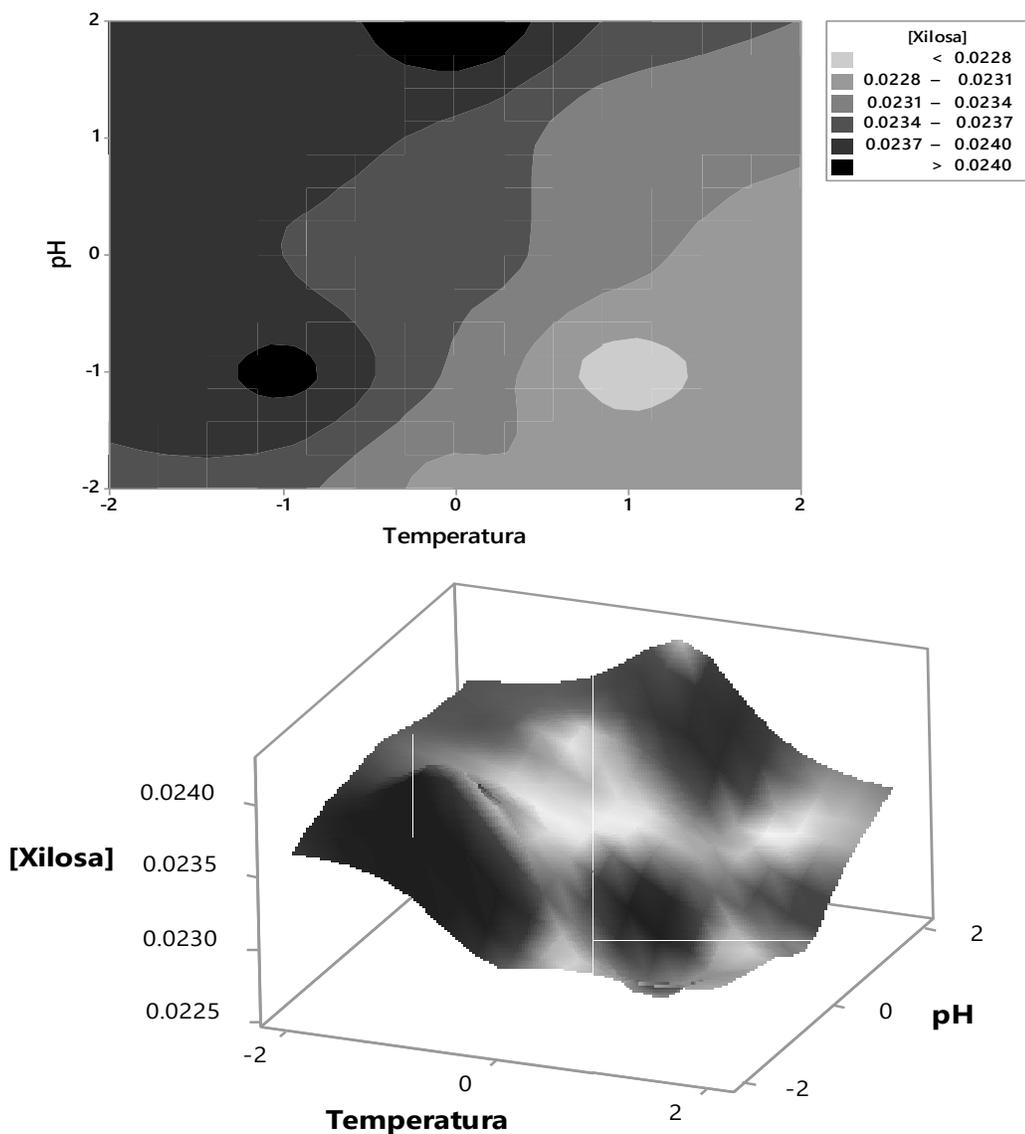


Figura 4.18 Gráfico de contorno (a) y gráfico de superficie (b) de la concentración final de xilosa vs el pH y la temperatura para los tratamientos del diseño central compuesto. Los valores son el promedio de dos mediciones

CONCLUSIONES

Las enzimas extraídas de cristalino de rata y de bovino son capaces de producir xilitol. La segunda tiene una mayor producción que se refleja en su mayor actividad enzimática y de consumo de sustrato.

La cantidad de xilitol que se produjo en los diferentes ensayos enzimáticos no se midió porque la concentración inicial de xilosa es demasiado pequeña y la sensibilidad del instrumento de medición (HPLC) no la alcanza a cuantificar.

Los resultados obtenidos al momento son valiosos a pesar de no contar con una cuantificación de xilitol por métodos instrumentales directos, desafortunadamente son necesarios para determinar la eficiencia de producción de xilitol que otros autores reportan y poder hacer un comparativo de los procesos, la eficiencia para proceso químico se encuentra en un 50-60% (Nidetzky *et al.*, 1996) mientras que la eficiencia para proceso microbiológico está en el 70-90% (De Freitas *et al.*, 2009), la mezcla de reacción utilizada en los ensayos de este proyecto no contiene elementos que pudieran desviar la reacción a otros productos así que se supone una eficiencia superior a la obtenida en el microbiológico donde toda la xilosa se transforme a xilitol.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann MR, Gallup JM, Zabner J, Evans RB, Brockus CW, Meyerholz DK, Grubor B, Brodgen KA (2004) **Differential expression of sheep beta-defensin-1 and -2 and interleukin 8 during acute Mannheimia haemolytica pneumonia.** Microb Pathog 37:21–27
- Alriksson B, Cavka A, Johnson LJ (2011) **Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in situ detoxification with reducing agents.** Bioresour Technol 102:1254–1263
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM (1998) **The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro.** Arch Oral Biol 43:157–161
- Ammons MC, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA (2009) **In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of Pseudomonas aeruginosa treated with lactoferrin and xylitol.** Int J Antimicrob Agents 33:230–236
- Ammons MC, Ward LS, James GA (2011) **Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings.** Int Wound J 8:268–273
- Amo K, Arai H, Uebanso T, Fukaya M, Koganei M, Sasaki H, Yamamoto H, Taketani Y, Takeda E (2011) **Effects of xylitol on metabolic parameters and visceral fat accumulation.** J Clin Biochem Nutr 49:1–7
- Baek S-C, Kwon Y-J (2007) **Optimization of the pretreatment of rice straw hemicellulosic hydrolyzates for microbial production of xylitol.** Biotechnol Bioprocess Eng 12:404–409
- Balan V, Sousa LC, Chundawat SPS, Mashall D (2009) **Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods.** Biotechnol Prog 12:404–409
- Balanza Comercial para Importaciones y exportaciones de México. INEGI (2014) Información obtenida del portal del INEGI en octubre del 2014, <http://www.inegi.org.mx/lib/buscador/bibliotecas/busqueda.aspx?textoBus=anuario%20estadistico%20del%20comercio%20exterior&busxCampo=Titulo&busxMetodo=1&CveBiblioteca=KCBIB&totDes=1&tipoRedIntExt=1&av=1>

- Bar A (1991) Xylitol. In: O'Brien Nabors L, Gelardi RC (ed) **Alternative sweeteners**, 2nd edn. Marcel Dekker Inc., New York
- Beltrán Sánchez R (2014) **Exploración de metabolitos secundarios de extractos de plantas nativas de Michoacán como inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán México
- Bruggeman JP, Bettinger CJ, Langer R (2010) **Biodegradable xylitol based elastomers: in vivo behavior and biocompatibility**. J Biomed Mater Res A 95:92–104
- Cao G, Ren N, Wang A, Lee DJ, Guo W, Liu B, Feng Y, Zhao Q (2009) **Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16**. Int J Hyd Ener 34:7182–7188
- Chandel AK, Singh OV, Narasu ML, Rao LV (2011b) **Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3**. New Biotechnol 28:593–599
- Chen X, Jiang Z-H, Chen S, Qin W. (2010) **Microbial and bioconversion production of xylitol and its detection and application**. Int J Biol Sci 6:834–44.
- Cirino PC, Chin JW, Ingram LO (2006) **Engineering *Escherichia coli* for xylitol production from glucose–xylose mixtures**. Biotechnol Bioeng 95:1167–76.
- Danhauer JL, Johnson CE, Corbin NE, Broccheri KG (2010) **Xylitol as a prophylaxis for acute otitis media: systematic review**. Int J Audiol 49:754–761
- De Freitas, Santos JC, Sarrouh BF, Rivaldi JD, Pessoa Jr A, Silva SS.(2009) **Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values**. J Chem Technol Biotechnol, 84:326e30
- De Freitas Branco, Ricardo, Dos Santos, Julio, Silva, Silvio S (2011) **A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production, Biomass and Bioenergy**, 35, pp, 3241-3246

- De Freitas, Branco, Ricardo, Chandel, K., Anuj y Silva, Silvio S (2012) **Chapter 8 Enzymatic Production of Xylitol: Current Status and Future Perspectives**. En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p.p.193-202). Londres:Springer.
- Del Corso A, Barsachi D, Gianessi M, Tozzi MG, Camici M, Hauben JL, Zandomenghi M, Mura U, (1990), **Bovine lens aldose reductase: tight binding of the pyridine coenzyme**. Arch Biochem, Biophys, 283, pp 512-518
- Doran, P. (1998). **Principios de Ingeniería de los bioprocesos**, Editorial acribia SA. Zaragoza (España).
- Durairaj L, Launspach J, Watt JL, Mohamad Z, Kline J, Zabner J (2007) **Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis**. J Cyst Fibros 6:31–34
- Ferreira AS, de Souza M, Barbosa NR, da Silva SS (2008) **Leishmania amazonensis: xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of macrophage nitric oxide production**. Exp Parasitol 119:74–79
- Ferreira AS, Souza MA, Raposo NRB, Ferreira AP, Silva SS (2011) **Xylitol inhibits J774A.1 macrophage adhesion in vitro**. Braz Arch Biol Technol 54:1211–1216
- Ferro, Esteban y Degen, Rosa, (2011), **Actividad inhibitoria de extractos de plantas medicinales de Paraguay sobre aldosa reductasa de cristalino de rata**, ROJASIANA Vol. 10 (2) 2011:31-42
- Franz H, Kompa E, Rozman T (1996) **Pharmaceutical composition for topical application to the eye for treating increased intraocular pressure**. USP 5.527.831, 18 June 1996
- Georgieff M, Oehmke M (1990) **Hypocaloric low osmotic aqueous preparation for infusion**. EP 0150053B1, 13 June 1990
- Georgieff M, Pscheidl E, Moldawer LL, Bistran BR, Blackburn GL (1991) **Mechanisms of protein conservation during xylitol infusion after burn injury in rats: isotope kinetics and indirect calorimetry**. Eur J Clin Invest 21:249–258
- Ghindea R, Csutak O, Stoica I, Tanase I, Tassu V (2010) **Production of xylitol by yeasts**. Romanian Biotechnol Lett 15(3):5217–5222

- Gírio, Francisco M, Carvalheiro, Florbela, Duarte, Luís C y Bogel-Lukasik, Rafał, (2012) **Chapter 1 Deconstruction of the Hemicellulose Fraction from Lignocellulosic Materials into Simple Sugars**. En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p. p. 3-28).Londres:Springer.
- Goli J. K., Jyosthna, Panda S. H. y Linga V. R. (2012) **Chapter 4 Molecular Mechanism of D-Xylitol Production in Yeasts: Focus on Molecular Transportation, Catabolic Sensing and Stress Response**, En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p.p.85-101). Londres:Springer
- Gutiérrez, Humberto y De la Vara Román, (2008), **Análisis y diseño de experimentos**, 2ª edición, McGraw-Hill.
- Han SJ, Jeong SY, Nam YJ, Yang KH, Lim HS, Chung J (2005) **Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis**. Clin Diagn Lab Immunol 12:1285–1291
- Haraguchi H, Ohmi I, Sakai S, Fukuda A, Toihara Y, Fujimoto T, *et al.* (1996), **Effect of Polygonum hydropiper sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes**. J. Nat Prod., 59(4);443-5
- Hayman, Selma y Kinoshita, Jin H (1964) **Isolation and Properties of lens aldose Reductase, The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 240, No. 2, p.p. 877-882
- Hildebrandt G, Lee I, Hodges J (2010) **Oral mutans streptococci levels following use of a xilitol mouth rinse: a double-blind, randomized, controlled clinical trial**. Spec Care Dentist 30:53–58
- Islam MS (2011) **Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats**. J Med Food 14:505–511
- Iverson A, Garza E, Zhao J, Wang Y, Zhao X, Wang J, Manow R, Zhou S (2013) **Increasingreducing power output (NADH) of glucose catabolism for reduction of xyloseto xylitol by genetically engineered Escherichia coli AI05**. World J MicrobiolBiotechnol 29:1225–32.
- Iwata C, Nakagaki H, Morita I, Sekiya T, Goshima M, Abe T, Isogai A, Hanali M, Kuwahara M, Tatematsu M, Robinsin C (2003) **Daily use of dentifrice with and**

- without xylitol and fluoride: effect of glucose retention in humans in vivo.** Arch Oral Biol 48:389–395
- James T Wu, Lily H. Wu y Joseph A. Knight (1986) **Stability of NADPH: Effect of Various Factorson the Kinetics of Degradation**, Clin, Chem 32/2, 314-319
 - Jerry JB, Alonzo HJ (2005) **Nasal administration of xylitol to a non-human mammal.** Patent, NZ532885, 29 September
 - Jiang, Zhongqi, Amartey, Samuel, Jiang, Zi-Hua y Qin, Wensheng, (2012) **Chapter 11 Current Analytical Methods for Qualitative and Quantitative Measurement of D-Xylitol.** En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p. p. 3-28).Londres:Springer
 - Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S, Ikezawa Z (2005a) **A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of Staphylococcus aureus without antibiotics.** J Dermatol Sci 38:197–205
 - Katsuyama M, Kobayashi Y, Ichikawa H, Mizuno A, Miyachi Y, Matsunaga K, Kawashima M (2005b) **A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin.** J Dermatol Sci 38:207–213
 - King NA, Craig SA, Pepper T, Blundell JE (2005) **Evaluation of the independent and combined effects of xylitol and polydextrose consumed as a snack on hunger and energy intake over 10 d.** Br J Nutr 93:911–915
 - Kontiokari T, Uhari M, Koskela M (1995) **Effects of xylitol of nasopharyngeal bacteria in vitro.** Antimicrob Agents Chemother 39:1820–1823
 - Kontiokari T, Uhari M, Koskela M (1998) **Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria.** J Antimicrob Chemother 41:563–565
 - Lehninger, AL (2005), Principios de Bioquímica, 4a edición
 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent**, The Journal of Biological Chemistry. Nov;193(1):265-75
 - Martínez, E.A., Villarreal, M.L.M., Almeida e Silva, J.B., Solenzal, A.I.N., Canilha, L., Mussatto, SI (2002) **Uso de diferentes materias primas para la producción**

- biotecnológica de xilitol** Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 3, núm. 5, diciembre, pp. 295-301,
- Mattila P, Knuutila M, Koyanen V, Svanberg M (1999) **Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration.** Calcif Tissue Int 64:340–344
 - Mattila PT, Pelkonen P, Knuutila ML (2005) **Effects of a long-term dietary xylitol supplementation on collagen content and fluorescence of the skin in aged rats.** Gerontology 51:166–169
 - Mattila PT, Svanberg MJ, Pökkä P, Knuutila ML (1998) **Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats.** J Nutr 128:1811–1814
 - MECAS (2012) **Edulcorantes alternativos en un contexto de altos precios del azúcar,** Organización Internacional del Azúcar <http://www.isosugar.org/>
 - Miller, Gail, (1959), **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry,** Vol. 31, No. 3, March
 - Montgomery, Douglas, 2004, **Diseño y análisis de experimentos,** Limusa Wiley, 2ª edición, México.
 - Mpabanga, P. Tandiwe, Chandel, K Anuj, Silva, SS y Singh, V Om (2012) **Chapter 3 Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Xylitol Production** En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p.p 63-78). Londres:Springer.
 - Murray, Robert K, Bender, David A, Botham Kathleen M, Kenelly, Peter J, Rodwell, Victor W, Weil, PAnthony (Editores), (2010), **Harper Bioquímica,** McGraw-Hill
 - Mussatto, Solange Inês, **Chapter 14 Application of Xylitol in Food Formulations and Benefits for Health** (2012) En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. (p.p.309-322). Londres:Springer
 - Naaber P, Lehto E, Salminen S, Mikelsaar M (1996) **Inhibition of adhesion of Clostridium difficile to Caco-2 cells.** FEMS Immunol Med Microbiol 14:205–209

- Nelson, David L, Cox, Michael M, (2005), **Leghninger. Principios de Bioquímica**, 4ª edición
- Nidetzky B, Neuhauser W, Haltrich D, Kulbe KD.(1996) **Continuous enzymatic synthesis of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor**. *Biotechnol Bioeng*; 52:387e96.
- Qian M, Tian S, Li X, Zhang J, Pan Y, Yang X (2006) **Ethanol production from dilute acid softwood hydrolysate by co-culture**. *Appl Biochem Biotechnol* 134:273–283
- Sampaio FC, da Silveira WB, Chaves-Alves VM, Passos FML, Coelho JLC (2003) **Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose**. *Braz J Microbiol* 34:325–328.
- Sano H, Nakashima S, Songpaisan Y, Phantumvanit P (2007) **Effect of xylitol and fluoride containing toothpaste on the remineralization of human enamel in vitro**. *J Oral Sci* 49:67–73
- Sanróman MA, Domínguez H, Núñez M, Lema JM (1991) **Xylitol: un alcohol com futuro**. *Afinidad* 48:215–222
- Sasaki, Miho; Inui, Masayuki y Yukawa, Hideaki (2012) **Chapter 5 Microorganisms for Xylitol Production: Focus on Strain Improvement**. En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) *D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization*. (p.p.109-128). Londres:Springer.
- Secuencias e información de las enzimas AKR's. **The National Center for Biotechnology**. Información obtenida el 4 de diciembre del 2014 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Shafer RB, Levine AS, Marlette JM, Morley JE (1987) **Effects of xylitol on gastric emptying and food intake**. *Am J Clin Nutr* 45:744–747
- Silva AF, Devito KL, Silva SS, Raposo NRB (2010b) **Effects of xylitol on enamel erosion control**. *Arq Bras Odontol* 6:3–9
- Silva AF, Silva SS, Oliveira MG, Raposo NRB (2010a) **Inibição in vitro da aderência de enteropatógenos pelo xilitol**. *Rev Ciênc Médicas e Biológicas* 9:42–49

- Silva AF, Suzuki EY, Ferreira AS, Oliveira MG, Silva SS, Raposo NRB (2011) **In vitro inhibition of adhesion of Escherichia coli strains by xylitol**. Braz Arch Biol Technol 54:235–241
- Silva, Silvério da, Silvio y Kumar Chandel, Anuj. (Editores) (2012) **D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization** Londres:Springer.
- Superfamilia de AldoKetoReductasas, **Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania**. Información obtenida el 4 de diciembre del 2014 de <http://www.med.upenn.edu/akr>
- Sreenath K, Venkatesh YP, (2010) **Quantification of xylitol in foods by an indirect competitive immunoassay**. J Agr Food Chem 58(2):1240–1246
- Takahashi K, Mashiko T, Akiba Y (2000) **Effect of dietary concentration of xylitol on growth in male broiler chicks during immunological stress**. Poult Sci 79:743–747
- Takahashi K, Onodera K, Akiba Y (1999) **Effect of dietary xylitol on growth and inflammatory responses in immune stimulated chickens**. Br Poult Sci 40:552–554
- Tiago, Lima de Albuquerque, Ivanildo José da Silva Jr., Gorete Ribeiro de Macedob, Maria Valderez Ponte Rochaa (2014) **Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review**, Process Biochemistry 49, Brasil, p 1779–1789
- Uhari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemelä M (1996) **Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial**. Brit Med J 313:1180–1184
- Ukab WA, Sato J, Wang YM, Van Eys J (1981) **Xylitol mediated amelioration of acetylphenyl hydrazine-induced hemolysis in rabbits**. Metabolism 30:1053–1059
- Valero MA, León-Sanz M, Escobar I, Gomis P, de la Cámara A, Moreno JM (2011) **Evaluation of nonglucose carbohydrates in parenteral nutrition for diabetic patients**. Eur J Clin Nutr 55:1111–1116
- Vanegas Córdoba, Isleny Andrea, Yepes Pérez, María del Socorro, Ruiz Villadiego, Orlando Simón (2004) **Producción de xilitol a partir de levaduras nativas**

colombianas, REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA VOL. VI No. 2
Diciembre 2004, Colombia, p 31-36

- Villarreal MLM, Prata AMR, Felipe MGA, Silva JBA (2006) **Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii***. Enzyme Microb Technol 40:17–24
- Wang YM, Patterson JH, van Eys J (1971) **The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia**. J Clin Invest 50:1421–1428
- Welsh MJ, Zabner J (2004) **Use of xylitol to reduce ionic strength and activate endogenous antimicrobials for prevention and treatment of infections**. US Patent 6.716.819 B2, 06 April 2004 (University of Iowa Research Foundation)
- Ylikahri R (1979) **Metabolic and nutritional aspects of xylitol**. Adv Food Res 25:159–180