



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTO DEL JUGO DE GIRASOL (*Helianthus annuus*), SOBRE LA
ACTIVIDAD DE INULINASA DE *Kluyveromyces fragilis*

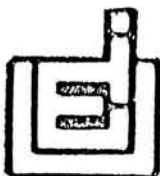
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ARODI BERNAL MARTINEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE
LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - XOCHIMILCO.
BAJO LA DIRECCION DEL M. en C. ALEJANDRO AZAOLA ESPINOSA.**

CON ESPECIAL

AGRADECIMIENTO

Cariño y respeto al M. en C. Alejandro Azaola quién por su atinada dirección y ayuda en este trabajo, fue posible su elaboración.

A usted maestro por su gran sabiduría, entrega y amistad Mil Gracias.

A los maestros Teresita Sainz, Rina González, Guadalupe Vázquez y Lino Mayorga. Gracias.

Al Ing. Agrónomo Daniel Ochoa, por su gran cooperación.

Deseo agradecer a todos los que de alguna forma contribuyeron a la realización del presente estudio.

Dedico este trabajo con Amor

A mis Padres:

Porque significan lo más valioso y presiado que haya sobre esta tierra. Gracias a sus experiencias han sido claro ejemplo de la forma honrada y limpia en que se llega a ser alguien y la manera honesta con la que se puede servir a los demás.

A mi Familia:

Alex, Dago, Sara, Junior, por compartir conmigo el amor de mis padres, aventuras, sueños, dicha, tropiezos y sobre todo los momentos importantes.

Con un cariño especial para mi cuñada Adriana y mi sobrina Celeste.

A Miguel Angel, por apoyarme y por hacerme ver mis errores, sé que cuento contigo.

A Mamá Agustina (†) y mi tío Carlos (†). A quienes recuerdo con cariño y que por azares del destino no pudieron ver culminados mis estudios.

A mis Amigos:

Estela, con quien he encontrado el valor de la amistad, MIL GRACIAS.

Oscar, por brindarme amistad, ayuda y cariño. Gracias por haberme entregado una pequeña parte de tu vida.

Agueda, Rosario, Ivonne, Manuel Sánchez, Juan Antonio (Toño), Araceli, Blanca Estela, Reynaldo, Fernando, León, Irma A., José y Paco. Por aquellos momentos y experiencias inolvidables, los cuales fueron fortaleciendo nuestra persona. GRACIAS.

A mis Compañeros y Amigos de Laboratorio:

Leticia, Margarita, Alma y Catalino, Ana Laura, Alberto, Héctor S., Amado, Héctor D., Rogelio, Ma.de Jesús, Claudia.

Con gran cariño y aprecio, a Agustín, Víctor, Pepe, Doña Rosita y Don Francisco. GRACIAS.

INDICE

	PAGINA
1.0 INTRODUCCION	1
2.0 ANTECEDENTES	4
INULINA	4
Metabolismo de polifruetosanos en Plantas	6
Cambios en Carbohidratos durante el almacenamiento de Raíces	7
GIRASOL	7
ENZIMAS	8
Clasificación	9
Inulinasas	9
Fuentes de Obtención	10
PRODUCCION MICROBIANA DE INULINASAS	11
Medio de Fermentación	11
Influencia de la Fuente de Carbono	11
Fuente de Nitrógeno	11
Influencia de metales y elementos traza	11
Efecto del pH sobre la producción de Inulinasa	12
Influencia de la temperatura	12
Acción de las Enzimas Fructan-hidrolasas	12
Localización de la enzima	13
APLICACIONES DE LAS INULINASAS	13
Producción de Jarabes Fructosados	13
Producción de Etanol	14
3.0 OBJETIVOS	15
4.0 MATERIALES Y METODOS	16
EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS	16
Identificación de azúcares en el Jugo de Girasol	16
PRODUCCION DE LA ENZIMA	18
Medios de cultivo	18
Experimental	18
Control	18

PROCESO DE FERMENTACION	19
Microorganismo	19
Condiciones de Fermentación	19
Adaptación	20
Inóculo	20
Fermentación	20
Controles durante la Fermentación	21
Crecimiento celular	21
Determinación de Azúcares Reductores	21
Determinación de Azúcares Totales	22
Determinación de Proteína	22
Determinación de Actividad Enzimática en Células	22
Determinación de Actividad Enzimática en Enzima	22
Definición de Unidad Enzimática	23
ANALISIS ESTADISTICO	23
5.0 ANALISIS DE RESULTADOS	24
Extracción de Carbohidratos	24
Producción y Caracterización de la Actividad Enzimática	25
Efecto del medio de cultivo en la cinética de crecimiento de <i>K. fragilis</i>	36
Consumo de Azúcares durante la Fermentación	37
Caracterización de la producción de la Actividad Enzimática	38
Efecto de la fuente de carbono en la producción de la enzima	38
Efecto del pH en la Actividad Enzimática	38
Concentración de Proteína durante la Fermentación	43
Efecto de la enzima en la Actividad Enzimática	43
Comparación de la Actividad de Inulinasa en Células y Enzima libre	44
6.0 DISCUSION	46
7.0 CONCLUSIONES	51
8.0 BIBLIOGRAFIA	52
9.0 ANEXO	
PRIMER EXPERIMENTO	
Tabla II.Crecimiento celular de <i>K. fragilis</i>, en dos medios.	56

Tabla IIa. Actividad Enzimática de <i>K. fragilis</i>	56
SEGUNDO EXPERIMENTO	
Tabla III. Crecimiento celular de <i>K. fragilis</i>	57
Tabla IIIa. Actividad Enzimática, sustrato 1%	57
TERCER EXPERIMENTO	
Tabla IV. Crecimiento celular de <i>K. fragilis</i> de Jugo de Girasol	58
Tabla IVa. Concentración de Azúcares durante la fermentación	59
Tabla IVb. Actividad enzimática (U.E) de <i>K.</i> <i>fragilis</i> , durante la fermentación de J. Girasol	60
Tabla IVc. Concentración de Proteína de <i>K.</i> <i>fragilis</i>	61
Tabla IVd. Actividad Enzimática de enzima	62
CUARTO EXPERIMENTO	
Tabla V. Crecimiento celular de <i>K. fragilis</i> , en dos medios de cultivo	63
Tabla Va. Concentración de Azúcares Reductores	64
Tabla Vb. Concentración de Azúcares Totales	65
Tabla Vc. Actividad Enzimática de Células a pH 3	66
Tabla Vd. Actividad Enzimática de Células a pH 5	67
Tabla Ve. Concentración de Proteína de <i>K.</i> <i>fragilis</i> en dos medios de cultivo	68
Tabla Vf. Actividad Enzimática de Enzima de <i>K. fragilis</i>	69

En los últimos años ha habido un importante desarrollo en la industria alimentaria debido tanto al avance en el conocimiento básico relacionado con las características bioquímicas de los alimentos, así como en las técnicas relacionadas para su procesamiento, transformación y conservación. En este sentido la tecnología enzimática ha jugado un papel fundamental al contribuir en diferentes sentidos: conservación del valor alimenticio, textura, color y producción de sustancias específicas que no se pueden obtener por métodos tradicionales de química orgánica. La industria utiliza diferentes enzimas comerciales para la manufactura o procesamiento de un gran número de alimentos y la tendencia actual en la producción, tanto de alimentos como de materia prima para su elaboración, es la de emplearlas en forma continua. Las ventajas que presentan las enzimas en la industria alimentaria son variadas, destacando el que son muy específicas en su forma de acción, por lo que efectúan reacciones sin generar subproductos; funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, por lo que no se requieren condiciones drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento o del equipo; actúan a bajas concentraciones y su velocidad de reacción puede ser controlada al modificar variables físicas o químicas y son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado, las limitaciones para usarlas dependen de la enzima, su costo y su disponibilidad a nivel industrial.

El desarrollo de la microbiología ha permitido comprender mejor los sistemas para la síntesis de enzimas en los microorganismos, su producción industrial se ha orientado hacia los procesos de fermentación. En el transcurso de los últimos treinta años se han desarrollado un número importante de fermentaciones productoras de enzimas, tal como: las hidrolasas, principalmente amilasas, celulasas y entre ellas destaca las inulinasas, las cuales degradan al polímero de azúcar rompiendo los

enlaces glucosídicos (Snyder and Phaff, 1962).

La inulinasa es una enzima β -fructosidasa que actúa sobre los enlaces β -2 \rightarrow 1 de los polímeros de fructosa (Manzoni and Cavazzon 1988). Inulinasas con actividad de β -fructosidasa se han encontrado en vegetales (Vandame and Dedrycke, 1983), levaduras (Guiraud et al. 1983), hongos (Murkerjee and Sengupta, 1987) y bacterias (Allais, 1987).

La inulina es acumulada como un polímero de reserva en varias plantas como Alcachofa de Jerusalem, Chicoria, Dalia, Diente de León, y Girasol (Bacon and Edelman, 1950; Duvnjak and Koren, 1987; Guiraud et al. 1980).

No obstante que el Girasol, es la principal materia prima para la elaboración de aceite, existe en nuestro país poca información acerca de su composición (Hernández, 1978). Los carbohidratos fermentables de girasol (*Helianthus annuus*), lo constituyen en gran parte unos polisacáridos denominados Fructosanas, por estar constituidos por unidades de fructosa y en muy pequeña proporción glucosa, este polímero es utilizado para el entallecimiento del Girasol (Devlin, 1982; Gola, 1965).

La hidrólisis de la inulina libera grandes cantidades de fructosa, pero también algo de glucosa (Edelman and Bacon, 1950). Los jarabes elaborados con los productos liberados por la hidrólisis de la inulina, pueden competir con los jarabes con un alto contenido de glucosa y fructosa (HFGCS), preparados a partir de la hidrólisis enzimática del almidón (Kim and Rhee, 1989). Este último método resulta más complicado y costoso comparado con el que se propone en este trabajo.

La fructosa, es un monosacárido que posee el poder edulcorante y solubilidad más alta de todos los azúcares naturales, por lo cual su utilización es muy factible para la elaboración de jarabes fructosados (Snyder and Phaff, 1962).

Por lo anterior, una alternativa para la producción de jarabes fructosados es la degradación enzimática de inulina a unidades de fructosa por la enzima inulinasa.

Por lo que este trabajo tiene la finalidad de aportar datos sobre la actividad

inulinasa y el crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* en una fermentación sumergida, cuya fuente de carbono es el Jugo de Girasol (*Helianthus annuus*), ya que posee los nutrientes necesarios para el desarrollo de la levadura, y se presenta como un alternativa de materia prima, la cual ofrece la ventaja de reducir el costo de la producción de fructosa.

Resulta importante señalar los cambios taxonómicos que ha sufrido la levadura *Kluyveromyces fragilis*, desde que en 1909 Jorgensen la aisló por primera vez del Kefir (Phaff, 1985). Él la denominó *Saccharomyces fragilis*, y es así como aparece en el compendio taxonómico "The Yeasts a Taxonomic Study", (Van-Rij Kreger, 1984).

Los primeros autores en poner en tela de juicio esta clasificación taxonómica fueron Wickerham en 1955 y Wickerham y Burton en 1956. Ellos pusieron en claro lo heterogéneo del género *Saccharomyces* y anunciaron su intención de establecer un género por separado (a llamarse *Delkeromyces*) para incluir a *S. fragilis*, *S. marxianus*, *S. lactis* y algunas otras especies. Sin embargo, ni Wickerham ni Burton dieron una descripción formal, así que este nombre no llegó a ser válido (Phaff, 1985).

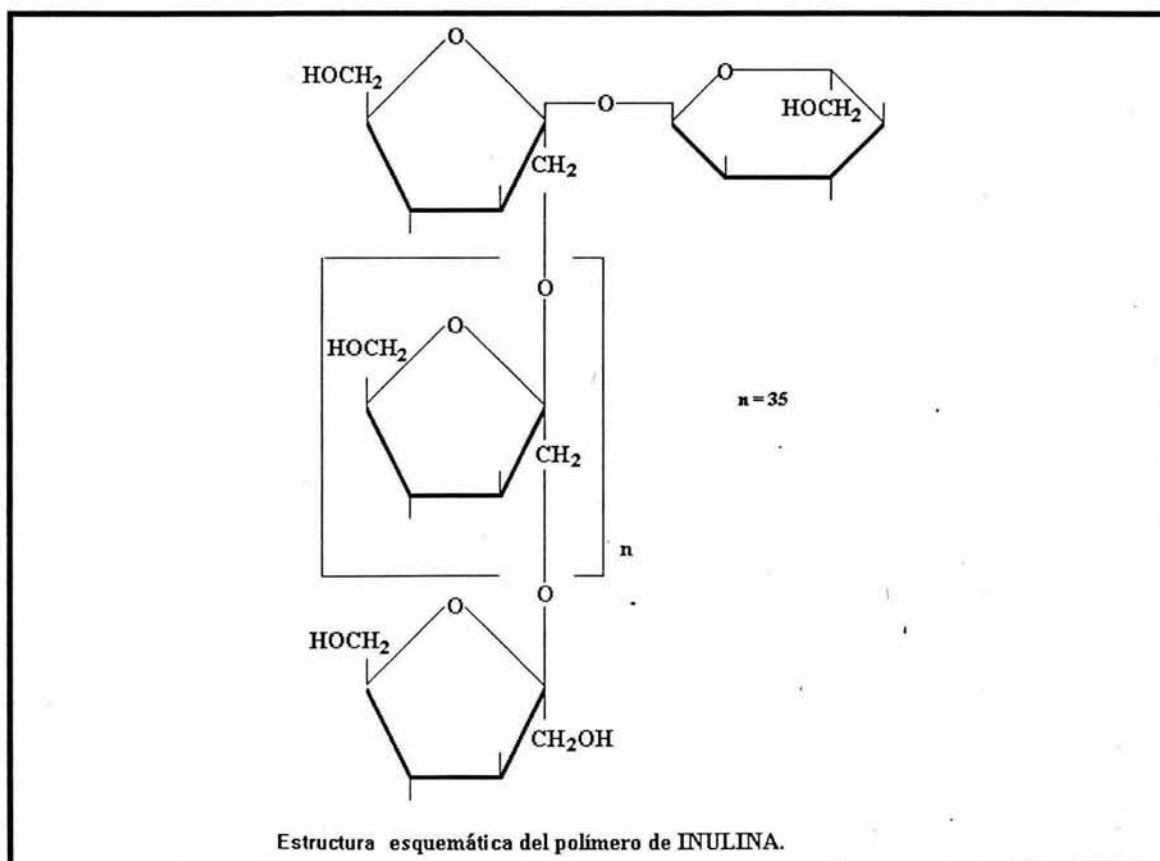
Van der Walt, 1959 estableció originalmente el género *Kluyveromyces* para una levadura llamada *Kluyveromyces polysporus*. Posteriormente en 1965, argumentó que no existía una diferencia significativa entre los géneros *Kluyveromyces*, *Fabospora* y *Zigospora* y los unió en un simple taxón. De acuerdo al Código Internacional, el nombre más viejo de *Kluyveromyces*, fue retenido. Así, el nuevo nombre *Fabospora fragilis*, se convirtió en *Kluyveromyces fragilis* (Phaff, 1985). La siguiente evolución en la nomenclatura ocurrió en 1970, como resultado de un estudio del DNA, hecho por Buknell y Douglas, en donde determinaron que *K. fragilis* y *K. marxianus* comparten el 93 % de sus secuencias del DNA y por tanto son sinónimos.

INULINA

La inulina fue descubierta por Rose quien la separó de extractos de tubérculos de Alcachofa de Jerusalem. El nombre de inulina fue primeramente usado por Thompson en 1811 y se deriva de que fue encontrada en plantas de *Inula helenium*. El polisacárido más investigado de las compositae es la inulina, la cual constituye

únicamente una pequeña fracción de un total de carbohidratos presentes en los tubérculos de alcachofa, el resto está compuesto esencialmente de unidades de fructofuranosa. Estudios realizados sobre inulina obtenida de *Dahlia tuber*, la cual fue metilada en una atmósfera de nitrógeno con hidróxido de sodio y sulfato de metilo y posteriormente hidrolizada con ácido oxálico, analizando los productos resultantes por cromatografía concluyen que la molécula de inulina está constituida por unidades de fructosa con uniones $\beta(2\rightarrow1)$ y que la cadena es terminada por una molécula de glucosa unida mediante un enlace tipo sacarosa (Hirst et al. 1950).

En estudios efectuados sobre Alcachofa de Jerusalem para observar los carbohidratos presentes en los tubérculos de ésta mediante el empleo de cromatografía en papel y polarimetría, se observó la presencia de polisacáridos de fructosa, que se caracterizan por medio de precipitación con diversos agentes como etanol, acetona e hidróxido de calcio. En base a los resultados obtenidos se plantea la siguiente estructura para la inulina (Bacon and Edelman, 1950).



Estudios estructurales sobre inulina de *Inula helenium* confirman la presencia de derivados de glucosa en los hidrolizados de inulina metilada y argumentan que ésta se encuentra en una proporción de 2.9 moles por 100 radicales de hexosa, teniendo la molécula de inulina una longitud de cadena de 35 unidades y peso molecular de 5600 (Bell and Palmer, 1952).

METABOLISMO DE LOS POLIFRUCTOSANOS EN PLANTAS

Trabajos efectuados para dilucidar la biosíntesis de fructosanas en plantas han reportado la existencia de una enzima presente en el tallo principal del Girasol (*Helianthus annuus*), capaz de construir glucofructosanas a partir de sacarosa (Edelman and Bacon, 1951).

En Alcachofa de Jerusalem se han detallado algunas características de la enzima capaz de construir fructosanas, la transfructosilasa, reportándose las siguiente actividades de ésta (Edelman and Dickerson, 1960):



Glc=glucosa Fru=fructosa

Los estudios realizados sobre la síntesis de fructosanas empleando el marcaje con isótopos radiactivos se encontró que:

- A) Una transfructosilasa fue separada de extractos de Alcachofa de Jerusalem.
- B) La enzima fue altamente específica para residuos terminales fructofuranósidos unión β (2→1).
- C) El más activo donador de fructosa fue encontrado ser 1-fructosil-sacarosa; sacarosa fue inactiva.
- D) Sacarosa y polímeros de alto grado de polimerización, mayor de 20, fueron los más eficientes aceptores de residuos fructosilados.

E) Diferentes variedades de actividad transferasa fueron catalizadas por la enzima y son las siguientes:

*** TRANSFERENCIA ASI MISMO**

Existe cuando un compuesto actúa como donador y aceptor de fructosa el más grande rango de transferencia existe con el trisacárido como sustrato (1-fructosilsacarosa).

Enzima activa con: oligosacáridos de grado de polimerización de 3 a 9 (1-fructosil)2-fructosa.

Enzima inactiva con: 1-fructosilfructosa, sacarosa, maltosa, melibiosa y rafinosa.

**** TRANSFERENCIA A POLIMEROS**

Se observó que existía preferencia para transferencia fructosa de fructosilsacarosa hacia el polímero.

CAMBIOS EN CARBOHIDRATOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRIO DE RAICES Y TUBÉRCULOS QUE CONTIENEN INULINA

Los carbohidratos almacenados en raíces y tubérculos varían durante el ciclo anual de crecimiento y el cambio se asocia con el período de dormancia, normalmente en invierno. En general los polisacáridos son convertidos a azúcares simples durante los meses fríos. El almacenamiento en frío causa rompimiento de los polisacáridos insolubles, acompañada por un correspondiente incremento de azúcares solubles durante las primeras cinco semanas de almacenamiento (Rutherford and Weston, 1968).

GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus*), es originario de la región centrooccidental de los Estados Unidos de América y de varias partes de México. Las tribus indígenas utilizaban las semillas de girasol silvestre como alimento y las flores como medicinal y

ceremonialmente. El girasol fue introducido a Europa de México, por los españoles y más tarde de Virginia, EUA y de Ontario y Quebec, Canadá, por los franceses e ingleses (Heiser, 1951; Garduño, 1973).

Como planta de ornato, el girasol se conoce desde hace siglos en varios Estados de la República Mexicana, usándose por su belleza y gran tamaño. En Estados como Puebla, Chihuahua y Zacatecas, el girasol era consumido por la población campesina por el valor nutritivo de la semilla.

Como cultivo de importancia industrial, el girasol es cultivado extensamente en varios países europeos como: URSS, Francia, Checoslovaquia, Yugoslavia, España, Hungría, Rumania, Bulgaria y Polonia. En América, se cultiva en EUA, Canadá, Argentina, México, Perú, Chile y Uruguay. Su alto valor nutritivo, especialmente su alto contenido de aceite y proteínas lo hacen ser considerado como un cultivo industrial (Fucikousky, 1976); además de que es una planta con alta tolerancia a sequías y heladas (González et al. 1971). No obstante que el Girasol, es la materia prima para la elaboración de aceite, en nuestro país existe poca información acerca de su composición (Hernández, 1978). El girasol, contiene polifruetosanos(inulina), que utiliza para el entallecimiento (Devlin, 1982; Gola et al. 1965), por lo que este polímero se encuentra en el tallo de la planta.

ENZIMAS

Los microorganismos sintetizan numerosas enzimas, las cuales tienen una función específica durante el crecimiento, metabolismo y autólisis. La mayoría de estas enzimas actúan dentro de las células, en un ambiente protegido, pero algunas de ellas se excretan(Scriban, 1985). La función de las enzimas extracelulares es hacer más accesible los nutrientes para el microorganismo mediante la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular. Debido a que estas enzimas se encuentran en el medio que rodean a la célula fuera de la protección de la membrana celular, son estables a variaciones físicas y química del ambiente que los rodea. Los micoorganismos deben producirlas en grandes cantidades

debido a los volúmenes en los que llevan a cabo su función. Por todo esto las enzimas extracelulares son atractivas para el uso industrial (Barford, 1981).

CLASIFICACIÓN

Todas las enzimas conocidas se han clasificado en 6 grupos de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Estos grupos son: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Las reacciones hidrolíticas son aquellas en las que los enlaces químicos son rotos con adición de una molécula de agua (el hidrógeno en uno de los fragmentos y el grupo OH en el otro).

Las hidrolasas a su vez se clasifican de acuerdo al tipo de enlace que hidrolizan. Estos enlaces pueden ser: enlaces éster, enlaces glicosídicos, enlaces éter, enlaces peptídicos, enlaces carbón-nitrógeno diferentes a enlaces peptídicos, enlaces ácidos anhídridos, enlaces carbón-carbón, enlaces aldehídicos y enlaces fósforo-nitrógeno.

Las enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos son clasificadas a su vez en tres grupos: las que hidrolizan enlaces oxígeno-glicosídicos, las que hidrolizan compuestos que tienen enlaces nitrógeno-glicosídicos y por último, las que hidrolizan compuestos con enlaces azufre-glicosídicos (Boyer, 1971).

INULINASAS

Las inulinasas son enzimas β -fructofuranosidasa, la cual está representada por el número EC. 3.2.1.27. El primer dígito indica el grupo al que pertenece, en éste caso a la hidrolasas. El segundo corresponde a la subclase de la enzima, que en el caso de las hidrolasas, se refiere al tipo de enlace hidrolizado que es un enlace glicosídico. El tercer número es la segunda subdivisión y ofrece más información con respecto al tipo de sustrato que utiliza la enzima, en el caso de la β -fructofuranosidasa indica que el enlace es un éster carboxílico. Finalmente, el cuarto número indica específicamente el sustrato de la enzima, en éste caso se trata de la inulina. De este momento en adelante

nos referiremos a la β -fructofuranosidasa con el nombre de inulinasa, que libera como producto moléculas de fructosa. Estas enzimas también suelen designarse como 2,1- β -D-fructan-fructanohidrolasas, las cuales tienen diferente actividad a las invertasas que específicamente hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa y pueden ser clasificadas como β -D-fructo-furanosido-hidrolasa.

FUENTES DE OBTENCION

Las enzimas que degradan la inulina son encontradas en plantas y microorganismos: incluyendo hongos, levaduras y bacterias, las cuales son llamadas inulinasas o inulasas. En la tabla se enlistan varios microorganismos productores de inulinasas.

Tabla I. Microorganismos productores de Inulinasa (Vandame and Dedrycke,1983).

Hongos:	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. ficus</i> <i>Eupenicillium javanicum</i> <i>Fusarium roseum</i> <i>F. oxysporus</i> <i>Gelasinospora cerealis</i> <i>Penicillium italicum</i> <i>Rhizopus delemar</i>
Levaduras:	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>K. lactis</i> <i>Candida kefyr</i> <i>Debaryomyces cantarellii</i> <i>Hansenula beijerinckii</i> <i>Rhodotorula spp</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Saccharomyces rosei</i>
Bacterias:	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> <i>Flavobacterium multivorum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>

PRODUCCION MICROBIANA DE INULINASAS

MEDIO DE FERMENTACION

Varios medios para la producción de inulinasas son reportados, su composición depende del tipo de microorganismo.

Para la producción de inulinasa de *Kluyveromyces fragilis*, se ha utilizado el siguiente medio (Byun and Nahm, 1978).

Extracto de Jerusalem artichoke 10 %; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.05 % Fe_2SO_4 0.015 % (pH 5.0). Sin embargo, Grootwassink and Fleming (1980) usan un medio de aplicación industrial: extracto de levadura 1 %, inulina 2 % a pH 5.0.

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA FORMACION DE INULINASAS

La adición de inulina como fuente de carbohidratos usualmente es un requisito para la formación de enzima. Snyder and Phaff (1960) examinan la influencia de varios carbohidratos como fuente de carbono en la producción de inulinasa extracelular por *Kluyveromyces fragilis*. El rendimiento mayor se obtuvo con inulina (0.3 U/ml) y rafinosa (0.15 U/ml), se observó un nivel medio con fructosa (0.1 U/ml), y un nivel bajo con sacarosa (0.03 U/ml), galactosa, glucosa, y manitol (0.05 U/ml).

FUENTE DE NITROGENO

El efecto del nitrógeno sobre la formación de inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* fue estudiado por Snyder and Phaff (1960). El extracto de levadura es la base de nitrógeno para las levaduras y son excelente para el crecimiento y producción de la enzima (Negoro and Kito, 1973).

INFLUENCIA DE METALES Y ELEMENTOS TRAZA

Workman et al. (1983), encuentra que el KCl (0.01 M), MgSO_4 (0.01 M), y FeSO_4

(0.001 M) posiblemente tiene influencia sobre la producción de la enzima con *Penicillium sp.* y *Aspergillus niger*. En donde el rendimiento de inulinasa se incrementa.

EFFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCION DE INULINASA

De acuerdo con Grootwassink and Fleming (1980), *Kluyveromyces fragilis* producen rendimiento comparables entre células y enzimas en un rango de pH entre 3.5 y 6.0.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La temperatura óptima para la producción de inulinasa para *Candida kefry* fue de 27 a 30 °C (Negoro and Kito, 1973); a temperaturas altas se obtiene una baja formación de inulinasa. Con *Kluyveromyces fragilis*, una actividad superior se obtuvo de los 30 a 34°C (Grootwassink and Fleming, 1980). Efstathiou (1986), reporta que estas enzimas son generalmente termolábiles, su mayor actividad se encuentra entre los 45 y 50 °C, y pierden rápidamente su estabilidad a los 60 °C.

Por otro lado, las inulinasas no presentan inhibición por la presencia de glucosa o sacarosa, y son inducibles por inulina, siendo inhibidas por elevadas concentraciones de fructosa (Gupta et al. 1988), además no se ven afectadas, en general por la presencia de cationes divalentes y en ocasiones son altamente estimuladas por iones de Mg^{++} .

ACCION DE LAS ENZIMAS FRUCTAN-HIDROLASAS

Las formas de acción de las enzimas fructan-hidrolasas son:

- 1) β -fructofuranosidasas inespecíficas capaces de hidrolizar sacarosa, así como enlaces fructofuranosídicos β (2→1) tipo inulina y β (2→6) tipo levano. Las unidades de fructosa son removidas sucesivamente de las partes terminales de la cadena del polisacárido e hidroliza la sacarosa a una velocidad 25 veces más rápido que a la inulina.
- 2) Enzimas las cuales específicamente hidrolizan los enlaces β (2→1), tipo inulina, liberando monómeros de fructosa a partir de la parte terminal de la cadena.

3) Enzimas que específicamente hidrolizan los enlaces (2,6) tipo levano, comúnmente se producen cadenas cortas de oligosacáridos, pero en algunos casos se producen algunas unidades de fructosa o difructosa hidrolizadas de la parte terminal del polímero (Rutherford and Deacon, 1972).

El rango de pH de la hidrólisis del levano y la más alta estabilidad de la enzima está entre 5.5 y 6.5.

LOCALIZACION DE LA ENZIMA

La inulinasa de la levadura *Kluyveromyces fragilis*, esta localizada externamente en la membrana celular sobre la pared celular (Azhari et al. 1989).

Estudios realizados por Snyder and Phaff (1960), el contenido de inulinasa de las células se encontró en el medio de cultivo, las enzima intracelular se puede obtener autolizando a las células a 30 °C durante 24 horas tratadas con cloroformo al 2 % y tolueno 2 %. Negoro and Kito (1973) observan actividad inulinasa intracelular y extracelular en cultivos de *Candida kefry*. Los niveles de enzima intracelular incrementan proporcionalmente con el crecimiento.

APLICACIONES DE LAS INULINASAS

PRODUCCIÓN DE JARABES FRUCTOSADOS

FRUCTOSA

La fructosa también llamada levulosa o azúcar de frutas (del latín, fructus; fruta), es uno de los más comunes azúcares naturales. Se encuentra en algunos vegetales como la papa y cebolla, y está ampliamente distribuido en frutas donde puede estar presente en forma libre o combinada como disacárido o polisacárido. En la miel, la fructosa constituye cerca de la mitad del total de azúcares presentes. Los polímeros de fructosa o fructosanas también se encuentran en muchas plantas que han sido usadas como material para obtener fructosa pura, es el caso de inulina, fructosana encontrada en las raíces de *Dalia tuber*, en los tubérculos de Alcachofa de Jerusalem (Aspinall, 1970) y en

el tronco principal del Agave.

PROPIEDADES FISICAS

La fructosa, es un monosacárido estructurado en configuración cetosa, que cristaliza como cristales anhidros de β -D-Fructopiranososa. La rotación óptica en solución acuosa es $-132.2^\circ \rightarrow -92.3^\circ$ a 20°C y $-102.6^\circ \rightarrow -89.2^\circ$ a 17°C , (Verstraten, 1967).

El poder edulcorante en solución acuosa al 10 % si se compara con sacarosa (100), es mayor para fructosa (120). En solución establece un estado de equilibrio de sus varios anómeros, de los cuales β -D-fructofuranosa es el más importante.

La fructosa es el más soluble en agua de todos los azúcares y se disuelve rápidamente aún en medio frío, lo cual lo hace un excelente humectante en confitería.

La viscosidad de las soluciones de fructosa es marcadamente menor que la de soluciones de sacarosa.

PROPIEDADES QUIMICAS

La fructosa en medio ácido fuerte y condiciones severas de temperatura da lugar a la formación de derivados de furano como el hidroximetilfurfural (Newth, 1951).

La D-fructosa cuando se trata con fenilhidrazina en exceso da lugar a la formación de la fenilosazona de la D-fructosa (Rakoff and Rose, 1966).

PRODUCCION DE ETANOL A PARTIR DE INULINA

Recientemente, un gran interés se concentra en la fermentación alcohólica a partir de inulina obtenida de Jerusalem artichoke, usando levaduras con actividad inulinasa (Guiraud et al. 1981). Se obtienen extractos crudos de inulina y por medio de fermentación se obtiene etanol obtenida en completa anaerobiosis usando *Kluyveromyces fragilis* y *K. marxianus*.

OBJETIVOS

3.0 GENERAL:

Estudiar el efecto del Jugo de Girasol (*Helianthus annuus*), sobre la actividad de inulinasa y crecimiento de *K. fragilis*.

3.1 PARTICULARES:

Desarrollar un proceso de Extracción y Cuantificación de azúcares presentes en tallos de Girasol (*H. annuus*).

Comparar el patrón de Crecimiento de *K. fragilis*, en Jugo de Girasol e Inulina.

Cuantificar la enzima asociada a la membrana de *K. fragilis*, en Jugo de Girasol e Inulina.

Determinación de la Actividad Inulinasa en Células y enzima libre.

EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS:

Se realizó la extracción con 100 g de tallos de girasol (*H. annus*), previamente lavados y secados en una estufa a 45°C por 72 horas, y triturados en un molino de cuchillas. Éstos fueron calentados con 1 lt. de agua destilada a 70°C para la extracción de polifructosanos, posteriormente se precipitarón con 50 ml de etanol frío, se agitó vigorosamente para después mantenerse a 4 °C por 72 hrs., transcurrido el tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 15min (Livingston, 1990), se separó el sobrenadante y el precipitado (Diagrama 1) y por último se determinó la cantidad de azúcares reductores, empleando el método del DNS (Miller, 1959), y azúcares totales por medio del Fenol-ácido Sulfúrico (Dubois, 1948). Para la determinación de ambos azúcares se realizaron curvas estándar.

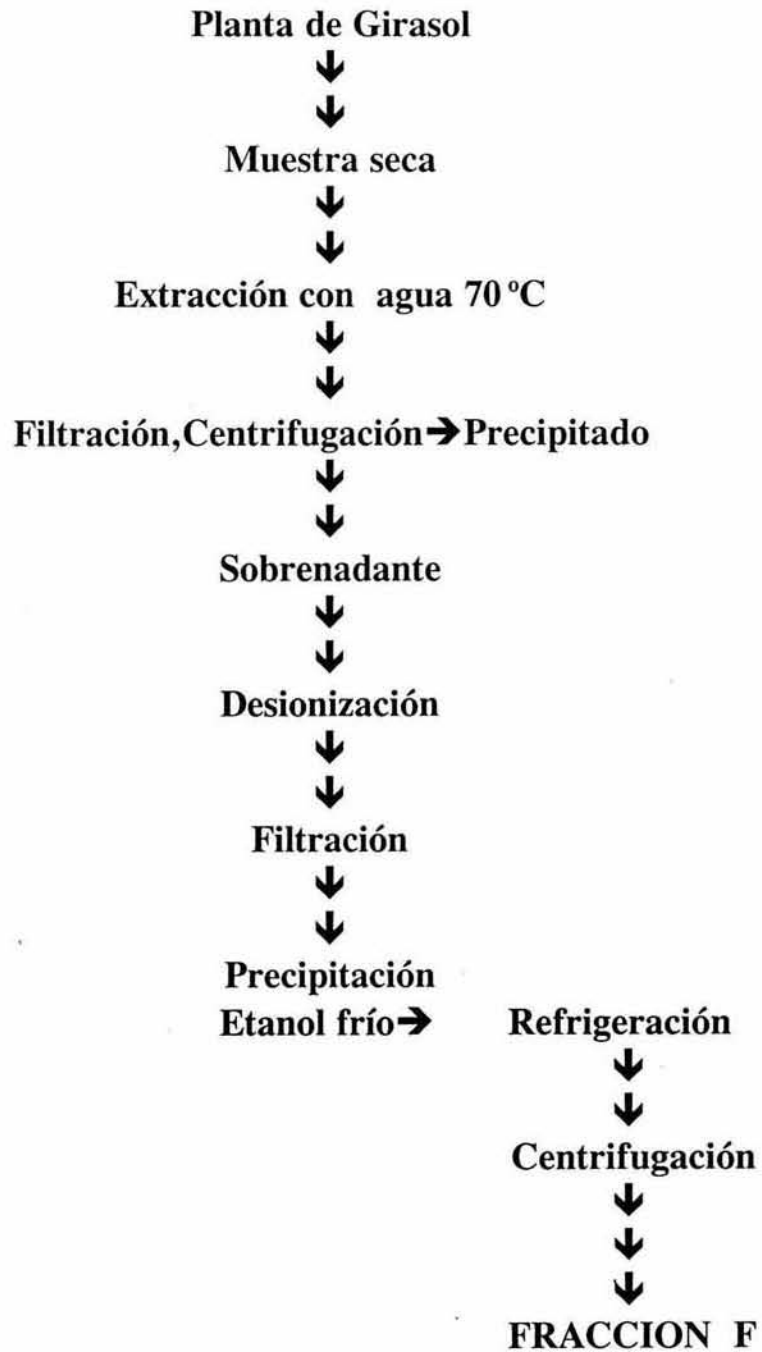
IDENTIFICACION DE AZUCARES EN EL JUGO DE GIRASOL**TLC**

Se identificaron por la técnica de cromatografía en capa fina (De Steffanis, 1968), utilizando como sistema de solventes: Cloroformo:Acido acético:Agua, (3.0: 3.5: 0.5 v/v). Los cromatogramas se revelaron con el reactivo: Difenilamina/anilina/ácido fosfórico.

CUANTIFICACION DE GLUCOSA Y FRUCTOSA SEPARADOS POR CROMATOLOGRAFIA EN CAPA FINA

Se corrieron las muestras en cromatografía de silica gel-NH₂, con indicador de fluorescencia, utilizando como fase móvil acetato de etilo:piridina:agua:ácido

Diagrama 1. Extracción de Polifructosanos (Livingston,1990)



acético (60:30:10:5), para la identificación de los azúcares se usó una reacción térmica, calentando a 165°C, durante 2 minutos. Las manchas se cuantificaron por fluorescencia en el densitómetro CAMAG, utilizando una lámpara de mercurio a 366 nm y filtro de 400 nm. El rango de concentración para los estándares va de 200 a 1000 mg/l.

PRODUCCION DE LA ENZIMA

MEDIOS DE CULTIVO

Para la realización de este trabajo se emplearon dos medios de cultivo, los cuales corresponden a un grupo experimental y otro control.

Experimental

Este medio de cultivo contiene como fuente de carbono a los azúcares proporcionados por el jugo de girasol, y extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Una vez realizada la extracción y determinación de azúcares, se procedió a ajustar la concentración de azúcares totales en el medio en 17 mg/ml, proporcionadas por el jugo de girasol, se ajustó el pH a 4.5 adicionando NaOH ó HCl 0.1 M., posteriormente se esteriliza a 10 lb por 10 min., Por otro lado, se prepara extracto de levadura 0.5 % a 15 lb. por 15 minutos el cual se ajustó a pH 4.5. Posteriormente en condiciones estériles se homogenizan los medios y se someten a prueba de esterilidad a 30 °C durante 24 horas.

Control

Este medio contiene como fuente de carbono, Inulina (1 %) y extracto de levadura (0.5%). La inulina se calentó bajo agitación moderada hasta su disolución total de la inulina, el pH se ajustó a 4.5, adicionando NaOH ó HCl 0.1 M, se esteriliza a 10 lb de presión durante 10 minutos. A este medio se le agrega como fuente de nitrógeno extracto de levadura (0.5%), se ajusta el pH a 4.5 y se esteriliza a 15 lb por 15 minutos. Se homogenizó la inulina en el matraz que contiene el extracto de levadura, se sometió a prueba de esterilidad a 30°C durante 24 horas.

PROCESO DE FERMENTACION

Microorganismo

El microorganismo empleado fue la levadura *Kluyveromyces fragilis*, la cual es conservada en tubos que contienen agar soya tripticaseína (AST), y almacenado a 4 ° C. La proliferación del microorganismo, se realiza en cajas petri con agar dextrosa sabouraud estéril, se sembró la cepa por el método de estría, se incuban a 30°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se realizaron frotis para la tinción de Gram, para observar si en la cepa existe contaminación.

Condiciones de Fermentación

La fermentación líquida se realizó en matraces erlenmeyer de 500 ml con un volumen de 200 ml del medio de cultivo experimental y control, bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura controlada a 30°C.
- Agitación continua de 90 golpes por minuto.
- pH inicial de los medios de cultivo: 4.5.

El proceso de fermentación para la obtención de la enzima inulinasa se divide en tres fases:

Adaptación, Inóculo, Fermentación.

ADAPTACION

Se inoculó la cepa de *K. fragilis*, en matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo correspondiente,(grupo experimental y el grupo control), se incubaron en un baño metabólico (Grant Instruments Modelo SS40 2L. Cambridge Ltd. England), durante 48 horas, bajo las condiciones de fermentación ya descritas.

INOCULO

Se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml, con 40 ml de medio de cultivo correspondiente(experimental y control), éstos fueron inoculados con 10 ml del medio de la fase anterior (Adaptación), que corresponde para cada caso y por último fueron colocados en el mismo baño metabólico bajo las condiciones mencionadas durante 24 horas, en este tiempo se encuentra en fase de crecimiento exponencial.

FERMENTACION

Del medio de inóculo procedentes del medio experimental y control se toman los ml necesarios para inocular 0.2-0.3 mg de células en peso seco por ml de medio de fermentación y fueron inoculados en matraces erlenmeyer de 500 ml. con x ml de medio. Una vez que fue realizado el inóculo fueron colocados en un baño metabólico, bajo las condiciones de fermentación ya mencionadas.

CONTROLES DURANTE LA FERMENTACION

Se muestreó cada tres horas durante las primeras 12 hrs., teniendo así los tiempos 0,3,6,9,12 hrs, posteriormente a las 24,48,72,96...hrs., hasta que el crecimiento se presente en fase estacionaria, determinando: Biomasa, Azúcares reductores, Azúcares totales, Actividad enzimática y Proteína.

CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento de biomasa de la levadura, se determinó por aumento de densidad óptica, midiendo la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro, utilizando agua destilada como blanco y para diluir las muestras.

De cada uno de los tiempos de fermentación se tomó 1 ml de cultivo de células, se lavaron con agua destilada, se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min., se decantó el agua, y se lavó nuevamente con 9 ml de agua destilada, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 15 min., se decantó y se agregó exactamente 10 ml de agua.

Los datos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón (Abs. vs. mg. biomasa), en peso seco de *K. fragilis* realizada previamente.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

Se determinan por el método colorimétrico de la técnica de DNS ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959). Se realizó primero una curva patrón con solución de glucosa (0-1000 mg/ml).

DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES

Se realizó por la técnica colorimétrica del Fenol- Ac.Sulfúrico (Dubois, 1948).

Primero se realizó una curva patrón con una solución de glucosa (0-1 mg/ml).

DETERMINACION DE PROTEINA

La cantidad total de proteínas se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951). Utilizando albúmina sérica bovina como un estándar en la concentración de proteína.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN CELULAS

La actividad total de inulinasa se estimó por medición de los azúcares reductores liberados en una reacción en presencia de 1 % de Inulina en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M y 1 mg de células en peso seco provenientes de cada tiempo de fermentación para los dos grupos (Jugo de Girasol e Inulina), a pH 3 y pH 5, a temperatura de 50 °C, por el método del ácido 3,5-dinitrosalícilico (DNS) Miller,1959. Se tomaron muestras de la reacción a los 0,15 y 30 min., para el grupo experimental y control.

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ENZIMA LIBRE

Se realizó una mezcla de reacción que contiene 1 ml de inulina al 6%, en buffer de acetatos 0.1 M, pH 5, al cual se le agregó 100 µg de enzima libre, para lo cual primeramente se liberó la enzima de la membrana celular de *K. fragilis*, por el método de extracción de las β-furanosidasas (Lam and Grootwassink, 1985), las células del caldo de fermentación para cada tiempo fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspenden las células en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5, con una concentración de 1 mg (peso seco) de células por cada 2 ml de buffer. Se incubó dicha solución a 50°C con agitación constante de 90 golpes por

minuto durante 24 horas y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos hasta aquí se considera la enzima libre, finalmente se agregó el buffer correspondiente para llegar a un volumen final de 3 ml, incubado a 50°C, a continuación se tomaron muestras de 0.2 ml a los tiempos 0, 15 y 30 minutos de reacción, por último se aplicó el método del DNS.

DEFINICION DE UNIDADES DE ACTIVIDAD

Una unidad enzimática (U.E), se definió como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de azúcares reductores por minuto bajo las siguientes condiciones: T =50°C., concentración inulina 1% y 6%, pH 3 y 5 en buffer acetatos.

ANALISIS ESTADISTICO

Para los datos cuantitativos (crecimiento celular, azúcares reductores y totales, concentración de proteína, actividad enzimática en células y enzima libre), en cada grupo se calculó la media y la desviación estándar.

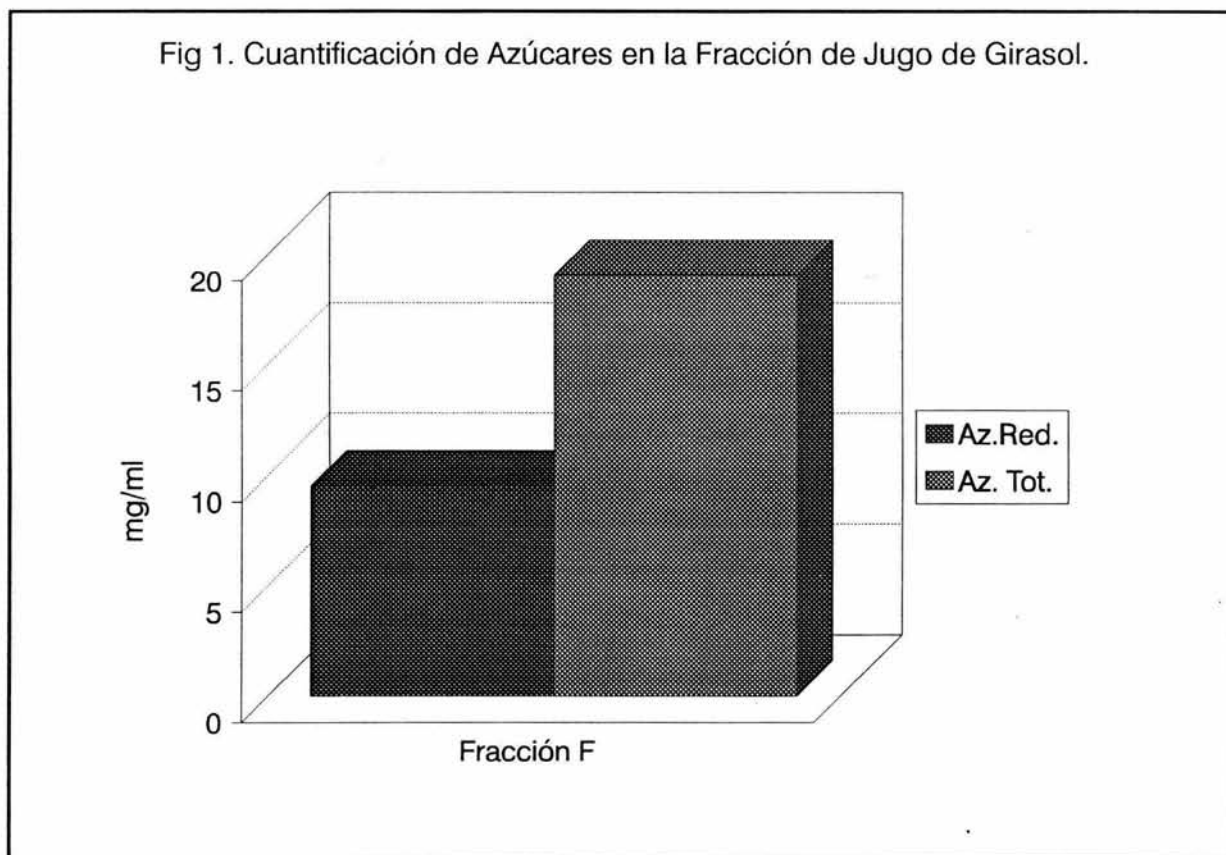
Para la actividad enzimática en células crecidas en Inulina y Jugo de Girasol a pH 3 y pH 5, éstos grupos fueron comparados entre sí, tomando en cuenta el tiempo de fermentación utilizando el Análisis de Varianza con un nivel de significación de 0.05.

Al igual que con la actividad de células con enzima libre, en Inulina y Jugo de Girasol, comparando los tiempos de fermentación con la síntesis de la enzima empleando el Análisis de Varianza con un nivel de significancia de 0.05.

ANALISIS DE RESULTADOS

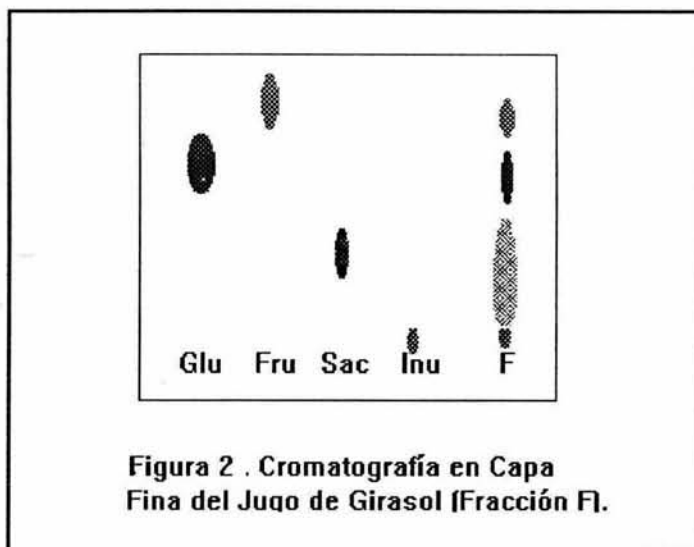
EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS

En la Figura 1, se presenta la concentración de Azúcares Totales y Reductores de la Fracción F, obtenida por medio del proceso de Extracción de Polifruktosanos (ver Material y Método). Se observa una concentración de 19.063 mg/ml y 9.510 mg/ml de Azúcares Totales y Reductores respectivamente.



En lo que respecta a la Identificación por medio de Cromatografía en Capa Fina, se obtuvieron como se observa en la Figura 2, azúcares como: Fructosa, Glucosa y una serie de Polímeros de mayor peso molecular, lo cuales no fueron identificados. Por último para completar este análisis se presenta la cuantificación de Glucosa y Fructosa

separadas por Cromatografía en Capa Fina, Figura 3, en este caso (Concentración de Glucosa y Fructosa), se muestran dos picos, el primero corresponde a la glucosa y el segundo a fructosa, se muestra el recorrido (MD), en el eje de las abscisas y la altura en el de las ordenadas. En la Fig.4, la curva de calibración para Glucosa y Fructosa, después de la transformación correspondiente se presenta una concentración de Glucosa (1.660 mg/ml) y Fructosa (5.037 mg/ml). Al relacionar estos datos se tiene 19.063 Azúcares Totales, dentro de los cuales 9.51 mg/ml, corresponden a Azúcares Reductores: como Glucosa(1.660 mg/ml) y Fructosa (5.037 mg/ml).



PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

El criterio utilizado para la selección de un medio de cultivo específico, fué que pudiera inducir la producción de la enzima extracelular que cataliza la hidrólisis del polisacárido empleando Jugo de Girasol como materia prima.

Se utilizó el medio Inulina (1%) y Jugo de Girasol (1% Az.T.), reportado para la máxima producción de inulinasa de *K. fragilis*, y se determinó la cinética de fermentación por medición del crecimiento microbiano. Los resultados se muestran en la Fig. 5, (ver datos en el apéndice), esta prueba es el primer experimento. se puede observar que el tiempo de fermentación es de 96 hrs., la fase estacionaria se observa a las 24 hrs. y 12 hrs. respectivamente.

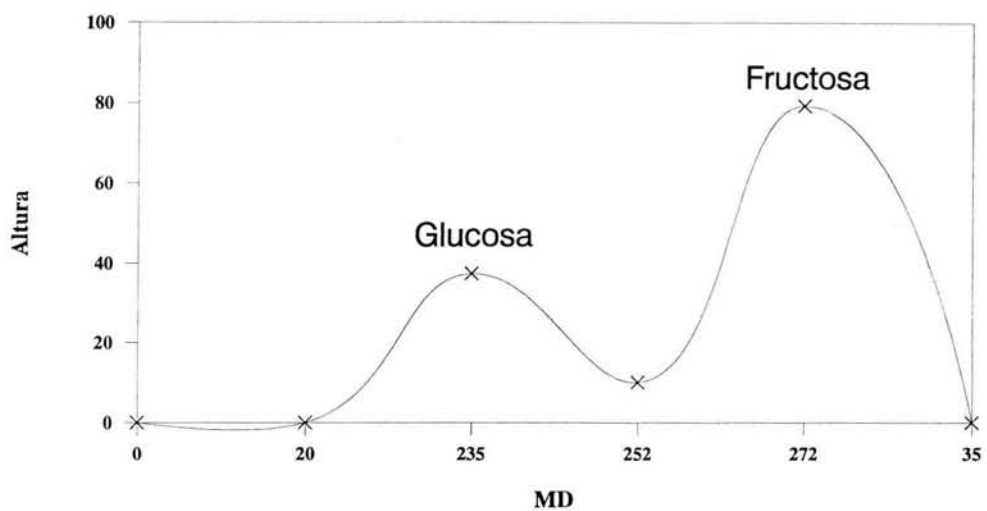


Fig.3. SEPARACION DE GLUCOSA Y FRUCTOSA DE LA FRACCION "F".

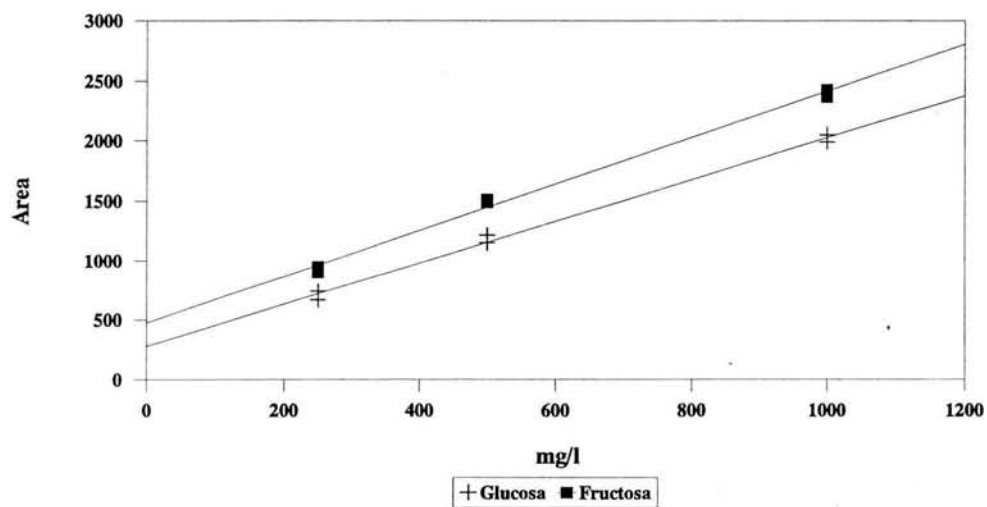


Fig. 4. CURVA DE CALIBRACION DE ESTANDAR DE GLUCOSA Y FRUCTOSA

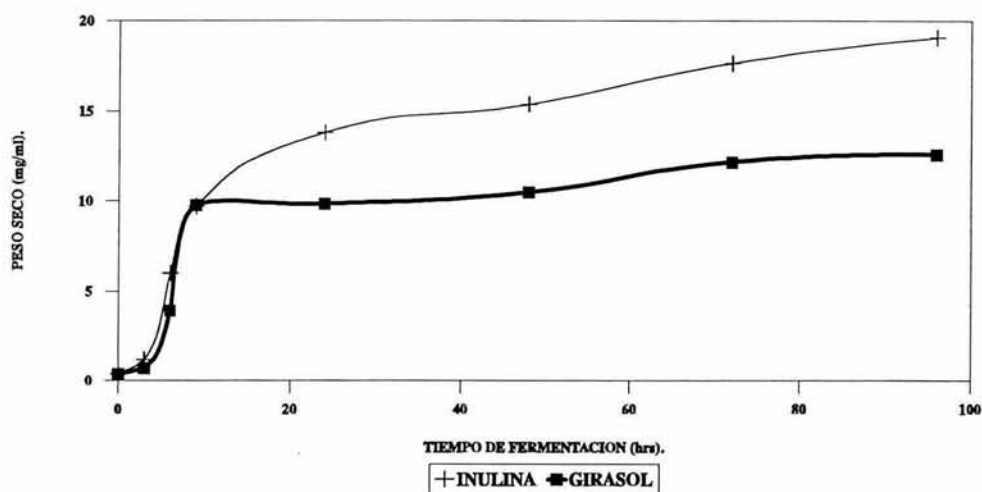


FIG. 5 CRECIMIENTO CELULAR DE *K. fragilis*,
EN DOS DIFERENTES MEDIOS DURANTE LA FERMENTACION

Con el fin de determinar la relación existente entre el crecimiento y la producción de la actividad enzimática, se realizó una fermentación siguiendo el crecimiento microbiano determinando la actividad enzimática durante la fermentación. En la Fig. 5a, se muestran los resultados obtenidos para este punto. En ésta se observa que la máxima producción de actividad enzimática se tiene al final de la fase logarítmica de crecimiento, aproximadamente después de las 12 hrs. de fermentación, también se encontró que después de la fase estacionaria hay disminución de la actividad, probablemente debido a la presencia de enzimas proteolíticas o a una baja estabilidad de la enzima. En tanto para el grupo experimental (Jugo de Girasol), no se observó actividad enzimática (Fig.5a).

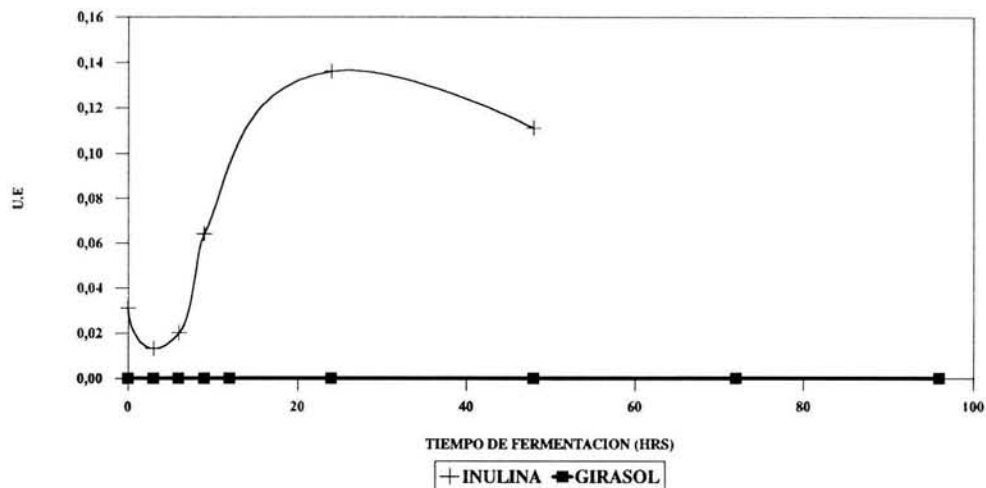


FIG. 5a ACTIVIDAD ENZIMATICA CON CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*, CRECIDAS EN MEDIO DE INULINA Y GIRASOL A pH 3. TIEMPO DE REACCION 1 hr.

En el medio del Jugo de Girasol (1% Az.T), se observa que crecen las células de *K. fragilis*, debido a que el medio contiene monosacáridos, disacáridos y polifruetosanos, por lo que las células utilizan este medio rico.

Debido a que no se obtuvo actividad de inulinasa, se preparó un inóculo en inulina y se vio el perfil de crecimiento, observándose en Fig. 6, que en los tres medios de cultivo llegan a la fase estacionaria a las 24 hrs. de fermentación.

En la Fig. 6a, se tiene la actividad enzimática con células de *K. fragilis*, a pH 3 a los 15 min. de reacción, en la que se observa no hay actividad de inulinasa en Jugo de Girasol ni en el grupo de Inóculo en Inulina.

En la Fig. 6b, se muestran las actividades a tres tiempos de reacción para las células crecidas en medio de Inulina 1%. La máxima actividad se detecta a los 30 y 45 minutos de reacción, 0.383 y 0.352 U.E respectivamente, a partir de las 12 hrs. el perfil de actividad es igual en los tres tiempos probados.

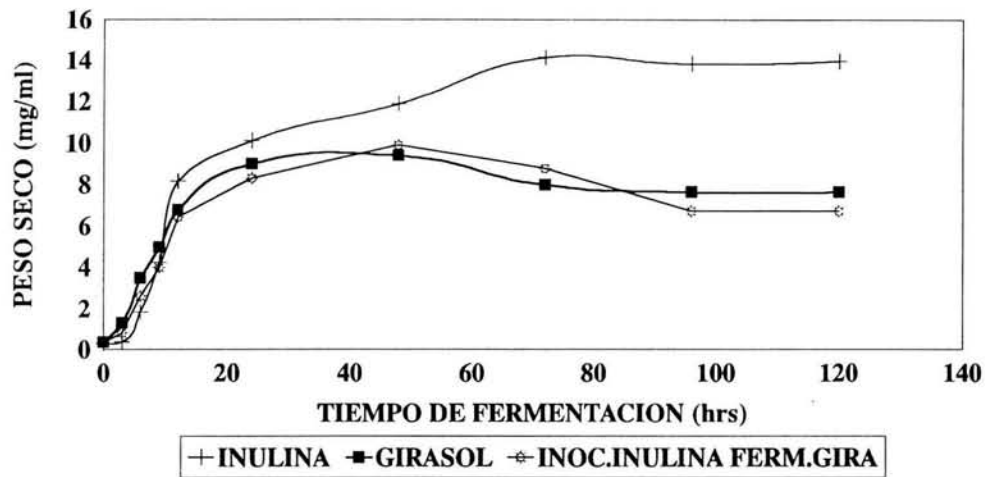


FIG.6 CRECIMIENTO CELULAR DE *K. fragilis*, EN MEDIO DE INULINA Y GIRASOL
1 % Az.T.

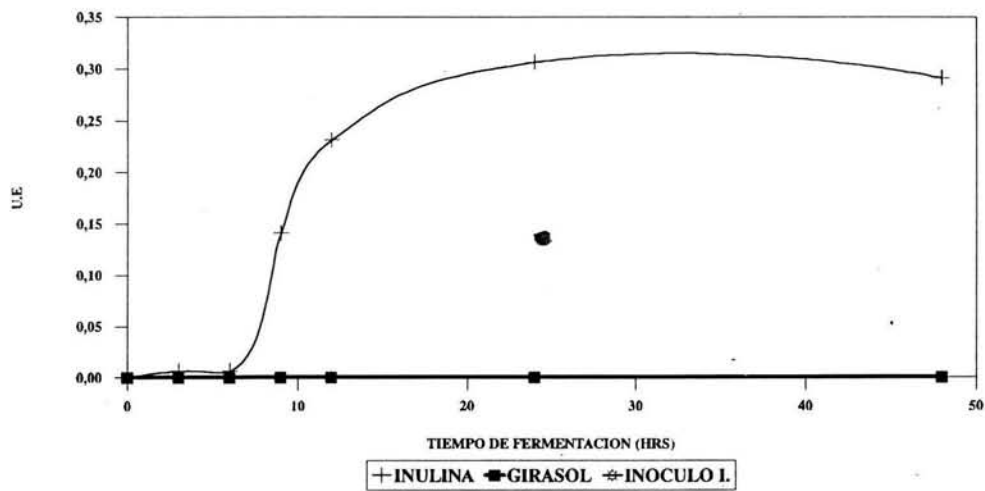


FIG. 6a ACTIVIDAD ENZIMATICA EN CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*
A pH 3. INULINA 1%. TIEMPO DE REACCION 15 MIN,

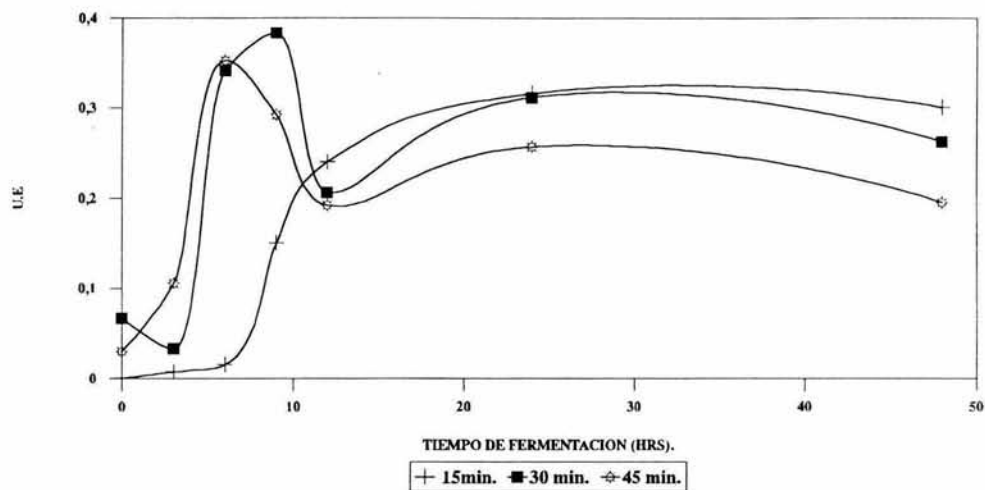


FIG. 6b. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*, A pH 3. CRECIDAS EN MEDIO DE INULINA 1 %.

Al término de este experimento y verificando nuevamente que no se inducían a las células de *K. fragilis*, a la actividad de inulinasa, en medio de Jugo de Girasol 1% Azúcares Totales, y sin embargo, su crecimiento era similar al del medio de inulina y comprobando por medio de Cromatografía en Capa Fina (Fig.2), que había monosacáridos (glucosa, fructosa); disacáridos (sacarosa) y polifructosanos en el medio de Girasol.

Se realizó una fermentación en Jugo de Girasol (17 mg/ml), para el crecimiento celular e Inulina al 6 % como sustrato en el medio de reacción para la síntesis de actividad enzimática.

Se observa en la Fig.7, que la duración de la fermentación en este medio, es de 216 hrs.,siendo a las 72 hrs. (24.561 mg/ml), en que llega a fase estacionaria.

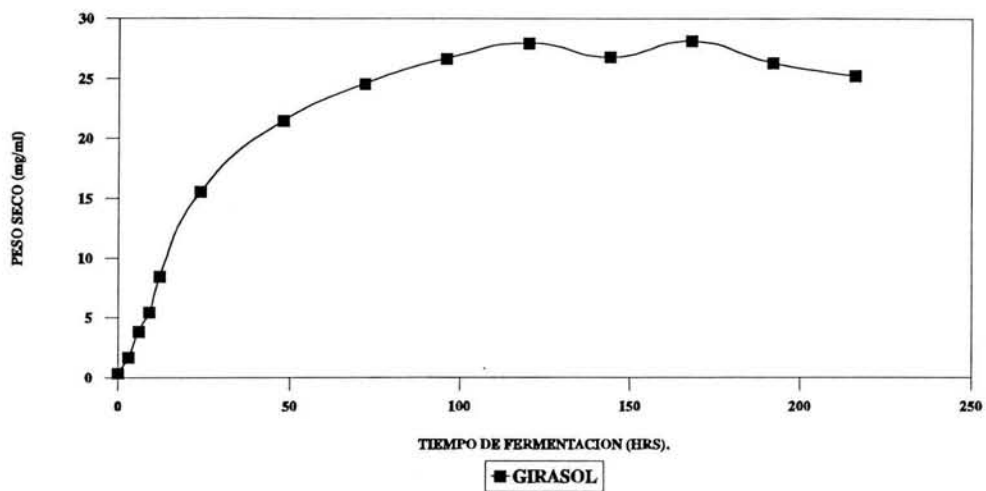


FIG.7 CRECIMIENTO CELULAR DE *K. fragilis*, EN MEDIO DE GIRASOL
17 mg/ml. Az.T.

En la Fig. 7a, se muestra la concentración de azúcares reductores y totales respectivamente. La concentración de azúcares reductores va incrementando durante las primeras 6 hrs. de fermentación (0.203 mg/ml), se observa el consumo de estos y después de las 48 hrs. apareciendo nuevamente a partir de las 72 hrs., así mismo se observa la concentración de Az. T. disminuyen conforme pasa el tiempo de fermentación, hasta las 9 hrs., aunque se observa un pequeño aumento en la concentración de azúcares totales a las 12 hrs. y nuevamente sigue la tendencia a decrecer con respecto al tiempo, para finalmente la concentración se mantiene constante.

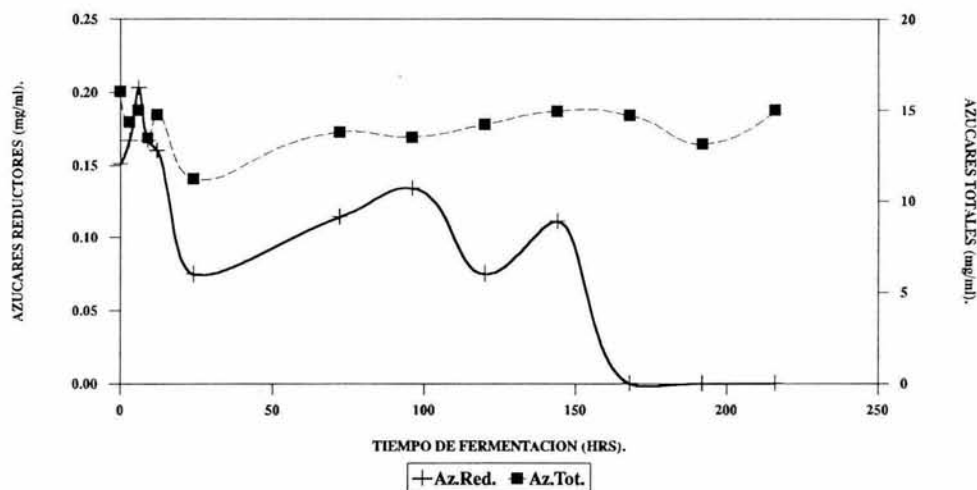


FIG. 7a. CONCENTRACION DE AZUCARES DE JUGO DE GIRASOL DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION.

Esto indica que conforme se van consumiendo los azúcares totales durante las primeras 6 hrs. de fermentación hay una liberación al medio de azúcares reductores, posteriormente la levadura (*K. fragilis*), consume azúcares reductores que encuentra en el medio, y la cantidad de azúcares totales decrece, finalmente en el medio no se encuentran azúcares reductores y los totales permanecen constantes.

En cuanto a la actividad enzimática se muestra la variante en el tubo de reacción, en el cual se usó Inulina como sustrato al 6% a pH 3 y pH 5 a 30 minutos de reacción.

En la fig 7b, se observa la actividad enzimática a pH 3, en la que la máxima producción de inulinasa es a las 9 hrs (0.306 U.E).

Por lo que respecta a pH 5, a las 6 hrs. de fermentación, se presenta una actividad de 0.257 U.E, posteriormente decae la actividad y para la 48 y 72 hrs. se incrementa, siendo a las 168 hrs. cuando se obtiene la máxima actividad (0.444 U.E).

De acuerdo a los datos de azúcares durante la fermentación se espera que la actividad de inulinasa se encuentre durante las primeras 9 hrs de fermentación ya que

hay un aumento de azúcares reductores en el medio al igual de las 72 y 96 hrs. de fermentación. Por lo mostrado anteriormente la actividad de inulinasa bajo los dos pHs, se encuentran actuando de manera similar, aunque con pH 3 se encuentran actividades más altas a tiempos más cortos de fermentación que las encontradas con pH 5.

La concentración de proteína, dado en la Fig 7c, muestra que va en aumento con respecto al tiempo de fermentación.

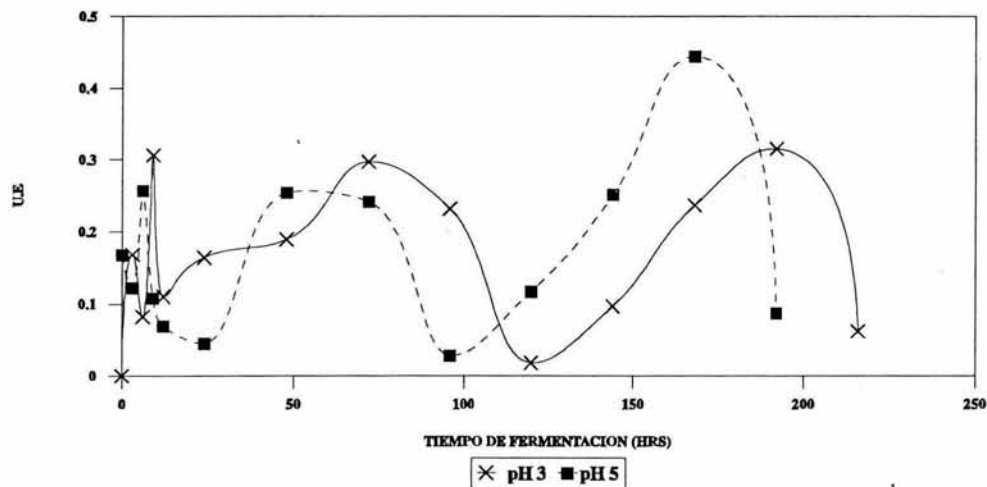


FIG. 7b. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*, CRECIDAS EN MEDIO DE GIRASOL. TIEMPO DE REACCIÓN 30 MIN.

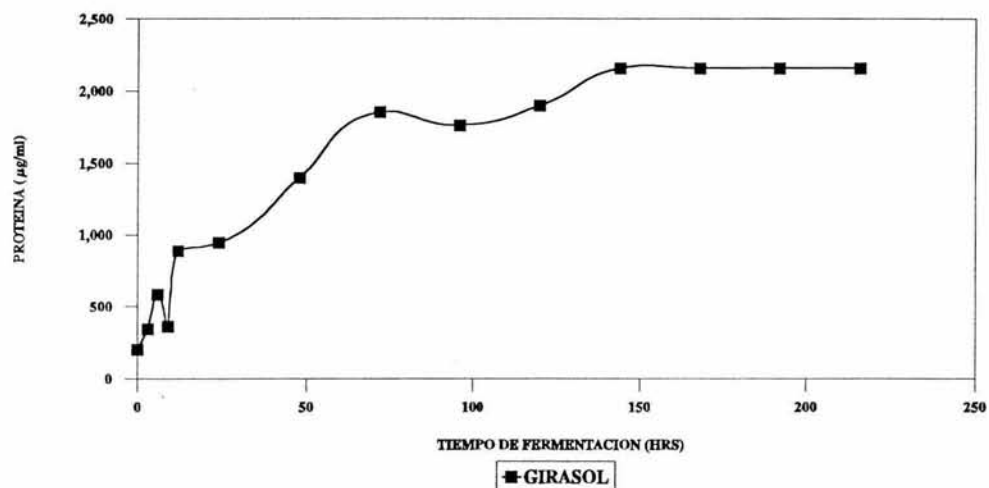


FIG. 7c. CONCENTRACION DE PROTEINA EN CALDO DE CULTIVO CON JUGO DE GIRASOL.

En la Fig 7d, se observa la actividad a pH 5 a los dos tiempos de reacción. A 15 minutos de reacción se muestra que conforme pasa el tiempo de fermentación aumenta la actividad de inulinasa al menos en las primeras 12 hrs (3.100 U.E), posteriormente decrece y permanece constante.

En tanto para 30 minutos de reacción no se observa un aumento notable de la actividad enzimática, siendo la máxima a las 216 hrs (4.909 U.E) de fermentación.

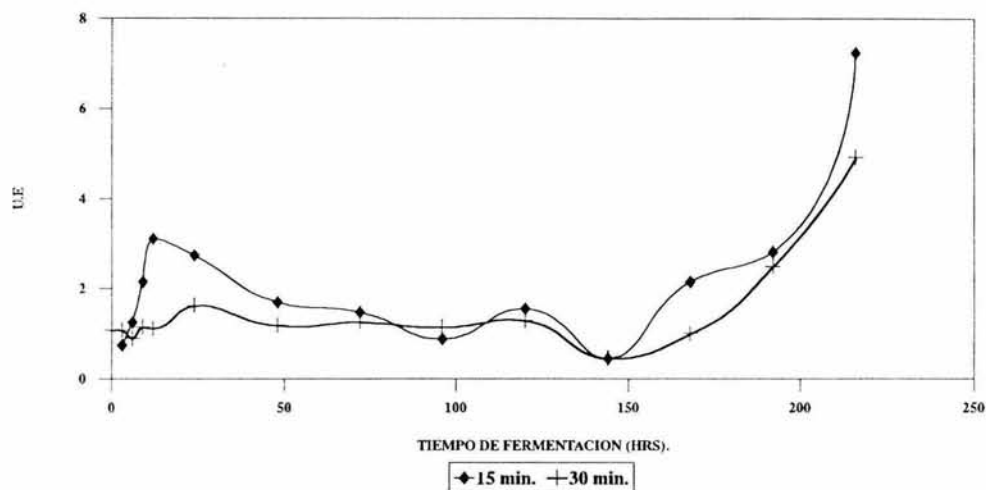


FIG. 7d. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ENZIMA LIBRE DE *K. fragilis*, DE MEDIO DE GIRASOL A pH 5.

La diferencia notable entre las actividades con células libres y enzima libre, estriba en la cantidad, mientras con células se obtienen máximas actividades de 0.306 U.E, con enzima libre obtenemos actividades de 3.100 U.E.

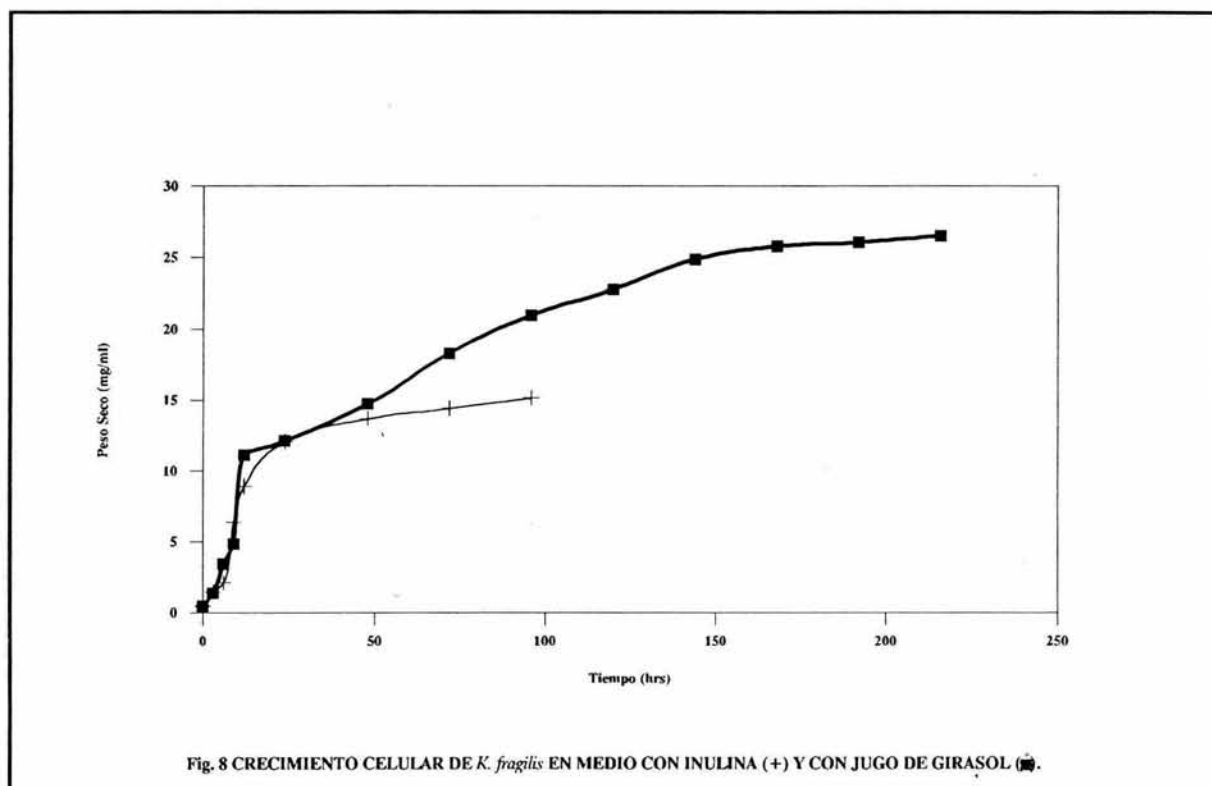
Por lo que al término del experimento se vió que variando la concentración de sustrato (Inulina 6%), en el tubo de reacción, se puede observar actividad de inulinasa.

Por los resultados obtenidos en el experimento anterior, se encuentra que las células que crecen en Jugo de Girasol, produce la enzima (inulinasa), que es detectada en el medio de reacción al aumentar la concentración de sustrato, ya que a la concentración de 1% , la enzima quizá tenía poca afinidad por el sustrato. Por lo que el siguiente paso es comparar con la de Inulina, por lo que en este experimento se siguió una fermentación con Inulina y Jugo de Girasol (17 mg/ml Az.T.).

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *K. fragilis*.

Se indica en la Fig.8, el crecimiento celular de *K. fragilis*, en medio de Inulina y Jugo de Girasol.

En medio de Inulina, se llega a la fase estacionaria a las 24 hrs. de fermentación, en comparación con el medio de Jugo de Girasol, que sigue un crecimiento similar, aunque a partir de las 12 hrs., continua creciendo sin una fase estacionaria franca, sino hasta las 120 hrs.



Como se puede apreciar en la Fig. 8, las células de *K. fragilis*, en medio de Jugo de Girasol (17 mg/ml Az.T.), tardan más tiempo en llegar a su fase estacionaria en comparación con las células crecidas en medio de Inulina ya que se tienen azúcares libres que son utilizados primeramente para el crecimiento, posteriormente utiliza otros hasta que no haya azúcares.

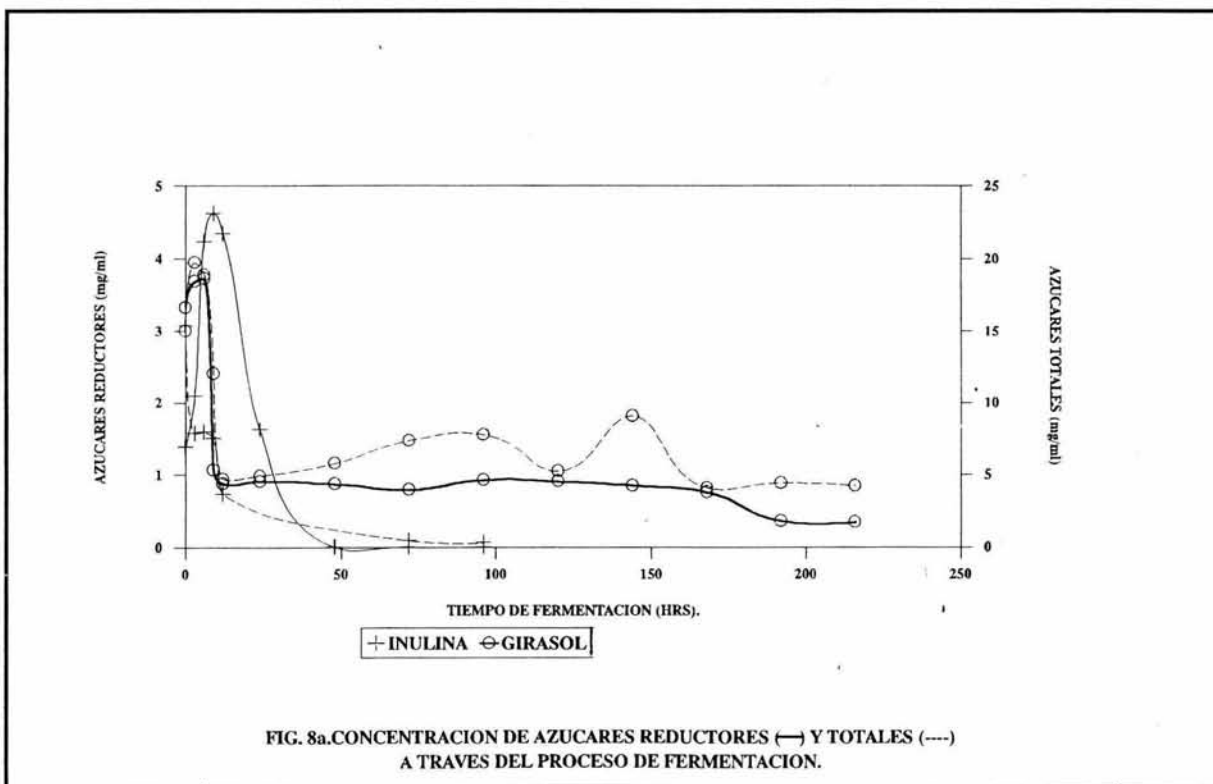
CONSUMO DE AZUCARES DURANTE LA FERMENTACION EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

Tal como se presenta en la Fig. 8a. en medio de Inulina la concentración de azúcares reductores muestran un incremento hasta las 12 hrs. después de estas caen hasta cero.

Por otro lado, en medio de Jugo de Girasol, la concentración de azúcares reductores se incrementa durante las 6 hrs., después de este tiempo cae la concentración.

En cuanto a la concentración de azúcares totales, se muestra que para medio de Inulina, conforme pasa el tiempo de fermentación disminuyen éstos azúcares, siendo a las 24 hrs. cuando hay una desaparición de los azúcares totales en el medio.

Para Jugo de Girasol, se da un pequeño aumento de azúcares totales durante las 3 y 6 hrs. de fermentación, posteriormente se observa una disminución hasta las 48 hrs. seguido de un aumento a las 72 hrs.(7.343 mg/ml),después de las 168 hrs. permanece constante.



Comparando éstos resultados de concentración de azúcares con el crecimiento celular de *K. fragilis*, tenemos que donde esperamos que haya actividad enzimática para el grupo control es a partir de las 3 hrs. y hasta las 24 hrs. de fermentación. Y para el caso del grupo experimental, esperamos que la actividad se aunque el caso no es tan definido como el grupo control, entre las 3 y hasta las 48 hrs. de fermentación y quizá después de las 120 hasta las 168 hrs. de fermentación.

CARACTERIZACION DE LA PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

- Efecto de la fuente de carbono en la produccion de la enzima

Se utilizó un inductor (inulina) para probar cual de las células crecidas en los dos medios era la más indicada para la obtención de la enzima.

En las siguientes figuras (8b,8c,8d,8e.),se observa la actividad enzimática a pH 3 y pH 5, a dos tiempos de reacción para los dos medios de cultivo (Inulina y J. Girasol).

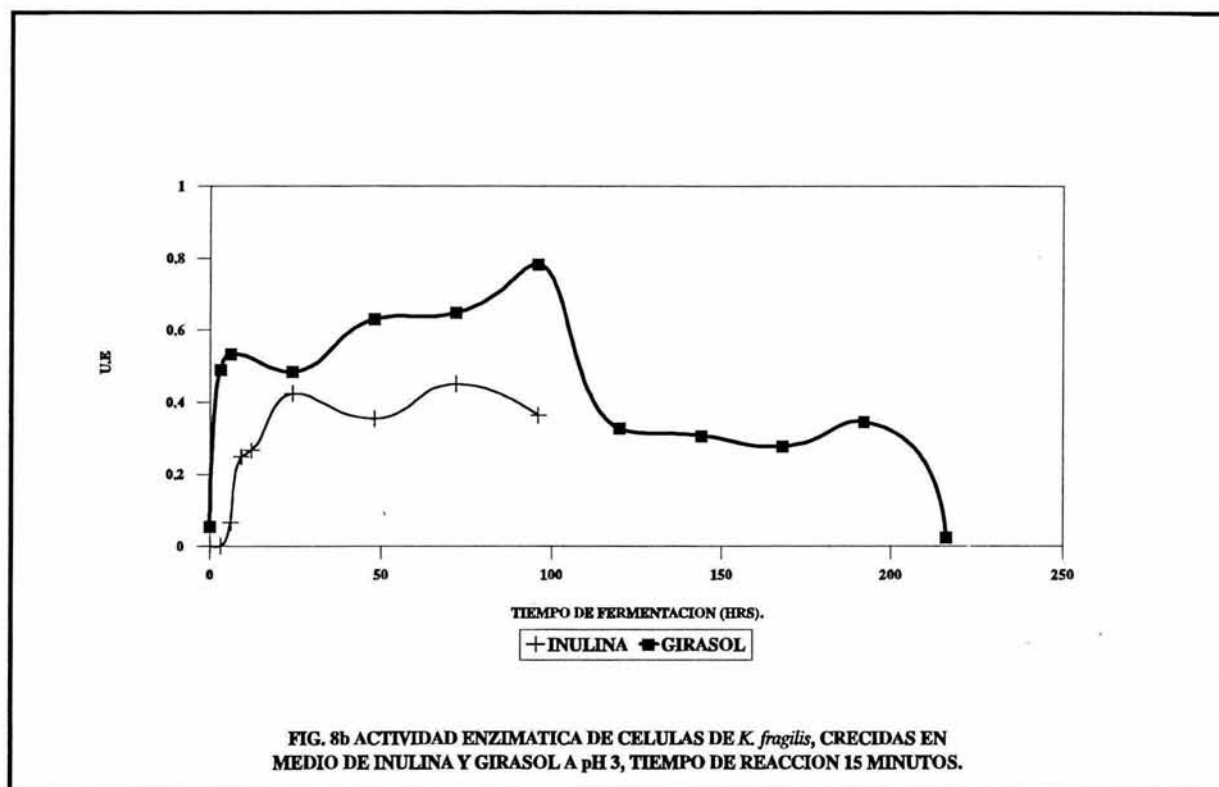
EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

a) pH 3 a 15 minutos de reacción.

Se observa en la Fig.8b., en cuanto a este tratamiento se sometió a un análisis de varianza con la prueba de Tukey con un nivel de significancia $P > 0.05$, por lo que se tiene que al tiempo de fermentación cero las actividades de las células crecidas en ambos medios son iguales, y son significativamente diferentes a partir de las 3 hrs. y hasta las 12 hrs., sin embargo a las 24 hrs. de fermentación se igualan las actividades (0.424 y 0.485 U.E), de las 48 a las 96 hrs., se tiene que son significativamente diferentes, siendo mayor la actividad para Jugo de Girasol, mostrando una máxima actividad significativamente mayor 96 hrs.(0.782 U.E).En general la actividad aumenta conforme pasa el tiempo de fermentación.

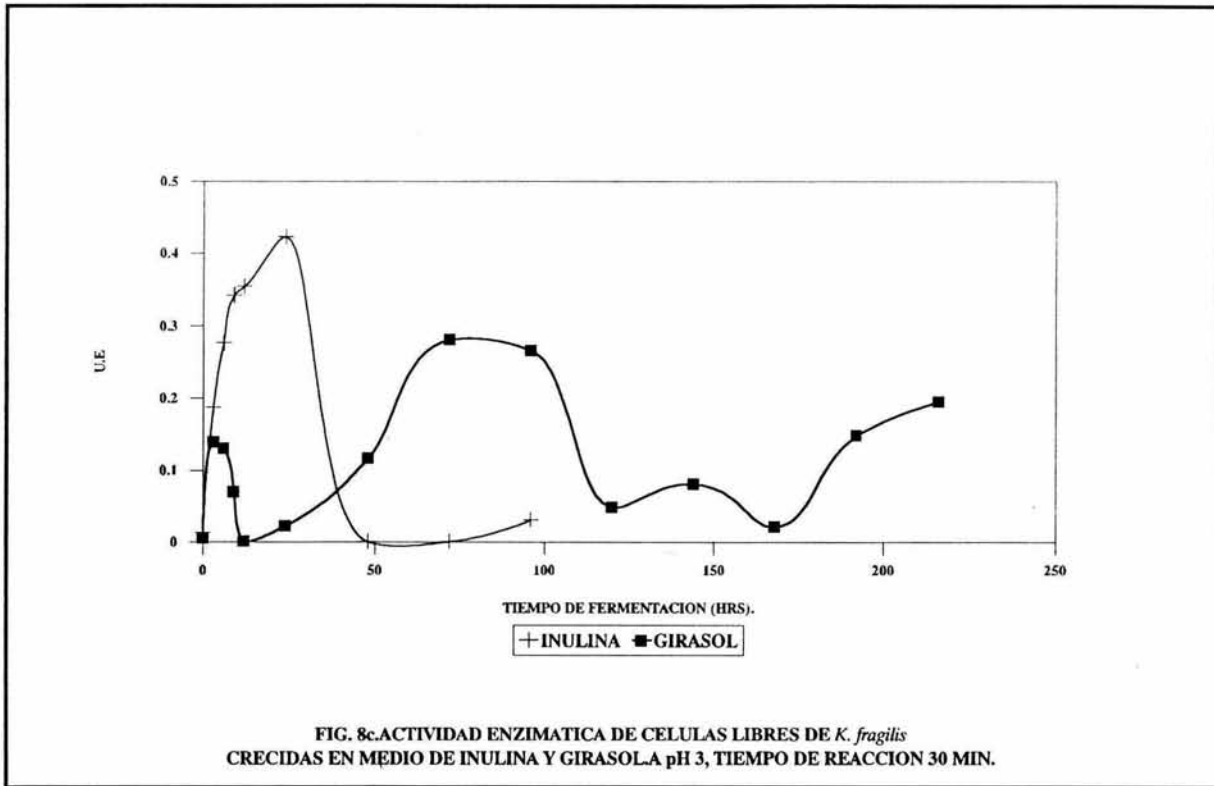
b) pH 3 a 30 minutos de reacción.

Se tiene que la actividad se observa en Fig.8c., con el mismo tratamiento estadístico, tenemos que en las primeras 3 hrs. las actividades en los dos grupos son iguales y a partir de las 6 hrs. se presenta actividades significativamente diferentes en los dos grupos hasta las 24 hrs., siendo mayor la actividad a las 24 hrs.(0.422 U.E) para Inulina, después de este tiempo la actividad cae, en tanto para Jugo de Girasol, la máxima actividad se presenta a las 72 y 96 hrs. (0.281 y 0.266 U.E).



Después de ver éstos datos tenemos que la máxima actividad para medio de Inulina es a las 24 hrs. de fermentación (0.423 U.E) a pH 3 con un tiempo de reacción de 15 minutos. Y para el grupo experimental bajo estas mismas condiciones la máxima actividad 96 hrs.(0.782 U.E) de fermentación. Y para el tiempo de reacción de 30 minutos, tenemos que para grupo control se haya la máxima actividad a las 24 hrs(0.422 U.E) y para el medio de Jugo de Girasol a las 72 hrs (0.281 U.E), con esto se presenta que para medio de Inulina a pH 3, no influye el tiempo de reacción, las

las actividades son iguales a las 24 hrs. Y para Jugo de Girasol a pH 3, se tienen diferencias significativas en el tiempo de reacción, siendo mayores al tiempo de reacción 15 minutos y aumentando dicho tiempo decrecen las actividades.



c) pH 5 a 15 minutos de reacción.

En cuanto a pH 5, con 15 minutos de reacción, y aplicando el ANOVA con la prueba de Tukey con $P > 0.05$, se tiene Fig. 8d., que durante las 12 hrs. de fermentación las actividades en los dos grupos son significativamente diferentes, siendo significativamente mayores en el grupo de Inulina a 3 hrs. (0.740 U.E), después de este tiempo la actividad cae, se muestra que las actividades para ambos grupos se igualan a las 24 y 48 hrs., en el grupo de Jugo de Girasol se incrementa la actividad, presentando la máxima actividad a las 96 hrs. (0.758 U.E).

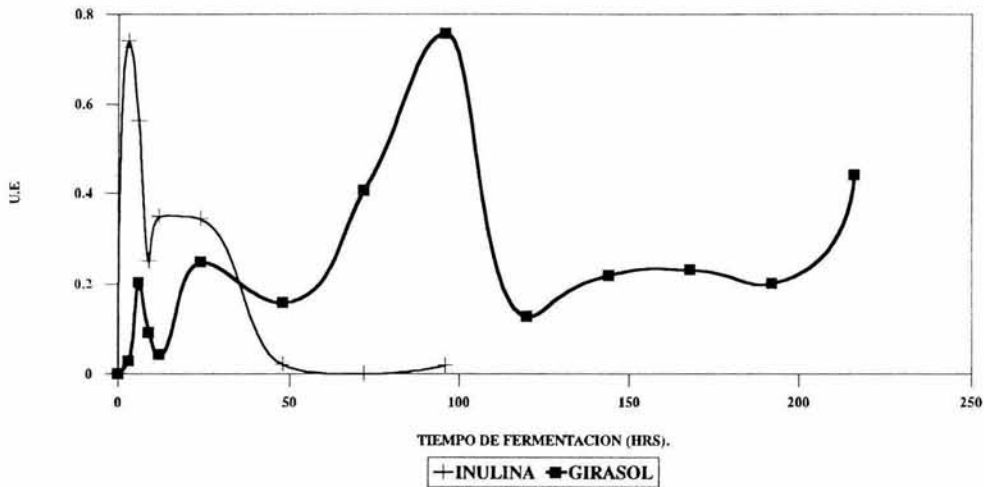


FIG. 8d. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*,
A pH 5, TIEMPO DE REACCION 15 MINUTOS.

d) pH 5 a 30 minutos de reacción.

Se tiene en la Fig.8e., que a los tiempos en que son significativamente diferentes es a las 3 y 6 hrs. de fermentación, mostrando la máxima actividad para Inulina a las 3 hrs. (0.157 U.E), y para Jugo de Girasol a las 6 hrs.(0.309 U.E). Para los demás tiempos se igualan y decrecen las actividades.

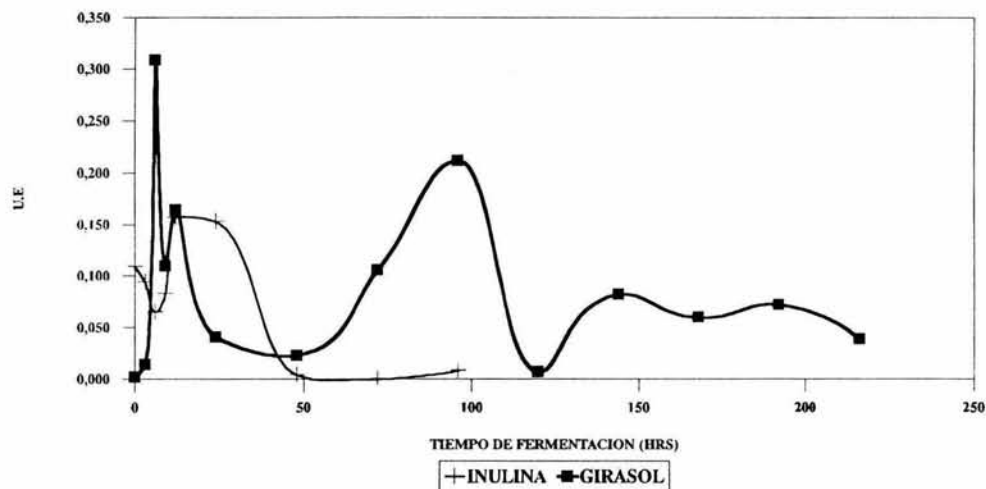


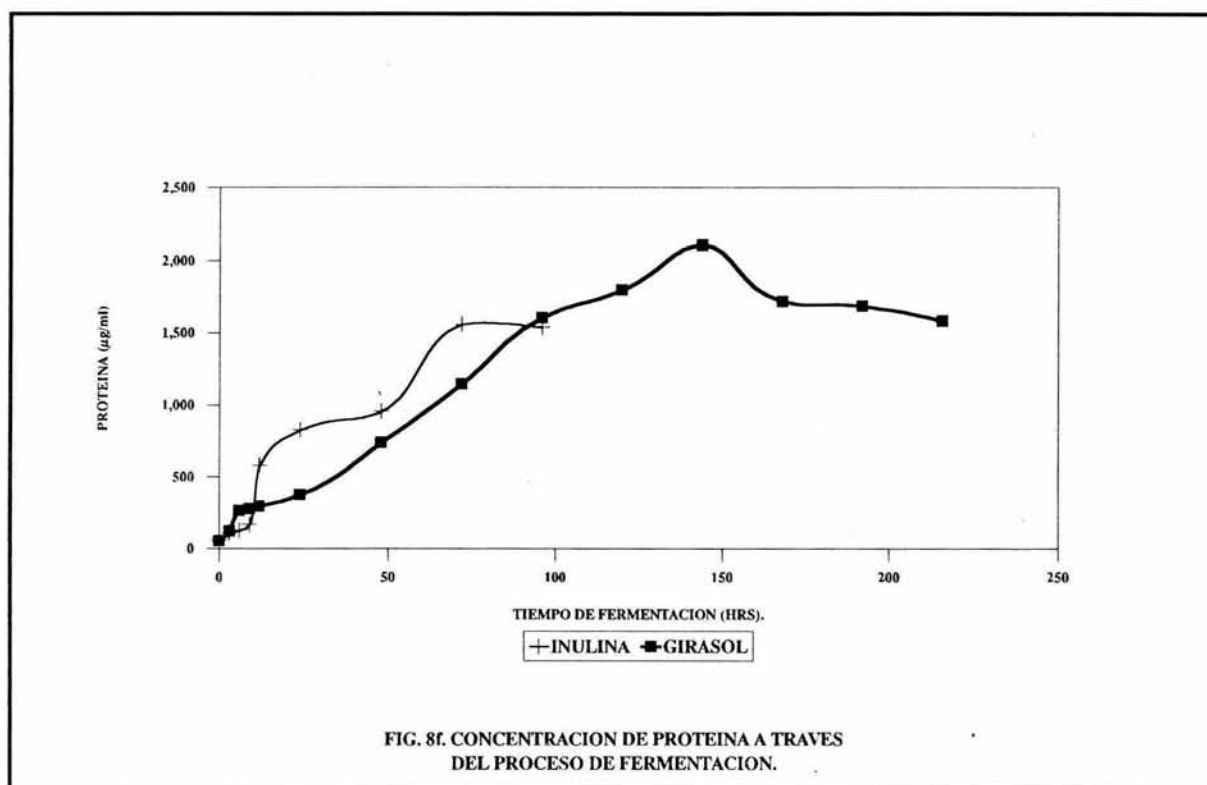
FIG.8e. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CELULAS LIBRES DE *K. fragilis*,
A pH 5, TIEMPO DE REACION 30 MINUTOS.

De acuerdo a éstos datos se tiene que la actividad en Inulina y Jugo de Girasol a pH 5, se observan diferencias significativas en cuanto al tiempo de reacción, a mayor tiempo de reacción la actividad cae. En medio de Inulina la máxima actividad se presenta a los 15 minutos de reacción a las 3 hrs.(0.740 U.E), de fermentación. En tanto para las células crecidas en Jugo de Girasol la máxima actividad a pH 5 es a los 15 minutos de reacción a las 96 hrs.(0.758 U.E) de fermentación.

La influencia que tiene el pH en la producción de la enzima inulinasa se ve claramente, ya que a pH 3 se muestran actividades significativamente más bajas en comparación a las obtenidas a pH 5, así como también el tiempo de la reacción, a tiempos más cortos, se obtiene la mayor producción de inulinasa, para ambas células crecidas en Inulina y Jugo de Girasol.

CONCENTRACION DE PROTEINA DURANTE LA FERMENTACION

En la Fig. 8f, se presenta la concentración de proteína encontrada en el medio de Inulina y Jugo de Girasol, durante la fermentación, la concentración de proteína en el medio de Inulina aumenta, partiendo de una concentración de proteína de 54.545 $\mu\text{g/ml}$, al tiempo cero, conforme pasa el tiempo de fermentación. Por lo que respecta al medio de Jugo de Girasol, al tiempo cero hay una concentración de 54.545 $\mu\text{g/ml}$, se encuentra un aumento a través del tiempo de fermentación. Lo notable es que comparando el grupo control con el experimental, tenemos que en Jugo de Girasol hay más concentración de proteína que en Inulina.



EFFECTO DE LA ENZIMA LIBRE EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

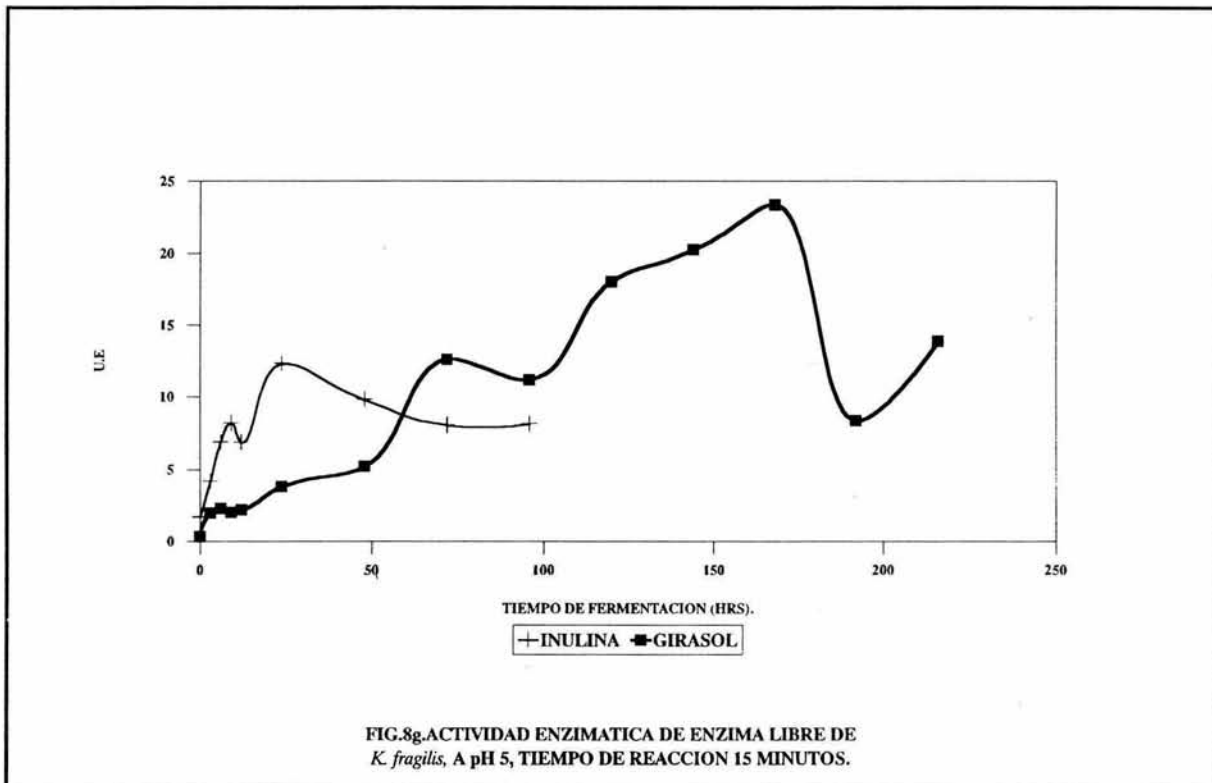
Se muestra la actividad enzimática de enzima libre de *K. fragilis*, en dos medios de fermentación (Inulina y Jugo de Girasol), a pH 5 a los 15 minutos de reacción.

a) 15 minutos de reacción:

Para la enzima libre en Inulina en la Fig. 8g, se muestra que las actividades son

significativamente diferentes en los dos grupos (Inulina y J. Girasol), se presentan actividades más altas para Inulina durante 48 hrs. de fermentación, siendo la actividad máxima a las 24 hrs.(12.306 U.E), después de este tiempo quedan valores constantes.

Para Jugo de Girasol a partir de las 72 hrs. de fermentación y hasta las 216 hrs., la actividad es significativamente mayor en comparación con la enzima obtenida de las células crecidas en Inulina, siendo la máxima a las 144 hrs.(22.061 U.E).



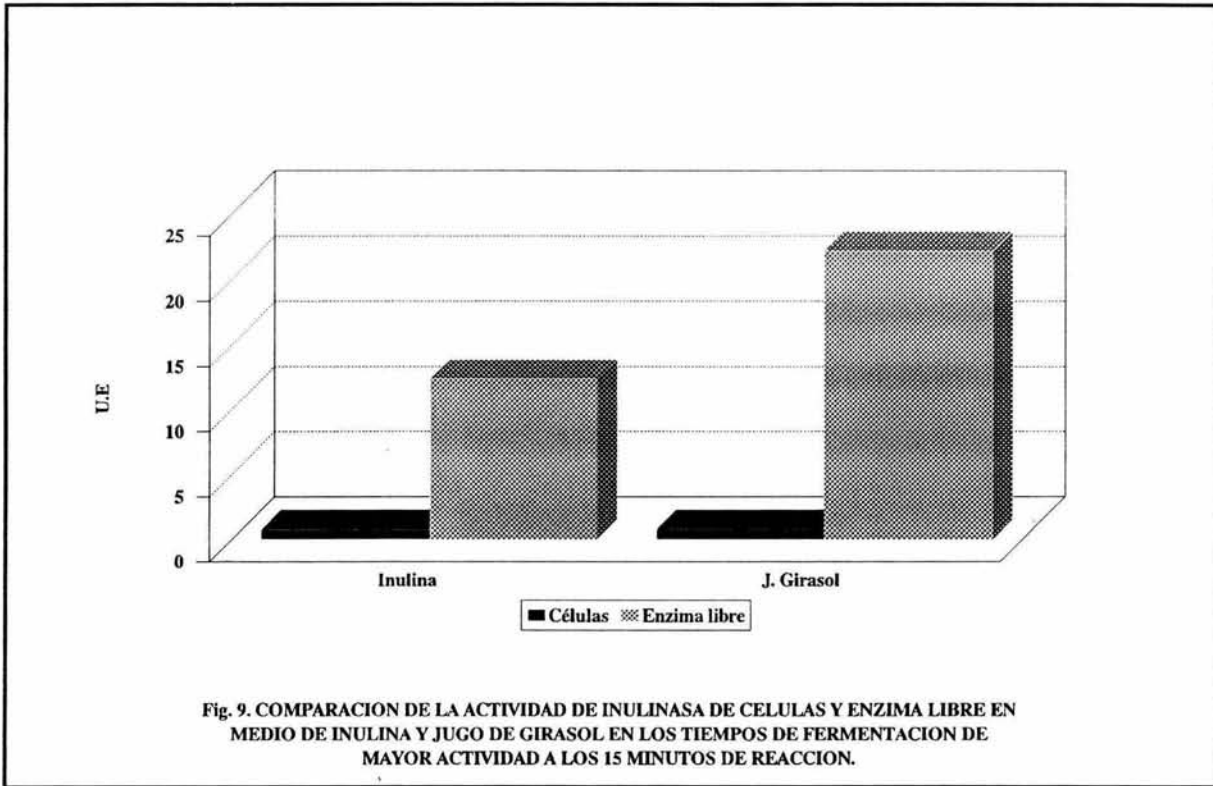
Se tiene que por el análisis de varianza hay diferencias significativas entre los dos tiempos de reacción (15 y 30 minutos), siendo mayor a los 15 minutos, tanto para la enzima obtenida en el medio de inulina como para la enzima de Jugo de Girasol.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE INULINASA DE CÉLULAS Y EXTRACTO CRUDO DE PROTEINA (ENZIMA LIBRE).

a) Tiempo de reacción 15 minutos:

Se muestran diferencias significativas entre la actividad de la enzima crecida en

medio de Inulina y las células crecidas en el mismo medio, presentando mayores actividades con enzima, 24 hrs.(12.306 U.E) y con células a las 3 hrs.(0.741 U.E). Ver Fig. 9.



En tanto para la producción de la actividad de inulinasa en células y enzima producida en medio de Jugo de Girasol, se encuentra que la actividad de enzima es significativamente diferente a la actividad de las células, siendo la máxima actividad a las 144 hrs. (22.061), para la enzima, y la máxima actividad para las células a las 72 hrs. (0.758 U.E).

Una de las aplicaciones con más interés en la industria para las inulinasas es la producción de jarabes fructosados o los llamados "Jarabes con alto contenido de fructosa y glucosa" (Ultra High Fructose Glucose syrups UHFG), pudiendo utilizar como materia prima los desechos agrícolas de plantas de Girasol como fuente de Inulina. Lo cual por la abundancia de estos en nuestro país, provee una excelente fuente de carbohidrato.

Estos jarabes fructosados ya desde hace varios años tenían ganado una interesante porción en el mercado de los edulcorantes, sustituyendo a la sacarosa, la cual causa problemas relacionado con la obesidad, caries y diabetes (Vandame and Dedrycke,1983).

Como es sabido la fructosa es preparada a partir de sacarosa por una conversión enzimática. Resultados obtenidos por Grootwassink et al. (1980), muestran que es más favorable la hidrólisis enzimática de la inulina que la hidrólisis química.

El adicionar inulina como fuente de carbono es generalmente un pre-requisito para la formación de la enzima. Snyder and Phaff (1960), estudiaron la influencia de varios carbohidratos como inductores de la enzima de *K. marxianus*. También fue estudiada esta producción con fuentes de carbono fermentables y no fermentables por Grootwassink and Hewitt, (1983). Obteniendo los más altos niveles de inulinasas con fructosa y sacarosa a pH 5 y 30 °C, mientras que con otras fuentes de carbono como lactosa, galactosa y etanol no mostraron producción de inulinasas.

Parekh and Margaritis (1986), estudiaron la influencia de la fuente de carbono con los siguientes resultados, el más alto rendimiento de la actividad de inulinasas se encontró con inulina (212 U/ml), sacarosa (635 U/ml), fructosa (53 U/ml) y por último glucosa (49 U/ml).

De acuerdo con Rouwenhorst (1988) y los anteriores autores, muestran que la producción de la inulinasas es inducible por la adición de inulina como fuente de

carbono, así como que la fructosa es un inductor primario, de ésta pero que a su vez en concentraciones altas provoca un represión catabólica (Rouwenhorst, 1988).

Para esta levadura la producción de la inulinasa intracelular es asociada al crecimiento y disminuye con la autólisis de las células, mientras que la inulinasa extracelular comienza a acumularse en el medio de cultivo después del crecimiento de las células y se incrementa en la fase de muerte (Grootwassink and Fleming, 1980). Mientras Grootwassink and Hewitt (1983), reportan que del total de inulinasa formada, el 70 - 75 % esta ligada a las células, mientras que el resto se encuentra en el medio.

En este trabajo, se estudió el efecto del Jugo de Girasol, sobre la actividad de Inulinasa y crecimiento de *K. fragilis*.

En la realización de los primeros experimentos se observó que en ambos medios (Inulina y J.Girasol), figuras 5 y 6 el crecimiento es semejante.

En tanto para la actividad de inulinasa, empleando como sustrato Inulina 1% (Snyder and Phaff, 1962), con las células crecidas en Inulina se presenta la actividad de inulinasa asociada al crecimiento de *K. fragilis*, siendo la máxima actividad a las 24 hrs (Fig. 5a y 6a). En tanto para las células crecidas en Jugo de Girasol no se presentaba actividad de inulinasa, pero promueve un buen crecimiento ya que en su composición mostrada en la Figura 2, presenta monosacáridos como fructosa, glucosa; disacáridos como sacarosa y fructosanos (polímeros de fructosa), por esta razón, la levadura tiene un crecimiento similar al de las células crecidas en Inulina. Aunque no se observó actividad debido a la poca concentración de sustrato (Inulina 1%), usada para medir la actividad enzimática.

Por lo que en el siguiente experimento se varió la concentración de sustrato Inulina 6% para determinar la actividad enzimática (Fig.7-7d). En trabajos reportados por Byun and Nahm,1978, utilizan inulina 5% como sustrato en el ensayo de la actividad, obteniendo actividades más altas (0.5 U/ml). El último experimento lo consideramos más completo, por lo que se discuten varios aspectos de él.

En el crecimiento de *K. fragilis*, con medio de inulina, se llega a fase estacionaria a las 24 hrs. de fermentación (12.010mg/ml), en tanto para Jugo de Girasol hasta las 216 hrs., sin embargo, la fase estacionaria se presenta a las 120 hrs.(22.757 mg/ml) en la Figura 8. Se considera que el Jugo de Girasol es una buena fuente de carbono para el crecimiento de *K. fragilis*.

Al seleccionar al Jugo de Girasol como materia prima, se pensó en que éste permitiera a las células de *K. fragilis*, crecer en este medio y que fuera capaz de producir la enzima de interés. Por lo que se determinó la concentración de azúcares en el medio de fermentación, se encontró que la fermentación en Inulina, los azúcares totales decrecen conforme al tiempo, en tanto los azúcares reductores aumentan durante cierto tiempo, con esto podemos decir que conforme se van consumiendo los azúcares totales hay liberación al medio de azúcares reductores que sirven como fuente de carbono para soportar el crecimiento, aunque se presenta una menor velocidad de crecimiento (Fig. 8a.).

El efecto que tiene el pH en la actividad de inulinasa y el tiempo de reacción se observa que para células crecidas en Inulina, la actividad es más estable que las obtenidas en Jugo de Girasol, siendo a pH 3 (Fig. 8b.), cuando se presentan actividades más bajas en comparación a pH 5 (Fig. 8d). A pH 3 para las células de inulina a 15 y 30 minutos de reacción no cae la actividad por lo que se puede decir que es más estable. En tanto para las células crecidas en J. Girasol, a pH 3 las actividades son bajas y decrecen con el tiempo de reacción .A pH 5 se obtienen actividades más altas y bajan con el tiempo de reacción. Además, que las actividades en Jugo de Girasol son diferentes que las de Inulina. Por lo que el Jugo de Girasol, si induce la actividad de inulinasa pero a diferentes tiempos (Fig. 8b y 8c).

Con respecto a la concentración de extracto crudo de proteína (Fig. 8f), es lógico pensar que en medio de J. Girasol se van a encontrar mayores concentraciones que en el medio de Inulina, ya que como se mencionó anteriormente como es un medio complejo que va a inducir a la producción de un sistema multienzimático. En tanto la

actividad con extracto crudo de proteína (enzima), se obtienen actividades más altas a los 15 minutos de reacción para ambos grupos (Fig. 8g), siendo mayores las actividades con Inulina a las 24 hrs. y para Jugo Girasol se presenta la máxima a las 144 hrs. Se encontraron actividades más altas con la enzima para los dos grupos, para inulina en un tiempo de fermentación máximo de 24 hrs. y para Jugo de Girasol de 120 y 144 hrs. de fermentación, no siendo necesario seguir la fermentación por más tiempo.

La Inulina empleada en este trabajo como medio de cultivo, es un medio definido, en el cual las células crecen y sintetizan a la enzima (β -fructofuranosidasa), en tanto para la producción de enzima con células de Jugo de Girasol, como es un medio complejo, las células crecen consumiendo primero los monosacáridos, disacáridos y finalmente polímeros de fructosa (Bacon and Edelman, 1950), y por lo tanto sintetizando quizá no únicamente una enzima sino varias, por lo que la producción de dos o más enzimas simultáneamente en lugar de sólo una en el experimento anterior, es una carga metabólica para la levadura. De ahí que es muy probable que los rendimientos en la producción de la enzima puedan tener caídas o se vean afectados.

En algunos reportes sobre esta levadura se encontró que puede actuar tanto sobre sacarosa como sobre inulina (Negoro, 1978; Vandame and Dedrycke, 1983). La fructosa es mejor inductora en la producción de la inulinasa que la sacarosa, por lo que esto se debe seguramente a que los azúcares pequeños presentan represión catabólica, efecto que ha sido reportado por Grootwassink and Hewitt (1983), por lo que para utilizarse como fuente de carbono o inductor, sería necesarios emplearlos en muy bajas concentraciones.

Para producir fructosa a partir de inulina por hidrólisis enzimática se requiere de un biocatalizador que catalice dicha reacción como puede ser células o enzimas con actividad de inulinasa, cuya obtención a partir de caldos de fermentación de la levadura *K. fragilis*, fue uno de los objetivos de este trabajo. La bibliografía reporta

que la actividad de inulinasa se encuentra asociada a la membrana de la célula (Lam and Grootwassink, 1985), lo cual se comprobó mediante la determinación de actividad enzimática en células durante el curso de la fermentación. Como la inulinasa es un metabolito asociado al crecimiento celular, siempre y cuando sea inducida desde el principio, es importante la obtención de una mayor cantidad de biomasa, tanto para obtener la enzima libre como la unida a la célula.

1. El Jugo de Girasol (*H. annuus*), contiene una mezcla de monosacáridos, disacáridos y polifruetosanos.
2. El mejor medio para el crecimiento de *K. fragilis* es el Jugo de Girasol en comparación al de Inulina.
3. En medio de Inulina el tiempo de fermentación es menor (24 hrs.), que para Jugo de Girasol (120 hrs.).
4. Las células crecidas en Jugo de Girasol e Inulina presentan actividades de inulinasa altas a pH 5 y a tiempos cortos.
5. La enzima libre sintetizada en Jugo de Girasol a las 144 hrs. de fermentación es más alto que para la enzima generada en Inulina 24 hrs. Por lo que se muestra que son sistemas diferentes entre sí.
6. La actividad de Inulinasa es más alta en extracto crudo de proteína (enzima), que en células.

- Allais J-J.; Kammoun S.; Blanc P.; Guiraud C. and Baratti J.C.1987. Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Appl. and Env. Microbiol.* 52(5): 1086-1090.
- Aspinall G.O.1970. *Polysaccharides*. Pergamonn Press. Oxford,Great Britain.
- Azhari R.;Szlak,A.M.;Ilan E.;Sideman S.1989. Purification and Characterization of endo- and exo-Inulinase. *Biotech. and Appl. Biochem* 11: 105-117.
- Bacon J.S.D. and Edelman J. 1950. The carbohydrates of the Jerusalem Artichoke and other compositae. *Biochem.J.* 48: 114-126.
- Barford H.C.1981. Production of Enzymes by fermentation. *Essays in Appl. Microbiol.* 1:25.
- Bell D.J. and Palmer A. 1952. Structural studies on Inulin from *Inula helenium* and on Levans from *Dactylis glomerata* and *Lolium italicum*. *J. Chem. Soc.* : 3763-3770.
- Boyer, P. 1971. *The Enzymes*. Academic Press. New York.
- Byun S.M., and Nahm B.H. 1978. Production of Fructose from Jerusalem Artichoke by Enzymatic Hydrolysis. *J. Food Science.* 43(6): 1871-1873.
- De Stefanis, 1968. Separation of sugars by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 34: 116-120.
- Devlin R.M. 1982. *Fisiología Vegetal*. Omega. 4a.Edic. España.
- Dubois M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A. and Smith F. 1948. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356.
- Duvnjak Z. and Koren W.D. 1987. Production of fructose syrup by selective removal of glucose from hydrolyzed Jerusalem Artichoke Juice. *Biotech. Lett.* 9 (11): 783-788.
- Edelman J. and Bacon J.S. 1950. The Action of a Hydrolytic Enzyme System from *H. tuberosus L.* on Carbohydrates Present in the tubers. *Biochem.* 49: 446-453.
- Edelman J. and Bacon J.S.D. 1951. The action of a hydrolitic enzyme system from *H. tuberosus L.* on carbohydrates present in the tubers. *J. Biochem.* 49: 446-453.

- Edelman J. and Dickerson A.G. 1960. The metabolism of fructose polymers in plants. *Biochem. J.* 98: 787-794.
- Efstathiou I.;Reyssset G. and Nicole T. 1986. A study of Inulinase Activity in the *Clostridium acetobutylicus* strain. *Appl. Microbiol. Biotech.* 25 (8): 143-149.
- Fucikousky Z.L. 1976. Enfermedades y plagas del Girasol en México. Colegio de Postgraduados. Esc. Nac. Agric.
- Garduño A. 1973. El Girasol. *Tecnología de Alimentos.* 8(4):25-36
- Gola G. 1965. Tratado de Botánica. Labor. 2a.Edic. España.
- González R.L.; Muller P.; Cuevas R.G. 1971. Alternativas para el cultivo del Girasol en México. Mundi Prensa. España
- Grootwassink J.W., and Fleming S.E. 1980. Non specific β -fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis* batch and continuous fermentation simple recovery method and some industrial properties. *Enzyme and Microb. Technol.* 2: 45-53.
- Grootwassink J.W.,and Hewitt G.M. 1983. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulase) in batch and continuous cultures of the yeast *K. fragilis*. *J. of General Microbiol.* 129: 31-41.
- Guiraud J.P., Bernit and Galzy P. 1980. Enzymatic hydrolysis of plant extract containing inulin. *Enzyme Microbiol. Technol.* 3: 305-308.
- Guiraud J.P., Daurelles J. and Galzy P. 1981. Alcohol Production from Jerusalem Artichoke Using Yeast with Inulinase activity. *Biotech. and Bioeng.* 23: 1461-1465.
- Guiraud J.P.; Bernit C. and Galzy P. 1983. Inulinase of *Debaryomyces cantarellii*. *Folia Microbiol.* 27: 19-24.
- Gupta K. A.; Nagpal B.; Kaur N. and Sing R. 1988. Mycelial and Extracelular Inulinases from *Fusarium oxysporum* Grown on Aqueous Extract of *Cichorium intybus* Roots. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 42: 69-76.
- Heiser, B.C. 1951. The Sunflower. University of Oklahoma Press Norman.
- Hernández Coria, Rocío Imelda. 1978. Obtención de harina y concentrado proteínico de semillas de girasol. QFB.Tesis UNAM.

Hirst E.L., McGilvray D.I and Percival E.G.V. 1950. Studies on fructosanas Inulin from *Dahlia tubers*. J. Chem. Soc.: 1297-1302.

Kim H.C. and Rhee K.S. 1989. Fructose production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin. Biotech. Lett. 11(3): 201-206.

Lam K.S and Grootwassink J.W. 1985. Efficient, nonkilling extraction of β -D-fructofuranosidasas (and exoinulinase) from *K. fragilis* at high cell Density. Enzyme Microb. Technol. 7: 239-242

Livingston D.P. 1990. Fructan Precipitation from a Water/Ethanol Extract of Oats an Barley. Plant Physiol. 92: 767-769.

Lowry O.H.; Rosebrough N.J.; Farr L.A.,and Randall R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Manzoni M. and Cavazzoni V. 1988. Extracelular from Inulinase four yeast. Technol. 21: 271-274.

Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent from Determination of Reducing Sugar. Annal. Chem. 31(3): 426-428.

Murkerjee K. and Sengupta S. 1987. Purification and properties of o nonspecific β -fructofuranosidasa (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceeus*. Can. J. Microbiol. 33: 520-540.

Negoro H., and Kito E: 1973. β -fructofuranosidase from *Candida kefyri*. J. Ferment. Technol. 51: 96-102.

Negoro H. 1978. Inulase from *K. fragilis*. J. Ferment. Technol. 56(2): 102-107.

Newth F. H. 1951. The formation of furan compounds from hexoses. Advan. Carbohydr. Chem. 6: 84-95.

Parekh S.R. and Margaritis A. 1986. Technical note: Application on immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* for continuous hydrolisis to fructose of fructans in Jerusalem artichoke extracts. J. of Food Technol. 21: 509-515.

Phaff, H.J. 1985. Biology of yeast other than Saccharomyces. Biology of industrial microorganisms. Edited. Arnold L. Demain and Nadine A. Solomon. The Benjamin/cummings publishing comp. Inc. California.

Rakoff H. and Rose N.C. 1966. Organic Chemistry. The Macmillan Company. USA

- Rutherford P.P. and Deacon A.C. 1972. The Mode of Action of Dandelion Root β -fructofuranosidase on Inulin. *Biochem. J.* 129: 511-512.
- Rutherford P.P and Weston E.W. 1968. Carbohydrate Change During Cold Storage of some Inulin-containing Roots and Tubers. *Phytochemistry.* 7: 175-180.
- Rouwenhorst R.J. 1988. Production distribution and kinetics proprieties of inulinase in continuous cultures of *K. marxianus*. *Appl. and Env. Microbiol.* 54(5): 1131-1137.
- Scriban, 1985. *Biotechnología. El Manual Moderno.* 4a.edic. México.
- Snyder H.E. and Phaff H.J. 1960. Studies on a β -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antoinie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 26:433-452.
- Snyder H.E. and Phaff H.J. 1962. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragiliis* on inulin. *J. of Biol. Chem.* 237(8): 2438-2441.
- Vandame J.E. and Dedrycke G.D. 1983. Microbial Inulinase: Fermentation process, properties and Applications. *Adv. in Appl. Microb.* 29: 139-176.
- Van-Rij Kreger, N.J. 1984. The yeast a taxonomic study. 3rd edition. Elsevier Amsterdam.
- Verstraten L.M. 1967. D-fructose and its derivates. *Adv. Carbohyd. Chem.* 22: 230-249.
- Workman W.E.; and Donal D. 1983. Purification and properties of the β -fructofuranosidasa from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Letters* 160(1): 16-20.

A N E X O

Tabla II. Crecimiento celular de *K. fragilis*, en dos medios de cultivo*.

Tiempo Hrs.	Inulina (mg/ml)		J. Girasol (mg/ml)	
	X	± D.S	X	± D.S
0	0.354	0.029	0.377	0.024
3	1.153	0.244	0.701	0.309
6	5.973	2.733	3.918	0.377
9	9.690	5.175	9.760	3.436
24	13.766	2.755	9.840	1.256
48	15.367	1.085	10.478	1.200
72	17.657	2.944	12.151	2.415
96	19.079	1.809	12.578	2.236

* Inulina 1% ; J. Girasol 1 % Az. Totales.
n=4

Tabla II a. Actividad Enzimática de *K. fragilis*, durante la fermentación.

Tiempo Hrs.	Inulina (U.E)	
	X	± D.S
0	0.031	0.021
3	0.013	0.018
6	0.020	0.028
9	0.064	0.091
24	0.136	0.010
48	0.111	0.007
72		
96		

1 U.E =1 μmol de Az. Red. liberado por mg de células por min.

Tabla III. Crecimiento celular de *K. fragilis*, durante la fermentación.

Tiempo Hrs	Inulina		J.Girasol		*	
	X	± D.S	X	± D.S	X	± D.S
0	0.249	0	0.568	0	0.650	0
3	0.343	0.022	0.867	0	0.800	0.118
6	1.552	0.013	2.582	0	2.381	0.074
9	3.047	0.064	3.730	0.017	3.755	0.017
12	5.316	0.030	5.311	0.980	4.932	0.209
24	18.402	5.972	19.221	2.135	17.229	2.761
48	12.016	0.900	11.114	0	17.229	2.761
72	16.368	0.820	11.829	0.383	10.288	0.181
96	15.593	1.161	8.989	0.115	6.859	0.863
120	13.984	0.275	9.727	2.971	6.859	0.863

* Inóculo en Inulina, fermentación en J. Girasol.

n= 2

Tabla III a. Actividad Enzimática (U.E), de *K. fragilis*, durante la fermentación en medio de Inulina 1 %.

Tiempo Hrs.	15 min.		30 min.		45 min.	
	X	± D.S	X	± D.S	X	± D.S
0	0	0	0.067	0.010	0.030	0.007
3	0.007	0.010	0.033	0.004	0.105	0.042
6	0.015	0	0.341	0.004	0.352	0.038
9	0.150	0.021	0.383	0.021	0.292	0.017
12	0.240	0.021	0.206	0.026	0.192	0.010
24	0.315	0.084	0.311	0.026	0.257	0.003
48	0.300	0.042	0.263	0	0.195	0.028

Tabla IV. Crecimiento celular de *K. fragilis*, en medio de J. girasol (17 mg/ml Az. t.).

Tiempo Hrs.	J. Girasol		
	X	±	D.S
0	0.365		0.004
3	1.660		0.028
6	3.839		0.177
9	5.424		0.166
12	8.443		0.541
24	15.558		1.472
48	21.458		1.913
72	24.561		1.030
96	26.561		1.289
120	27.942		0.347
144	26.791		0.335
168	28.120		1.338
192	26.306		0.085
216	25.217		0.164

n=4

Tabla IV a. Concentración de Azúcares, de *K. fragilis*, durante la fermentación en medio de J. Girasol (17 mg/ml Az. T.).

Tiempo Hrs.	Az. Reductores (mg/ml)		Az. Totales (mg/ml)	
	X	± D.S	X	± D.S
0	0.151	0.039	16.041	1.285
3	0.167	0.007	14.374	2.380
6	0.203	0.016	14.999	1.894
9	0.167	0.022	13.506	2.508
12	0.160	0.036	14.756	1.196
24	0.075	0.027	11.249	1.782
48	0	0	0	0
72	0.114	0.016	13.819	1.372
96	0.134	0.012	13.541	1.125
120	0.075	0.022	14.235	3.018
144	0.111	0.034	14.957	2.280
168	0	0	14.722	1.937
192	0	0	13.159	4.860
216	0	0	14.999	5.188

n=4

Tabla IV b. Actividad Enzimática (U.E), de *K. fragilis*, durante la fermentación en medio de Jugo de Girasol.

Tiempo Hrs.	pH 3		pH 5	
	X	± D.S	X	± D.S
0	0	0	0.168	0.044
3	0.168	0.045	0.122	0.077
6	0.082	0.040	0.257	0.152
9	0.306	0.101	0.108	0.045
12	0.110	0.044	0.069	0.070
24	0.164	0.097	0.045	0.038
48	0.189	0.165	0.254	0.073
72	0.297	0.050	0.241	0.049
96	0.231	0.075	0.028	0.031
120	0.018	0.023	0.117	0.097
144	0.097	0.108	0.251	0.029
168	0.236	0.027	0.444	0.108
192	0.315	0.059	0.087	0.059
216	0.062	0.073		

**Tubo de reacción = 1 mg células + 0.85 ml Inulina(6%) + Buffer de acetatos 0.1 M
pH 3 ó pH 5.**

n=8

Tabla IV c. Concentración de Proteína de *K. fragilis*, durante la fermentación en Jugo de Girasol (17mg/ml Az. T.).

Tiempo Hrs.	J. Girasol ($\mu\text{g/ml}$ Proteína)		
	X	\pm	D.S
3	202.27		9.644
6	345.45		12.855
9	581.81		12.855
12	363.63		12.855
24	886.36		0
48	943.17		16.072
72	1397.72		16.072
96	1852.26		16.072
120	1761.36		48.210
144	1897.72		48.210
168	2159.09		0
192	1431.81		32.138
216	329.54		80.355

n = 2

Tabla IV d. Actividad Enzimática de enzima libre de *K. fragilis*, durante la fermentación en Jugo de Girasol.

Tiempo Hrs.	15 min. (U.E)		30 min. (U.E)	
	X	± D.S	X	± D.S
3	0.738	0.835	1.070	0.260
6	1.255	0.104	0.885	0.313
9	2.141	1.148	1.144	0.156
12	3.100	0.208	1.107	0.104
24	2.731	0.730	1.623	0.313
48	1.698	1.148	1.181	0.209
72	1.476	0.626	1.255	0.104
96	0.880	0.618	1.144	0.364
120	1.550	1.357	1.291	0.260
144	0.443	0.626	0.443	0.626
168	2.141	0.104	0.996	0.052
192	2.805	0.835	2.473	0.052
216	7.235	0.208	4.909	0.260

n=8

Tabla V. Crecimiento celular de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo.

Tiempo Hrs.	Inulina (mg/ml)		J. Girasol (mg/ml)	
	X	± D.S	X	± D.S
0	0.429	0.034	0.469	0.204
3	1.418	0.077	1.360	0.320
6	2.074	0.012	3.412	0.149
9	6.325	0.253	4.841	0.441
12	8.877	0.949	11.096	0.595
24	12.010	0.267	12.099	0.873
48	13.633	0.985	14.708	2.590
72	14.375	0.212	18.286	1.918
96	15.132	0.847	20.959	1.856
120			22.757	1.627
144			24.845	1.184
168			25.728	0.813
192			26.017	1.010
216			26.495	0.561

n=4

Tabla V a. Concentración de Azúcares Reductores de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo.

Tiempo Hrs.	Inulina (mg/ml)		J.Girasol (mg/ml)	
	X	± D.S	X	± D.S
0	1.380	0.074	3.328	0.030
3	2.084	0.118	3.690	0.191
6	4.230	0.092	3.729	0.296
9	4.621	0.128	1.065	0.055
12	4.344	0.132	0.874	0.031
24	1.621	0.134	0.904	0.050
48	0	0	0.871	0.117
72	0	0	0.792	0.042
96	0	0	0.923	0.104
120			0.907	0.079
144			0.845	.073
168			0.756	0.170
192			0.358	0.060
216			0.345	0.067

n=4

Tabla V b. Concentración de Azúcares Totales de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo.

Tiempo Hrs.	Inulina (mg/ml)		J. Girasol (mg/ml)	
	X	± D.S	X	± D.S
0	15.392	7.531	15.021	2.130
3	7.863	2.038	19.732	0.121
6	7.937	5.177	18.879	0.186
9	7.492	8.313	12.017	2.673
12	3.634	5.037	4.673	2.460
24	0	0	4.895	0.794
48	0	0	5.785	0.209
72	0.445	0.629	7.343	4.035
96	0.296	0.593	7.751	3.291
120			5.229	3.448
144			9.079	6.714
168			4.079	4.717
192			4.413	0.142
216			4.228	0.191

n=4

Tabla V c. Actividad Enzimática de células libres de *K.fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo a pH 3.

Tiempo Hrs.	Inulina (U.E)		J. Girasol (U.E)	
	15 min. X ± D.S	30min. X ± D.S	15 min. X ± D.S	30 min. X ± D.S
0	0.000 0.057	0.000 0.123	0.055 0.009	0.006 0.012
3	0 0	0.187 0.014	0.489 0.070	0.139 0.017
6	0.065 0.045	0.276 0.091	0.533 0.022	0.130 0.051
9	0.247 0.167	0.342 0.062	0.009 0.007	0.070 0.052
12	0.265 0.182	0.354 0.113	0 0	0.001 0.002
24	0.423 0.104	0.422 0.025	0.484 0.177	0.023 0.027
48	0.354 0.130	0 0	0.629 0.045	0.117 0.031
72	0.450 0.018	0 0	0.647 0.140	0.281 0.031
96	0.363 0.042	0.031 0.040	0.782 0.062	0.266 0.045
120			0.326 0.077	0.049 0.052
144			0.306 0.046	0.081 0.013
168			0.277 0.023	0.022 0.022
192			0.345 0.049	0.148 0.026
216			0.024 0.030	0.195 0.079

n=4

Tabla V d. Actividad Enzimática de células libres de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo a pH 5.

Tiempo Hrs.	Inulina (U. E)		J. Girasol (U.E)	
	15 min. X ± D.S	30 min. X ± D.S	15 min. X ± D.S	30 min. X ± D.S
0	0.000 0.000	0.000 0.000	0.004 0.009	0.002 0.004
3	0.740 0.086	0.094 0.041	0.029 0.046	0.014 0.011
6	0.563 0.088	0.065 0.019	0.202 0.009	0.309 0.056
9	0.250 0.084	0.083 0.029	0.092 0.098	0.110 0.007
12	0.348 0.225	0.157 0.131	0.043 0.055	0.164 0.039
24	0.343 0.221	0.153 0.087	0.248 0.291	0.041 0.076
48	0.021 0.027	0.004 0.009	0.158 0.153	0.023 0.034
72	0 0	0 0	0.407 0.048	0.106 0.013
96	0.019 0.039	0.008 0.013	0.758 0.061	0.212 0.102
120			0.128 0.107	0.007 0.009
144			0.219 0.253	0.082 0.096
168			0.231 0.268	0.060 0.103
192			0.201 0.043	0.072 0.010
216			0.443 0.060	0.039 0.004

n= 4

Tabla V e. Concentración de Proteína de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo.

Tiempo Hrs.	Inulina (µg/ml)			J. Girasol (µg/ml)		
	X	±	D.S	X	±	D.S
0	54.545		2.624	54.545		2.624
3	107.954		45.925	122.000		13.266
6	124.999		13.121	267.000		82.065
9	164.772		32.803	270.000		67.606
12	579.545		39.364	297.000		91.294
24	825.000		136.991	374.999		13.121
48	955.000		156.950	738.635		91.851
72	1555.000		227.082	1147.726		275.553
96	1535.000		112.398	1602.172		747.931
120				1795.454		603.593
144				2102.272		774.174
168				1715.909		39.364
192				1681.772		26.295
216				1579.545		65.607

n=2

Tabla V f. Actividad Enzimática de enzima libre de *K. fragilis*, durante la fermentación en dos medios de cultivo, a pH 5.

Tiem- po Hrs.	Inulina (U . E)		J. Girasol (U . E)	
	15 min. X ± D.S	30 min. X ± D.S	15 min. X ± D.S	30 min. X ± D.S
0	1.690 0.975	0.000 0	0.347 0.469	1.13 0.402
3	4.161 0.943	0.000 0	1.978 0.927	1.66 0.454
6	6.891 0.138	0.074 .094	2.282 0.254	1.44 0.298
9	8.170 0.113	0.024 .049	2.038 0.190	1.59 0.344
12	6.863 0.875	2.337 .523	2.188 0.000	1.59 0.269
24	12.3060.905	3.208 .170	3.829 2.720	7.36 0.487
48	9.795 .139	4.451 1.93	5.211 0.530	6.74 0.446
72	8.036 .190	1.441 .910	12.63 1.402	12.83 2.832
96	8.122 .626	0.743 .474	11.19 2.025	10.06 1.558
120			18.05 1.382	16.64 1.442
144			20.27 2.367	15.26 0.841
168			23.38 3.266	21.06 2.329
192			8.357 4.420	7.23 4.847
216			13.92 1.498	11.99 1.178

n=2