



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA
960 DE NOVOZYME COMO BIOCATALIZADOR PARA LA
HIDRÓLISIS DE INULINA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA:

MARIANA MORELOS LÓPEZ



CDMX.

2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Eduardo Bárzana García
VOCAL: Profesor: Dr. Óscar Hernández Meléndez
SECRETARIO: Profesor: Dra. Carmina Montiel Pacheco 1er.
SUPLENTE: Profesor: Dr. Javier Axosco Marín
2° SUPLENTE: Profesor: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E", Facultad de Química,
Circuito de Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Mariana Morelos López

AGRADECIMIENTOS

Por el financiamiento a DGAPA UNAM proyecto PAPIIT IA204118, PAPIIT IN219520
Facultad de Química PAIP 5000-9153 y a la beca del Sub-Programa 127 Formación básica
en investigación

Contenido

Resumen	6
Antecedentes	7
1. Fructanos.....	7
1.1 Inulina	10
1.2 Fructooligosacáridos	12
2. Chicoria como fuente de inulina.....	14
3. Inulinasas	16
4. Inmovilización enzimática	20
4.1 Técnicas de inmovilización enzimática	21
4.1.1 Adsorción	21
4.1.2 Unión covalente.....	22
4.1.3 Inmovilización por afinidad	23
4.1.4 Atrapamiento	24
4.1.5 Método de SOL-GEL.....	24
4.1.5 Inmovilización por atrapamiento en SOL-GEL	27
5. Hipótesis	29
6. Objetivo General.....	29
Objetivos particulares.....	29
7. Materiales y métodos	30
7.1. Materiales	30
7.2. Métodos	30
7.2.1 Determinación de la concentración de proteína	30
7.2.2 Caracterización de la enzima libre Novozym 960	30
7.2.2.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de Novo 960 en la hidrólisis de inulina	30
7.2.2.2 Efecto del pH en la hidrólisis de inulina catalizada por la mezcla comercial Novozym 960	31
7.2.3 Inmovilización por atrapamiento en sol-gel.....	31
7.2.3.1 Actividad en función del tiempo de maduración	32
7.2.3.2 Ciclos de reuso	32
7.2.3.2 Termoestabilidad	32
8. Resultados y discusión	34
8.1 Cuantificación de proteína.....	34

8.2 Determinación de la mejor temperatura de reacción.....	34
8.3 Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa de Novo 960	37
8.4 Tiempo de maduración del sol-gel	38
8.4.1 Inmovilización enzimática.....	39
8.4.2 Ciclos de reuso	42
8.4.3 Termoestabilidad	44
9. Conclusiones.....	46
10. Perspectivas	47
Referencias	48

Resumen

La achicoria (*Chicorium intybus*) es una planta herbácea perenne, de la familia de las Asteráceas. Puede alcanzar un metro de altura y tiene una raíz profunda cónica, gruesa y pivotante. Sus raíces son una fuente de inulina, en donde se encuentra en una concentración de 15-18% aproximadamente. Estas raíces son la principal fuente de materia prima para la producción de inulina a nivel mundial.

La inulina está constituida por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -(2 \rightarrow 1) fructosil-fructosa. Las cadenas de fructosa terminan en una unidad de glucosa unida por un enlace α -(1,2) (residuo -D-glucopiranosil), pero el monómero terminal de la cadena también puede corresponder a un residuo β -D-fructopiranosil.

Los derivados de inulina con mayor potencial a nivel industrial además de ésta son; la fructosa, para la producción de jarabes de alta fructosa, ya que el proceso tradicional a partir de almidón involucra, altas temperaturas y al menos dos pasos enzimáticos para su producción obteniéndose rendimientos menores al 50%. Mientras que el proceso a partir de inulina sólo involucra un paso enzimático, temperaturas moderadas y se obtienen rendimientos superiores al 90%. Otro derivado de la inulina son los fructooligosacáridos (FOS), estos se caracterizan por poseer un enlace β -(2-1), un grado de polimerización de 2 a 10 unidades y presentan una estructura predominantemente lineal. Los fructooligosacáridos se consideran como prebióticos debido a que son hidrolizados por las bacterias presentes en la parte inferior del tracto intestinal y aportan un contenido calórico reducido (1,5 Kcal/g).

La mezcla de inulinasas 960 de NOVOZYME proveniente de *Aspergillus Niger* son enzimas que pertenecen a la familia de las fructosil hidrolasas, encargada de hidrolizar los enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa en la inulina generando fructosa y glucosa como productos, estas enzimas pueden tener una funcionalidad de exo o endo hidrolasas.

El objetivo del presente proyecto es inmovilizar mediante atrapamiento en sol-gel a la inulinasa de NOVO 960, para llevar a cabo la hidrólisis de inulina de chicoria, y determinar las mejores condiciones a las cuales se debe llevar a cabo la hidrólisis.

La inmovilización se llevó a cabo utilizando el proceso del sol gel el cual implica una solución coloidal (sol) que actúa como precursor de una red de polímeros reticulados.

Este sol es un alcóxido formado a partir de tetrametilortosilicato. En esta técnica la

inulinasa de NOVO 960 es colocada en el precursor para posteriormente iniciar la polimerización y atrapar a la enzima en la red polimérica, obteniendo un material sólido el cual es adecuado para llevar a cabo la hidrólisis de la inulina de chicoria y permitiendo su reutilización.

Antecedentes

1. Fructanos

Los fructanos son carbohidratos no reductores formados por unidades fructosil-fructosa generalmente con una unidad terminal de glucosa (Wang, *et. al.*, 1999). Se clasifican en cinco grupos: inulinas, levanas, graminanos, neoseries de inulina y neoseries de levana. Las inulinas consisten en cadenas lineales de unidades de fructosa unidas por un enlace β -(2-1); las levanas consisten en unidades de fructosa unidas por enlaces β -(2-6); los graminanos son polisacáridos generalmente ramificados con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) con un residuo inicial de glucosa; las neoseries de inulina presentan una estructura lineal con enlaces β -2-1 y además contienen un residuo de glucosa intermedio con enlaces en el carbono 1 y 6 y las neoseries de levana son estructuras lineales con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) donde en cada extremo de una molécula de sacarosa central hay un residuo fructofuranosil (Figura 1). (López, *et. al.* 2007: Ritsema y Smeekens, 2003; Waleckx, *et. al.*, 2008)

Además de la clasificación descrita anteriormente, existe un sexto grupo de fructanos denominado Agavinas, las cuales en realidad son una mezcla de graminanos y neofructanos. Este tipo de fructanos se encuentran predominantemente en plantas del género Agave, el cual se localiza principalmente en México, país que es considerado el centro de origen y diversidad biológica del Agave debido a la diversidad taxonómica de esta especie, ya que se han localizado en el país 272 de las 310 especies reportadas en este país (Sosa-Herrera, *et al.*, 2016). Mancilla-Margalli y López (2006) proponen tres tipos de fructanos para las especies de Agave y Dasyilirion pertenecientes a la familia Agavaceae: los graminanos y los neofructanos (Agavinas) y los subdividen en tres grupos donde $n_1-n_4 \geq 0$ y n depende la especie y las condiciones ambientales. (Figura 2).

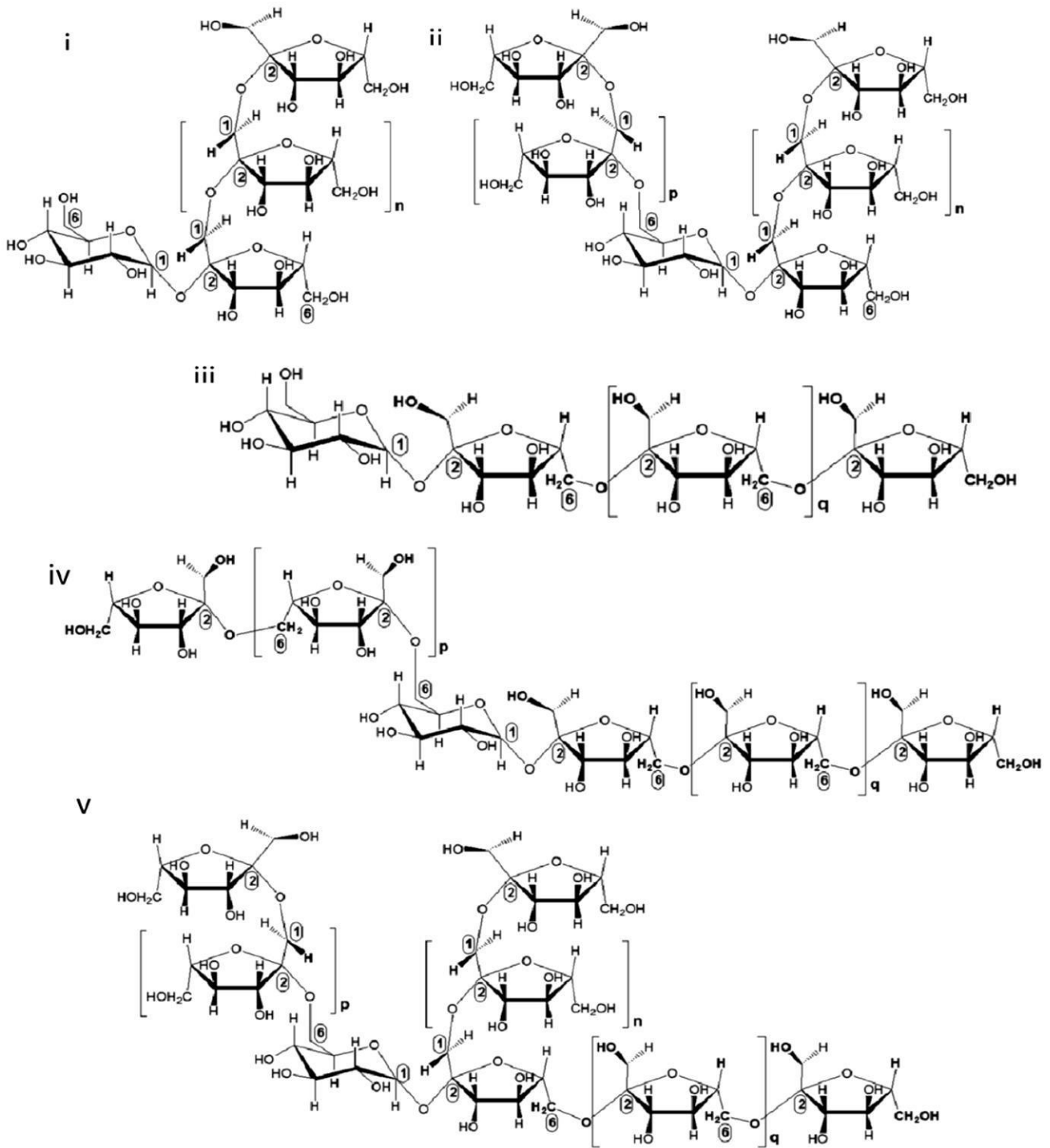


Figura 1. Tipos de fructanos: i) Inulina ii) levano iii) graminanos iv) neo-inulina y v) neo-levana (Adaptado de Waleckx y col., 2008).

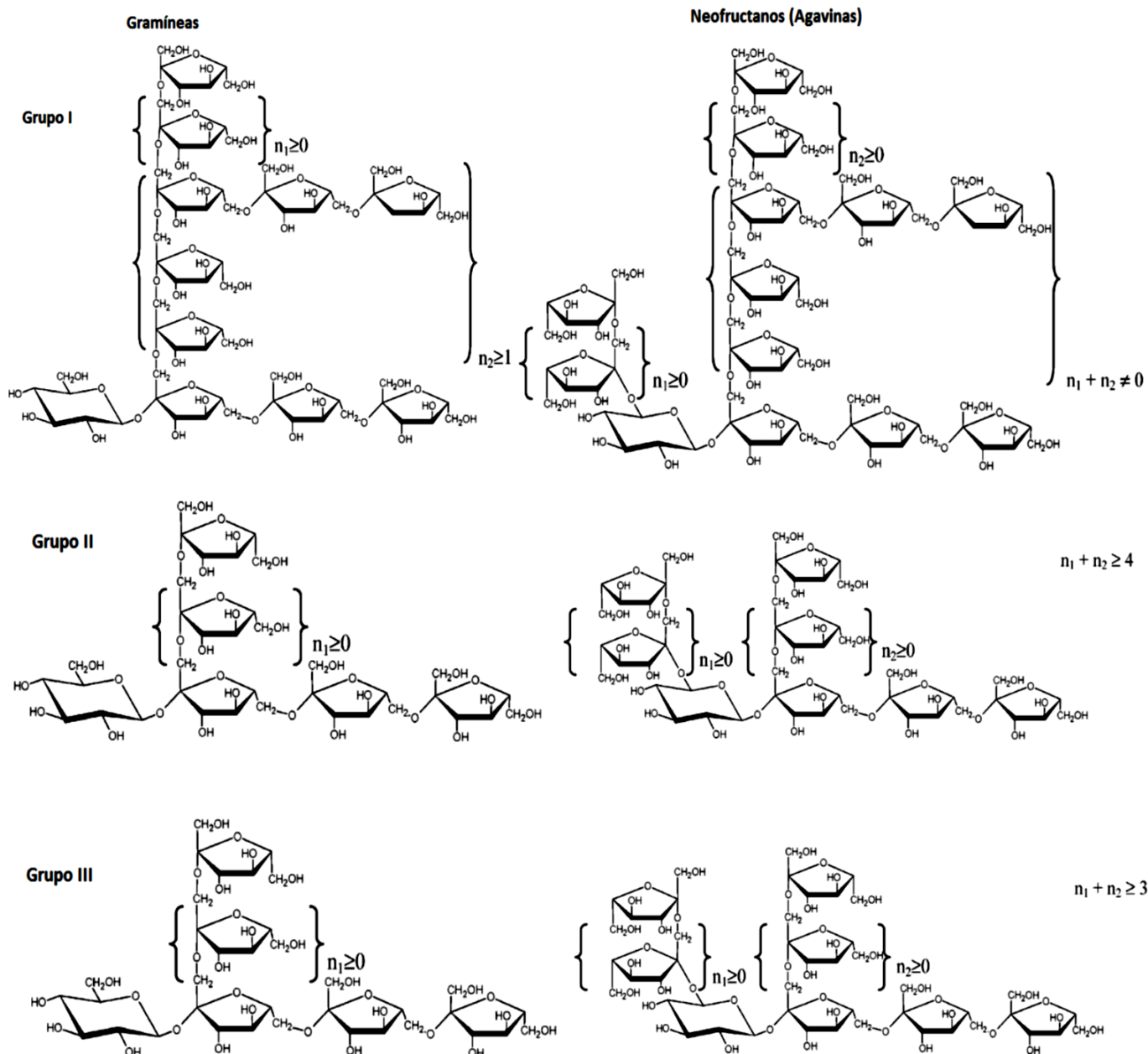


Figura 2. Estructuras propuestas para las especies Agave y Dasyllirion, en base a la estructura molecular se presentan tres grupos y dos tipos de fructanos. (A Gaminanos y B Agavinas) (Mancilla-Margalli y López, 2006).

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos más abundantes no estructurales presentes en la naturaleza (Sosa-Herrera, *et al.*, 2016). Son sintetizados por plantas y bacterias; la función de los fructanos en las plantas es actuar como carbohidratos de reserva, regular la concentración de sacarosa en la vacuola y ayudar a resistir el estrés por sequía o frío (Vijn y Smeekens, 1999); los fructanos producidos por bacterias, los cuales han sido

descritos como extracelulares, brindan protección contra la desecación, la fagocitosis, la depredación por protozoos, el ataque de fagos, antibióticos, toxinas y estrés osmótico (Sosa-Herrera, *et al.*, 2016).

A nivel industrial las principales fuentes de fructanos son, la chicoria (*Cichorium intybus*) y la alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*) (Carabin y Flam, 1999). Estos son utilizados como ingrediente alimenticio de bajo nivel calórico además de funcionar como edulcorantes o como sustitutos de grasas; también han demostrado propiedades prebióticas como son inhibir el desarrollo de cáncer de colón y la disminución de triglicéridos y colesterol en la sangre (Vijn y Smeekens, 1999).

1.1 Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva producido por plantas vegetales y cereales. Es encontrado en aproximadamente 36,000 especies de plantas pertenecientes a las familias de las asteráceas (ej. girasol, achicoria, caléndula, etc.), campanuláceas (ej. Campanilla, lobelia, flor de globo, etc.), gramíneas (ej. Caña de azúcar, trigo, arroz, bambú, etc.) y liliáceas (ej. Tulipán, Lirio y Azucena) (Marchetti, 1993). Las especies con mayor contenido de inulina la almacenan en la parte subterránea de la planta como un carbohidrato de reserva que permite a la planta resistir condiciones de estrés; en la tabla 1 se observa el contenido de inulina en algunas plantas comestibles.

Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales.

Especie vegetal	Inulina (g/100g base seca)
Pataca (<i>Helianthus tuberosus</i>)	89
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	79
Raíz de Dalia (<i>Dahlia spp.</i>)	59
Cebolla (<i>Allium cepa L.</i>)	48
Ajoporro (<i>Allium porrum L.</i>)	37
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	29
Yacón (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	27
Espárrago (<i>Asparragus officinalis L.</i>)	4
Cambur (<i>Musa cavendishii</i>)	2
Centeno (<i>Secale cereale</i>)	1

(Madrigal y Sangronis, 2007)

La inulina fue aislada por primera vez en 1804 por un científico alemán de apellido Rose, a partir de la *Inula Helenium*; este compuesto se caracteriza por ser una estructura lineal formada por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa con un residuo terminal de glucosa unido por un enlace α -(1-2) (Figura 3.)

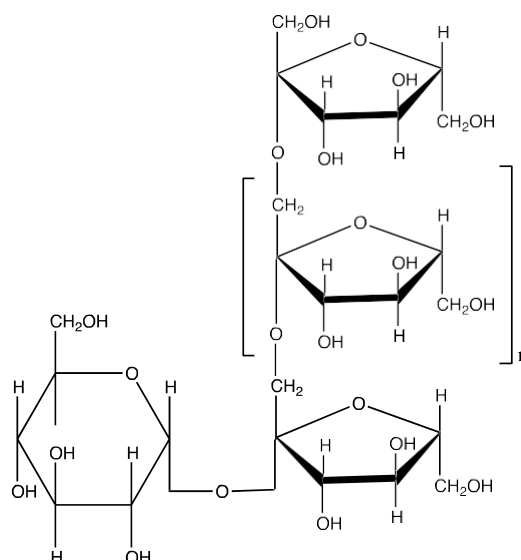


Figura 3. Estructura de la inulina. (Olvera, Castillo y López-Munguía2007).

Dependiendo de la cantidad de unidades de fructosa unidas al residuo terminal será el grado de polimerización de la molécula, por lo general en el caso de la inulina este varía de 2 a 60 unidades (Singh, *et.al.*, 2016). La inulina y los derivados provenientes de su hidrólisis se clasifican GRAS (Generally Regarded as Safe) por la FDA. Esta designación se otorga a las sustancias adicionadas a los alimentos las cuales según los expertos son seguras y están exentas de los requerimientos usuales para los aditivos de alimentos, debido a sus propiedades nutricionales, así como sus cualidades prebióticas, ya que funge como alimento para la microbiota presente en el intestino grueso, lo que reduce los triglicéridos y colesterol (Davidson, *et al.*, 1998). También confiere un incremento significativo en la absorción de calcio y magnesio en el intestino y aporta un bajo nivel calórico (Roberfroid, 1999). A escala industrial la inulina se extrae principalmente de la dalia, la alcachofa y la chicoria, siendo esta última la más común (Singh, *et al.*, 2016), el producto se maneja como un polvo blanco, sin olor y con sabor neutral.

Entre las características fisicoquímicas de la inulina encontramos que en su forma nativa

(mezcla de cadenas largas y cortas) contiene azúcares libres (glucosa, fructosa y sacarosa) que le confieren dulzor (10% del dulzor de la sacarosa) (Franck, 2002). La inulina de cadenas largas o de alta pureza (HP) mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa como estabilizante, debido a que aporta una mayor viscosidad. También se le atribuye la capacidad de formar geles, mediante un mecanismo en el cual las moléculas del polisacárido de inulina se agrupan induciendo la formación de agregados cuando se encuentran dispersas en agua (Kim, *et al.*, 2001). La oligofructosa, un derivado de la inulina se obtiene como un jarabe viscoso (75% materia seca) e incoloro, que posee una mayor solubilidad y dulzor que la inulina, y demuestra propiedades tecnológicas similares a la sacarosa y al jarabe de glucosa (Roberfroid, M. 2005; Crittenden, R. 1996).

1.2 Fructooligosacáridos

Los fructooligosacáridos (FOS) son carbohidratos de reserva considerados como uno de los principales grupos de prebióticos debido a sus propiedades bifidogénicas (Singh, *et al.*, 2016). Los FOS estimulan el crecimiento de bifidobacterias y *Lactobacillus sp.* en el colón; como resultado de su degradación se producen ácidos grasos de cadena corta como el acético, el propionico y el butírico los cuales disminuyen el pH del colón y mejoran la absorción de minerales (Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Scholz-Ahrens, *et al.*, 2007; Tazoe y Kaji, 2008). Los FOS poseen menor intensidad de dulzor, aproximadamente un tercio del dulzor de la sacarosa, lo que los convierte en un buen endulzante para los pacientes diabéticos (Sangeetha, *et. al.* 2005), también poseen bajo valor calórico (1.5 Kcal/g) comparados con los carbohidratos comúnmente utilizados (4 Kcal/g); y se han reportado propiedades hipocolesterolémicas e hipolipidémicas, así como no generar caries (Katapodis, *et. al.*, 2004).

Los FOS se encuentran en varias plantas, frutas y cereales como la cebolla, el ajo, el plátano y algunos cereales. Su estructura depende de la fuente que se obtengan, y pueden ser tres: extracción de plantas ricas en inulina, por síntesis enzimática a partir de la sacarosa y por hidrólisis enzimática de la inulina (Rastall, 2010; Panesar, *et. al.*, 2014). La estructura general de los FOS puede representarse de la forma GF_n o F_n , donde G y F se refieren a la glucosa y fructosa respectivamente y n al número de unidades fructosilo (Figura 4) (Singh y Singh, 2010; Crittenden y Playne, 1996). Los FOS obtenidos a partir de la inulina poseen enlaces β -

(2-1) como la 1-kestosa, la nistosa, y la fructofuranosil nistosa, en cambio aquellos obtenidos a partir de la sacarosa (neo-FOS) presentan enlaces β -(2-6) como la neokestosa (Mabel, *et al.*, 2008). Los FOS obtenidos a partir de la inulina presentan un alto grado de polimerización (DP<9) en comparación a los obtenidos de la sacarosa (DP<4) (Singh, *et al.*, 2016). En la tabla 2 se muestra una comparación entre fructooligosacáridos obtenidos a partir de inulina y de sacarosa y se puede observar las diferencias entre grado de polimerización.

Tabla 2. Comparación entre inulina, oligofruktosa y fructooligosacáridos. Tabla modificada de Madrigal, L. y Sangronis E. (2007).

Origen	Inulina de chicoría	Oligofruktosa a partir de hidrólisis enzimática de inulina	FOS a partir de transfructosilación de sacarosa
Grado de polimerización	2-60	2-9	2-4
Estructura química	Lineal (1-2% ramificación)	Lineal	Lineal

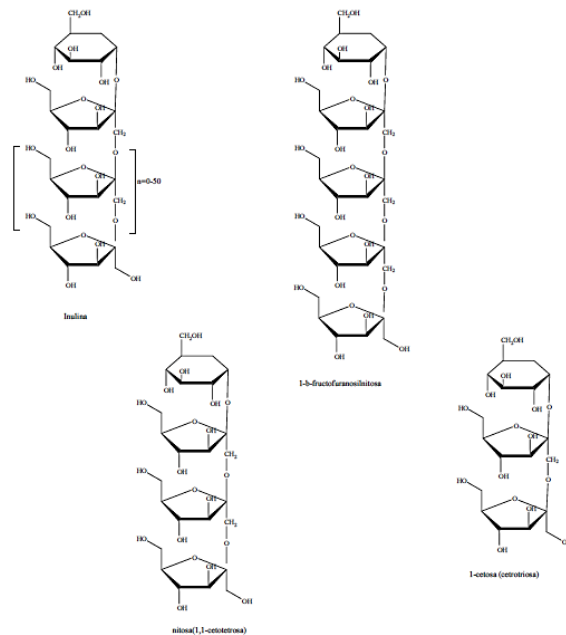


Figura 4. Estructuras generalizadas de algunos fructooligosacáridos. Montani, M. 2004.

Debido a las características mencionadas anteriormente la importancia de los oligofructanos a nivel industrial ha ido en aumento y se exploran nuevas formas de síntesis que disminuyan costos y al mismo tiempo arrojen mayores rendimientos.

2. Chicoria como fuente de inulina

El género *cichorium* (Asteraceae) consiste en seis especies distribuidas en diferentes áreas de Europa y Asia (Bais y Ravishankar, 2001). La chicoria (*cichorium intybus*) es una hierba erguida perenne bastante leñosa, con una altura aproximada de un metro, una raíz pivotante carnosa de hasta 75 cm de largo y hojas basales grandes (Bais, *et. al.*, 2001; van Wyck, *et al.*, 1997). Su nombre proviene del griego y latín, *Cichorium* que significa “campo” e *intybus* que significa “cortar”, este significado es debido a las hojas y en parte a la raíz latina *tubus* para indicar “tallo hueco” (EMA, 2013). La chicoria es una planta resistente que puede soportar temperaturas extremas durante sus fases vegetativas y reproductivas (Bais y Ravishankar, 2001). En las figuras 5 y 6 se observan imágenes de la chicoria.



Figura 5. *Cichorium intybus*. Anónimo. (10/16/2014). *Cichorium intybus*. 20/10/2017, de

RE.HERBSitio web: <http://www.reherb.eu/en/content/cichorium-intybus>.

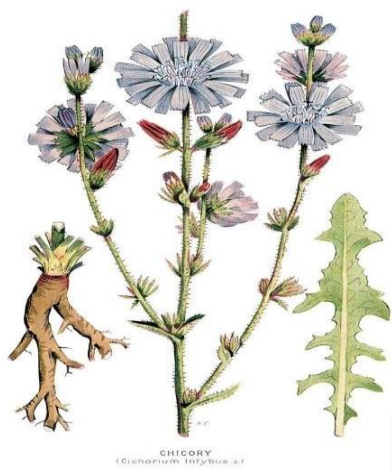


Figura 6. Chicoria. *Cichorium Intybus*, L. Clark, George and Fletcher, James: "Farm Weeds" (1906)

En la antigüedad la chicoria era cosechada en Egipto como planta medicinal, para utilizarse como sustituto del café, como cultivo vegetal y ocasionalmente se utilizaba para forraje para animales (Wang y Cui, 2011). En la década de los años 70 se descubrió que la raíz de la chicoria contiene hasta un 40% de inulina (Judzientiené y Budiené, 2008), la cual es considerada un ingrediente GRAS de los alimentos. Sus efectos fisiológicos y bioquímicos resultan en una mejora en la salud y en la reducción de muchas enfermedades (Kaur y Gupta, 2002), en la actualidad la chicoria es cosechada para la producción industrial de inulina (van Arkel, *et al.*, 2012). Es una planta muy versátil que se presta a la manipulación genética para obtener mayor rendimiento de inulina y otros compuestos de interés (Bais y Ravishankar, 2001).

3. Inulinasas

Las inulinasas pertenecen a la familia de las glucósil-hidrolasas; estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos y se clasifican principalmente en dos grupos, exo y endo Inulinasas. Tienen como objetivo hidrolizar los enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa de la inulina, generando fructooligosacáridos, fructosa y glucosa. (Singh, *et. al.*, 2017).

Las exoinulinasas hidrolizan las cadenas de inulina desde su extremo no reductor de forma secuencial, liberando unidades de fructosa. En cambio las endoinulinasas producen el rompimiento de los enlaces glucosídicos β -D-(2-1) de forma aleatoria produciendo una mezcla de fructooligosacáridos, los cuales pueden contener oligómeros del tipo β -D-Fru(2-1)- $[\beta$ -D-Fru(2-1)]_n donde n=1-9 y α -D-Glu(2-1)- $[\beta$ -D-Fru(2-1)]_n donde n=2-9, (Sangeetha *et al.*, 2005; Prapulla *et al.*, 2000); en la figura 6 se ejemplifican los productos obtenidos a partir de la acción de la endoinulinaasa.

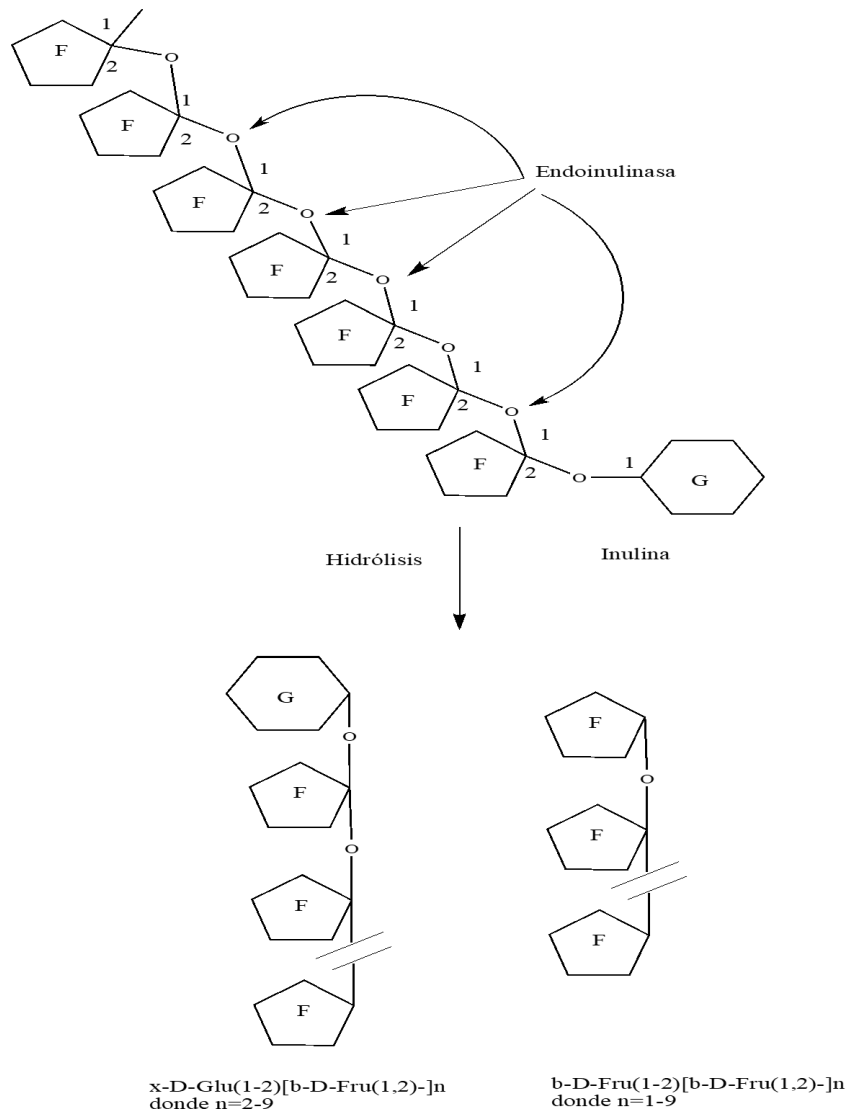


Figura 6. Síntesis enzimática de fructooligosacáridos usando endoinulinasa. (Singh, *et. al.*, 2016).

Las inulinasas se encuentran en el tracto digestivo de algunos animales, en plantas y también son producidas por microorganismos; a nivel industrial las plantas y los animales no son utilizados para obtener inulinasas debido a que se observan bajos rendimientos, en cambio son preferidos los hongos filamentosos, levaduras y bacterias. En la tabla 3 se muestran los microorganismos productores de inulinasas y sus actividades reportadas.

Tabla 3. Microorganismos productores de inulinasas. Neagu y Bahrim, G. 2011. Inulinasas a versatile tool for biotechnology.

Microorganismo	Actividad máxima	Referencia
Hongos		
<i>Aspergillus Niger</i>	1.75 U/mL	Gern et al., 2001
	100 U/mL	Ge and Zhag, 2005
	52.5 IU/mL	Kumar et al., 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	No disponible	Gill et al., 2006
<i>Aspergillus awamori</i>	No disponible	Nagem et al., 2004
<i>Aspergillus ochraceus</i>	108 Total U	Guimaraes et al., 2007
<i>Aspergillus ficuum</i>	193.6 U/gds	Chen et al., 2011
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2.9 U/mL	Ertan et al., 2003
<i>Geotrichum candidum</i>	45.65 IU/mL	Mughal et al., 2003
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.792 U/mL	Ertan et al., 2003
<i>Chrysosporium pannorum</i>	115 U/mL	Xiao et al., 1988
Bacterias		
<i>Paenibacillus spp.</i>	2.48 g/L	Gern et al., 2001
<i>Streptomyces spp.</i>	524 IU/L	Sharma et al., 2006
	89 U/gds	Dilipkumar et al., 2011
<i>Bacillus spp.</i>	42.36 U/mL	Zherebtsov et al., 2002
<i>Pseudomonas spp.</i>	No disponible	Kim et al., 1997
<i>Arthrobacter spp.</i>	No disponible	Kang et al., 1998
Levaduras		
<i>Pichia guilliermondii</i>	39.56 U/mL	Gao et al., 2007
	61.5 U/mL	Chi et al., 2009
	130.38 U/mL	Yu et al., 2009
	60.1 U/mL	Gong et al., 2007
<i>Cryptococcus aureus</i>	52.37 U/mL	Gao et al., 2007
	85 U/mL	Chi et al., 2009
	436.2 U/gds	Chi et al., 2009
<i>Yarrowia lipolitica</i>	62.85 U/mL	Gao et al., 2007
	22.5 U/mg	Liu et al., 2010
<i>Debaryomyces hansenii</i>	52.52 U/mL	Gao et al., 2007
<i>Candida kefyri</i>	40 U/mL	Pessoa and Vitolo, 1998
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	194.1 U/mL	Kalil et al.,
	127 U/mL	Kalil et al., 2001
	176 IU/mL	Santisteban et al., 2005
	208 IU/mL	Santisteban et al., 2009
	262.9 U/mg	Golunski et al., 2011
	1294 U/mL	Treichel et al., 2009
	18743 U/mL	Kushi et al., 2000
	50.2 IU/mL	Singh and Bhermi, 2008
	47.1 IU/mL	Singh et al., 2006
	250 U/gds	Mazutti et al., 2007
	47.2 U/mL	Mazutti et al., 2010
	1317 U/mL	Treichel et al., 2009
	1139 U/mL	Squarezi et al., 2009

*U, IU- Actividad expresada como unidades de actividad internacional

**gds- gramos de sustrato seco

La ventaja de producir inulinasas a partir de bacterias se debe a su termoestabilidad, sin embargo, los datos reportados en literatura son escasos y se refieren principalmente a endo-inulinasas. Una especie que demostró altos niveles de actividad inulinolítica fue la de *Streptomyces spp.* con 524 U/L utilizando ajo como sustrato. Así mismo se reportó que las especies *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* son buenas productoras de inulinasas (Neagu y Bahrim, 2011). Por otro lado, las levaduras son preferidas sobre las bacterias para la producción de inulinasas ya que son más fáciles de cultivar, poseen altas tasas de crecimiento y altos rendimientos enzimáticos en corto tiempo; entre las especies más sobresalientes encontramos *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Candida spp.* y *Cryptococcus aureus* (Singh, et al., 2017).

Los hongos filamentosos productores de inulinasas han demostrado una mayor ventaja técnica sobre las levaduras y bacterias debido a su habilidad de desarrollarse en ambientes ácidos y altas temperaturas, lo que reduce las posibilidades de contaminación y previene la formación de productos secundarios y formación de color, además que pueden cultivarse con sustratos de bajo costo. Algunas especies de hongos que han demostrado altos niveles de actividad enzimática son *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*; y dentro de la especie de *Aspergillus* los más utilizados para producir inulinasas son *A. Niger*, *A. Niveus*, *A. Ficum*, *A. Tamari*, *A. Terreus* y *A. Tubingensis*. (Singh, et. al., 2017).

En 1978 Nakamura y colaboradores demostraron que la cepa de *Aspergillus Niger* 12 es capaz de producir tres tipos de inulinasas extracelulares, dos exo-inulinasas (PI y PII) y una endoinulina (PII) independientemente de la fuente de carbón utilizada. Es por esto que la empresa danesa Novozyme eligió esta cepa para elaborar la mezcla comercial Novozyme 960 la cual consiste en una solución acuosa de inulina y glicerol (Nakamura ,et. al., 1995).

La producción de FOS partir de endoinulinasas va en aumento a nivel industrial, ya sea utilizando la enzima libre en sistemas de producción por lotes o inmovilizando a la enzima para su uso en continuo, en la mayoría de los casos el intervalo de temperatura óptima es de 37-60 °C y un pH de 6-7 para la hidrólisis de inulina. En dichas condiciones se ha reportado un rendimiento de 60 a 80% de FOS (Singh, et. al., 2016).

Se tienen reportes del aprovechamiento de inulinasas comerciales para la producción de FOS, particularmente la mezcla comercial de Novozym 960 de *Aspergillus Niger* se ha empleado para la hidrólisis de inulina, reportándose una dosis de 60 U/ml con una temperatura óptima de 60°C y un pH de 6, lo cual produce mezclas de inulotriosas, inulotetrasas e inulopentosas después de 48 horas de incubación (Singh, *et al.*, 2016).

4. Inmovilización enzimática

Para mejorar los procesos enzimáticos así como la estabilidad de las enzimas, por varios años se han llevado a cabo investigaciones sobre metodologías que permitan el uso continuo y la recuperación del biocatalizador. En este marco teórico, la inmovilización se presenta como una alternativa viable y se han desarrollado métodos para la inmovilización de enzimas, tales como encapsulación mediante el método sol-gel (Borole *et al.*, 2004), entrecruzamiento de cristales enzimáticos (Ayala *et al.*, 2002), conjugados enzima-polímero (Bakker *et al.*, 2000; Lozinsky *et al.*, 2003) así como la fijación física o covalente sobre soportes sólidos. Durante la inmovilización, las moléculas de proteína se fijan o se combinan, ya sea mediante interacciones electrostáticas o bien por enlaces químicos, con un material inerte formando una fase sólida en el medio de reacción. Los sustratos y los productos se pueden difundir entre las dos fases de tal manera que la enzima no forma parte del producto o del sustrato por lo que puede ser recuperada y reutilizada.

El soporte o matriz donde se inmoviliza a la enzima debe presentar características como resistencia física, estabilidad, regenerabilidad, ser inerte y reducir los problemas de transferencia de masa tanto de sustratos como de productos, no ser susceptible a la contaminación bacteriana (Singh, 2009). La inmovilización enzimática presenta las ventajas de poder reutilizar la enzima en un proceso continuo, lo que a su vez permite elevadas cargas de enzima durante un mayor tiempo dentro del reactor, esto sin que la enzima pierda estabilidad durante la reacción. Sin embargo, al momento de inmovilizar se corre el riesgo de que la proteína pierda su conformación nativa así como la pérdida de un porcentaje de su actividad total, además de que el costo de la enzima inmovilizada es mayor al de la enzima libre (Hartmeier, 1985; Mozhaev, *et al.*, 1987).

Finalmente, el desempeño de la enzima inmovilizada también depende de algunos

parámetros que no son catalíticos, tales como la resistencia mecánica y química, biodegradabilidad, capacidad de carga, retención de la enzima y re-uso.

4.1 Técnicas de inmovilización enzimática

Existen diferentes técnicas de inmovilización enzimática y cada una se adapta al tipo de enzima y sus características. A continuación se describe cada una y se mencionan algunos ejemplos.

4.1.1 Adsorción

La adsorción de una enzima en un material sólido es un proceso que resulta de las interacciones iónicas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. La inmovilización se lleva a cabo por el simple contacto de la enzima con el soporte, mientras que la fuerza de la adhesión depende del tipo y cantidad de las interacciones físicas, las cuales son fuertemente influenciadas por las características de la enzima y del soporte. Por ejemplo:

1. el pH del medio de reacción, que influye en el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del soporte,
2. la fuerza iónica que al incrementarse produce la desorción de la enzima, porque los iones inorgánicos compiten con la proteína por la unión al soporte,
3. el diámetro de poro y el área superficial específica del soporte,
4. tiempo de incubación durante la adsorción
5. temperatura de adsorción (Spahn y Minteer, 2008).

Algunos ejemplos de soportes utilizados en inmovilización por adsorción son: fibras de coco ya que poseen una buena retención de agua, celulosa microcristalina con la capacidad de lograr uniones irreversibles, la caolinita que posee una alta retención enzimática por acetilación y materiales micro y mesoporosos que ofrecen una amplia área superficial (Dey *et al.* 2002; Rosales-Hernández, *et al.* 2007; Karagulyan, *et al.* 2008; Brígida, *et al.* 2010; Mitchell y Ramirez, 2011; Huang, *et al.* 2011).

4.1.2 Unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte inorgánico es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. El método de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con residuos de aminoácidos de las proteínas. Entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los que intervienen en la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina y, en menor medida, la metionina, el triptófano, la arginina, el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo no se encuentran expuestos sobre la superficie proteica, por lo que no intervienen en la unión covalente con el soporte. Este método presenta las siguientes ventajas:

1. la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla,
2. la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización y
3. se produce una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH al tener estabilizada su estructura terciaria (D'Souza 1999, Singh 2009).

Generalmente, se observa un incremento de la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización covalente, lo que se atribuye principalmente a las siguientes razones:

- estabilización conformacional debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química,
- evita la agregación intermolecular al mantener a las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio,

- alteración del microentorno de la enzima por efecto de la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno se sitúa sobre la superficie de un soporte con una carga superficial, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción (Klibanov, 1978). En otros casos, el soporte tiene un efecto amortiguador, de tal manera que se mantiene el pH, donde la enzima presenta su máxima actividad, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la afinidad del soporte por el agua regula la actividad de la enzima (Reslow, 1988). Cuanto mayor es la afinidad del soporte por el agua, más agua se adsorbe y la enzima posee la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

Uno de los retos a enfrentar en la inmovilización por unión covalente es conservar la estructura y propiedades de la enzima; como ejemplo de un buen agente de entrecruzamiento se tiene al glutaraldehído debido a su capacidad de formar enlaces covalentes estables y ser soluble en solventes acuosos. Se ha reportado que los inmovilizados en soportes de sílica gel modificada por silanización con eliminación de grupos aldehído sin reaccionar presentan alta estabilidad y actividad catalítica, así como soportes porosos SBA (Santa Barbara Amorphous) rodeados de residuos de Si-OH (Lee, *et al.* 2006; Szymanska *et al.* 2009). Se ha reportado un incremento en el tiempo de vida medio y la estabilidad térmica por unión covalente con soportes como sílica mesoporosa, quitosano, etc. (Hsieh, *et al.* 2000; Ispas, *et al.* 2009).

4.1.3 Inmovilización por afinidad

Existen dos formas de inmovilización por afinidad. Por un lado se puede conjugar la matriz de soporte con un ligando que tenga afinidad por la enzima. Por otro, es la enzima la que se conjuga con un ligando que posea afinidad por la matriz (Sardar, *et al.*, 2000). Los soportes con afinidad permiten albergar una mayor cantidad de enzima lo que da lugar a un incremento en actividad, eficiencia y estabilidad. Como ejemplo de estos soportes podemos mencionar esferas de sílica porosa cubiertas de quitosano y agarosa cubierta con capas de concanavalin A (Shi, *et al.* 2003; Sardar y Gupta, 2005).

4.1.4 Atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento se logra mediante la polimerización de la matriz a partir de una solución que contiene el monómero y la enzima. Esto da como resultado el atrapamiento físico de la enzima dentro de la matriz y generalmente no compromete la estructura de la enzima. Sin embargo, puede ocurrir la desnaturalización debido a el contacto de la enzima con los precursores de la polimerización o a las condiciones en las que se realiza la polimerización. También puede ocurrir lixiviación si es que el poro de la matriz es mayor al tamaño de la enzima (David, *et al.*, 2011).

A la inmovilización por adsorción en materiales de silica se le han atribuido grandes áreas superficiales, distribución uniforme de poros y alta capacidad de adsorción (Ispas et al., 2009). Sin embargo, las matrices de solgel con polímeros de calixareno utilizadas para atrapar a la lipasa *C. rugosa*, han permitido lograr una eficiencia de atrapamiento alta teniendo en cuenta sus capacidad de almacenamiento y sus enlaces selectivos (Erdermir y Yilmza, 2011). También se han reportado atrapamientos eficientes con alginato-grenetina y calcio, los cuales previene la lixiviación y proporcionan estabilidad a la enzima (Shen, *et al.*, 2011).

4.1.5 Método de SOL-GEL

El sol-gel es un método de preparación de materiales amorfos y policristalinos. Las estructuras únicas, micro estructuras y compuestos que pueden hacerse por este método abren muchas aplicaciones prácticas, como son la fabricación de componentes ópticos, recubrimientos dieléctricos, superconductores, nanopartículas y celdas solares, entre otras. (Castañeda-Contreras, 2006).

El sol-gel se inicia por medio de una suspensión coloidal la cual al polimerizar dará paso a una condensación para formar un material sólido. Un coloide es una suspensión en la cual la fase dispersa es tan pequeña (1-1000 nm) que las fuerzas gravitacionales son insignificantes y las interacciones son dominadas por fuerzas como las de Van der Waals y atracciones entre superficies cargadas. Esto da paso a la definición de sol, la cual se refiere a una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido, que generan polímeros o

partículas a partir de las cuales se puede fabricar un material cerámico. (Brinker, 1990)

En el proceso del sol-gel los precursores de la polimerización consisten en un metal o metaloide rodeado por varios ligandos, los ligandos no incluyen a otros metales o metaloides. Los alcóxidos son los precursores más utilizados en la preparación de sol-gel y un ligando alcoxi se forma removiendo un protón del grupo OH de un alcohol (Ecuación 1). En la tabla 3 se muestra una lista de los ligandos alcoxi más comúnmente usados.

Ec. 1 *Metanol* $CH_3 - OH$ *Metóxi* ($*OCH_3$)

Alquil	Fórmula	Alcói	Fórmula
Metil	*CH ₃	Metóxi	*OCH ₃
Etil	*CH ₂ CH ₃	Etóxi	*OCH ₂ CH ₃
n-propil	*CH ₂ CH ₂ CH ₃	n-propóxi	*O(CH ₂) ₂ CH ₃
Iso-propil	H ₃ C(*C)HCH ₃	Iso-propóxi	H ₃ C(*O)CHCH ₃
n-butil	*CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	n-butóxi	*O(CH ₂) ₃ CH ₃
Sec-butil	H ₃ C(*C)HCH ₂ CH ₃	Sec-butóxi	H ₃ C(*O)CHCH ₂ CH ₃
Iso-butil	*CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Iso-butóxi	*OCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Ter-butil	*C(CH ₃) ₃	Ter-butóxi	*OC(CH ₃) ₃

Tabla 3. Ligandos alcoxi más comúnmente usados.

Los alcóxidos metálicos son miembros de la familia de los compuestos metalorgánicos los cuales poseen un ligando orgánico unido a un metal o metaloide, por ejemplo, el tetrametoxisilano (CH₃O)₄Si (TMOS). No debe confundirse con los compuestos organometálicos, los cuales se definen por tener enlaces metal-carbón y no enlaces metal-oxígeno-carbón. Es así como los alcóxidos no se consideran organometálicos. Sin embargo, es común que se les de esta definición en la literatura.

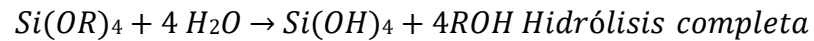
Los alcóxidos metálicos son los más utilizados como precursores para el sol-gel debido a su alta reactividad con el agua. La reacción es una hidrólisis, porque un radical hidroxilo (-OH) se une a un átomo metálico, ver ecuación 2.

Ec. 2

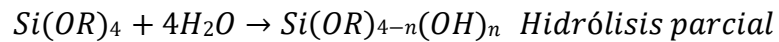


La R representa a un protón u otro ligando y ROH representa un alcohol. Dependiendo de la cantidad de agua y cantidad de catalizador presente puede ocurrir una hidrólisis completa o parcial (Ver ecuaciones 3 y 4).

Ec. 3



Ec. 4



Dos moléculas parcialmente hidrolizadas se pueden unir en una reacción de condensación, la cual por definición establece que se liberan pequeñas moléculas como agua o alcohol. Este proceso puede continuar hasta construir un polímero formado por moléculas de silicón, cabe mencionar que se entiende como polimerización el incremento en la conectividad de la red producida por las reacciones de condensación.

La polimerización de un alcóxido de silicio da lugar a una compleja red polimérica, ya que el monómero $[Si(OH)_4]$ completamente hidrólizado es tetrafuncional (Figura 8).

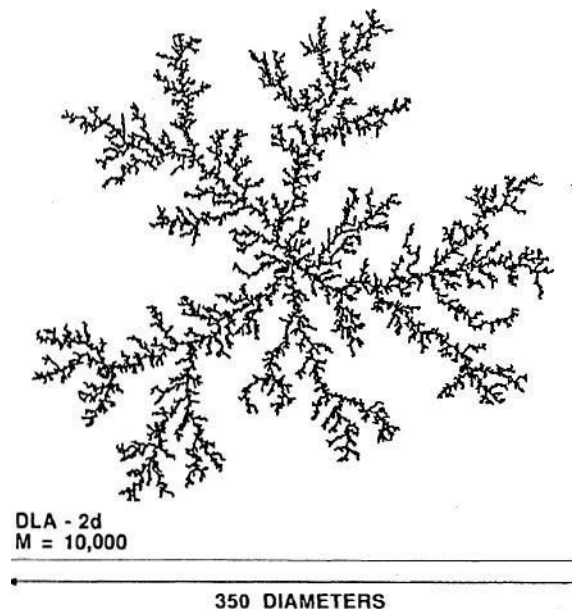


Figura 8. Fractal polimérico hecho a partir de un monómero polifuncional ($f > 2$). (Computer Simulation of two-dimensional aggregation by P. Meakin.)

4.1.5 Inmovilización por atrapamiento en SOL-GEL

El encapsulamiento de enzimas en sol-gel ofrece la ventaja de realizarse bajo condiciones moderadas de pH y temperatura, lo que previene la desnaturalización de la proteína, además de obtenerse materiales porosos con estructuras que permiten el transporte de masa a través de las redes que forman.

Los precursores de polimerización más frecuentemente usados son el tetraetilortosilicato (TEOS) y el tetrametilortosilicato (TMOS). El método de encapsulación se lleva a cabo en dos etapas; en la primera ocurre la hidrólisis del precursor en condiciones ácidas o en presencia de un catalizador, para formar el sol, es decir, la solución coloidal; en la segunda etapa tiene lugar una condensación alcohólica a un pH neutro lo que resulta en la formación de la red. En esta etapa es donde se añade la enzima para ser encapsulada en la red que se forma. (Livage et. al, 2001; Pierre, 2004; Bhatia et. al, 2000).

Dependiendo de las condiciones a las que se lleve a cabo la gelificación del sol-gel serán sus características estructurales. Se tienen tres tipos de geles los cuales son, xerogeles, aerogeles y ambigeles. Los xerogeles se obtienen al realizar la gelificación de sol-gel hidrofílicos a temperatura ambiente (25°C) lo que da como resultado que la red se comprima en un 70% aproximadamente (Pierre, 2004). Si se tiene un gel húmedo amorfo se tendrán poros con diámetros de 4-130nm, en cambio, si el gel se ha secado se tendrán poros de 1-10nm. Esto también se verá afectado por el pH del medio ya que, entre menor sea el pH menor será el tamaño del poro. Los aerogeles se obtienen secando el material con CO₂ supercrítico y en este caso los diámetros de los poros no varían tanto. Se ha reportado que en un medio de pH 7 y condiciones supercríticas se obtienen poros de 2-80nm (Bhatia et. al, 2000). Los ambigeles se refieren a xerogeles hidrofóbicos que son secados a temperatura ambiente y poseen diámetros de poro similares a los xerogeles húmedos.

Se ha reportado en encapsulaciones en sol-gel de α -quimotripsina, superoxidasa dismutasa y peroxidasa de rábano una retención de actividad de 11-76% respecto a la enzima libre. Después de un almacenamiento de diez meses en pH neutro se reportó una lixiviación de 1-13% y una actividad del 86-99% respecto a la actividad inicial (Gil y Ballesteros, 1998).

5. Hipótesis

Al inmovilizar por atrapamiento en sol-gel a la inulinasa de NOVO 960 y determinar las mejores condiciones tanto para la maduración del material, así como para la hidrólisis de inulina de chicoria, se obtendrá un biocatalizador capaz de favorecer la actividad inulinolítica en un sistema que permita su reuso.

6. Objetivo General

Inmovilizar por atrapamiento en sol-gel a la inulinasa de NOVO 960 y caracterizar el material para obtener un biocatalizador estable y reusable.

Objetivos particulares

- Determinar la temperatura y pH óptimos para la reacción de hidrólisis de inulina mediante la enzima libre NOVO 960.
- Inmovilizar a la inulinasa de NOVO 960 por atrapamiento en sol-gel.
- Cuantificar la cantidad de proteína inmovilizada en sol-gel.
- Determinar la temperatura y pH óptimos de la reacción de hidrólisis de inulina para la enzima inmovilizada.
- Determinar el número de ciclos de reuso de la enzima inmovilizada.
- Determinar el mejor tiempo de maduración de la enzima inmovilizada.
- Determinar la termo-estabilidad del biocatalizador obtenido.

7. Materiales y métodos

7.1. Materiales

La mezcla enzimática de Novozym 960 solución acuosa en glicerol se compró a Novozyme América.

Los reactivos Tetrametilortosilicato (TMEOS), la albúmina sérica bovina (BSA), fructosa, inulina de chicoria todos de lata pureza se adquirieron en Sigma Aldrich. La proteína verde fluorescente fue donada amablemente por el Dr. Ismael Bustos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.2. Métodos

7.2.1 Determinación de la concentración de proteína

Se utilizó el método de Bradford para determinar la concentración de proteína presente en la mezcla comercial NOVO 960 (Bradford, M. (1976) *Analytical Biochemistry* 72, 248-254). Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) en un intervalo de concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml y se adicionó el reactivo de Bradford y se dejó reaccionar durante 5 min.

La cantidad de enzima inmovilizada se determinó por diferencia entre la enzima inicial y la enzima remanente después de la inmovilización.

7.2.2 Caracterización de la enzima libre Novozym 960

Para la caracterización de la enzima libre se determinaron únicamente la temperatura y el pH a los cuales la enzima presentaba una máxima producción de fructosa. Esta determinación se llevó a cabo cuantificando la actividad enzimática global (U), la cual se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de producto por minuto.

7.2.2.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de Novo 960 en la hidrólisis de inulina

La reacción se llevó a cabo en tubos de Eppendorf en un volumen de 1 mL con una disolución

de inulina de chicoria al 0.5% m/v en buffer de acetatos pH 5, 100 mM, 2 μ l (3.359 mg de proteína/mL de mezcla comercial) de inulinasa Novozym 960, a 500 rpm durante 10 min.

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a las siguientes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C, tomando una alícuota de 100 μ l cada 2 minutos. Se cuantificó la cantidad de azúcares reductores producidos mediante el método de ácido 3,5 dinitrosalísílico (DNS) (Miller, 1959).

Se realizó una curva patrón de concentración de fructosa con las siguientes concentraciones: 0, 2, 3, 5, 7 y 10 mg/mL. El método de DNS es un método colorimétrico, el cual determina la presencia de azúcares reductores mediante su oxidación por medio del ácido 3,5 dinitrosalísílico. Este compuesto por sí solo posee un color amarillo, el cual se torna marrón oscuro en proporción a la cantidad de azúcares reductores presentes en la solución.

Para la determinación de azúcares reductores se emplearon 100 μ l de muestra, se agregaron 200 μ l de buffer de acetatos pH 5, 100 mM y 600 μ l de DNS. La muestra se calentó a 80°C por 5 min y posteriormente la reacción se detuvo en un baño de hielo y agregaron 4 mL de agua, la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro Genesys 10S a 540 nm.

7.2.2.2 Efecto del pH en la hidrólisis de inulina catalizada por la mezcla comercial Novozym 960

Se realizaron 4 reacciones en los siguientes valores de pH: 3, 4, 5 y 6; se cuantificó la cantidad de azúcares reductores producidos mediante el método de DNS. La temperatura para estos ensayos se mantuvo fija tomando como referencia el mejor resultado obtenido del procedimiento anterior. La reacción se llevó a cabo como se describe previamente.

7.2.3 Inmovilización por atrapamiento en sol-gel

Para el proceso de sol-gel se utilizó como precursor de la polimerización el alcóxido tetrametilortosilicato (TMOS) de Sigma Aldrich. En este método se realizó la polimerización de 1ml de alcóxido con 1.9 ml de buffer de acetatos pH 5, 100 mM, agregando 100 μ l de inulinasa NOVO96, sonicando durante 5 minutos la solución y posteriormente gelificando a distintos tiempos. Por último, el sólido obtenido se pulverizó y se almacenó a 4°C.

Los tiempos de maduración de los distintos geles fueron: 16, 24 y 48 horas.

De igual modo se inmovilizaron 100 μ l de proteína verde fluorescente, siguiendo el mismo procedimiento anterior para comprobar que efectivamente la proteína quedaba retenida.

7.2.3.1 Actividad en función del tiempo de maduración

Para medir la actividad del material inmovilizado se utilizaron tubos de Eppendorf, tomando 100 mg de material y agregando 1 ml de solución de inulina de chicoria al 0.5% m/v en buffer de acetatos, 100 Mm, se colocaron en agitación a 500 rpm durante 10 minutos, la temperatura y pH de reacción se seleccionaron tomando como referencia los resultados obtenidos para mejor temperatura y pH de reacción.

7.2.3.2 Ciclos de reúso

Para evaluar la capacidad de reúso del biocatalizador se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis en tubos de Eppendorf utilizando 50 mg de inmovilizado y 1 ml de solución de inulina de chicoria al 0.5% m/v en buffer de acetatos, 100 Mm, durante 10 minutos a 500 rpm, fijando la temperatura y pH establecidos por los resultados de las pruebas anteriores.

Se utilizaron los geles madurados a las 16, 24 y 48 horas entre cada ciclo de hidrólisis se tomó una muestra de 600 μ L, se centrifugó el resto de la solución contenida en el tubo, se realizó un lavado con buffer de acetatos y se repitió nuevamente la reacción de hidrólisis.

Cada muestra de cada ciclo fue analizada mediante el método de DNS.

7.2.3.2 Termoestabilidad

Este procedimiento se llevó a cabo tanto para la enzima libre como para la inmovilizada, con el objetivo de determinar la estabilidad en función de la temperatura. Las temperaturas evaluadas fueron 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C.

Para el caso de la enzima libre se tomaron 100 μ l de Novozyme 960 y se calentaron a la temperatura predeterminada durante 2 horas a 500 rpm.

Posteriormente se realizó la hidrólisis de inulina tomando 2 μ l de la enzima tratada térmicamente agregando 998 μ l de inulina de chicoria al 0.5% m/v en buffer de acetatos, 100 mM, la reacción fue incubada durante 10 minutos a 500 rpm.

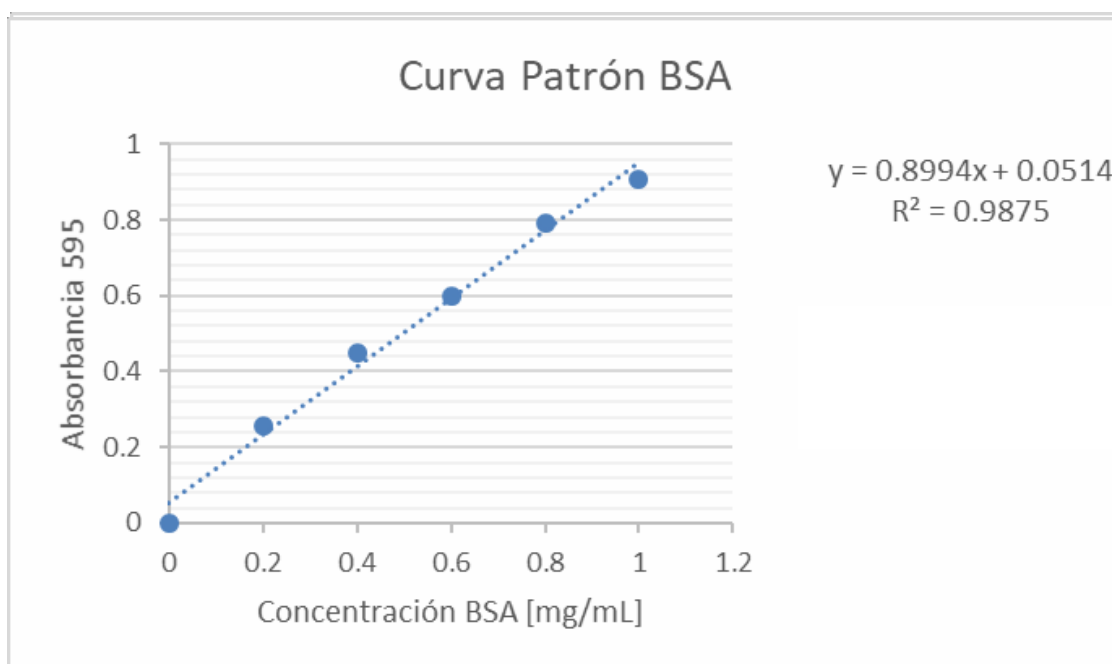
La enzima inmovilizada se evaluó tomando 100 mg de biocatalizador y agregando 1 ml de buffer de acetatos 100 mM, pH 5. Se calentó a la temperatura prevista durante 2 horas y posteriormente se lavó el buffer. Se agregó 1 mL de solución de inulina de chicoria al 0.5% m/v para llevar a cabo la hidrólisis durante 10 minutos.

Ambas pruebas fueron cuantificadas mediante el método de DNS.

8. Resultados y discusión

8.1 Cuantificación de proteína

Un parámetro importante en la caracterización e inmovilización de enzimas es la cuantificación de proteína. Esta se determinó en la mezcla comercial NOVO 960 por el método de Bradford. Se utilizó una solución inicial de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 1 mg/ml y se emplearon concentraciones en un intervalo de 0.2 a 1 mg/mL para realizar una curva patrón (Gráfica 1).

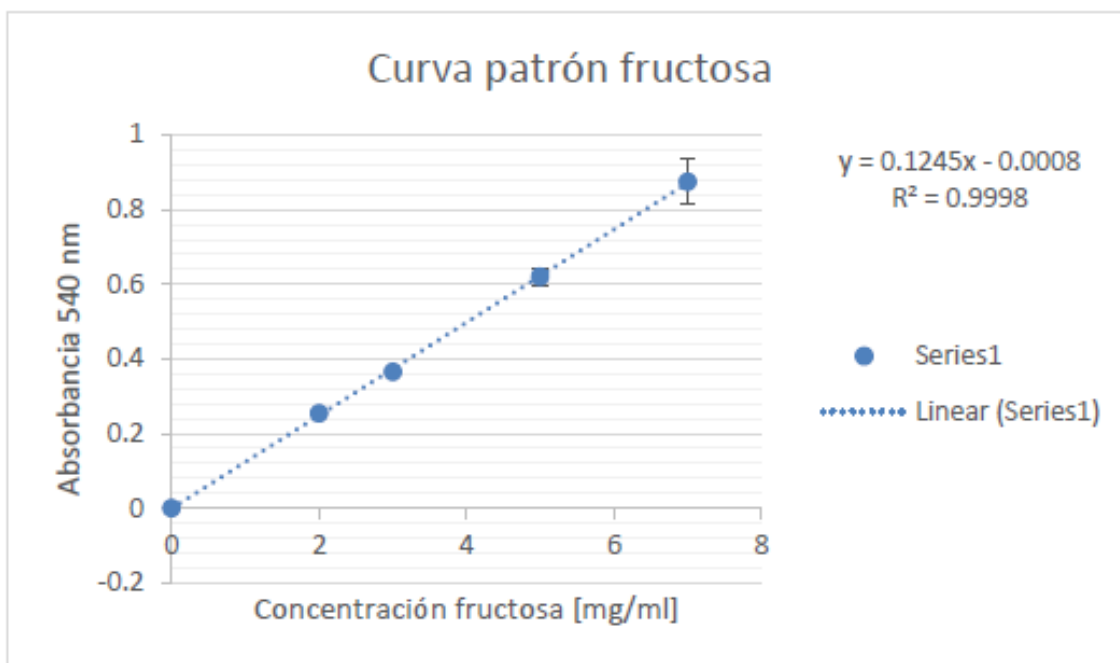


Gráfica 1. Curva patrón por el método de Bradford.

Una vez realizada la curva patrón, se determinó para la muestra comercial NOVO 960 una concentración de 3.359 mg de proteína/mL. Cabe mencionar que la proteína usada en este proyecto no es una enzima pura.

8.2 Determinación de la mejor temperatura de reacción

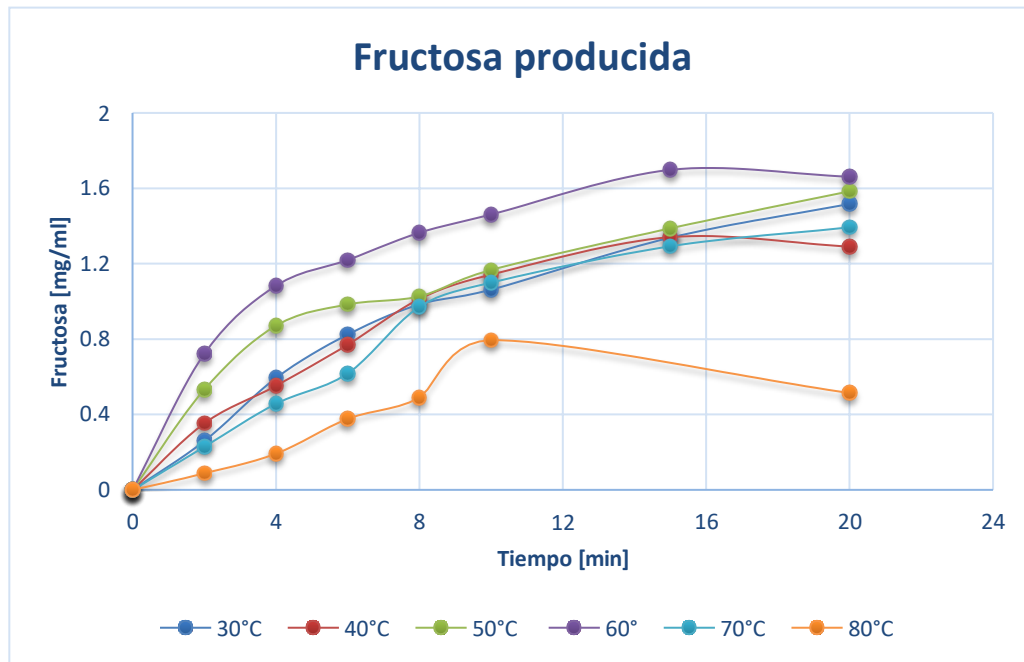
Con la finalidad de conocer los mejores parámetros para llevar a cabo la hidrólisis de inulina de chicoria, se determinó la actividad enzimática de la inulinasa de NOVO 960 libre cuantificando la cantidad de fructosa producida por unidad de tiempo por cada miligramo de proteína presente en la reacción. Para esto se realizó una curva patrón de fructosa (Gráfica 2) con la cual se pudo interpolar la concentración de fructosa obtenida como producto.



Gráfica 2. Curva patrón de fructosa determinada por DNS.

Se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis de inulina a 30, 40, 50, 60, 70, y 80°C, a pH 5 con un buffer de acetatos 100 Mm y una agitación de 500 rpm, se tomó una muestra de reacción cada 2 minutos por un total de 20 minutos; posteriormente se midió la concentración de azúcares reductores por el método de DNS. La gráfica 3 muestra las curvas temporales de reacción. En estas curvas temporales se puede observar que la reacción es más rápida a 60°C, mientras que a 80 °C la velocidad decrece rápidamente.

Para determinar la velocidad de reacción, se calculó la pendiente a cada temperatura en los primeros 10 minutos de reacción. La tabla 4 muestra la velocidad a cada temperatura de hidrólisis ensayada.



Gráfica 3.
Fructosa producida en función del tiempo de reacción a diferentes temperaturas.

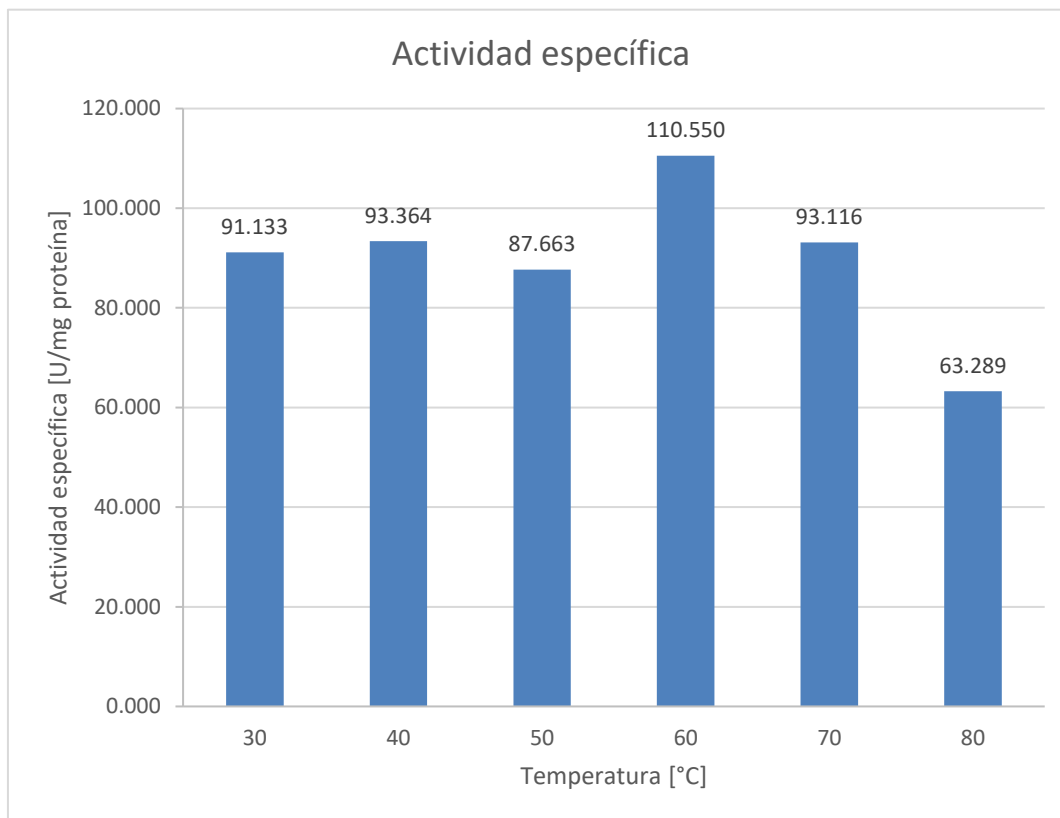
Temperatura	Velocidad
(°C)	(mg fructosa/min*ml)
30	0.1103
40	0.113
50	0.1061
60	0.1338
70	0.1127
80	0.0766

Tabla 4
Velocidad de reacción vs temperatura

Para trabajar en condiciones de velocidad inicial, se trabajó con un exceso de sustrato en comparación con la concentración de enzima. Como se puede observar en la gráfica 3 la velocidad inicial de reacción (mg fructosa/min) se alcanza a los 10 minutos de reacción en la mayoría de las temperaturas (parte lineal de la curva), por lo que se obtuvo la pendiente este intervalo de tiempo.

Para cada temperatura de reacción se midió la actividad enzimática de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Actividad = \left(\frac{Pendiente / Masa Molar * Volumen de Reacción}{Concentración de Proteína} \right)$$



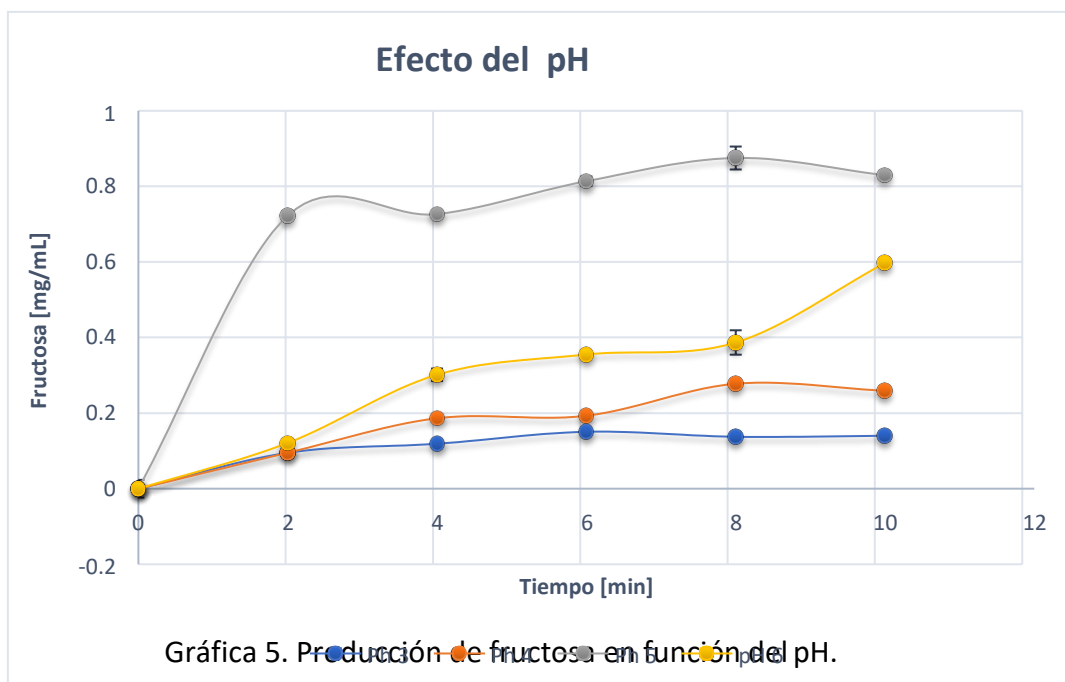
Gráfica 4.

Actividad específica de la inulinasa Novo 960 en función de la temperatura. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 1 mL, 0.5% de inulina de achicoria pH 5 a 500 rpm con 6.7 µg de proteína.

Una vez obtenido las velocidades iniciales (pendientes) para cada temperatura, con la ecuación anterior se obtuvo la actividad específica misma que se observa en la gráfica 4. La mejor temperatura a la que se lleva a cabo la hidrólisis de la inulina de chicoria es a 60°C, el volumen total de enzima para cada reacción fue de 2 µl que corresponden a 0.006718 mg de proteína, obteniendo una actividad específica de 110.55 U/mg de proteína.

8.3 Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa de Novo960

Se determinó el efecto del pH sobre la reacción de hidrólisis de inulina. Para ello se mantuvo la reacción a una temperatura constante de 60°C y los valores de pH evaluados fueron 3, 4, 5 y 6. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos, en los diferentes amortiguadores (100 mM) con inulina de chicoria al 0.5%. En la gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos para la producción de fructosa. Se observa una mayor producción de fructosa (0.875 mg/ml) llevando a cabo la reacción a un pH de 5. Yewale y colaboradores (2013) reportaron una actividad máxima a pH 4 para la enzima libre *Aspergillus Niger* NCIM 945, mientras que Nakamura y colaboradores (1995) reportaron una máxima actividad a un pH de 5.2 y 50°C al inmovilizar *Aspergillus Niger* mutante 817 mediante unión covalente en soportes de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodimida clorhidrato (EDC) y 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodimida meto-*p*-toulen-sulfonato (CMC). Santa y colaboradores (2011) reportaron una actividad relativa máxima de 0.42 a un pH de 4 para la enzima libre comercial Fructozyme L y una actividad relativa máxima de 0.29. Frías (2018) reportó más de un 60% de producción de azúcares reductores para el caso de la inulinasa NOVO 960 purificada mediante exclusión molecular e inmovilizada en 10-10% de PEG-PVA con un tiempo de incubación de 6 horas; y para la enzima purificada mediante intercambio iónico obtuvo un 90% de producción de azúcares reductores en un inmovilizado 15-10% PEG-PVA.



8.4 Tiempo de maduración del sol-gel

Una vez encontradas las mejores condiciones de reacción de la inulinasa sobre inulina de chicoria, la enzima se inmovilizó por atrapamiento en sol-gel. Se probaron varios tiempos de maduración para observar la actividad en función del tiempo. Las condiciones seleccionadas fueron a 16, 24 y 48 horas de gelificación.

Las muestras se analizaron mediante una microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar en escala micrométrica la superficie tridimensional del material obtenido. Por medio de esta técnica se hace incidir un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto.

En la figura 9 se pueden observar las microscopias del material triturado obtenido de la inmovilización de la enzima comercial Novozym 960. Para el caso del inmovilizado con 16 h de maduración, su tamaño es mayor y conforme se incrementa el tiempo este va disminuyendo, debido a que el polímero continúa llevando a cabo la condensación, lo que provoca que el material pierda agua. Al mismo tiempo, entre mayor sea el tiempo de gelificación la red se entrelazará más, impidiendo el libre paso del sustrato a través del catalizador y una aparente pérdida de actividad. Como se mencionó anteriormente, cuando dos moléculas de alcóidos parcialmente hidrolizados se unen para formar una red se lleva a cabo una condensación, en donde el agua es un producto resultante.

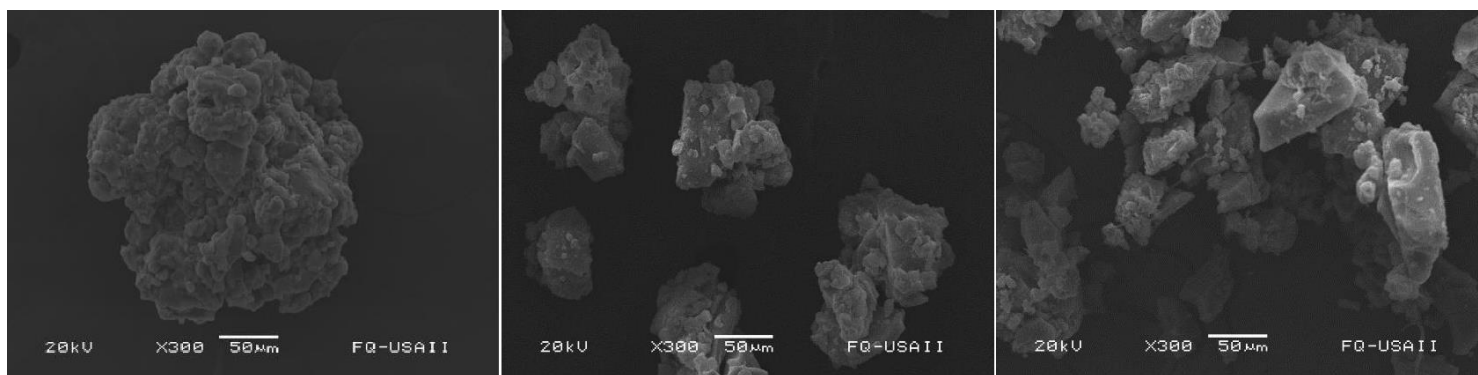


Figura 9. Microscopia electrónica de barrido de inulinasa de chicoría inmovilizada a distintos tiempos de maduración en sol-gel, de izquierda a derecha se observa inmovilización a 16 horas, 24 horas y 48 horas, en escala de 50µm

8.4.1 Inmovilización enzimática

Para el inmovilizado en sol-gel se utilizó como precursor de la polimerización el tetrametilortosilicato (TMOS). Se obtuvo un sólido transparente con un ligero color amarillo y se observó que entre menor fuera el tiempo de maduración mayor era la humedad contenida en el producto. En el caso de los geles preparados a 16 horas se distinguía una textura más suave y una mayor facilidad al momento de triturar el material. En cambio, para los geles preparados a 24 y 48 horas la textura era más dura y se encontró mayor resistencia a la hora de ser desprendidos del vaso de precipitado. Incluso algunos se habían condensado por más tiempo, como el gel de 48 horas, por lo que su apariencia era similar a la de un cristal. En las figuras 10 se observa un inmovilizado de 24 horas.



Figura 10. Matriz de sol-gel de 24 horas.

La cantidad de enzima inmovilizada se calculó mediante un balance de materia. Se inmovilizaron 100 μL de inulinasa de Novo 960, lo que corresponde a 0.3359 mg de proteína de acuerdo con la concentración de proteína obtenida mediante el método de Bradford. A esta concentración se restó la proteína que se lixivió del sol-gel, dicho valor se obtuvo mediante un lavado con buffer de acetatos pH 5.5 y centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min; la concentración final de proteína fue de 0.1452 mg, 0.23 y 0.2073 mg de proteína/g material respectivamente para cada inmovilizado.

Inmovilizado (Horas)	16	24	48
Concentración de proteína (mg proteína/g material)	0.1452	0.23	0.2073

Tabla 5. Concentración de proteína de material inmovilizado a 16, 24 y 48 horas. Se cuantificó la actividad de la enzima inmovilizada a 16, 24 y 48 horas, utilizando 100 mg

del inmovilizado e hidrolizando 1 mL de solución de inulina de chicoria al 0.5% m/v en buffer de acetatos, 100 Mm a pH 5 y 60°C, durante 10 minutos a 500 rpm. La técnica de inmovilización usada permitió la producción de partículas estables con buena actividad catalítica y un porcentaje de actividad relativa de 56%, 49% y 63%, respectivamente (Gráfica 6).

Gráfica 6. Porcentaje de actividad relativa de la inulinasa de Novo 960 inmovilizada en sol-gel a diferentes tiempos de maduración 16, 24 y 48 horas.

El encapsulamiento de la mezcla enzimática, además de permitir la recuperación para su reuso demuestra un rendimiento similar en algunos casos a los datos reportados para inmovilización de inulasas en diferentes soportes y evaluada en la hidrólisis de inulina. Silva, et.al (2013) evaluaron la actividad enzimática de la inmovilización de inulinasa comercial de *Aspergillus Niger* en espuma de poliuretano, obteniendo una actividad de 225 U/g proteína para la hidrólisis de inulina en condiciones de 50° C y pH 5.5. Yewale et. al (2013) evaluaron la actividad de la Inulinasa de *Aspergillus Niger* NCIM 945 inmovilizada por unión covalente en lecho de quitosano, obteniendo un porcentaje de actividad relativa de 16.6% a pH 5. Miroslava, (2018), evaluó la actividad de la inulinasa comercial de Novo 960 inmovilizada en matrices de PEG-PVA después de haber realizado dos procesos de purificación enzimática, uno mediante exclusión molecular, el cual produjo un rendimiento de actividad mayor al 60% con una actividad específica de 77.94 U/mg proteína y otra purificación mediante intercambio iónico reportando un rendimiento de más del 90% con una actividad de 57.34 U/mg proteína. En ambos casos se llevó a cabo la hidrólisis de inulina durante 6 horas a 50°C y pH 5. Santa et. al (2011) reportaron un rendimiento de

inmovilización de $81\% \pm 3$ para la hidrólisis de inulina mediante la inmovilización de la inulinasa comercial Fructozyme L. en sol-gel.

Para determinar si la proteína se distribuía uniformemente en la matriz de sol-gel se realizó un inmovilizado de proteína verde fluorescente, durante 16 y 48 horas (Figura 11). Una vez obtenido el sólido, se expuso a luz UV donde se aprecia que la proteína se distribuyó de manera uniforme por toda la red del polímero y por lo tanto un inmovilizado homogéneo.

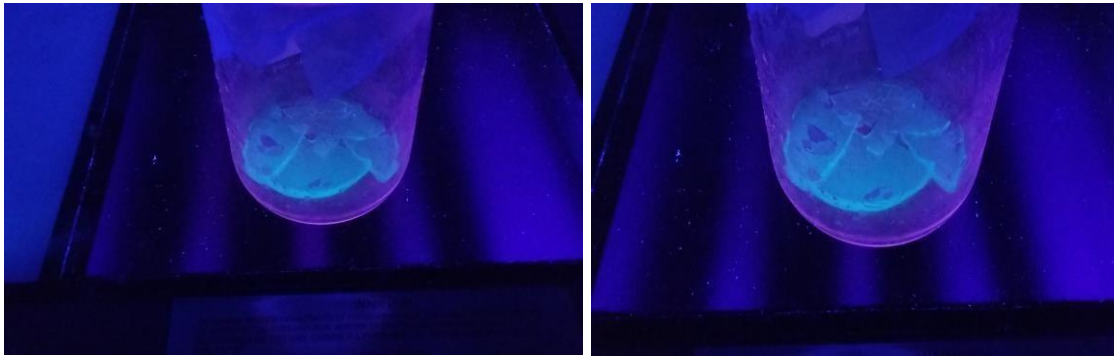
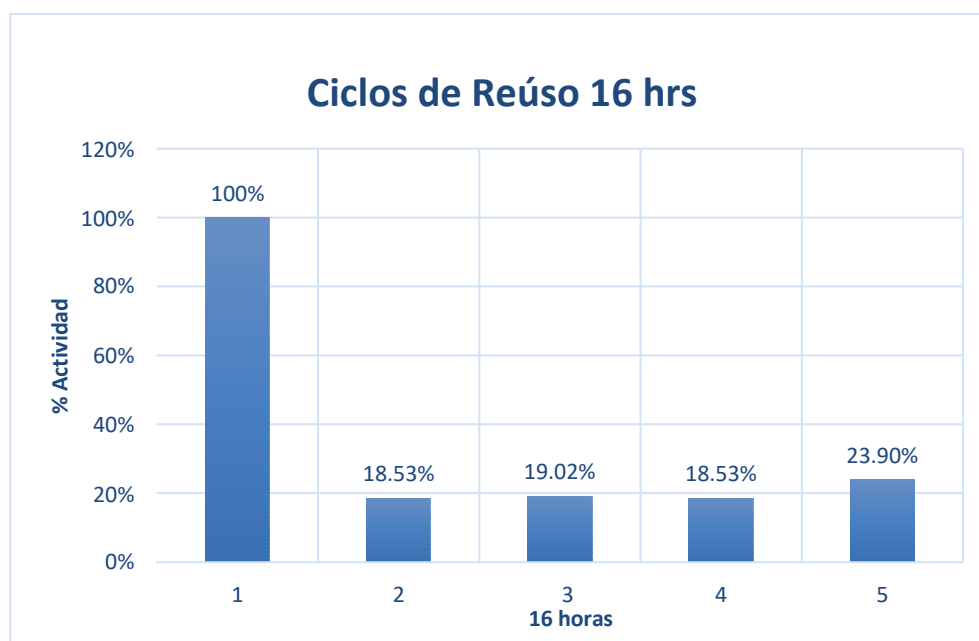


Figura 11. Inmovilización de la proteína verde fosforescente (GFP) en la matriz de sol gel.

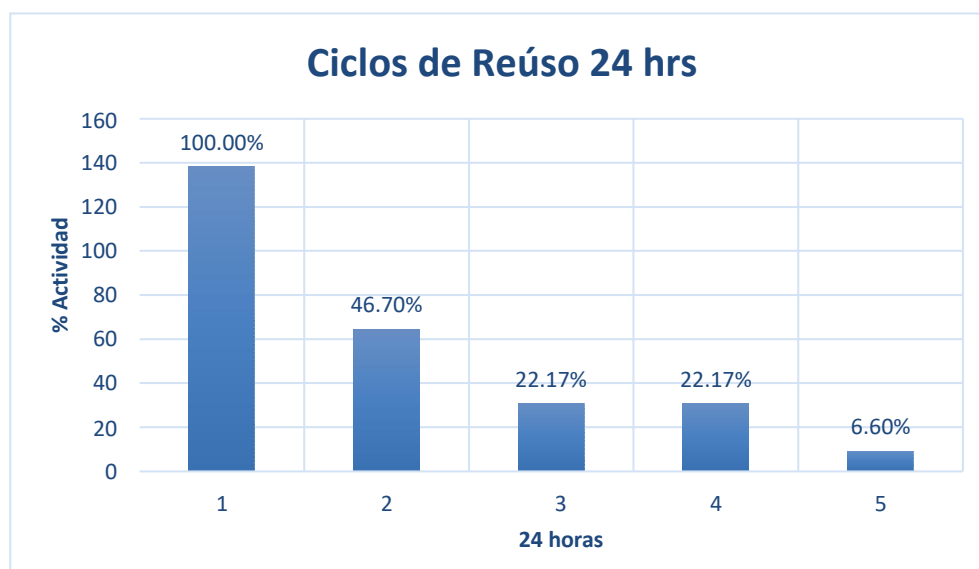
Izq. Maduración de 16h, Der. 48 h.

8.4.2 Ciclos de reuso

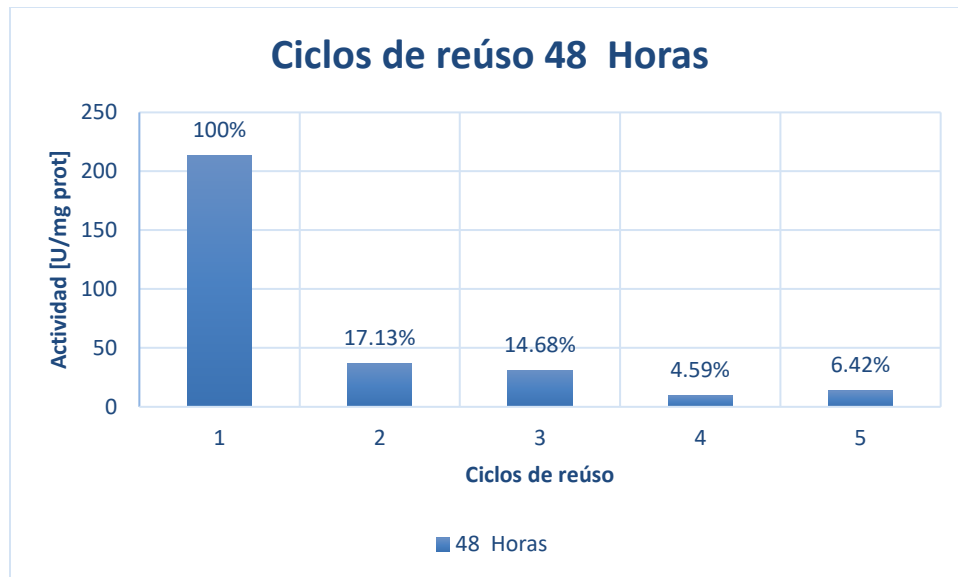
Se determinaron los ciclos de reuso para cada tipo de material obtenido llevando a cabo repetidas reacciones de hidrólisis de inulina y realizando entre cada ciclo un lavado con buffer de acetatos pH 5, 100Mm. La actividad de cada ciclo se cuantificó mediante el método de azúcares reductores de DNS.



Gráfica 7. Porcentaje de actividad en función de los ciclos de reuso para el catalizador gelificado durante 16 horas.



Gráfica 8. Porcentaje de actividad en función de los ciclos de reuso para el catalizador gelificado durante 24 horas.



Gráfica 9. Porcentaje de actividad en función de los ciclos de reuso para el catalizador gelificado durante 48 horas.

En las gráficas 7, 8 y 9 se puede observar el decaimiento de la actividad enzimática para los distintos tipos de sol-gel madurados durante 16, 24 y 48 horas respectivamente. Así mismo se puede observar el porcentaje de actividad en cada ciclo de reuso. Se observa que al ciclo 5 ya no existe actividad para los inmovilizados de 24 y 48h.

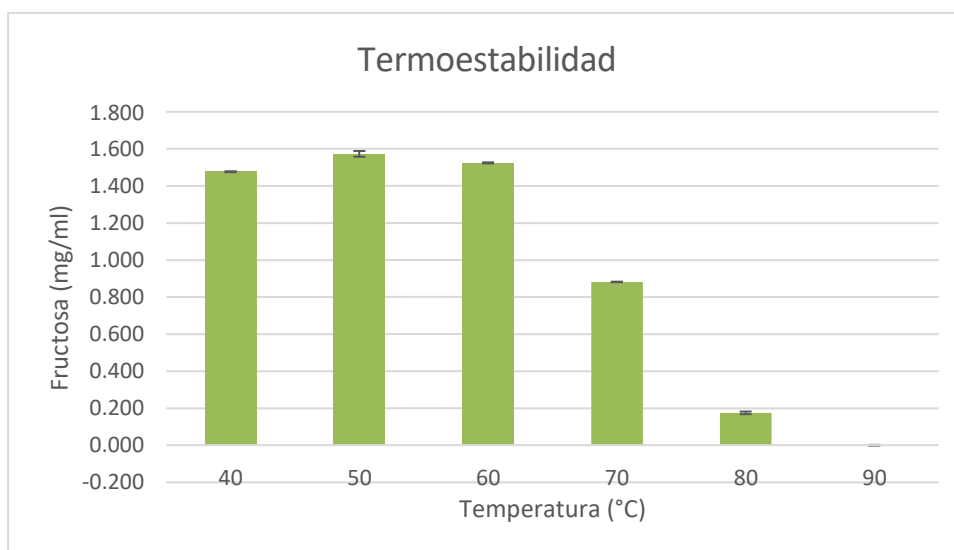
Como se puede observar el sol-gel madurado durante 24 horas es el que retiene durante más ciclos su actividad enzimática, en cambio los geles de 16 y 48 horas pierden hasta un 82% de actividad después del primer uso. Esto podría indicar que la red no es estable y por lo tanto está afectando la configuración de la enzima de tal forma que no permite que el sustrato penetre hasta los sitios activos de ésta. Santa et. al (2011) reporta 20 ciclos consecutivos en reactor batch para la inulinasa comercial Fructozyme L inmovilizada en matriz de sol-gel; Miroslava (2018) reporta 6 ciclos de reuso para la inulinasa comercial Novo 960 inmovilizada en PEG-PVA 10-10% m/v; Catana et. al (2007) reporta 24 horas de ciclos continuos en reactores batch a 40°C sin observar decaimiento en la actividad para la inulinasa comercial Fructozyme L. inmovilizada en un soporte de Amberlita.; Nakamura et. al (1995) reportó una hidrólisis completa en un reactor de columna de lecho empacado durante 45 días de operación continua.

8.4.3 Termoestabilidad

Uno de los factores para determinar la eficacia de un catalizador es su termoestabilidad, ya que esto le permite disminuir el decaimiento de la actividad conforme se aumenta la temperatura durante la reacción, además de que se ha reportado un incremento en la termoestabilidad al inmovilizar a las enzimas, lo que permite realizar reacciones en condiciones de temperatura distintas a las cuales trabaja comúnmente la enzima.

Para determinar la termoestabilidad de la enzima de Novo 960 libre se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria con la enzima tratada a seis temperaturas (40, 50, 60, 70, 80 y 90°C) durante dos horas, y posteriormente se realizó la hidrólisis con una solución de inulina al 0.5 % m/v en buffer de acetatos 100 mM pH 5 a una temperatura de 60°C (Gráfica 10)

La temperatura a la cual se obtuvo un mayor rendimiento fue a 50°C obteniendo 1.573 mg/ml de fructosa. También se puede apreciar la disminución de producción de fructosa conforme se aumentó la temperatura de tratamiento de la enzima, hasta no obtener ningún producto de hidrolisis al llegar a los 90°C, lo que indicaría la inactivación total de la enzima.

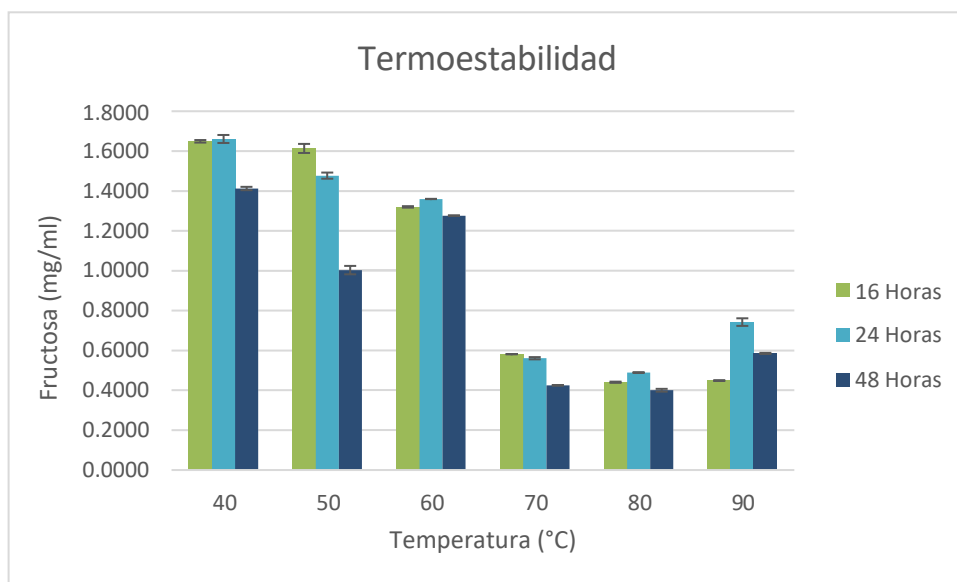


Gráfica 10. Termoestabilidad de la enzima libre de Novo 960. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

Posteriormente se determinó la termoestabilidad del catalizador obtenido a diferentes tiempos de maduración (16, 24 y 48 hrs), tomando una muestra de 100mg de material inmovilizado agregando 1 ml de buffer de acetatos 100Mm pH 5 y elevando a la

temperatura determinada durante 2 horas, posteriormente se decantó el buffer y se llevó a cabo la hidrólisis agregando 1ml de solución de inulina al 0.5% m/v en buffer de acetatos 100Mm pH 5 a 60°C, el producto de la reacción se cuantificó mediante el método DNS (Miller, 1959).

En la Gráfica 11 se observa la producción de fructosa después de tratar la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas. El mayor decaimiento de actividad se tiene al realizar la hidrólisis con el inmovilizado tratado a 70°C, y disminuye la actividad conforme aumenta la temperatura.



Grafica 11. Termoestabilidad de enzima NOVO 960 inmovilizada en sol-gel.

9. Conclusiones

- Se determinaron las mejores condiciones de reacción para la hidrólisis de inulina de chicoria con la inulinasa Novo 960 libre, obteniendo un máximo rendimiento de fructosa a 60°C y a pH de reacción de 5
- Se obtuvo un biocatalizador de inulinasa NOVO 960 por atrapamiento en sol gel capaz de hidrolizar la inulina de chicoría produciendo fructosa y utilizando Tetrametilortosilicato como precursor para la polimerización.

- Se obtuvieron tres materiales madurados a 16, 24 y 48 horas, obteniendo 56, 49 y 63% de actividad relativa para cada uno.
- Se comprobó la homogeneidad del inmovilizado por atrapamiento de proteína verde fluorescente (GFP) en una matriz de sol-gel utilizando Tetrametilortosilicato como precursor de la polimerización.
- Se analizaron por medio de Microscopia electrónica de barrido (SEM) los tres catalizadores obtenidos, con el fin de apreciar la morfología y el tamaño de partícula de cada material obtenido.
- Se realizaron 5 ciclos de reuso para cada inmovilizado, concluyendo que el catalizador de 16 horas pierde el 81.47% de su actividad después del primer ciclo. El catalizador de 24 horas disminuye su actividad en un 53.3% después del primer ciclo y el catalizador de 48 horas pierde el 82.87% de actividad después del primer ciclo. Así que el inmovilizado que más retiene su actividad durante los 5 ciclos es el catalizador madurado durante 24 horas.
- Se analizó la termoestabilidad de los tres catalizadores en un intervalo de temperatura de 40 a 90°C, observando una máxima actividad a 60°C para los tres materiales y un notable decaimiento al aumentar la temperatura a 70°C.

10. Perspectivas

- Purificar a la mezcla de enzimas presentes en la solución comercial, para cuantificar la actividad de la enzima libre y compararla con los resultados obtenidos.
- Inmovilizar a las enzimas purificadas por atrapamiento en sol-gel y comparar la actividad relativa.
- Cuantificar los fructooligosacáridos obtenidos mediante la hidrólisis de inulina.
- Estudiar los tiempos de maduración del sol gel y así como las proporciones de alcóxido y enzima.

Referencias

- Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. 2002. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 295: 828-831.
- Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. 2000. Highly efficient immobilization of glycosilated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol and Bioengineering* 70:342-348.
- Bais, H. P. & Ravishankar, G. A. 2001. *Cichorium intybus* L.-cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81(5):467-484
- Bhatia, R. B., Brinker, C. J., Gupta, A. K., & Singh, A. K. (2000). Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chemistry of Materials*, 12(8), 2434-2441.
- Borole, A., Dai, S., Cheng, CL., Rodríguez, M. Jr. Davison, B.H. 2004. Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 273: 113-116.
- Brígida, A. I. S., Calado, V. M. A., Gonçalves, L. R. B., & Coelho, M. A. Z. (2010). Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 832-838.
- Castañeda-Contreras, J. (2006). Fabricación de materiales amorfos y policristalinos con la ruta sol-gel. *Bol. Soc. Mex. Fis*, 20, 13-15.
- Catana, R., Eloy, M., Rocha, J. R., Ferreira, B. S., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2007). Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 101(1), 260-266.
- Carabin, I.G., & Gary Flamm, W.G. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fibre. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30, 268-282.
- Crittenden, R. A., & Playne, M. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in food science & technology*, 7(11), 353-361.
- D'souza, S. F. (1999). Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science*, 69-79.
- David, A. E., Yang, A. J., & Wang, N. S. (2011). Enzyme stabilization and immobilization by sol-gel entrapment. In *Enzyme Stabilization and Immobilization* (pp. 49-66). Humana Press, Totowa, NJ.

- Davidson, M., Maki, K., Synecki, C., Torri, S.A. y B., D.K., 1998. Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutrition Res*, 3(18), p.503-517.
- Dey G., Nagpal V., Banerjee R., (2002) Immobilization of alpha-amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103:303-313.
- Erdemir, S., & Yilmaz, M. (2012). Catalytic effect of calix [n] arene based sol–gel encapsulated or covalent immobilized lipases on enantioselective hydrolysis of (R/S)-naproxen methyl ester. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72(1-2), 189-196.
- European Medicines Agency. 2013. Assessment report on *Cichorium intybus* L. radix. EMA/HMPC/113041/2010.

- Franck, A. (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87: 287-291

- Frías Ierán, Nataly Miroslava, sustentante Purificación e inmovilización de la endoinulinasa (NOVO 960) por atrapamiento en geles de PVA-PEG / 2018
- Gill, I., & Ballesteros, A. (1998). Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol– gel polymers: an efficient and generic approach. *Journal of the American Chemical Society*, 120(34), 8587-8598.
- Hartmeier, W. (1985). Immobilized biocatalysts—from simple to complex systems. *Trends in biotechnology*, 3(6), 149-153.
- Hsieh, H. J., Liu, P. C., & Liao, W. J. (2000). Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology letters*, 22(18), 1459-1464.
- Huang, X. J., Chen, P. C., Huang, F., Ou, Y., Chen, M. R., & Xu, Z. K. (2011). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(3-4), 95-100.
- Ispas, C., Sokolov, I., & Andreescu, S. (2009). Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(2), 543-554.
- Judzentienė, A. & Budienė, J. 2008. Volatile constituents from aerial parts and roots of *Cichorium intybus* L. (chicory) grown in Lithuania. *Chemija*. 19: 25-28

- Karagulyan, H. K., Gasparyan, V. K., & Decker, S. R. (2007). Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 159-167). Humana Press.
- Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2004). Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(4), 378-382.
- Kaur, N. & Gupta, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of biosciences*. 27(7):703-714

- Kim Y., Faqih M. N., Wang S. S., 2001, Factors affecting gel formation of inulin, Carbohydrate polymers; 46: 135-145
- Klibanov, A.M. 1983. Immobilized enzymes and cells as practical catalyst. *Science*. 219: 722-727.
- Lee, D. H., Park, C. H., Yeo, J. M., & Kim, S. W. (2006). Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12(5), 777-782.
- Livage, J., Coradin, T., & Roux, C. (2001). Encapsulation of biomolecules in silica gels. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 13(33), R673.
- Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840.
- López, M. G., & Urías-Silvas, J. E. (2007). Agave fructans as prebiotics. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, 37, 1-14.
- Mabel, M. J. Sangeetha, P. T. Kalpana, P. Srinivasan, K. Prapulla, S. G.. (2008). Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. *Carbohydrate research*, 343, 56-66
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387.
- Mancilla-Margalli, A., López, M., (2006). Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agriculture Food*, 51, 7835-7840.
- Marchetti, G. (1993). Inulin and falcons. *Industries Alimentary*, 32, 945-949.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mitchell, S., & Pérez-Ramírez, J. (2011). Mesoporous zeolites as enzyme carriers: synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catalysis today*, 168(1), 28-37.
- Montani, 2004. Memoria del Primer Seminario en Alimentos Funcionales y su Beneficio Sobre la Salud Humana. San José, Costa Rica, Cooperativa Dos Pinos. I disco compacto 8 mm.
- Mozhaev, V. V., Berezin, I. V., & Martinek, K. (1987). [53] Reactivation of immobilized enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 135, pp. 586-596). Academic Press.
- Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A., & Ohta, K. (1995). Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of fermentation and bioengineering*, 80(2), 164-169.

- Neagu, C., & Bahrim, G. (2011). Inulinases-a versatile tool for biotechnology. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9, 1.
- Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología*, 14, 327-345
- Panesar, V. Bali, S. Kumari, N. Babbar, H. S. Oberoi, Prebiotics, in: S. K. Brar, G. S. Dhillon, M. P. S. Fernandez (Eds) *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, Springer, New York, 2014, pp. 237-260.
- Pierre, A. C. (2004). The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(3), 145-170.
- Prapulla, S.G., Subhaprada, V. & Karanth, N. G. (2000). Microbial productionof oligosaccharides: A review, *Adv. Appl. Microbiol.* 47:299-343
- Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual review of food science and technology*, 1, 305-339.
- Reslow, M. Adlercreutz, P., Mattiansson, B. 1988. On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-proof reaction media. *Eur. J. Biochem.* 172: 573-578.
- Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 223-230.
- Roberfroid M. Caloric value of inulin and oligofructose. *J. Nutr.* 1999; 129: 1436-1437.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13-S25.
- Rosales-Hernández, M., Kispert, L., Torres-Ramírez, E., Ramírez-Rosales, D., Zamorano-Ulloa, R., & Trujillo-Ferrara, J. (2007). Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves. *Biotechnology letters*, 29(6), 919-924.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G.2005. Recent trends in microbial production analysis, and applications of fructooligosaccharides, *Trends Food Sci. Technol.* 16:442-457
- Santa, G. L., Bernardino, S. M., Magalhães, S., Mendes, V., Marques, M. P., Fonseca, L. P., & Fernandes, P. (2011). From inulin to fructose syrups using sol-gel immobilized inulinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(1), 1-12.

- Sardar, M., & Gupta, M. N. (2005). Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering. *Enzyme and microbial technology*, 37(3), 355-359
- Sardar, M., Roy, I., & Gupta, M. N. (2000). Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit™ L-100. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 672-679.
- Scholz-Ahrens, K. E., & Schrezenmeir, J. (2007). Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2513S-2523S.
- Shen, Q., Yang, R., Hua, X., Ye, F., Zhang, W., & Zhao, W. (2011). Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. *Process biochemistry*, 46(8), 1565-1571.
- Shi, Q. H., Tian, Y., Dong, X. Y., Bai, S., & Sun, Y. (2003). Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption. *Biochemical engineering journal*, 16(3), 317-322.
- Singh BD (2009) Biotechnology expanding horizons. Kaylani, India Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K (2011) a-Amilase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B-Enzym* 74:1-5.
- Singh, R. S., Chauhan, K., & Kennedy, J. F. (2017). A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *International journal of biological macromolecules*, 96, 312-322.
- Singh, R. S., Dhaliwal, R., & Puri, M. (2007). Production of high fructose syrup from *Asparagus inulin* using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 649–655.
- Singh, R. S. & Singh, R. P. 2010. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technol. Biotechnol.* 48:435-450
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 565-572.
- Sosa-Herrera, M.G., Martínez-Padilla, L.P., Delgado-Reyes V.A., & Torres-Robledo, A. (2016). Effect of agave fructans on bulk and surface properties of sodium caseinate in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 60, 199-205.
- Spahn C, Minter SD (2008) Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent pat Eng* 2:195-200.
- Szymańska, K., Bryjak, J., & Jarzębski, A. B. (2009). Immobilization of invertase on mesoporous silicas to obtain hyper active biocatalysts. *Topics in Catalysis*, 52(8), 1030-1036.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S. I., & Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59(Suppl 2), 251-262.

- Utha State University. 2003. Talks USA (on line). Consulado 24 jun. 2004. <http://www.usu.edu/~forage/frucabs.htm>

- van Wyk, B. E., van Oudtshoorn, B. & Gericke, N. 1997. Medicinal plants of south Africa *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59: 377-385.

- van Arkel, J., Vergauwen, R., Sévenier, R., et al. 2012. Sink filling, inulin metabolizing enzymes and carbohydrate status in field grown chicory. *Journal of plant physiology.*169(15):1520-1529

- Vijn, I., and Smeekens, S. 1999, Fructan: more than a reserve carbohydrate. *Plant Physiology*, 42:77

- Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., & Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108(1), 40-48.

- Wang, J., Sporns, P., & Low, N. H. (1999). Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1549-1557.

- Wang, Q. & Cui, J. 2011. Perspectives and utilization technologies of chicory: a review. *African Journal of Biotechnology*, 10(23):95-115

- Yewale, T., Singhal, R. S., & Vaidya, A. A. (2013). Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(2), 96-101.