



39
rej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“EVALUACION DE DIFERENTES CEPAS DE
HONGOS Y LEVADURAS PARA LA
PRODUCCION DE ENZIMAS DE INTERES
INDUSTRIAL”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
PATRICIA GUADALUPE ESPINOSA MACEDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



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 está 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.

I N D I C E

	Pags.
1.-Introducción.....	1
2.-Objetivos.....	3
3.-Antecedentes taxonomicos de la levadura	
<i>K. marxianus</i>	4
4.-Generalidades.....	7
3.1 Lactasa.....	7
3.2 Pectinasa.....	20
3.3 Inulinasa.....	28
5.-Materiales y métodos.....	28
6.-Resultados y discusión.....	44
7.-Conclusiones.....	56
8.-Bibliografía.....	56

INTRODUCCION

Desde hace tiempo la Biotecnología adquirió gran importancia en todas las áreas de impacto industrial, tales como farmacéutica, alimentaria y química. En particular en el sector alimentario donde cada vez se obtienen mayores productos biológicos como son: enzimas, ac. cítrico, gomas, bebidas alcohólicas y muchos más.

Esta importancia se debe, entre otras cosas a que se puede realizar un proceso de obtención con un costo bajo, teniendo un producto con características ventajosas, como pureza, apariencia, entre otras. (50).

En el caso de la enzima lactasa, la obtención a partir de plantas y órganos animales resulta incosteable. Por esta razón la enzima comercial se obtiene de la fermentación de hongos como el *Aspergillus oryzae* y el *Aspergillus niger* y de las levaduras *Kluyveromyces fragilis* y *K. fragilis*. (6,53,48).

El hongo *A. oryzae*, y la levadura *K. fragilis*, juegan un papel importante en la industria, más allá de la obtención de la enzima lactasa, puesto que del hongo pueden obtenerse entre otras enzimas, la α amilasa y proteasas (3). Además, participa en la fabricación del sake de origen japonés, fabricado con arroz. El hongo es utilizado para elaborar el llamado "koji", el cual contiene amilasas que hidrolizan el

almidón del arroz, produciendo azúcares que pueden ser utilizados posteriormente por las levaduras del género *Kluyveromyces*. (3).

En lo que respecta a la levadura, de ella pueden obtenerse además de lactasa intracelular como ya se mencionó, pectinasa (19) e inulinasa (55), ambas extracelularmente, así como Proteína Unicelular, esta para consumo humano, existiendo procesos industriales para su obtención en países como Francia, E.U.A. y la U.R.S.S. (21).

Si a lo anterior agregamos que a partir de una sola fermentación con la levadura se pueden obtener simultáneamente dos enzimas (lactasa-inulinasa o lactasa-pectinasa, la primera intra y la segunda extracelular), las ventajas económicas son evidentes.

La importancia en la industria de alimentos de estas tres enzimas (lactasa, pectinasa e inulinasa), será tratada posteriormente.

OBJETIVOS.-

Evaluación de diferentes cepas de *Kluyveromyces fragilis* para la producción de lactasa, pectinasa e inulinasa, crecidas en un medio líquido de lactosa, pectina e inulina respectivamente. Así como elegir la cepa mejor productora de estas enzimas para probarla en la obtención simultánea de dos de ellas.

Evaluación de una cepa mutada del hongo *Aspergillus oryzae* para la producción de lactasa en un medio de Salvado de trigo.

ANTECEDENTES TAXONOMICOS DE LA LEVADURA

Kluyveromyces fragilis

Resulta importante señalar los cambios taxonómicos que ha sufrido la levadura *Kluyveromyces fragilis*, desde que en 1907 Jørgensen la aisló por primera vez del Kefir (49). El la denominó *Saccharomyces fragilis*, y es así como aparece en el compendio taxonómico "The yeasts a Taxonomic Study" primera edición, editada por Kreger-van Rij H.J.W. y Lodder J. en 1952 (66).

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 *DeKermomyces*) para incluir a *S. fragilis*, *S. fragilis*, *S. fragilis*, *S. fragilis* y algunas otras especies. Sin embargo, ni Wickerham ni Burton dieron una descripción formal, tampoco designaron un tipo para este género, así que este nombre no llegó a ser válido. (49).

En 1954 Dubravcevic en una edición Rusa de su monografía propuso la colocación de especies diploides (aquellas como *S. fragilis*) en un nuevo género llamado *Fabospora*. Fue hasta 1960 cuando formalmente se aceptó el nombre de *Fabospora fragilis* (49).

van der Walt (1956) (49) 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 *Zygospora* y los unió en un simple taxón. De acuerdo al Código Internacional, el nombre más viejo de *Kluyveromyces*, fué retenido. Así, el nuevo nombre de *Fabospora fragilis* se convirtió en *Kluyveromyces fragilis* (49). Es así como aparece en la segunda edición del compendio taxonómico "The Yeasts a Taxonomic Study" editado por Kreger-van Rij en 1970. (66).

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. Debido a que *K. marxianus* es el nombre más antiguo tiene prioridad, quedando por tanto éste sobre *K. fragilis*.

En la última edición de The Yeast A Taxonomic Study, publicada por Kreger-van Rij 1984, (66), esta levadura aparece como *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*; en esta edición la especie *K. marxianus* aparece conteniendo a las siguientes variedades: *marxianus*, *bulgaricus*, *dobzhanskii*, *erosophilum*, *lactis*, *vanudenii* y *wikenii*.

Recientemente Sidenberg y Lachance (1986) (57) propusieron el establecimiento de la especie *K. marxianus* sin

variedades, incluyendo los antiguos nombres de las especies *marxianus*, *fragilis*, *bulgaricus*, *cicerisporus* y *nikenii*, y la especie *K. lactis* con las variedades *lactis* y *drosophilus*. Estas modificaciones serán incluidas en la próxima edición del compendio "The Yeasts a Taxonomic Study", que se encuentra en preparación, donde el capítulo de *Kluyveromyces* estará escrito por el Dr. Marc Andre Lachance. (comunicación personal).

2. GENERALIDADES

2.1 Lactasa

2.1.1 Antecedentes.

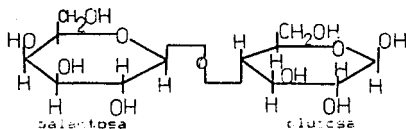
-La lactosa o azúcar de la leche, es un disacárido formado por glucosa y galactosa (fig 2.1.1.1), el cual posee un bajo poder edulcorante, así como una baja solubilidad y no puede ser absorbida directamente por el intestino de los mamíferos. Los monosacáridos de la lactosa, tienen un poder edulcorante mayor a esta y son tres o cuatro veces más solubles. (tabla 2.1.1.1).

tabla 2.1.1.1

Poder edulcorante relativo de soluciones al 10% de sacarosa y solubilidad de las mismas. (2,10,43).

Azúcar	Poder edulcorante %	Solubilidad en H ₂ O g/ml
Sacarosa	100	2.0
Lactosa	40	0.2
Glucosa	75	1.0
Galactosa	70	1.0

Fig. 2.1.1.1. Estructura de la lactosa



La enzima lactasa u β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.22) hidroliza la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa.

Esta enzima puede ser encontrada en el intestino de mamíferos jóvenes, en plantas, hongos, bacterias y levaduras. En la tabla 2.1.1.3 se enlistan varios microorganismos productores de lactasa así como otras fuentes.

La lactasa comercial se obtiene a partir de *Aspergillus niger*, *A. oryzae* y *Kluyveromyces fragilis* y *lactis*. En la tabla 2.1.1.3 se enlistan algunas lactasas comerciales de levaduras. García S. M. (Comunicación personal).

El factor que determina el área de aplicación de las lactasas es su pH óptimo de actividad. La lactasa de bacterias y levaduras presenta un pH de 6.5-7.0 lo que las hace directamente aplicables sobre la leche, suero dulce y soluciones de lactosa. Las lactasas de hongo por su parte tienen un pH de 4.5 son solamente aplicables al suero ácido.

La tabla 2.1.1.4 nos muestra la temperatura y el pH óptimos de lactasas de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis* (29,34).

Tabla 2.1.1.4 Temp. y pH óptimo de lactasas de hongos y levaduras. (29,34)

	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>K. fragilis</i>	<i>K. lactis</i>
Temp. °C	55	50	40	37
pH	3.5-4.5	4.5-5.5	6.5-7.0	6.5-7.0

Tabla 2.1.2 Fuentes de lactasas.

Bacterias: *Escherichia coli*
Bacillus megaterium
Thermus aquaticus
Streptococcus lactis
Streptococcus thermophilus
Lactobacillus bulgaricus
L. helveticus
Bacillus circulans

Hongos: *Aspergillus niger*
A. oryzae
A. flavus
Mucor pusillus
M. miehei
Alternaria palmi

Levaduras: *Kluyveromyces marxianus*
K. lactis
Candida pseudotropicalis
Brettanomyces anomalus

Plantas: Durazno
Albaricoque
Almendra
Café

Organos de animales:
Intestino
Tejidos de cerebro y piel

Referencia 22,65

Tabla 2.1.3 Lactasas comerciales de levadura. (3)

Nombre comercial	Compañía	Fuente	UL/ml
Maxilac LX-5000	GIST-BROCADES	<i>K. lactis</i>	5000
Maxilac L-2000	GIST-BROCADES	<i>K. lactis</i>	2000
Hydrolat	STURGE-ENZYMES	<i>K. marxianus</i>	5000
LF 7028	ROHM	<i>K. marxianus</i>	2000
Lectozym	NOVO	<i>K. marxianus</i>	3000
Neutral lactase	PFIZER	<i>Candida pseudotropicalis</i>	2750
Takamine lactase	MILES	<i>K. marxianus</i>	-
Lact-aid	SUGARLO	<i>K. marxianus</i>	1000
Kerulac	GIST-BROCADES	<i>K. lactis</i>	-

UL= Cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μ mol de ONPG por min. a pH 6.6 y 40°C.

La hidrólisis de la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa trae como consecuencia algunas ventajas en la elaboración de productos lácteos. Los productos de la hidrólisis presentan mayor solubilidad, como ya se había mencionado, evitándose así los problemas asociados a la cristalización, principalmente en productos como helados, leche condensada, cajetas, etc. Como también se incrementa el poder edulcorante. Además, se hace accesible la leche a la población con problemas de intolerancia a la lactosa. La intolerancia es el estado que presenta un individuo, ocasionado por una deficiente síntesis en la mucosa del yeyuno de la β -galactosidasa (lactasa), que provoca que la lactosa de la leche y sus derivados no sea hidrolizada y absorbida en el intestino delgado; en estas condiciones, la lactosa es posteriormente utilizada por diversos microorganismos del intestino grueso que, al fermentarla, producen gases y ácidos, que provocan malestares como flatulencia, dolores abdominales y hasta diarrea, ocasionando por tanto pérdida considerable de líquidos (2,22,33).

2.1.2 Producción de la enzima.

Como ya se dijo anteriormente la producción comercial de esta enzima es utilizando cepas del hongo *A. niger* y *A. oryzae* y cepas de las levaduras *K. marxianus* y *K. lactis* estando por tanto bien definidos los parámetros de esta fermentación. Los medios de

cultivo utilizados en la producción de la enzima por el hongo *A. oryzae* es mediante fermentación sólida, utilizando salvado de trigo adicionado de azúcares como glucosa y sacarosa. (1,4E). Como ya se mencionó la enzima del hongo es extracelular.

Para las levaduras de *K. marxianus* y *K. lactis*, se utiliza como medio de cultivo suero de queso, teniendo muy buenos rendimientos. (9,17,54,59).

En la tabla 2.1.2.1 se enlistan pH y Temperaturas óptimas de crecimiento para los microorganismos más importantes productores de la enzima.

Tabla 2.1.1.1 Temp. y pH óptimas de crecimiento de diferentes microorganismos productores de lactasa

Microorganismo	pH	Temp °C	Ref.
<i>Candida pseudotropicalis</i> .	2.6	38	9
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	4.5	28	67
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	28	34
<i>Aspergillus oryzae</i>	4.5	30	48

Para la enzima de *K. marxianus* se tiene que la actividad especifica de lactasa y el rendimiento total de lactasa aumentó durante la fase logarítmica y alcanza su máximo en los inicios de la fase estacionaria. Posteriormente se observa un decremento en la actividad. (54)

Puesto que la enzima producida por levaduras es intracelular tiene que ser extraída. Para ello existen diferentes métodos reportados por varios autores como Mahoney, R.R., Nickerson, T.A. (40), y Sánchez, F.L. (54).

En lo referente a la lactasa fungal se tiene que los máximos rendimientos de producción se logran a los cinco días de fermentación sobre un medio de salvado de trigo. (1,48).

2.1.3 Estabilidad de la enzima.

Como es sabido, la estabilidad de una enzima se ve afectada por muchos factores como son: temperatura, pH, tiempo, condiciones de almacenamiento y la concentración de la solución de la enzima entre otros.

Diferentes autores han reportado los efectos del pH y la temperatura en la estabilidad de la enzima de *K. marxianus* (40,41,67), así como también sobre la lactasa de *A. nyzae* (48). A continuación se presentan estos resultados.

La enzima de *K. marxianus* fue razonablemente estable por encima de los 34°C (41). Por arriba de los 40°C la desnaturalización fue rápida. En cuanto al pH los resultados se obtuvieron incubando soluciones de la enzima en ausencia de lactosa por 30 min. a 25°C a diferentes valores de pH. Después se

reajustó el pH a 6.5 para la determinación de actividad. (41).

Tabla 2.1.3.1.

tabla 2.1.3.1. Estabilidad de la enzima

pH	% act. retenida
5.5	18
6.0	80
6.5	100
7.0	100
7.5	100
8.0	90
8.5	70
9.0	40

En el rango de 6.5 a 7.5 la enzima permaneció estable.

La estabilidad de la enzima de *A. nyrzae* a diferentes valores de pH esta bien establecida en la patente de este hongo (48). Los valores reportados en la tabla (2.1.3.2) se obtuvieron manteniendo soluciones de la enzima a diferentes pH a 30°C por una hora. Utilizando para la medición de la actividad retenida como sustrato ONPG.

Tabla 2.1.3.2. Estabilidad de la enzima

pH	% act. retenida
3.0	12
3.5	69
4.0	92
5.0	100
6.0	100
7.0	100
8.0	100
9.0	62
9.5	18

Como se puede observar la enzima es estable en el rango de pH de 5.0 a 7.0.

En la tabla 2.1.3.3. aparecen los valores de estabilidad de la enzima a diferentes valores de Temp. Estos se obtuvieron manteniendo las soluciones de la enzima a diferentes Temp. durante 10 min. Se constata que la enzima se mantiene estable a las temperaturas de 30 a 40°C.

Tabla 2.1.4.3 Estabilidad de la enzima a diferentes valores de Temp.

Temp °C	% act retenida
30	100
40	100
50	33
60	15

Las condiciones de almacenamiento para lactasa de *A. niger*, reportadas por varios autores aparecen en la tabla 2.1.3.4.

Tabla 2.1.3.4. Condiciones de almacenamiento

Tiempo de almaceña.	Temp °C	Act. ret. %	Referen.
1 semana	22	95	40,41,67
2-3 semanas	4	95	29,31
3 meses	-20	95	29,31,32

Es evidente que dentro del rango estudiado la enzima es estable.

2.1.4 Agentes que afectan la actividad de la enzima

Existe una gran cantidad de agentes que pueden afectar la actividad de la lactasa. Entre ellos se pueden mencionar a ciertos metales, así como también a los mismos productos de la hidrólisis.

De los metales se tienen aquellos que con su presencia se logra una máxima actividad de lactasa, entre ellos el Mn^{2+} con una concentración de 10^{-5} es el más efectivo (39,41,67). Otros activadores en menor escala son: Ca^{2+} , Mg^{2+} en concentraciones de 10^{-2} y 10^{-4} respectivamente (34).

Las enzimas de *Kluyveromyces marxianus* y *Aspergillus oryzae* son inhibidas por metales como Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} particularmente las de levaduras por Na^+ y Ca^{2+} , aunque esta inhibición se reduce adicionando fosfatos. (54).

A continuación se enlistan los compuestos que causan mayor inhibición sobre la acción de las lactasas de *K. marxianus* y *A. oryzae*, así como sus concentraciones (48,67).

COMPUESTO	<i>K. marxianus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>A. oryzae</i>
	Conc. (M)		Inhibición (%)	
NaCl	10^{-1}	-	58	-
HgCl_2	10^{-2}	10^{-4}	100	100
CuSO_4	10^{-2}	10^{-2}	90	90
CdCl_2	10^{-3}	-	42	-
CaCl_2	10^{-2}	-	100	-
AgNO_3	10^{-2}	10^{-2}	100	100
EDTA	10^{-3}	10^{-2}	100	0
PCMB	10^{-4}	-	100	-
N-bromosuc- cinamida	-	10^{-4}	-	100
Laurilsulfa- to de sodio	-	10^{-2}	-	100

2.1.5 Aplicaciones de la lactasa

Aunque el uso potencial de las lactasas ha sido reconocido por años, no fué desarrollada la obtención a nivel comercial sino hasta los años 50s. El reconocimiento de los

problemas de intolerancia a la lactosa en los 50s jugó un importante papel en la implementación del proceso para la producción de la enzima.

A continuación se mencionan las principales aplicaciones de los hidrolizados de lactosa, ya sean a partir de leche o suero (34).

1.- La aplicación de la lactasa directamente sobre la leche por el consumidor es ya una realidad en los E.U., en donde se pueden encontrar lactasas en el mercado (35). Su uso es muy sencillo, teniendo solo que agregar una pequeña cantidad de enzima a la leche y dejar en refrigeración 24 horas. Esto es de gran ayuda para las personas intolerantes a la lactosa.

2.- Sobre la leche a nivel industrial.

2.1 Leche hidrolizada de venta en los mercados. Existe en los E.U. un producto llamado Lactaid, accesible al público (36).

2.2 Productos concentrados.- Leche condensada y helados. se previene la cristalización de la lactosa.

2.3 Leche en polvo para dietas especiales particularmente para niños con deficiencia temporal de β -galactosidasa, así como para ancianos y enfermos.

2.4 Productos fermentados. Se alcanza más rápidamente el pH deseado - de este modo se reduce el tiempo de proceso. Ejem. Yogurth, quesos.

3.- Suero de leche.-El suero es el sobrenadante que resulta de la coagulación de la caseína durante la elaboración del queso. El suero contiene todos los minerales, proteínas y azúcares solubles de la leche; el contenido de lactosa es de 4.2 a 4.4% (10).

3.1 El hidrolizado del suero es concentrado hasta obtener jarabes con un 70-75% de sólidos. Estos jarabes son utilizados como ingredientes en la elaboración de helados, productos de panadería, confitería y refrescos (34).

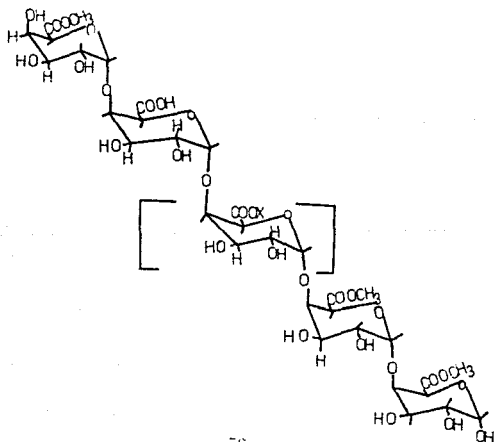
2.2 Pectinasa.

2.2.1 Antecedentes.

El término sustancias pécticas se usa generalmente para referirse a un grupo de polisacáridos vegetales en el cual el ácido D-galacturónico es el principal componente. La estructura básica de estos compuestos está formada por moléculas de ácido D-galacturónico unidos por enlaces glucosídicos α -D(1-4), en donde algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con grupos metilos o en forma de sal. Cuando el ácido galacturónico se encuentra esterificado por grupos metilos se designa el polímero como Pectina; mientras que si se encuentran libres de grupos metilo el polímero se conoce como ácido Pécico (3).

En la fig. 2.2.1.1 aparece la fórmula estructural de las sustancias pécticas.

X puede ser H o CH_3



Las enzimas que modifican la estructura de las pectinasas son llamadas enzimas pectinolíticas o pectinasas y son clasificadas con base en su modo de ataque o su preferencia por el sustrato pectina o ác. péctico (2):

1) Pectin metilesterasa (E.C. 3.1.1.11). Hidroliza el éster metílico produciendo metanol y pectinas de bajo metoxilo.

2) Endo polimetil galacturonasa. Hidroliza el enlace $\alpha(1,4)$ de las pectinas.

3) Endo poligalacturonasa (E.C. 3.2.1.15). Hidroliza al azar el enlace $\alpha(1,4)$ del ác. péctico.

4) Exo poligalacturonasa (E.C. 3.2.1.67). Hidroliza el enlace $\alpha(1,4)$ del ác. péctico a partir del extremo reductor.

5) Endo pectiniliasa (E.C. 4.2.2.10).

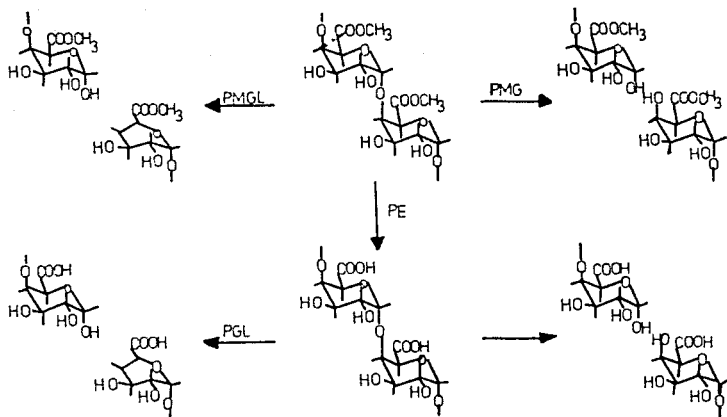
6) Endo pectatoliasa (E.C. 4.2.2.2).

7) Exo pectatoliasa.

Las tres últimas actúan formando dobles ligaduras en las pectinas y ác. péctico, provocando la ruptura del enlace glicosídico.

La figura 2.2.1.2 muestra la forma de actuar de las pectinasas.

Las pectinasas se encuentran en una amplia variedad de especies del reino vegetal, principalmente en los frutos donde juegan un papel importante en el proceso de maduración. En estas especies es más abundante la Pectinestearasa (PE), aunque también suelen encontrarse las Poligalacturonasas (PG). (21). Aunque los vegetales raramente son utilizados como fuente de pectinasas.



2 CH₃ OH

FIG. 2.2.1.2.

VIAS DE ACCION DE LAS PECTINASAS

Para la mayoría de las aplicaciones comerciales, las preparaciones de pectinasas se obtienen de hongos y consisten en una mezcla de varias enzimas (11). De estos el más importante productor es *Aspergillus niger* (18).

2.2.2 Endo-poligalacturonas de *K. marxianus*.

De todas las especies de levaduras conocidas que poseen act. pectinolítica, la de *Kluyveromyces marxianus* es generalmente reconocida como la más efectiva.

La enzima producida por esta levadura ha sido ampliamente estudiada (19,20), y se sabe que sólo produce la enzima endopoligalacturonasa (39). Existen algunos trabajos en la literatura (35) en donde se reporta que la enzima presenta diferentes formas, diferenciadas por su peso molecular y punto isoeléctrico, aunque estas dependen de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* utilizada. A continuación se presentan estos resultados.

	PM	pI	Temp °C	pH
enzima I	46,000	6.1	50	4-5
enzima II	50,000	6.1	50	4-5
enzima III	30,000	5.8	50	4-5

Esta enzima es específica para los ácidos poligalacturónicos y oligalacturónicos y muestra preferencia por las cadenas largas, formando mezclas de mono-di y tri ácidos

galacturónicos. (21). Hidroliza también la pectina en forma limitada, en grado inversamente proporcional en función al contenido de metoxilos (20,37).

2.2.3 Producción y estabilidad de la enzima

Wimborne y Rickard (69), reportaron que la poligalacturonasa de *K. marxianus* es una enzima extracelular producida de manera parcialmente constitutiva. Estos autores observaron que al adicionar pectina al medio de cultivo, la producción de la enzima se duplica. Sin embargo la pectina no es una buena fuente de carbono para el crecimiento de la levadura, como también reportaron.

Wimborne y Rickard (69), también señalan que para un medio de glucosa sin pectina la síntesis de la enzima es completamente reprimida por condiciones de alta aereación, siendo producida solamente bajo condiciones anaerobias, coincidiendo con lo reportado por García G.M. y Gómez R.L. (20,21).

En la tabla 2.2.2.1 aparecen la temperatura y pH óptimos de incubación y de actividad para la lactasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus*.

Tabla 2.2.2.1

	Incubación	Actividad	Referencia
Temp °C	27	50	35,62
pH	5	5	35.62

La producción de la enzima está asociada al crecimiento y generalmente comienza a decrecer en la fase estacionaria (19,20), y como se mencionó anteriormente se produce de una manera parcialmente constitutiva. (69).

Con respecto a la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas, se tiene que la enzima no presenta ninguna alteración en su actividad a los 30 min. de incubación a 30°C, pero pierde el 50% de ésta si se incuba por encima de los 55°C, quedando sin actividad a los 70°C. (35). El rango de estabilidad de pH que presenta la enzima es de 3.5 a 6.0 (35).

Para su almacenamiento las células son removidas del líquido de fermentación por centrifugación y la solución de enzima cruda es mantenida a 0°C con tolueno como preservativo. A esta temperatura la solución es muy estable pudiendo ser mantenida por varios meses sin la pérdida de la actividad (36).

2.2.4 Agentes que inhiben la actividad de la enzima.

Son varios los compuestos que causan alguna alteración en la actividad de la enzima. A continuación se enlistan algunos compuestos y las concentraciones a las que inhiben la actividad de la enzima, reportados por Takuo Sakai et al. (62).

Compuesto	conc mM	% Inhibición
HgCl ₂	1	78
AgNO ₃	1	49
BaCl ₂	1	49
CaCl ₂	1	41
PbCl ₂	1	99
p-CMB	0.1	56

ác. p-cloromercuribenzoico.

La actividad no se ve afectada por la adición de EDTA.

Luh y Phaff (26) reportan que sometieron a la enzima a un tratamiento con HNO₃ 1M a pH de 3.9 con temperatura controlada por 1 hora y la actividad cayó prácticamente a cero, debido a que el HNO₃ interactúa con los grupos amino libres presentes en la molécula de la enzima.

2.2.5 Aplicaciones

Las pectinasas tienen un papel muy importante en la industria de alimentos, pudiendo ser utilizadas en un amplio rango de procesos como son:

i) agente clarificante en la producción de jugos de frutas y vegetales (25,62). La enzima de *P. maritimus* ha sido probada con muy buenos resultados en la clarificación de jugos de naranja, comparándose con una enzima comercial (23).

En los jugos las sustancias pécticas se encuentran en estado coloidal, y mantienen suspendidos otros compuestos, lo

zual resulta en un alto grado de turbidez. Por tanto, cuando las pectinasas se agregan, actúan despolimerizando la pectina, se destruye el coloide y todo el material en suspensión se precipita, retirándose por filtración (72).

2) Como agente de maceración y licuefacción de tejidos para preparar concentrados de puré de frutas y extracción de aceites esenciales (15,31,35,62).

3) Combinaciones de pectinasas y celulasas son usadas en la producción del mosto de uva en la elaboración de vino y en la producción de almidón a partir de papa y maíz (15).

4) En ocasiones el bagazo de las frutas resultante de la elaboración de jugos recibe un tratamiento de pectinasas previo a un segundo prensado para la extracción del líquido residual; esto redonda en un rendimiento mayor.

5) Se utilizan también en la estabilidad de la turbidez en jugos de frutas, vegetales y néctares (32). El mecanismo de estabilización está basado probablemente en la destrucción de poligalacturonidos formados por la acción de la PE a urónidos de bajo peso molecular.

2.3 Inulinasa.

2.3.1 Antecedentes.

La inulina es un polímero de fructosa encontrado como un carbohidrato de reserva en raíces y tubérculos y es muy abundante en la alcachofa de Jerusalem y algunos agaves (44), siendo en estos el polisacárido más abundante (6).

En la tabla 2.3.1.1 se muestra la composición del agave tequilana. Dentro de estos generos se tienen muchas variedades siendo las más importantes: Carpintero, Pata de Mula, Azul, Sihuín, Bermejo, Azul 2, que vegetan en los estados de Zacatecas, Guanajuato, Querétaro y principalmente en la zona de los Altos de Jalisco.

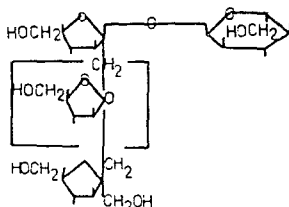
Tabla 2.3.1.1 Composición de diferentes variedades de agave tequilana. (6)

Nombre Común	H ₂ O %	Fibra Cruda %	Inulina %	AzúC. Red. Totales %	N ₂ prot. %	Can. %	pH
Carpintero	70	11.0	15.4	1.03	0.021	3.9	5.5
Pata de Mula	69	12.0	19.8	1.00	0.019	2.9	5.0
Bermejo	65	12.5	18.1	1.06	0.022	2.5	5.0
Azul	62	11.8	20.1	1.03	0.024	2.5	5.5
Zapotluchino	70	12.0	14.3	1.03	0.023	2.7	4.5
Sihuín	65	12.5	17.5	1.00	0.021	2.5	4.5
Cioto	68	12.5	15.6	1.23	0.020	2.4	5.0
Azul 2	60	11.0	24.1	1.50	0.020	2.7	4.5

La inulina es un polisacárido lineal de moléculas de D-fructosa unidas por un enlace(2,1), mostrando una unidad de glucosa terminal.

A continuación se muestra la estructura de la inulina (65):

Fig.2.3.1.1



El largo de la cadena varía más o menos entre 30 y 35 unidades de fructosa (44). Esta variación está en función de la planta y de la temporada; durante el crecimiento el polímero de inulina se incrementa hasta el fin de la temporada de calor y posteriormente decrece. Esto se debe presumiblemente a la acción de la actividad de las inulinasas propias de la planta (65).

Las enzimas que degradan la inulina son encontradas en plantas y microorganismos, incluyendo hongos, levaduras y bacterias y son llamadas inulinasas o inulasas. En la tabla 2.3.1.2 se enlistan varios microorganismos productores de inulinasas.

Estas enzimas fueron purificadas primero de tubérculos como la alcachofa de Jerusalén en 1764 (65), estas inulinasas de plantas no presentan actividad de invertasas. En contraste, las enzimas de microorganismos presentan actividad sobre sacarosa tanto como sobre inulina. Generalmente las inulinasas están clasificadas como 2,1,6-D-fructan-fructanohidrolasas (E.C.3.2.1.7).

pero la diferencia con las invertasas (E.C. 3.2.1.26) no es clara para las enzimas micobacterianas. Para tratar de diferenciar unas de otras esta generalmente aceptado que la relación de actividad sobre inulina vs. sobre sacarosa (I/S) caracteriza las enzimas: para las inulinasas la relación I/S es mayor de 10^{-2} , mientras que para las invertasas este valor es menor de 10^{-4} (44).

Esta relación fue utilizada en el presente trabajo.

2.3.2 Influencia de la fuente de carbono en la formación de la enzima

El adicionar inulina como fuente de carbono es generalmente un pre-requisito para la formación de la enzima. Snyder y Pfeff (58) estudiaron la influencia de varios carbohidratos como inductores de la enzima de *A. niger*.

Los más altos rendimientos se obtuvieron con inulina (0.3 U/ml) y rafinosa (0.15 U/ml). Un rendimiento medio se tuvo con fructosa y sorbitol (0.1 U/ml) y muy bajo con sacarosa, galactosa, glucosa y manitol. (58).

También fue estudiada esta producción con fuentes de carbono fermentables y no fermentables por Grootwassink y Hewitt (26). Obteniendo los más altos niveles de inulinasa 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 inulinasa.

Utilizaron también una cepa mutada hiperproductora,

Tabla 2.3.2 Microorganismos productores de inulinasa. (65)

Hongos:

Aspergillus niger
A. oryzae
A. ficus
Eupenicillium javanicum
Fusarium roseum
F. oxysporum
Gelasinospora cerealis
Penicillium italicum
P. rubrum
P. spp
Rhizopus delemar

Levaduras:

Kluyveromyces marxianus
K. lactis
Candida kefyr
C. pseudotropicalis
Debaryomyces cantarellii
D. phaffii
Hansenula beijerinckii
Rhodotorula spp
Schizosaccharomyces pombe
Saccharomyces fermentati
S. rosei

Bacterias:

Arthrobacter ureafaciens
Flavobacterium multivorum
Lactobacillus plantarum

obteniendo altos rendimientos sin importar el tipo de fuente de carbono empleada: Glucosa 26 U/mg, Etanol 18 U/mg, Lactato 22 U/mg. (Una unidad equivale a una μmol de sacarosa hidrolizada en 1m) (26).

Pareih y Margaritis (56) estudiaron la influencia de la fuente de carbono con los siguientes resultados: el más alto rendimiento de la actividad de inulinasa se encontró con inulina (212 U/ml), siguiendo la sacarosa (63.5 U/ml), fructosa (53 U/ml) y por último glucosa (49 U/ml).

Estos autores concuerdan también con Kouwenhorst (53) en que la producción de la inulinasa es inducible por la adición de inulina como fuente de carbono, así como que la fructosa es un inductor primario (53) de ésta pero que a su vez en concentraciones altas provoca una represión catabólica.

2.3.3 Efecto del pH y temperatura del medio en la producción de la enzima

Como ya se ha dicho el control de parámetros como pH y temperatura durante una fermentación es de suma importancia para alcanzar los más altos rendimientos del producto final.

En la tabla 2.3.3.1 se muestran algunos valores reportados como óptimos para la producción de inulinasa de *K. marxianus* y algunos otros microorganismos.

Tabla 2.3.3.1 Temp. y pH óptimos para la producción de inulinasa

Microorganismo	pH	Temp C	Ref.
<i>Candida kefyr</i>	-	27-30	65
<i>Penicillium spp</i>	5	30-33	65
<i>K. marxianus</i>	3.5-5.0	30-34	25
<i>K. marxianus</i>	4.0-5.0	40	52
<i>K. marxianus</i>	4.9	30	71
<i>K. marxianus</i>	4.5	28	45
<i>K. marxianus</i>	5.0	28	56
<i>Flarobacterium multivorum</i>	7.5	30	30

2.3.4 Producción y localización de la inulinasa

Snyder y Phaff (25,45,58) reportaron que la levadura de *K. marxianus* produce inulinasa intra y extracelular.

Para esta levadura la producción de la inulinasa intracelular es paralela 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 (25,45).

Jean-Jacques Allais et al. (30) encontraron por el contrario que para las bacterias la producción de la enzima no está asociada al crecimiento.

Varios trabajos han mostrado que no existe diferencia entre las enzimas intra y extracelular con base en ciertas características fisiológicas (30).

J. W. Grootwassini et al. (25) reportaron que del total de inulinasa formada el 70-75% están ligados a las células, mientras que el resto se encuentra en el medio.

En un reciente trabajo R. J. Rowenhorst et al. (23) investigaron la localización de la enzima de *K. fragilis* en tres fracciones: 1) Sobrenadante; 2) pared celular; 3) Ligada a la célula, encontrando que esta distribución dependía de cuatro factores: a) naturaleza de la fuente de carbono; b) rango de dilución; c) composición del medio (mineral o complejo) y d) temperatura de crecimiento.

2.3.5 Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de la inulinasa.

Los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad de la enzima, varían dependiendo el origen de la misma, esto es, si provienen de hongos, levaduras o bacterias.

La tabla 2.3.5.1 nos da una idea de lo antes dicho:

Tabla 2.3.5.1 Temp. y pH óptimos de crecimiento para varios microorganismos productores de inulinasa

Microorganismo	pH	Temp °C	Ref.
Hongos: <i>Penicillium spp</i>	4.5-5.0	45	44
<i>Aspergillus ficus</i>	5.0	30	44
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	60	
Levaduras: <i>Candida kefyr</i>	4.5	50	46
<i>K. marxianus</i>	5.0	55	26, 53, 56
<i>Debaryomyces cantarelli</i>	4.0	30	5
Bacterias: <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	6.0	50	64
<i>Flavobacterium aultivorum</i>	5.0	30	30

2.3.6 Inhibidores y Activadores de las inulinasas.

Muchos autores han estudiado el efecto de diferentes compuestos, tanto inhibidores como activadores de la actividad de la inulinasa.

En la tabla 2.3.6.1 se resumen algunos de estos compuestos, sobre inulinasas de varios microorganismos (65).

Tabla 2.3.6.1 Actividades relativas de inulinasas después de agregar diferentes compuestos con concentraciones de 10^{-3} M. (65)

Microorganismo	Ca ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Hg ²⁺	Ag ⁺
Hongos: <i>Penicillium</i> spp	100	40	100	127	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	100	80	85	132	0	0
levaduras: <i>Debaryomyces</i> <i>hansenii</i>	-	31	2	0	85	65
<i>Kluyveromyces</i> <i>marxianus</i>	100	25	100	100	0	0
Bacterias: <i>Anthrobacter</i> <i>ureafaciens</i>	98	35	100	100	0	0

2.3.7 Aplicaciones de la enzima.

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 Syrup UHFBS), pudiendo utilizar agaves como fuente de inulina. Lo cual por la abundancia de estos en nuestro país provee de una excelente fuente del carbohidrato.

Estos jarabes fructosados ya desde hace varios años están ganando una interesante porción en el mercado de los edulcorantes, sustituyendo a la sacarosa, la cual causa problemas relacionados con la obesidad, caries, y diabetes (65).

Como es sabido la fructosa es preparada a partir de sacarosa por una conversión enzimática. Kopsell, et al. U.S. pat. 2,709,867. (43).

Resultados obtenidos por GrootWassink et al. (25) muestran que es más favorable la hidrólisis enzimática de la inulina que la hidrólisis química. En estos resultados se observa que después de 8 h de hidrólisis ácida el 82% del total de los azúcares reductores, contenía 53% de monosacáridos y 25% de disacáridos; mientras que en 6 h de hidrólisis enzimática el 82% del total de azúcares reductores contenía 79% de monosacáridos y 3% de disacáridos.

La hidrólisis enzimática a 50°C no causa ninguna coloración indeseable, que sí aparece en el hidrolizado ácido de inulina. Cambios en el aroma y sabor son mínimos en la hidrólisis enzimática.

Otra desventaja de la hidrólisis ácida es la formación de 5% de difructosa anhidrida, compuesto que no posee ninguna propiedad edulcorante, por lo que tiene que ser removida del jarabe de fructosa (25).

Por tener además ciertas ventajas sobre las invertasas, como es, una mayor conversión a monosacáridos (inulina 98%, invertasa 89%) después de 8 h de incubación así como que las invertasas no son capaces de hidrolizar los recién formados tri y tetrasacáridos, las inulinasas pueden ser sustitutos de estas en procesos industriales tales como confitería, panadería (25).

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismos

Las cepas de *Kluyveromyces marxianus* evaluadas fueron: CDBP-L-278, CDBP-L-337 de la colección de cultivos microbianos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV del IPN; la cepa UCD-C-351 de la colección de cultivos de la Universidad de California en Davis; y las cepas NRRL-Y-1109 y NRRL-L-1195 de la colección NRRL del Departamento de Agricultura de los EUA. Como productoras de lactasa, pectinasa e inulinasa.

Se evaluaron además las cepas de *Aspergillus oryzae*: ATCC-AU (American Type Culture Collection), 161-1 y 161-B, como productoras de lactasa.

Tanto las cepas del hongo como de la levadura fueron mantenidas en agar papa dextrosa (Bioxon). Así como también esporas del hongo se mantuvieron en glicerol.

3.2 Medios de cultivo.

Medio de lactosa.- 2% de lactosa anhidra (Sigma), 0.25% de extracto de levadura (Bioxon), 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% de KH_2PO_4 y 0.05% de MgSO_4 (Baker) en agua destilada y desionizada. El medio fué preparado según lo reportado por García Garibay et al. (17).

Medio de pectina.- Se preparó del mismo modo que el medio de lactosa, sustituyendo esta por glucosa y adicionando 0.5% de pectina (Sigma). Según García Garibay et al. (21).

Medio de inulina.- Inulina 1% (Sigma) y 0.5% de extracto

de levadura (Bioxon) en agua destilada y desionizada. Se ajustó el pH a 5 con ácido acético dil. (Baker) (56).

Medio de fructosa.- Fructosa 1% (Sigma) y 0.5% de Ext. de levadura (Bioxon), en agua destilada y desionizada. Se ajustó el pH a 5 con ácido acético dil. (Baker).

Medio de sacarosa.- Sacarosa 1% (Baker) y 0.5% de Ext. de levadura (Bioxon), en agua destilada y desionizada. Se ajustó el pH a 5 con ácido acético dil. (Baker).

Medio de Salvado.- Salvado de trigo 3.5% y 1.5% de KH_2PO_4 en agua de la llave. Se ajustó el pH a 5 con H_3PO_4 dil. (Baker).

Medio de lactosa-pectina.- Se preparó de la misma manera que el medio de lactosa adicionando además 0.5% de pectina (Sigma).

Medio de lactosa-inulina.- Se preparó de la misma manera al medio de lactosa-pectina, sustituyendo la pectina por inulina. Se ajustó el pH a 5 con ácido acético dil. (Baker).

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, separando siempre el azúcar del resto de los nutrientes.

3.3 Condiciones de Cultivo

En matraces. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml tapados con algodón, para todas las fermentaciones en las que se emplearon las copas de la levadura, en el caso del hongo se utilizaron matraces de 500 ml.

En las fermentaciones con la levadura el volumen de trabajo fue de 50 ml, mantenidos a 28°C y 110 RPM en una

incubadora New Brunswick G-24.

En fermentador. El fermentador que se utilizó fué un LH serie 2000, con vaso de volumen nominal de 5 l. El volumen de trabajo fué de 4 l; adicionando además 3ml de antiespumante de silicón. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura 28°C, pH 5 y una agitación de 560 RPM, al inicio de la fermentación, teniendo que aumentar ésta conforme transcurría el tiempo. Este fermentados se utilizó para las fermentaciones del hongo.

3.4 determinación de actividad.

La evaluación de la actividad de las enzimas se hizo por separado para cada una de ellas.

Actividad de lactasa de levadura.—Fué determinada siguiendo el método reportado por Garcia Garibay et al. (17); las células se permeabilizaron de la siguiente manera: Un volumen conocido de medio de cultivo, se mezcló con 5ml de alcohol isoamílico (Baker) y se llevó a un aforo de 25ml con sol. amortiguadora de fosfatos pH 6.6 0.1M. Esta mezcla se agitó por 1 h manteniendola a 28°C.

Para determinar la actividad se tomaron 0.1 ml de esta mezcla y se adicionaron a 2.7 ml de sol. amortiguadora de fosfatos 0.1ml de sol. 3.36M de 2 mercaptoetanol (Sigma) y 1 ml de sol. 0.068M de ONPG (Sigma), manteniendose a 40°C, se tomaron lecturas de absorbancia a 410 nm a diferentes tiempos durante 10 min en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV.

Se utilizó una curva patrón de sol. de ONP (Sigma) con un rango de concentraciones de 0.025 a 0.809 μ moles/ml.

Una unidad de lactasa (UL) es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μmol de ONPG por min. a pH 6.6 y 40°C .

Actividad de pectinasa.- Se midió la actividad de acuerdo a lo reportado por García Garibay et al. (21), técnica que consiste en medir el aumento de reductores directos por el método de Somogyi-Nelson (47) utilizando una curva patrón de ácido galacturónico (Sigma) como referencia, con un rango de concentraciones de 0.138 a $0.693\mu\text{moles/ml}$.

La enzima se separó del paquete celular centrifugando el medio de cultivo a 3500 RPM durante 15min.

Se tomaron 0.1 ml del sobrenadante y se mezclaron con 9.7ml de sol. de ácido pectico (Sigma) al 1% y se mantuvo en un baño a 30°C . Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción y se determinó la act. por el método de Somogyi-Nelson. (47). Se leyó la absorbancia a 520nm después de agregar el reactivo 2.

La actividad intracelular de pectinasa se determinó en las células permeabilizadas con alcohol isoamílico de la misma forma que se hizo para lactasa.

Una unidad de pectinasa (UPG) es la cantidad de enzima necesaria para producir una μmol de reductores por min a pH 5 y 30°C .

Actividad de inulinasa.- Esta actividad se determinó de la misma manera que la de pectinasa. es decir, por el método de Somogyi-Nelson. (47). Utilizándose en este caso una curva patrón de fructosa cuando el sustrato era inulina, y otra de una mezcla

equimolecular de fructosa y glucosa cuando el sustrato era sacarosa. El rango de concentraciones fue de 0.138 a 0.694 μ moles de monosacáridos/ml.

La separación de enzima extracelular de las celulasas se hizo de la misma manera que para pectinasa. La inulinasa intracelular se determinó permeabilizando las células de la misma forma que para lactasa.

Se tomaron 0.1 ml del sobrenadante y se mezclaron con 0.9 ml de sol. al 4% de sacarosa o inulina en sol. amortiguadora de acetatos 0.1M pH 5 y se mantuvo a 50°C en un baño, tomando alícuotas a diferentes tiempos.

Una unidad de inulinasa (UI) es la cantidad de enzima necesaria para producir una μ mol de fructosa o fructosa-glucosa por min a pH 5 y 50°C.

Actividad de lactasa de hongo.- Esta se determinó de la siguiente manera:

Se ajustó el pH del medio a 5 con H_3PO_4 dil. (Baker), se filtró, de este filtrado se tomaron 0.5 ml que fueron mezclados con 2.4 ml de sol. amortiguadora de fosfatos pH 4.6, mas 0.1 ml de sol. de 2 mercaptoetanol 3.36M (Sigma) y 1 ml de sol. de ONPG (Sigma); esta mezcla se mantuvo a una temperatura de 55°C y se tomaron lecturas de absorbercia a diferentes tiempos, en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV.

Una unidad de lactasa de hongo (UL) es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μmol de ONPG por min a pH 4.6 y 55°C.

3.5 Crecimiento microbiano.

Crecimiento de biomasa de levadura.- Se determinó por aumento densidad óptica, midiendo la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV, utilizando agua destilada como blanco y para diluir las muestras.

Los datos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón (A vs. g biomasa) la cual fué obtenida haciendo pasar diferentes diluciones de un cultivo de *Kluyveromyces marxianus* cepa L-27E, de volúmenes conocidos a través de una membrana Millipore, con tamaño de poro de 0.45 μm de diámetro, puestas a peso constante previamente.

La biomasa retenida se lavó y se secó en una estufa de vacío a 60°C hasta peso constante.

4. Resultados y discusión.

4.1 Determinación de lactasa.

4.1.1 *Kluyveromyces marxianus*.

Para la obtención de esta enzima, se utilizó un medio de lactosa.

Se evaluaron las cinco cepas de levadura bajo las mismas condiciones de cultivo en matraces erlenmeyer de 250 ml. Los resultados (promedio de dos determinaciones), aparecen en la tabla 4.1.1.

Como podemos observar las cepas 1109, 1195 y 278 son las que presentan una mayor actividad de lactasa.

De las dos primeras ya se tenían reportes de su producción de la enzima, pero no así de la cepa 278.

La cepa 1109 se reporta en la literatura como la de mayor producción de esta enzima de 41 cepas (40); la cepa 1195 es considerada en la NREL como de capacidad equivalente a la anterior.

Con una producción menor aparece la cepa 351, mientras que la 337 no presenta actividad.

4.1.2 *Aspergillus oryzae*.

En el caso de la producción de lactasa de hongo, primero se realizó una fermentación en matraces erlenmeyer, para evaluar las tres cepas que se tienen: 161-B, 161-1 y ATCC-45.

Los resultados (promedio de dos determinaciones) aparecen en la tabla 4.1.2, como podemos observar la diferencia

que aparece entre ellas no es mucha, por lo que se eligió a la 151-E para realizar dos fermentaciones en un fermentador de 5 l.

Los resultados de estas fermentaciones aparecen en la tabla 4.1.3; de ellas podemos decir que el máximo de producción de enzima se logra a las 75 horas de fermentación.

La ventaja que se tiene en esta fermentación es que el Salvado de Trigo que se utiliza como medio de cultivo es más económico que otros medios reportados para la producción de lactasa por hongos (1).

Ahora bien si comparamos la producción de lactasa de hongo y levadura, tomando en cuenta que la lactasa de hongo es extracelular y la de levadura intracelular y basandonos en los resultados de las tablas 4.1.1 y 4.1.3, podemos observar que las cepas 1109 y 278 de la levadura presentan una actividad de lactasa (UL/l) mayor que la del hongo.

Pero para elegir alguno de los dos microorganismos se debe tomar en cuenta el uso que se le va a dar a la enzima, es decir, si se va a utilizar sobre la leche directamente o sobre suero ácido. En el primer caso se recomendaría la enzima de levadura y para el segundo la del hongo.

4.2 Producción de pectinasa por *Aspergillus*

sartorii

Se realizó utilizando un medio con pectina y otro sin ella, ya que la producción de la enzima es constitutiva bajo

condiciones de baja aereación, e inducible cuando la tensión de oxígeno es alta.

Para la actividad intracelular se utilizó el mismo método de permeabilización de las células que para la determinación de actividad de lactasa de levaduras. Esto con el fin de observar si la pectina ejercía alguna influencia en el sistema de excreción de la pectinasa, y por otra parte si se mantenía una cierta actividad intracelular. Los resultados aparecen en la tabla 4.2.1.

Como pueden observar la pectinasa es una enzima totalmente extracelular, ya que la producción de ésta intracelularmente fue nula, tanto en un medio en presencia de pectina como en ausencia de ella. Esto implica además que la pectina ejerce efecto inductor sobre la producción de la enzima, y ninguno sobre el sistema de excreción.

Teniendo que la cepa 178 fué la que más pectinasa produjo para ambos casos (medio con pectina y sin ella), mientras que la 151 solo presentó actividad en presencia de la pectina, lo cual coincide con lo reportado por García Garibay et al (21).

En lo referente a las otras tres cepas (1109, 1195 y 151), no se obtuvieron resultados positivos de producción de pectinasa.

Tabla 4.1.1 Actividad de lactasa de levadura

Cepa	Actividad	
	UL/g biomasa	UL/l
CDBB-L-27B	1590	995
NRRL-Y-1109	2046	1125
NRRL-Y-1195	1068	450
UCD-351	699	-
CDBB-L-337	60	-

Tabla 4.1.2 Actividad de lactasa de hongo.
La Fermentación de llevo a cabo en matraz

Cepa	Act. UL/l 1er. filtrado	Act. UL/l 2do. f.
161-B	1300	543
161-1	1300	476
ATCC-AD	1180	460

Tabla 4.1.3 Actividad lactasa de hongo. Fermentador 5 1

t (h)	Oxígeno disuel. %	pH		Agitación RPM	Act. U/1	
		1a.Fer	2a.Fer		1a.Fer	2aFer
0		5.0	5.0	560	0	0
6	67		5.9	560	-	124
8		4.9	-	560	184	-
20	13	5.0	-	560	-	140
22	23.6		5.1	600	-	140
24	18	4.7	5.1	600	178	-
27	12.8		5.1	630	-	-
30	14.1		5.2	630	-	-
32		5.0		630	210	-
43	37.5		5.3	630	-	182
45	36.5		5.3	630	-	-
47	37.2		5.4	630	240	234
48	38	5.1	5.4	630	-	-
54	35.5		5.5	630	-	312
56		5.2		630	500	-
67	46		5.5	550		532
69	48		5.6	550	-	-
75	50	5.7	5.6	550	780	737
80		5.8			180	
96		6.0			150	
104		6.1			-	

4.3 Determinación de inulinasa por *Kluyveromyces*

marxianus

4.3.1 determinación del sustrato a utilizar en la medición de actividad.

Fueeto que esta enzima puede actuar tanto sobre inulina como sobre sacarosa, se utilizaron dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* la 278 y la 351 para elegir el sustrato idóneo en la medición de actividad.

Así mismo se pudieron determinar los valores de I/S (relación de actividad sobre inulina y sobre sacarosa), valor que diferencia a las inulinasas de las invertasas como ya se mencionó anteriormente.

Las determinaciones se hicieron tanto para inulinasa extracelular como intracelular.

Los resultados obtenidos se reportan en la tabla 4.3.1.

Al utilizar sacarosa como sustrato para la determinación de actividad de inulinasa (β -fructofuranosidasa) se obtuvieron resultados más reproducibles, además de una mayor sensibilidad en la técnica que utilizando inulina. Por lo que se utilizó ésta para todas las demás determinaciones de actividad. (permeabilización e inductor). Por otra parte, está ampliamente documentado que la inulinasa de esta levadura puede actuar tanto sobre sacarosa como sobre inulina (44,65).

Esto nos llevó a determinar el valor de la relación I/S, que comparándolos con la literatura (25,44), nos indican

Tabla 4.2.1 Actividad de pectinasa de *K. marxianus*

Cepa	Medio con pectina		Medio sin pectina	
	Act. Extra UPG/l	Act. Intra UPG/g	Act. Extra UPG/l	Act. Intra UPG/g
CDBB-L-278	1450	0	192	0
UCD-351	700	0	0	0
NRLL-Y-1109	0	0	0	0
NRLL-Y-1193	0	0	0	0
CDBB-L-337	0	0	0	0

Tabla 4.3.1 Actividad Inulinasa de *K. marxianus*.
Medio Inulina 1%

Cepa	Sustrato Inulina			Sustrato Sacarosa		
	Act. Extra UI/l	Act. Intra UI/g	Act. Intra UI/g	Act. Extra UI/l	Act. Intra UI/g	Act. Intra UI/g
CDBB-L-278	195	73.3	285.7 $1.5 = 0.14$	2160	912	2000
UCD-351	190	51.4	97.0 $1.75 = 0.05$	2050	554	1812

El valor de $1/5$ se obtiene de la división de la act. de inulina sobre la act. de sacarosa: Ejem. $(195/2160)=0.09$, $(285.7/2000)=0.14$.

que la enzima que se produjo es inulinasa.

4.3.2 Elección del mejor método de permeabilización

Para hacer la determinación de la actividad de la inulinasa intracelular se probaron dos métodos de permeabilización. En el primero se utilizó un volumen conocido de medio de cultivo, al que se le midió densidad óptica, este se congeló por una noche, a la mañana siguiente se descongeló y se determinó la actividad. El segundo método que se probó fue el mismo que para la determinación de actividad de lactasa; esto es con alcohol isoamílico.

Para esta prueba se utilizaron las cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus*. Los resultados aparecen en la tabla 4.3.2.

De los resultados obtenidos se eligió el método del alcohol isoamílico como el mejor para la permeabilización de las células.

Aunque se obtuvieron dos datos en los que el valor de la actividad era mayor por el método de congelación, estos eran para las cepas 1109 y 1195, que presentan una actividad más baja que la de las cepas 278 y 351, estas mayores productoras de las cinco cepas.

En todos los demás casos se obtuvieron valores mayores cuando se permeabilizó con alcohol, lo que implica que con congelación no se tiene una buena permeabilización.

Tabla 4.3.2. Act. Inulinasa de *K. marxianus*. Medio Inulina 1%
Evaluación del método de permeabilización.

Cepa	Act. Extra. UI/	Alcohol isoamílico UI/g	Coelación UI/g
CDBB-L-278	216	2900	516
UCD-351	295	1812	709
NRRL-Y-1109	50	760	773
NRRL-Y-1195	74	770	900
CDBB-L-337	66	136	118

Tabla 4.3.3. Actividad Intra y Extracelular de Inulinasa
de *K. marxianus* con inulina, fructosa y sacarosa como inductores

Cepa	Act. Extra. UI/l			Act. Intra UI/g		
	inulina	fructosa	sacar.	inul.	fruct.	sacar.
CDBB-L-278	2160	40	290	2000	291	224
UCD-351	2050	111	28	1812	288	0

4.3.3 Efecto de la fuente de carbono en la producción de la enzima

Se utilizaron dos diferentes inductores sin contar a la inulina para probar cuál era el más indicado en la obtención de la enzima, el primero fue fructosa y el segundo sacarosa.

Se utilizaron sólo las cepas que muestran mayor productividad de la enzima, esto es la 278 y la 351.

Como podemos observar en la tabla 4.3.3.1 la fructosa es mejor inductora en la producción de la inulinasa que la sacarosa, pero con ninguno de los dos se obtuvieron resultados parecidos a los obtenidos cuando se utilizó inulina como inductor.

Esto se debe seguramente a que los azúcares pequeños presentan represión catabólica, efecto que ha sido reportado por GrootWashin (26), por lo que, para utilizarse como fuentes de carbono e inductores, sería necesario agregarlos en muy bajas concentraciones, lo cual limitaría su crecimiento.

Con los resultados obtenidos de los tres incisos anteriores podemos decir que las cepas mejor productoras de la inulinasa son la 278 y la 351, en ese orden.

La tabla 4.3.4 resume las actividades de las tres enzimas para cada una de las cepas.

En esta tabla podemos observar que las cepas 278 y la 351 son las mejores productoras de las tres enzimas. La 1109 y 1195 resultaron ser muy buenas productoras de lactasa, pero no de sacarificasas extracelulares, por lo que no son aptas para nuestro objetivo.

4.4 Producción simultánea de lactasa-pectinasa y lactasa-inulinasa

Para realizar estas fermentaciones se utilizó la cepa 278 que fue la que produjo en mayor cantidad las tres enzimas en forma global.

Para la producción simultánea de lactasa-pectinasa se utilizó un medio con lactosa y pectina, mientras que para la obtención de lactasa-inulinasa el medio fue igual al anterior cambiando únicamente la pectina por inulina.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 4.4. En ella podemos ver que los valores de actividad para las tres enzimas son menores que los obtenidos para cada una de ellas por separado, pero aun así estos son muy buenos.

La producción de dos enzimas simultáneamente en lugar de solo una como en los experimentos anteriores, es una carga metabólica para la levadura. De ahí que es muy probable que los rendimientos en la producción simultánea de dos enzimas puedan mejorarse considerablemente si se establecen compromisos en las condiciones de producción, en mejorar el medio de cultivo de manera que se pueda aliviar, al menos parcialmente la carga metabólica implícita.

Tabla 4.3.4 Actividades de las tres enzimas de *A. niger*

Cepa	Lactasa		Pectinasa UPG/1	Inulinasa	
	UL/1	UL/g		Act.Extra UI/1	Act.Intra UI/g
Levaduras: CDBB-L-278	1271	1590	1450	2160	2000
UCD-351	195	599	700	2050	1812
NRRL-Y-1109	1175	2046	0	500	760
NRRL-Y-1195	440	1068	0	74	770
CDBB-L-337	0	60	0	86	136
Hongos: 161-B	1300				
161-1	1300				
ATCC-40	1180				

Tabla 4.4 Actividades simultáneas de lactasa-pectinasa y lactasa-inulinasa. De la cepa CDBB-L-278

Fermentación	Lactasa UL/g	Pectinasa		Inulinasa	
		UPG/1	UPG/g	UI/1	UI/g
lactasa- pectinasa	700	1343	175	-	-
lactasa- inulinasa	411	-	-	1205	382

5. Conclusiones

Se ratificó que las cepas NRRL-Y-1109 y NRRL-Y-1195 son buenas productoras de lactasa, no obstante, resultaron ser malas productoras de pectinasa e inulinasa.

Para la producción de la lactasa de *A. pergillus oryzae* no se encontró mucha diferencia entre la cepa silvestre y las mutantes. Lo que se concluye de esta parte del trabajo es que el medio empleado (salvado de trigo) puede traer muchas ventajas económicas.

Para la producción de inulinasa el mejor inductor resultó ser la inulina.

Se presenta una alta producción de la enzima inulinasa de levadura tanto intra como extracelular.

Las cepas CDBB-L-278 y JCD 351 fueron las mejores productoras de las tres enzimas, siendo la primera la que más altos rendimientos presentó.

La cepa CDBB-L-337 resultó una mala productora de las tres enzimas.

La cepa CDBB-L-278 resultó ser la mejor cepa para la obtención simultánea de dos enzimas.

Las actividades en esta fermentación resultaron bajas, quedando solo optimizar las condiciones de la misma para incrementar la producción de estas enzimas.

Por lo anterior podemos concluir que se presenta un posible campo de explotación y utilización en el mercado de nuestro país, para la levadura de *Kluyveromyces marxianus*, particularmente para la cepa CDBB-L-278, así como para el hongo *Aspergillus oryzae*, cumpliéndose ampliamente el objetivo del presente trabajo.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Annunziato, M.F., Mahoney, R.R., and Hudgett, R.E. "Production of α -galactosidase from *A. oryzae*, grown in solid state culture". J. of food science, Vol. 51 (5), 1370-1371 (1986).
- 2) Badui, S., Diccionario de Tecnología de los alimentos, 1a. Edición, Ed. Alhambra, (1988).
- 3) Badui, S., Química de los alimentos, 2a. reimpresión, Ed. Alhambra, (1984).
- 4) Bajpai, P., and Margaritis, A., "Optimization studies for production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *K. marxianus*". Process Biochemistry. Vol. 21 (1), 16-18, (1986).
- 5) Feluche, I., Guiraud, J.P., and Galzy, P., Folia Microbiology, 25, 32-35, (1980).
- 6) Blanco, S.G., Tesis "Obtención de fructosa a partir de la hidrólisis de inulina de agave por diversos métodos. México, D.F., Fac. Química, UNAM (1979).
- 7) Bourgi, J., Guiraud, J.P., and Galzy, P. "Isolation of a *K. fragilis* derepressed mutant hyperproduced of inulase por ethanol production for Jerusalem arichoke". J. fermentation technology Vol. 64(3), 239-243, (1986).
- 8) Call, H.P., and Emeis, C.C., "Characterization of anendopolygalacturonase of the yeast *K. marxianus*". J. food biochemistry 7(2), 59-85, (1983).
- 9) Castillo, F.J., Pedrique, M. "Biotecnología de enzimas, 1er. Simposio Interamericano. Ed. Carlos Huitron, UNAM,

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

México, (1983).

10) Coughlin, R.W., and Charles, M., "Applications of lactose and immobilized lactase". Chapter 6. Immobilized enzymes for food processing. W.H. Pitcher, (Ed). C.R.C. Press, Boca Raton, Florida, (1980).

11) Demain, A.L., and Phaff, H.J. "The preparation of tetragalacturonic acid" Arch. biochemistry biophysical. Vol 51, 114-121, (1954).

12) Demain, A.L., and Phaff, H.J., "Hydrolysis of oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. J. biology chemistry, 381-393, (1954).

13) Federici, F., and Petruccioli, M., "Effect of some cultural conditions on polygalacturonase production by *Cryptococcus albidus* var. *albidus*". Ann. microbiology. 35, 235, (1985).

14) Fenton, D.M., "Solvent treatment for β -D-galactosidase release from yeast cells" Enzyme microbiology technology, Vol. 4, 209-212, (1982).

15) Fens, G.T.A., Rob, H., and R.W., "Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degradin enzymes" J. of applied biochemistry, Vol. 2, 452-468, (1980).

16) Frazier, W.C., and Westhoff, D.C., Microbiología de los alimentos. 3a. edición, Ed. Acrisia. (1985).

17) Garcia, G.M., Torres, J., López-Munguía, C.A., "Influence of oxygen transfer rate of β -galactosidase production from *A. niger*". biotechnology letters. Vol. 9(16), 417-420, (1987).

18) Garcia, G.M., y Lopez-Munguia, C.A., "Enzimas inmovilizadas y su aplicacion en la industria alimentaria", Ciencia y desarrollo, 39-46, (1985).

19) Garcia, E.M., Gomez, R.L., and Bárcana, E., "Studies on simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *K. fragilis*", biotechnology letters Vol. 9(6), 411-416, (1987).

20) Garcia, G.M., Gomez, R.L., and Bárcana, E., "Simultaneous production of single cell protein, and pectinase from whey". Food processing waste conference, Atlanta, Georgia, (1987).

21) Garcia G.M., y Gómez, R.L., Tesis. "Obtención de biomasa y endopoligalacturonasa de *K. fragilis* a partir de suero de queso, Mexico, D.F., Fac. Química, UNAM, (1982).

22) Gelias, V., and Lopez-Leiva, M., "Hydrolysis of lactose. A literature review". Process biochemistry, February 2-12, (1985).

23) Gomez, R.L., Garcia, G.M., and Bárcana, E., "Utilization of endopoligalacturonase from *K. fragilis* in the clarification of apple juice". J. of food science. Vol. 53(4), 1236-1237, (1988).

24) Godfrey, T., and Reichelt, J., "Industrial enzymology". The nature press, New York, N.Y., (1983).

25) Grootwassink, J.W.L., and Fleming, S.E., "Non-specific polyfructuronidase (viscylase) from *K. fragilis*. Batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties". Enzyme microb. technology. Vol. 1 January.

45-53, (1980).

26) Grootwassink, J.W.D., and Hewitt, G.M., "Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulase) in batch and continuous cultures of the yeast *K. fragilis*". J. of general microbiology, 129, 31-41, (1983).

27) Guiraud, J.P., et al., "Isolation of a respiratory deficient *K. fragilis* mutant for the production of ethanol from Jerusalem artichoke", Biotechnology and bioengineering, Vol. 29, 850-858, (1987).

28) Hewitt, G.M., and Grootwassink, J.W.D., "Simultaneous production of inulase and lactase in batch and continuous cultures of *K. fragilis*". Enzyme microbiology technology, Vol. 6 June, 263-270, (1984).

29) Holsinger, V.H., "Potential application for lactose-hydrolyzed milk and whey fractions in dairy foods", Chapter 22. Lactose digestion clinical and nutritional implications. Editors. Paige, D.M., and Bayles, T.M., Baltimore, Johns Hopkins University Press, (1981).

30) Jacques, J.A., et al. "Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity". Applied and environmental microbiology, Vol. 52(5), Nov. 1086-1090, (1986).

31) Kobayashi, S., and Matsub, R., "Moderating activity of endopolygalacturonase produced by *Saccharomyces fragilis*". Agriculture bio. and chemistry, 43(6), 1369-1370, (1979).

32) Koop, T.J.P., and Filnik, W., "Cloud loss studies in citrus juices. Cloud stab lization by a yeast-polygalacturonase".

Lebensm.-Wiss. Technology, Vol. 7(2), (1974).

33) Lactase. "New frontiers for lactose-reduced milk".
Eu. asociado Banner 5., Food engineering July, 52(7), 30-33,
(1980).

34) Lee, C.H., and Lindley, M.G., "Developments in food
carbohydrate". Chapter 2. Applied science. London (1982).

35) Lim, J., et al., "Multiple forms of
endo-polygalacturonase from *S. fragilis*". Agric. biology
chemistry. 44(2), 473-480. (1980).

36) Luh, B.S., and Phaff, H.J., "Properties of yeast
polygalacturonase". Arch. biochemistry biophysics. 48, 23-37,
(1954).

37) Luh, B.S., and Phaff, H.J., "Ends products and
mechanism of hydrolysis of pectin and pectic acid by
yeast-polygalacturonase (YPG)". Arch. biochemistry biophysics. 51,
102-110, (1954).

38) Luh, B.S., and Phaff, H.J., "Studies on
polygalacturonase of certain yeast". Arch. biochemistry
biophysics. 33, 212-227, (1951).

39) Mahoney, R.R., and Adamchuk, C., "Effect of milk
constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *K.
fragilis*". J. of food science, Vol. 45, 762-764, (1980).

40) Mahoney, R.R., Nickerson, I.A., and Whitaker, J.R.,
"Selection of strains, growth conditions, and extraction procedures
for optimum production of lactase from *K. fragilis*". J. of dairy
science. Vol. 55(11), 1620-1625. (1974).

41) Mahoney, R.R., and Whitaker, J.R., "Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *A. fragilis*". J. of food biochemistry (7), 327-350, (1977).

42) Mahoney, R.R., and Whitaker, J.R., "Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *A. fragilis*". J. of food science, Vol. 47, 584-591, (1978).

43) Merck Index of chemicals and drugs, (1980).

44) Moussa, E., and Faratti, J.C., "Purification, properties and comparison of invertase, exopolysaccharide and endopolysaccharide of *A. ficus*". Applied microbiology and biotechnology, 26, 13-20, (1987).

45) Negoro, H., "Inulase from *A. fragilis*". J. fermentation technology, Vol. 56(2), 102-107, (1978).

46) Negoro, H., and Kito, E., J. fermentation technology, Vol. 51, 103-110, (1973).

47) Nelson, N., "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". J. biol. chemistry, 153(C), 375-380, (1944).

48) Patente. United States Patent. "Process for preparing β -galactosidase from *A. oryzae*". Nov. (1975).

49) Phaff, H.J., "Biology of yeast other than Saccharomyces". Chapter 18. Biology of industrial microorganisms. Edited. Arnold L. Demain and Nadine A. Solomon. The Benjamin/Cummings publishing comp. Inc. California, (1975).

50) Quintero, S.F., "Ingenieria bioquímica". Teoría y aplicaciones. 2a. edición. (1987). Ed. Alhambra, Mexico.

51) Roubrouz, F.M., "Fectic enzymes, their biosynthesis and roles in fermentation and spoilage. Current developments in yeast research. Ed. by Stewart, G.G., and Russell, I., Advances in biotechnology. Ontario. (1981).

52) Foa, M.F., Viteira, A.M., and Bartolomeu, K.L., "Production of high concentration of ethanol from mash, juice and pulp of Jerusalem artichoke tubers by *K. fragilis*". Enzyme microbiology technology, Vol. 8 Nov. 675-676. (1986).

53) Foweraker, R.J., et al. "Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *K. marxianus* C.B.S., 555". Applied and environmental microbiology. Vol. 54(5), May. 1101-1107. (1988).

54) Sanchez, F.L., y Castillo, F.J., "Producción, extracción y caracterización parcial de β -D-galactosidasa de *K. fragilis* crecida en suero de leche". Acta científica venezolana. T. 154-159. (1980).

55) Sanad, F. and Argyrios, M., "Inulinase (fructofuranosidase) production by *K. marxianus* in batch culture". Applied microbiology and biotechnology. 22, 446-448. (1985).

56) Sanad, F. and Argyrios, M., "Production of inulinase (fructofuranosidase) by *K. marxianus*". Agr. cul. biol. and chemist.. Vol. 50(4), 1085-1087, (1986).

57) Eiderberg, D.E., and Lechance, M.F., "Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and relation of *K. marxianus*. (Hansen). van den Walt. Inst. J.

Eist. bacteriology, 36(1), 94-102, (1986).

58) Snyder, H.E., and Phaff, H.J., "Studies on a β -fructosidase (inulinase) produced by *S. fragilis*". Antoine van Leeuwenhoek. J. microbial serol., 26, 433-451, (1960).

59) Somerlate, H.F., et al., "Production of β -galactosidase from *K. fragilis*, grown in cheese whey". J. of dairy science, Vol. 58(7), 1618-1623, (1985).

60) Tai-Boong, U., Si-Myung, B., "Thermal stability of the multiple charge isoforms of inulase from *A. niger*". Biotechnology letters, Vol. 9(4), 287-290, (1987).

61) Takatoshi, I., Suzui, M., and Adachi, S., "Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeast". Agricult. and biological chemistry, Vol. 46(4), 899-904, (1982).

62) Takuo, S., Okushima, M., and Yoshitake, S., "Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *K. fragilis*". Agricultural and biological chemistry. 48(8), 1951-1961, (1984).

63) Tsang, E.W.T., and Grootwassink, J.W.D., "Stability of α -glucosidase production on lactose in batch and continuous culture of a *K. fragilis* hyperproducing mutant". Enzyme microb. technology, Vol. 10, May, 297-301, (1989).

64) Uchiyama, T., Niwa, S., and Tanaka, K., Biochem. biophys. Acta, 315, 412-420, (1973).

65) Vandamme, E.J., and Dericke, D.G., "Microbial inulinases. Fermentation process, properties, and applications".

Advances in applied microbiology. Vol. 29. Copyright by Academic Press Inc. N. Y., (1973).

66) Von-Rij Erger, N.J.W., "The yeast a taxonomic study. 3rd. edition. Elsevier. Amsterdam. (1984).

67) Wendrich, W.L., and Amundson, C.D., "Characterization of β -galactosidase from *S. fragilis*". J. milk food technology. Vol. 34(5), 200-206, (1971).

68) Wienzbicki, L.E., and Rosilowski, F.W., "Lactase potential of various microorganisms grown in whey". J. dairy sci., 56(1), 25-32, (1983).

69) Wimborne, M.F., Richard, P.A.D., "Pectinolytic activity of *S. fragilis* cultured in controlled environments". Biotechnology, and bioengineering. Vol. 20, 231-242, (1978).

70) Woc, Y.K., and Si, M.B., "Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminobenzylcellulose". Enzyme microb. technology. Vol. 4 July, 235-244, (1982).

71) Workman, W.E., and Donal F.D., "Purification and properties of β -fructofuranosidase from *K. fragilis*". FEBS 0683. Vol. 150(1,2), 14-20, (1985).

72) Yamasaki, M., Kato, G., and Shang-Young, Ch., "Pectic enzymes in the clarification of apple juice. II The mechanism of clarification". Agriculture and biological chemistry. 71(5), 551-561, 1967.