



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LA ENZIMA Novo960
(INULINASA) INMOVILIZADA POR ATRAPAMIENTO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
I N G E N I E R O Q U Í M I C O

P R E S E N T A :
EMILIO RUANO NOÉ

México, D.F

2012





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: Agustín López Munguía Canales.

Vocal: Rogelio Rodríguez Sotres.

Secretario: Carmina Montiel Pacheco.

1er Suplente: Luis Tonatihut Sánchez Linares.

2do Suplente: Sandra Paola Sánchez Rodríguez.

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO 314, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Asesor de Tesis:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

Supervisor Técnico:

Dr. Alberto López Luna

Sustentante:

Emilio Ruano Noé

AGRADECIMIENTOS:

A la Doctora Carmina Montiel Pacheco, investigadora de la Facultad de Química de la UNAM, por haber dirigido este trabajo, por su apoyo y sugerencias durante mi estancia en el laboratorio y por todas sus enseñanzas.

Al Doctor Alberto Lopez Luna, investigador de la Facultad de Química de la UNAM, por haber permitido unirme al proyecto de investigación sobre este trabajo, por su ayuda, confianza y enseñanzas durante mi tiempo en el laboratorio.

Al Doctor Miquel Gimeno Seco, investigador de la Facultad de Química de la UNAM, por permitirme formar parte del Laboratorio 314 del conjunto E de la Facultad de Química, por sus enseñanzas y darme la confianza durante mi formación en el laboratorio.

Al Doctor Agustín Lopez Munguía Canales, Investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM, y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Investigador de la Facultad de Química de la UNAM, por sus valiosas asesorías sobre este trabajo y brindarme su tiempo y comentarios para mejorar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 314 por el tiempo y los buenos momentos que compartimos.

A la UNAM por todas las oportunidades que me ha brindado y darme un lugar en donde terminar mi carrera.

A Coca-Cola por la beca de movilidad estudiantil que me permitió cursar un semestre en Korea University.

A mis Papás, **Luz María y Samuel**, por todo. Los amo.

A toda mi familia, mi hermana, tíos, primos y sobrinos. Los quiero.

A todos mis amigos y amigas que he conocido hasta este instante de mi vida, en el Tec, Capan, UNAM, Grupo 11, Hamburgo F.C., Ingenieros, Corea, Lab314. Los aprecio a todos. (Mención: Karla, Mariana, Armando, David G y David U)

Resumen

La inulina es un polímero de fructosa unido por enlaces β -(2-1) con la presencia de una glucosa terminal, unida al carbono 1 de la fructosa. Este polímero puede ser usado para la producción de fructosa y sus derivados, o bien, para la producción de inulino-oligosacáridos (IOS). Estos últimos han sido estudiados ampliamente por su capacidad probiótica, lo que les ha valido un uso amplio en diversos alimentos y en consecuencia, les ha dado un gran valor agregado. Los IOS disponibles comercialmente son obtenidos mediante la hidrólisis controlada de inulina de chicoria (*Cichorium intybus*). Esta inulina tiene la propiedad de ser lineal y de fácil utilización. Dado que realizar la hidrólisis de manera química conlleva la formación de subproductos así como el uso de catalizadores ácidos y temperaturas altas, además de una alta inversión en los procesos de purificación, la hidrólisis enzimática se presenta como una alternativa para la obtención de fructosa o IOS, ya que los subproductos son mínimos o nulos además de usar condiciones de reacción suaves.

En este trabajo se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de la inulina de chicoria, empleando una inulinasa comercial de *Aspergillus Niger* (Novo 960) de Novozyme. El objetivo de este estudio fue inmovilizar a la enzima para su posterior recuperación y establecer las condiciones óptimas en la hidrólisis de la inulina. Adicionalmente, se comparó el efecto de la inmovilización sobre la reacción con respecto a la enzima libre.

La inmovilización se realizó por adsorción física en soportes de Lewatit y silica gel y por atrapamiento en microcápsulas de alginato de calcio y polivinil alcohol-polietilenglicol (PVA-PEG). Los resultados muestran que la enzima se inmoviliza en mayor o menor cantidad en los 4 soportes. Sin embargo, la actividad de ésta se ve disminuida considerablemente. La inmovilización por adsorción presentó poca estabilidad y se consideró inadecuada para llevar a cabo la reacción. El inmovilizado en PVA-PEG, dentro los soportes evaluados, presentó la mayor actividad enzimática. Por otra parte, el alginato de calcio mostró, de alguna forma, aislar la actividad preferentemente a la endo-inulinasa.

Para determinar la eficiencia de la inmovilización en los soportes de Lewatit y silica gel se llevaron a cabo pruebas de cuantificación de proteína por el método de Lowry donde

se observó adsorción de la enzima pero desprendimiento de ésta en lavados posteriores.

Se realizaron pruebas de actividad, temperatura y pH óptimos para la reacción de hidrólisis de la inulina, así como la determinación de las propiedades cinéticas para la enzima libre e inmovilizada en alginato de calcio y PVA-PEG. La determinación de la actividad se llevó a cabo por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) para medir los azúcares reductores generados en la hidrólisis. Se encontró que la producción de azúcares reductores entre la enzima libre y los inmovilizados disminuía por un orden de magnitud. La temperatura óptima encontrada fue de 60°C para la enzima libre y la inmovilización en alginato de calcio, mientras que la inmovilización de PVA-PEG mostraba poca estabilidad estructural arriba de los 50°C, la cual se determinó como la temperatura óptima. El pH óptimo resultó de 5.5 en las 3 condiciones.

Se comprobó que la inmovilización por atrapamiento, en los soportes de PVA-PEG y alginato de calcio, puede disminuir la velocidad de reacción de la mezcla enzimática de *Aspergillus Niger* (Novozyme Novo 960), para su posible uso en un sistema de producción continua de IOS.

CONTENIDO

Introducción.....	12
Antecedentes.....	13
2.1 Inulina.....	13
2.1.1 Definición.....	13
2.1.2 Origen y características.....	14
2.1.3 Propiedades fisicoquímicas.....	16
2.1.4 Producción.....	17
2.1.5 Importancia industrial y comercial.....	19
2.2 Hidrólisis de inulina.....	21
2.2.1 Hidrólisis completa: Jarabes de fructosa.....	22
2.2.2 Hidrólisis parcial: Inulo-oligosacáridos.....	24
2.2.3 Método químico.....	27
2.2.4 Método biotecnológico.....	28
2.3 Inulinasas.....	29
2.3.1 Producción de inulinasas.....	29
2.3.2 Propiedades de las inulinasas.....	30
2.3.3 Mecanismo de reacción.....	34
2.3.4 Propiedades cinéticas.....	36
2.4 Inmovilización enzimática.....	38
2.4.1 Inmovilización por atrapamiento.....	39
2.4.2 Atrapamiento en matrices.....	40
2.4.3 Atrapamiento en membranas.....	40
2.4.4 Inmovilización por adhesión.....	41
2.4.5 Entrecruzamiento.....	41
2.4.6 Adsorción.....	42

2.4.7 Inmovilización de inulinasas	42
Hipótesis	47
Objetivos	48
4.1 Objetivo general	48
4.2 Objetivos particulares	49
Materiales y métodos	50
5.1 Materiales	50
5.2 Métodos.....	51
5.2.1 Concentración de proteína.....	51
5.2.2 Actividad enzimática.	51
5.2.3 Inmovilización por adsorción física.	51
5.2.4 Inmovilización en alginato de calcio.....	52
5.2.5 Inmovilización en co-polímero PVA-PEG.....	52
5.2.6 Hidrólisis de la inulina.	52
5.2.7 Determinación de azúcares reductores	53
5.2.8 Determinación de temperatura y pH óptimos.....	53
5.2.9 Determinación de propiedades cinéticas	53
5.2.10 Termoestabilidad	54
5.2.11 Ciclos de reuso	54
Discusión y resultados	55
6.1 Concentración de proteína.	55
6.2 Inmovilización enzimática.....	57
6.3 Actividad enzimática.....	60
6.4 Determinación de temperatura y pH óptimos	63
6.4.1 Temperatura óptima.....	63
6.4.2 pH óptimo	65

6.5 Análisis composicional	67
6.6 Determinación de propiedades cinéticas	70
6.7 Termoestabilidad	72
6.8 Ciclos de reúso	73
6.9 Hidrólisis enzimática en un reactor tubular	75
Conclusiones.....	77
Perspectivas.....	79
Bibliografía	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Contenido de inulina en plantas usadas comúnmente en la dieta humana	14
Tabla 2	Productividad y contenido de inulina en las cosechas anuales de chicoria, dalia y alcachofa de Jerusalén	15
Tabla 3	Propiedades fisicoquímicas de la inulina comercial de chicoria.	17
Tabla 4	Resumen de las aplicaciones de la inulina y los IOS en alimentos.....	25
Tabla 5	Propiedades de algunas inulinasas microbianas.....	31
Tabla 6	Inhibidores y activadores de algunas inulinasas microbianas.	37
Tabla 7	Datos de actividad y valores cinéticos de inulinasas microbianas inmovilizadas en distintos soportes	43
Tabla 8	Resultados de concentración de enzima libre e inmovilizada	56
Tabla 9	Propiedades cinéticas aparentes de la inulinaasa a condiciones óptimas.....	70
Tabla 10	Propiedades del reactor	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Molécula de inulina.....	13
Figura 2.2 Molécula de agavina.....	16
Figura 2.3 Proceso industrial para la obtención de inulina de chicoria.	18
Figura 2.4 Efecto prebiótico de la inulina.....	20
Figura 2.5 Representación de la hidrólisis total de inulina.....	21
Figura 2.6 Representación de la hidrólisis parcial de inulina.	22
Figura 2.7 Cambios en la microflora intestinal tras ingerir IOS.....	26
Figura 2.8 (a) Representación gráfica de la estructura secundaria de la exoinulinasa. (b) Representación de la superficie de la exoinulinasa con la molécula de fructosa en el sitio activo.....	33
Figura 2.9 Modelamiento de la endoinulinasa de <i>A. niger</i>	34
Figura 2.10 Esquema hipotético para el mecanismo de acción de la exoinulinasa de la <i>B. Polymyxa 722</i>	35
Figura 2.11 Métodos de inmovilización enzimática.	38
Figura 2.12 Sitio de unión para la formación de alginato de calcio.	45
Figura 2.13 Estructura del co-polímero PVA-PEG.	46
Figura 6.1 Curva patrón por método de Lowry.	57
Figura 6.2 Retrato de inmovilizados. (a) Esferas de alginato de calcio (b) Esfera de co-polímero PVA/PEG.....	58
Figura 6.3 Barrido electrónico para (a) PVA-PEG (b) silica gel.	59
Figura 6.4 Barrido electrónico para (c) Lewatit y (d) Alginato de calcio.....	59

Figura 6.5 TLC para la determinación cualitativa de carbohidratos después de la reacción de hidrólisis enzimática de inulina de los distintos soportes a (a) 0 min (b) 30 min (c) 60 min (d) 90 min (e) 120 min.	60
Figura 6.6 TLC para la determinación cualitativa de carbohidratos después de la reacción de hidrólisis enzimática de inulina de (a) chicoria (b) agave.	62
Figura 6.7 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la inulinasa.....	64
Figura 6.8 Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa.	66
Figura 6.9 Cromatograma de los productos de la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria con inulinasa libre.	68
Figura 6.10 Cromatograma de los productos la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria con inulinasa inmovilizada en alginato de calcio.	69
Figura 6.11 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la inulinasa.	71
Figura 6.12 Análisis cinético ajustado a la ecuación de Lineweaver-Burk para (a) Enzima Libre. (b) Enzima inmovilizada en PVA/PEG y (c) Enzima inmovilizada en alginato de calcio.	71
Figura 6.13 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa libre.....	72
Figura 6.14 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa inmovilizada en Alginato de calcio.	72
Figura 6.15 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa inmovilizada en PVA-PEG.	73
Figura 6.16 Reutilización de la inulinasa inmovilizada en PVA-PEG.....	74

Figura 6.17 Reutilización de la inulinasa inmovilizada en alginato de calcio	74
Figura 6.18 Cinética en el reactor tubular.	76
Figura 6.19 Reactor de lecho empacado construido en el Laboratorio-314 del edificio E de la Facultad de Química.	76

ABREVIATURAS.

IOS : inulo-oligosacáridos.

GP : Grado de polimerización.

PVA : Polivinil-alcohol.

PEG : Polietilenglicol.

HPLC : High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alto rendimiento).

TLC : Thin layer chromatography (Cromatografía de capa fina).

DNS : Ácido dinitrosalicílico.

INTRODUCCIÓN

Las biofuncionalidades, aplicaciones y beneficios hacia la salud, de cadenas cortas de inulo-oligosacáridos (IOS), especialmente los pentámeros (IOS₅) y hexámeros (IOS₆), se han documentado ampliamente en la nutrición humana por Franck y DeLeenHeer (2004), Van Loo (1995), entre otros. Estas incluyen la activación del sistema inmune, resistencia a infecciones, síntesis de vitaminas del complejo B, mejora de la absorción de minerales en el intestino, disminución de los niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos y prevención de cáncer en el colon. Asimismo, como ingredientes alimenticios son importantes ya que resultan de uno a tres veces más dulces que la sacarosa, son libres de calorías, no son cariogénicos y no son usados como fuente de energía por el organismo, por lo tanto, son adecuados para ser consumidos por los diabéticos (Kaur y Gupta, 2002). Desde un punto de vista biotecnológico, estos son una fuente potencial de fructosa, la cual se usa ampliamente en la industria alimentaria como dulcificante, alimentos especiales para diabéticos y diurético (Roch-Norlund *et al.*, 1972).

En vista de lo anterior existe una creciente necesidad en el estudio de la síntesis de IOS con una longitud de cadena definida. Los métodos actuales emplean técnicas simples tales como la hidrólisis química de la inulina, mediante el tratamiento con ácidos minerales u orgánicos, por resinas catiónicas ácidas, zeolitas o por oxidación con carbón activado a altas temperaturas, hidrolizando inevitablemente cualquier intermediario IOS a fructosa. Lamentablemente, estos procesos son poco amigables con el medioambiente. Una alternativa a la síntesis química es el uso de enzimas como catalizadores para la producción de IOS, ya que éstas operan a condiciones suaves de reacción (presión y temperatura), produciendo pocos o nada de desechos tóxicos o subproductos.

ANTECEDENTES

2.1 INULINA

2.1.1 DEFINICIÓN

La inulina es un carbohidrato de reserva de origen vegetal perteneciente al grupo conocido como fructanos. Este grupo son los polisacáridos no estructurados más abundantes encontrados en la naturaleza después del almidón y se caracterizan por tener una estructura polimérica con fructosa como unidad repetidora, en la que los enlaces fructosil-fructosa constituyen la mayoría y puede existir una parte terminal de glucosa. En el caso de la molécula de inulina, su cadena lineal está constituida de unidades de fructosa, unidas por enlaces β -(2,1), que termina en un residuo de glucosa unido por un enlace α -(1,2), tipo sacarosa, como se observa en la Figura 2.1. El número de unidades de fructosa unidas a la glucosa terminal, referido como grado de polimerización, puede variar desde muy pocas unidades hasta 70, por lo que se puede considerar a la inulina vegetal como una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos (Franck y DeLeenHeer, 2004).

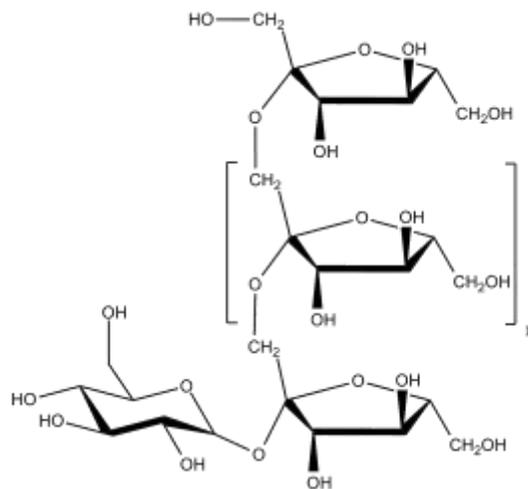


Figura 2.1 Molécula de inulina

2.1.2 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS.

En la naturaleza, la variedad de polifruktanos se encuentran comúnmente en plantas de las familias *Compositae* (25,000 especies), *Liliaceae* (3,500 especies) y *Graminae* (1,200 especies). Sin embargo, la inulina definida por los enlaces β -(2,1) se encuentran principalmente en la familia *Compositae*. Precisamente, su nombre se origina del género *Inula* (*Alant*), de la familia de las *Compositae*, debido a que históricamente fue aislada por primera vez de la *Inula helenium* en 1804, por el científico alemán Rose. A esta familia pertenecen plantas como la dalia, diente de león y alcachofa, mismas que presentan grandes cantidades de este tipo de carbohidrato. En la Tabla 1, se enlistan las fuentes vegetales de inulina mayormente conocidas, donde se ubican plantas utilizadas comúnmente en la dieta humana, como el puerro, la cebolla y el ajo.

**TABLA 1 CONTENIDO DE INULINA EN PLANTAS USADAS
COMÚNMENTE EN LA DIETA HUMANA**

Fuente	Partes Comestibles	Contenido sólido seco (% peso fresco)	Contenido de inulina (% peso fresco)
Cebolla	Bulbo	6-12	26
Alcachofa de Jerusalén	Tubérculo	19-25	14-19
Chicoria	Raíz	20-25	15-20
Puerro	Bulbo	15-20*	3-10
Ajo	Bulbo	40-45*	9-16
Alcachofa	Hojas	14-16	3-10
Plátano	Fruta	24-26	0.3-0.7
Centeno	Cereal	88-90	0.5-1*
Cebada	Cereal	ND	0.5-1.5*
Diente de León	Hojas	50-55*	12-15
Bardana	Raíz	21-25	3.5-4.0
Camas	Bulbo	31-50	12-22
Yacón	Raíz	13-31	3-19
Salsifí	Raíz	20-22	04-11

ND: No disponible; *Valor estimado.
Modificado de (Van Loo *et al.*, 1995)

Dependiendo de la familia de origen, edad y procedencia genética, la molécula de inulina tendrá distinto grado de polimerización (GP), así como distinto número de ramificaciones (Ricca *et al.*, 2007). Por ejemplo, la inulina obtenida de la planta de chicoria tiene un GP promedio de 10 a 14 y un grado de ramificación menor al 2%, mientras que la proveniente de la dalia presenta de 13 a 20 unidades de fructosa en promedio y un mayor grado de ramificación (4-5%). En la Tabla 2, se muestra el contenido de inulina en la chicoria, la dalia y la alcachofa de Jerusalén, así como datos de su producción y composición. Es importante mencionar que la inulina también puede ser de origen bacteriano, pero ésta contrasta significativamente con su contraparte vegetal al tener un GP muy alto, en un intervalo de 10^4 a 10^5 unidades.

TABLA 2 PRODUCTIVIDAD Y CONTENIDO DE INULINA EN LAS COSECHAS ANUALES DE CHICORIA, DALIA Y ALCACHOFA DE JERUSALÉN

		Chicoria	Dalia	Alcachofa de Jerusalén
Raíces/Tubérculos [Tones por ha]	Promedio	43.5	25	42
	Intervalo	25-75		35-60
%MS	Promedio	22.4	18	22
	Intervalo	20-25	19-25	15-22
Inulina [%]	Promedio	16.6	11	16
	Intervalo	14.9-18.3	10-12	14-18
Inulina [Tones por ha]		5-11	2.5-3	4.5-8.5
GP promedio		10-14	13-20	6-10
GR		<2%	4-5%	

MS: Materia Seca; GP: Grado de Polimerización; GR: Grado de Ramificación.
Modificada de (Franck y DeLeenHeer, 2004)

Actualmente, la chicoria es la más utilizada en la producción industrial de inulina. La chicoria pertenece a la familia de las *Asteraceae* y se cultiva en mayor medida en países como Inglaterra, Bélgica, Francia, Holanda, Alemania, Chile, Sudáfrica e India (Bais y Ravishankar, 2001). La inulina de la chicoria se almacena en la raíz primaria de la planta como carbohidrato de reserva y su contenido varía poco entre distintas cosechas, alcanzando niveles del 14.9% hasta el 18.3%, como se observa en la Tabla 2. Es una planta que se cosecha dos veces por año, manteniendo un contenido de inulina alto y constante año con año.

En México, una posible fuente importante de fructanos se encuentra en la planta de *Agave*, ya que los fructanos que produce, denominados agavina, son la fuente principal de carbono para la fermentación del Tequila y otras bebidas. La diferencia de este compuesto con respecto a las moléculas de inulina, es su amplio grado de ramificación (Figura 2.2). (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009)

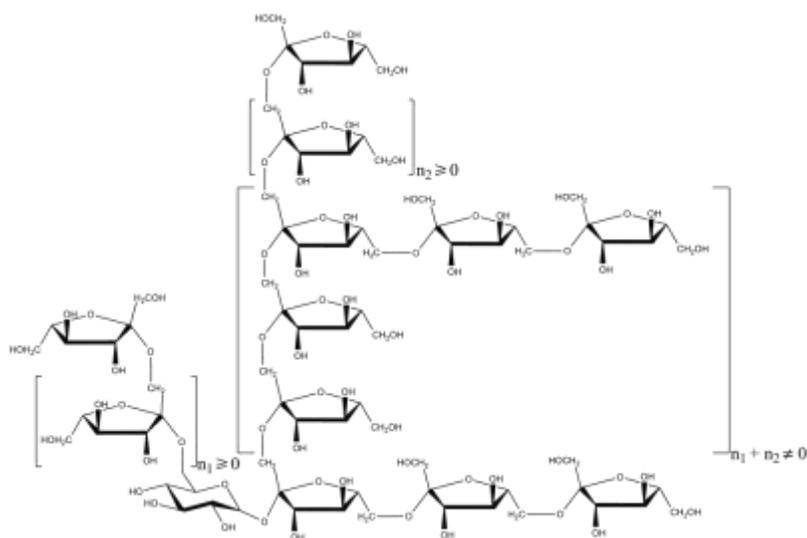


Figura 2.2 Molécula de agavina.

Tomada de (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009)

2.1.3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

La inulina de chicoria se encuentra disponible en un polvo blanco, inodoro, de alta pureza y una composición química conocida. Presenta un sabor blando neutro con ningún resabio o sensación posterior a la prueba. La inulina estándar, definida como la inulina con un GP menor a 10, es ligeramente dulce, mientras que la de alto rendimiento ($GP > 10$) no presenta dulzura. Esta última resulta conveniente para mezclar con otros alimentos, sin modificar su sabor (Franck, 2006).

La inulina de chicoria es moderadamente soluble en agua con un 10% de solubilidad a temperatura ambiente. Su solubilidad dependerá, en parte, del proceso de precipitación utilizado en su obtención, ya sea precipitada en agua o en etanol. Estudios realizados por Phelps (1965) demostraron una mayor solubilidad en la inulina precipitada en etanol.

La viscosidad de la inulina de chicoria es relativamente baja, considerando una concentración moderada de 5% (p/v) de inulina, siendo de 1.65 cp a 10°C. En la Tabla 3, se enlistan más propiedades fisicoquímicas conocidas para este compuesto.

En condiciones fuertemente ácidas, los enlaces β -(2,1) entre las unidades de fructosa se pueden hidrolizar completamente. En este proceso se forma fructosa con mayor notoriedad en sistemas con condiciones de pH bajo, temperatura alta y poca substancia seca. La inulina tiene un comportamiento estable con un pH mayor a 4.

TABLA 3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA INULINA COMERCIAL DE CHICORIA.

	Inulina estándar	Inulina de alto rendimiento
Estructura química	GF _n ($2 \leq n \leq 60$)	GF _n ($10 \leq n \leq 60$)
GP promedio	12	25
Materia seca (%)	>95	<95
Contenido de inulina (% en MS.)	92	99.5
Contenido de azúcares (% en MS.)	8	S 0.5
pH (10 % p/p)	5-7	5-7
Ceniza sulfatada (% en MS.)	<0.2	<0.2
Metales pesados (ppm en MS)	<0.2	<0.2
Apariencia	Polvo Blanco	Polvo Blanco
Sabor	Neutro	Neutro
Dulzura (v. sacarosa =100 %)	10%	Ninguna
Solubilidad en agua a 25°C (g/l)	120	10
Viscosidad en agua (5 %) a 10°C (cp)	1.6	2.4

Modificada de (Franck y DeLeenHeer, 2004)

2.1.4 PRODUCCIÓN

El proceso de producción de la inulina de chicoria se lleva a cabo en 2 etapas como se muestra en la Figura 2.3. En la primera etapa, las raíces cosechadas son transportadas a la fábrica donde son pesadas, lavadas y cortadas. La inulina cruda es extraída de los trozos cortados, empleando agua caliente en un difusor a contracorriente. Los trozos ya sin inulina son secados y vendidos como alimento para la ganadería. El jugo extraído se purifica por encalado y carbonatación a pH alto. El lodo de CaCO₃ formado, ayuda a

precipitar péptidos, distintos aniones, proteínas degradadas y algunos coloides. Este lodo genera un producto usado por los agricultores para mejorar la estructura del suelo.

En la segunda etapa, el jugo no procesado se refina usando resinas de intercambio iónico para desmineralizar y carbón activado para decolorar. Posteriormente, el jugo se esteriliza por medio de un filtro de $0.2\mu\text{m}$ previo a ser evaporado y secado por espreas. Para obtener la inulina de alto rendimiento, la fracción de GP bajos se separa físicamente previo a la segunda etapa (Franck, 2006).

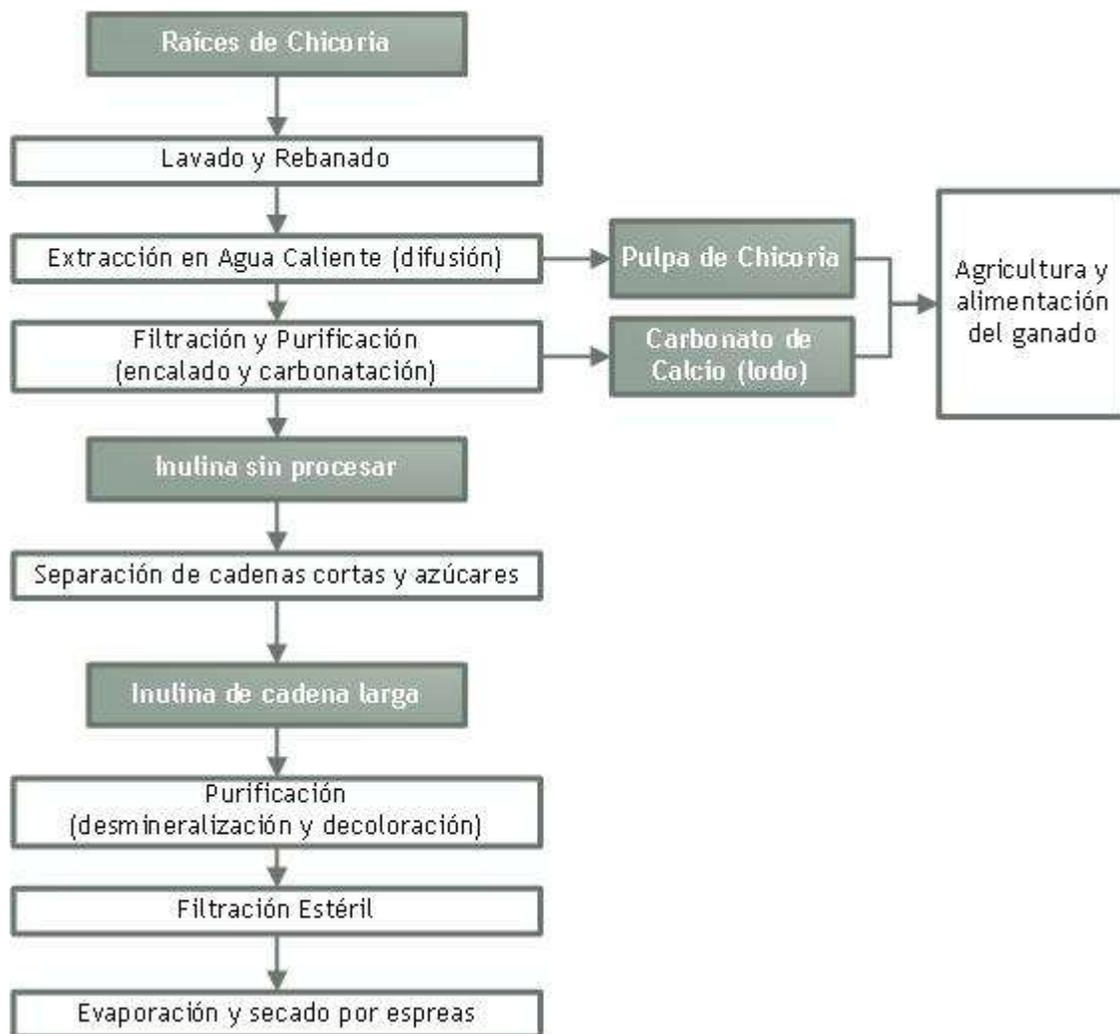


Figura 2.3 Proceso industrial para la obtención de inulina de chicoria.

Es importante mencionar que la inulina extraída de raíces frescas, aun tomando la precaución de inhibir la hidrólisis ácida, siempre contendrá una fracción de fructosa, glucosa, sacarosa y pequeños oligosacáridos.

2.1.5 IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y COMERCIAL

Actualmente, Orafti, Cosucra y Sensus son los 3 principales productores industriales de inulina, cubriendo la demanda mundial de este alimento funcional. Los tres proveedores utilizan la chicoria como su materia prima. El proceso de extracción de inulina de chicoria ha evolucionado desde un proceso experimental en laboratorio, hasta la escala industrial en su totalidad. En los últimos 20 años, se ha reportado que el área destinada a la cosecha de chicoria, para la producción de inulina y fructosa, se ha incrementado de forma muy significativa, lo cual indica el crecimiento en el negocio de este carbohidrato. En años recientes, algunas compañías en China han mostrado una propuesta agresiva para entrar al mercado, con precios más bajos y haciendo uso de la alcachofa de Jerusalén como materia prima de bajo costo.

La importancia actual de la inulina radica en su clasificación como alimento funcional. Un alimento se denomina como funcional si cumple uno de los siguientes criterios: 1) Contiene un componente alimenticio, ya sea nutriente o no, que afecta una o un limitado número de funciones en el cuerpo de una forma determinada que se tenga efectos positivos (Bellisle *et al.*, 1998); 2) Tiene un efecto fisiológico o psicológico más allá del efecto nutricional tradicional (Clydesdale, 1997). En general, un alimento funcional resulta en un efecto relevante sobre el bienestar y la salud de un individuo o en la disminución al riesgo de contraer una enfermedad. Es importante establecer que un alimento funcional debe permanecer como alimento; no puede tratarse de pastillas o capsulas, sino componentes que formen parte de una dieta o un patrón de comida reconocido como benéfico para la salud (Ruberfroid, 1999).

La inulina ha demostrado poseer distintos beneficios nutricionales para los animales y el ser humano. Hay fuerte evidencia de que los enlaces β -(2,1) presentes en la molécula hacen que pase a través de la boca, estómago e intestino delgado sin ser absorbida ni sufriendo cambios significativos en su estructura. Esto se debe a que las enzimas digestivas presentes en el cuerpo humano no son capaces de hidrolizar estos enlaces, por lo que la inulina llega al colon casi en su totalidad. Ya en el colon, la microbiota intestinal metaboliza a la inulina por completo, transformándola principalmente en ácidos grasos de cadena corta, biomasa y gases. Gibson *et al.* (1995) demostraron el efecto prebiótico de la inulina en el colón y, como se observa en la Figura 2.4, esta

promueve el crecimiento y la actividad metabólica de bacterias benignas, principalmente, las *Bifidobacterias*.

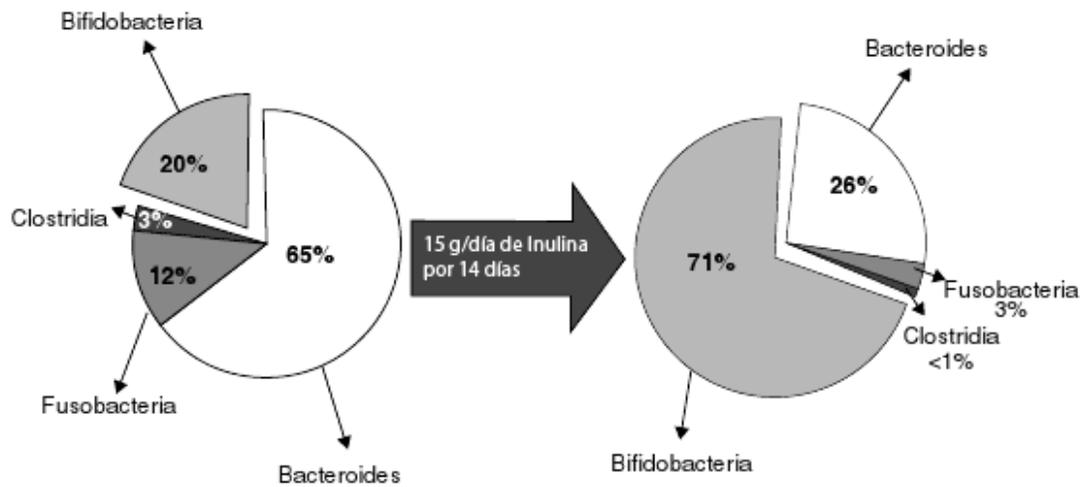


Figura 2.4 Efecto prebiótico de la inulina.

Tomada de (Gibson *et al.*, 1995)

Otro aspecto importante de la inulina es su uso como materia prima para la producción de inulo-oligosacáridos y fructosa. Algunas de las aplicaciones y características de la inulina y los IOS provenientes de la misma, resultan similares. Éstas serán detalladas y comparadas más adelante.

2.2 HIDRÓLISIS DE INULINA

La inulina puede ser hidrolizada para la obtención de determinados productos. La reacción puede producirse parcial o totalmente. En el caso de la hidrólisis total (Figura 2.5) se obtendrá fructosa y glucosa por completo, mientras que en la hidrólisis parcial (Figura 2.6), los productos serán principalmente inulo-oligosacáridos con un GP bajo.

Esta reacción se lleva a cabo naturalmente en especies que metabolizan la inulina, pero en la actualidad se han desarrollado métodos químicos y biotecnológicos, mencionados más adelante (p27, p28), para poder llevarla a cabo de forma controlada.

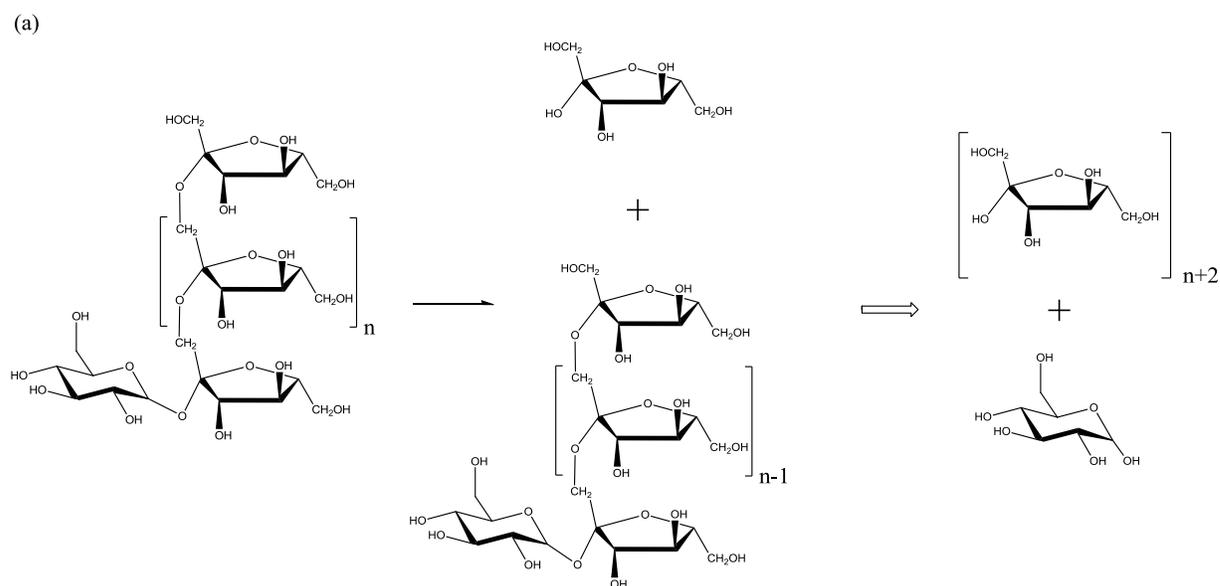


Figura 2.5 Representación de la hidrólisis total de inulina.

La reacción se repite hasta que la molécula de inulina se haya transformado en su totalidad a fructosa y glucosa

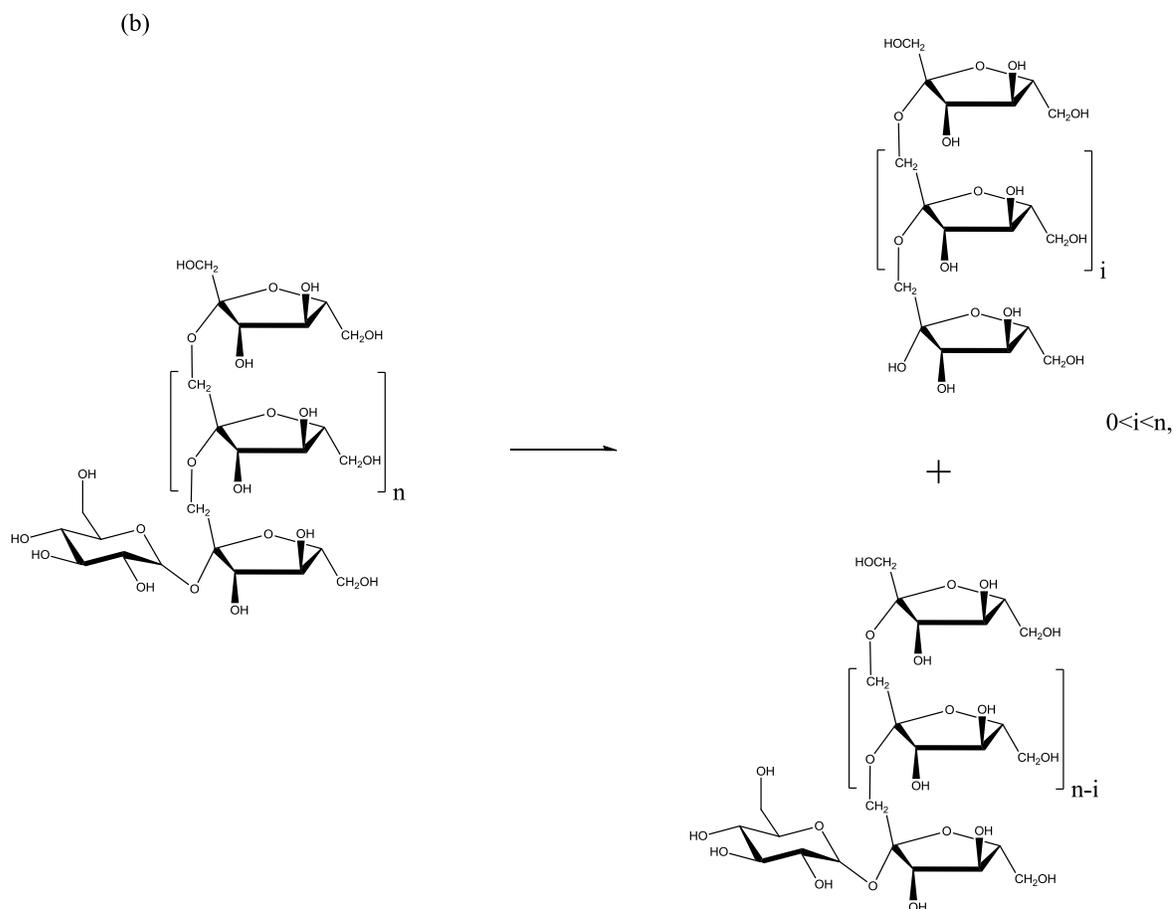


Figura 2.6 Representación de la hidrólisis parcial de inulina.

2.2.1 HIDRÓLISIS COMPLETA: JARABES DE FRUCTOSA

Los jarabes de fructosa son utilizados ampliamente en la industria gracias a que la fructosa es la azúcar natural más dulce, siendo 1.2 veces más dulce que la sacarosa en base peso. Esto significa una cantidad menor de azúcar para obtener el mismo sabor (Shallenberger, 1993). Otras propiedades de los jarabes de fructosa, importantes para la industria, son su baja viscosidad con respecto a otros jarabes dulces y la alta concentración obtenible en fructosa por la alta solubilidad de esta azúcar.

Su consumo resulta benéfico en algunos aspectos, uno de ellos siendo que en comparación de la ruta metabólica de la glucosa, la de la fructosa no depende de la insulina, convirtiéndose en un azúcar que puede ser usada en alimentos para diabéticos, aunque sus efectos en la salud a largo plazo aún no son especificados con certeza. En

otro rubro, su efecto en el decaimiento dental es menor a otros azúcares. (Roch-Norlund *et al.*, 1972). Estas propiedades han dado importancia a los jarabes de fructosa en la industria alimentaria.

Actualmente, la mayor parte de la fructosa utilizada en la industria alimentaria se produce a partir del almidón de maíz. La producción se realiza mediante una hidrólisis de almidón, seguida por una isomerización, en la que se obtiene un promedio de 42% de fructosa. Esta conversión puede ser incrementada hasta 95% por medio de una separación cromatográfica y una posterior isomerización de la glucosa residual (Kays y Nottingham, 2008).

Al ser un polímero de fructosa, la inulina resulta en una mejor alternativa para producir un jarabe rico en fructosa. El porcentaje de fructosa, obtenido en la hidrólisis, varía con el grado de polimerización de la inulina. Un lote con bajo GP producirá jarabes con un contenido considerable de glucosa y, por lo tanto, una fracción de fructosa reducida. Para evitar esto, son necesarios dos procesos para la producción de jarabes ricos en fructosa a partir de inulina: 1) la hidrólisis y 2) el enriquecimiento de fructosa.

Para obtener un jarabe de fructosa de alta pureza es necesario separar la inulina con bajo GP antes de la hidrólisis o extraer la glucosa al término de la reacción. La separación de inulina con bajo GP se puede lograr por distintos métodos. Los más comunes siendo a través de cromatografía, ultrafiltración (Kamada *et al.*, 2002), precipitación fraccionada de compuestos con mayor peso molecular usando, ya sea etanol o bajas temperaturas (Chabbert *et al.*, 1985) y reacción enzimática. En la reacción enzimática, generalmente, se utilizan cepas de levadura que promueven la fermentación de inulina, restringida a fracciones de bajo peso molecular (Schorr-Galindo *et al.*, 1995.). Así, la inulina sin procesar se fermenta inicialmente para producir etanol de la fracción con bajo peso molecular. La fracción residual con un GP alto se hidroliza posteriormente, obteniendo jarabes de fructosa de hasta el 95% (Kays y Nottingham, 2008).

2.2.2 HIDRÓLISIS PARCIAL: INULO-OLIGOSACÁRIDOS

Los oligómeros de inulina son generalmente considerados como inulo-oligosacáridos (IOS)(también referidos en ocasiones como fructooligosacáridos u oligo-fructosa) con un GP menor a 9 y con estructura F_n (Kays y Nottingham, 2008). Al igual que la inulina, estos oligómeros tienen una amplia utilidad en la elaboración de alimentos con valor agregado. En la Tabla 4, se muestran algunas de las aplicaciones, de la inulina y los IOS, en la industria de alimentos y bebidas. Su aplicación se respalda en que ofrece un beneficio dual al alimento: 1) una mayor calidad organoléptica y 2) una composición nutrimental mejor balanceada. Su efecto favorable en la reducción de triglicéridos y colesterol (Davidson *et al.*, 1998) y su bajo nivel calórico de tan sólo 1-2Kcal/g (Kaur y Gupta, 2002) lo hace conveniente y recomendado en la dieta de personas obesas. Las personas diabéticas también pueden gozar de este beneficio, ya que no se requiere a la insulina en la vía metabólica de los IOS.

Otros efectos positivos en la ingesta de IOS se han reconocido en casos de constipación por sus propiedades como fibra dietética. Su ingesta no presenta efectos alternos indeseables, comunes con el consumo de otras fibras dietéticas. El principal problema de otras fibras es la influencia negativa en la absorción de vitaminas y minerales (Hond y Ghoo, 2000). En el caso de los IOS, se ha demostrado un incremento significativo en la absorción de minerales en el intestino como calcio y magnesio (Ohta *et al.*, 1995). Inclusive, se ha señalado que los IOS tienen un potencial quimiopreventivo en el desarrollo de cáncer de colon, muy significativo (Wargowich *et al.*, 1995).

TABLA 4 RESUMEN DE LAS APLICACIONES DE LA INULINA Y LOS IOS EN ALIMENTOS.

Aplicación	Funcionalidad	Porción de inulina (% p/p)	Porción de IOS (% p/p)
Productos Lácteos	Sustituto de azúcar y grasas	2-10	2-10
	Sinergia con saborizantes		
	Cuerpo y sensación en la boca		
	Estabilidad de espuma		
Postres congelados	Fibra y prebiótico	2-10	5-12
	Sustituto de azúcar y grasas		
	Textura y derretimiento		
	Sinergia con saborizantes		
Margarinas	Fibra y prebiótico	2-10	—
	Sustituto de grasa		
	Textura y extensión		
	Estabilidad de emulsión		
Pan y bienes horneados	Fibra y prebiótico	2-15	2-25
	Retención de humedad		
	Sustituto de azúcar		
Cereales para desayuno	Fibra y prebiótico	2-25	2-15
	Textura crujiente y expansión		
Rellenos	Sustituto de azúcar y grasas	2-30	2-50
	Mejora en la textura		
Frutas preparadas	Sustituto de azúcar	2-10	5-50
	Sinergia con saborizantes		
	Cuerpo y sensación en la boca		
	Fibra y prebiótico		
Aderezos de ensaladas	Sustituto de grasa	2-10	—
	Cuerpo y sensación en la boca		
Productos de carne	Sustituto de grasa	2-10	—
	Textura y estabilidad		
	Fibra		
Productos dietéticos y suplementos alimenticios	Sustituto de azúcar y grasas	2-15	2-20
	Sinergia con saborizantes		
	Bajo en calorías		
	Cuerpo y sensación en la boca		
Chocolate	Fibra y prebiótico	5-30	—
	Sustituto de azúcar		
	Fibra		
Tabletas	Resistencia al calor	5-100	2-10
	Sustituto de azúcar		
	Fibra y prebiótico		

Tomada de (Franck, 2002)

Se ha reportado que los IOS ayudan a potenciar la población bacteriana de *Bifidobacteria* en el intestino. La predominancia de ésta población, en el intestino grueso, contribuye a la prevención de muchas enfermedades y a una mejora en la salud en general.

Gibson (1994) y Roberfroid (1995) reportaron que el efecto bifidogénico, producto de la fermentación de fructanos en humanos y animales, es selectivo. Sus estudios revelaron que pacientes humanos, tomando una ingesta diaria (15 g/día) de determinados fructanos por 14 días, mostraban un cambio significativo en la distribución poblacional de su microflora intestinal. La población muestra eran humanos con una población minoritaria de *Bifidobacterias* en su microflora intestinal. Al final del estudio, los pacientes que ingirieron IOS mostraron el mayor cambio en el tamaño de población *Bifidobacteriana*, la cual conformó el 82% de la población total en su intestino. En contraste, los pacientes con un suministro de sacarosa, de acuerdo al control proporcionado, tuvieron solamente una fracción del 17% y 44% para el mismo género de bacterias (Figura 2.7). Haciendo referencia previa a la Figura 2.4, la inulina registró una fracción del 71%. El incremento de las *Bifidobacterias*, promovido por el consumo de IOS, fue acompañado por un decremento en la población de *Bacteroides* y otras poblaciones potencialmente patogénicas.

Una ingesta diaria de 4 g de IOS es suficiente para incrementar la *Bifidobacteria* y obtener sus beneficios en la salud (Roberfroid *et al.*, 1998).

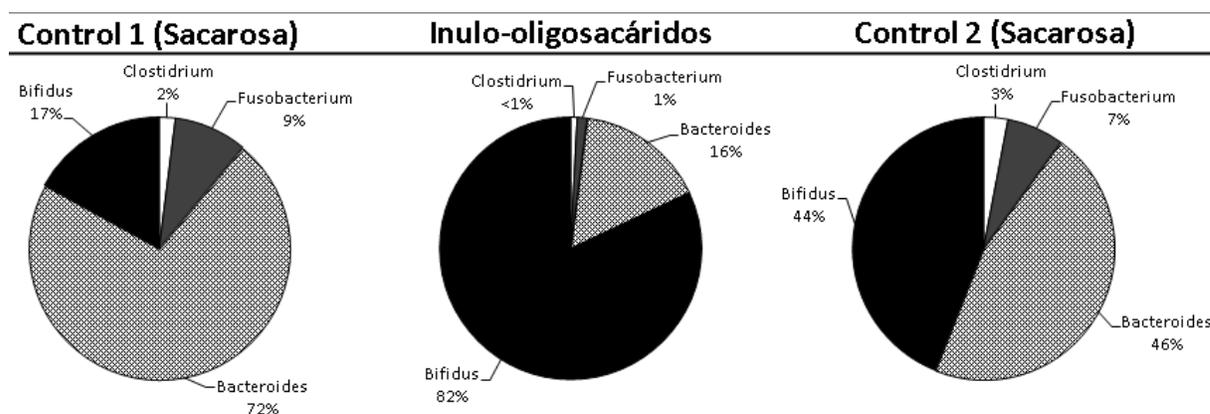


Figura 2.7 Cambios en la microflora intestinal tras ingerir IOS.

Tomada de (Gibson *et al.*, 1995)

Respecto a su obtención, los IOS pueden ser producidos en microorganismos como *Escherichia coli* con la expresión de la β -fructofuranosidasas. En este caso, la sacarosa actúa como donador de fructosa y como aceptor inicial. Las β -fructofuranosidasas necesitan tener una actividad de transfructosilación suficiente para producir IOS. La enzima, obtenida de la *Aspergillus niger* ATC20611, ha sido utilizada con éxito para producción industrial (Hidaka *et al.*, 1988).

Otra forma de producción es la, ya mencionada, hidrólisis parcial de las fracciones con oligómeros de alto peso molecular (GP de 20-25). El método de preparación de una fracción de oligómero depende del intervalo de GP deseado en el producto final y del GP en el componente inicial. En el caso de la inulina de alcachofa de Jerusalén es posible usar ultrafiltración, cromatografía u otros medios para separar una fracción con bajo peso molecular, ya que tiene un GP más bajo que la inulina de chicoria y éste va disminuyendo conforme más tiempo tarde en ser cosechada (Kango y Chand, 2011).

2.2.3 MÉTODO QUÍMICO

La hidrólisis química de la inulina se puede realizar por tratamiento con ácidos orgánicos o minerales como reportan Beglov y Golubev (2004) y Kim y Hamdy (1986). Igualmente, se ha desarrollado un proceso a través de catálisis heterogénea usando catalizadores ácidos sólidos, como resinas de intercambio catiónicas ácidas, zeolitas o carbón activado oxidado (Rocha *et al.*, 2006). La hidrólisis química se puede lograr acidificando a pH de 2 a 3 con un intercambiador catiónico de ácido fuerte y calentando de 70 a 100°C (Matsumoto y Yamazaki, 1986).

El método químico se encuentra asociado con algunas desventajas. Específicamente, la formación de contaminantes tóxicos como la acrilamida, co-productos no deseados como la difructosa anhidra y compuestos que agregan color al producto final (Vandamme y Derycke, 1983). Estas desventajas reducen la producción, ya que se requiere un procesamiento del producto, más demandante en tiempo y dinero, para eliminar todo tipo de contaminante (Rocha *et al.*, 2006).

2.2.4 MÉTODO BIOTECNOLÓGICO

Una alternativa para superar los problemas presentados por los métodos químicos es el uso de una vía biotecnológica, a través la reacción enzimática de la hidrólisis.

La hidrólisis de inulina hasta fructosa se lleva a cabo por la exoinulinasa (EC 3.2.1.80; β -D-fructano-fructohidrolasa) actuando por sí sola o en asociación con la endoinulinasa (EC 3.2.1.7; β -fructano-fructanohidrolasa). La endoinulinasa es responsable de la hidrólisis parcial del polímero a IOS de longitud variada (Yun *et al.*, 2000). Muchas de estas enzimas fructosil-hidrolasas poseen una amplia especificidad de sustrato, suponiendo que cada oligómero de fructosa es un sustrato diferente; la clasificación del grado de especificidad de la enzima, dependerá de la proporción entre la sacarosa y la inulina hidrolizada (S/I) (Kango y Chand, 2011).

Esta reacción se puede llevar a cabo con una enzima inmovilizada, que permitiría el reúso del biocatalizador y reduciría los costos al evitar la necesidad de separar la enzima del producto final.

Este método será descrito con mayor análisis de cada componente en apartados próximos (p29, p30, p34, p36, p42).

2.3 INULINASAS

Las inulinasas son enzimas que se encuentran en el grupo de las hidrolasas, clasificadas como fructofuranosil hidrolasas. Son producidas por un amplio número de organismos, incluyendo plantas, bacterias, hongos y levaduras. La reacción catalizada por las inulinasas generalmente implica la acción de dos enzimas, la exoinulinasasa y la endoinulinasasa.

2.3.1 PRODUCCIÓN DE INULINASAS

Las inulinasas pueden ser obtenidas de plantas y diversos microorganismos. Se ha demostrado que las plantas dientes de león, chicoria y la alcachofa de Jerusalén contienen inulinasas que puede ser extraídas y purificadas. Sin embargo, estas fuentes no son tan productivas como las microbianas, que al parecer, serían las únicas fuentes potenciales para llevar a cabo un proceso industrial para la obtención de inulinasas.

Lo que distingue las enzimas obtenidas de distintos microorganismos es la producción de enzima activa por cultivo [U/ml] (unidades de actividad/ ml de cultivo) y las propiedades de la enzima, que estrictamente dependen, no sólo de la clase de microorganismo utilizado, sino también de la forma en que la fermentación fue llevada a cabo. Un importante número de hongos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasasa. Muchos de ellos han sido cultivados para purificar la enzima como muestran los trabajos realizados por Pandey *et al.* (1999) y Vandamme y Derycke (1983). Dentro de los microorganismos detectados para producir inulinasas, las cepas de hongo, más prominentes como productoras, son la de *Aspergillus* y la de *Penicillium*, mientras que para las cepas de levadura, la de *Kluyveromyces* es la más común. Especies de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* han sido reportadas como prometedoras entre las bacterias productoras de inulinasas (Kango y Chand, 2011). La producción de enzimas y el sitio de actividad enzimática, al parecer, son determinados por el tipo de microorganismo usado como fuente y el sustrato usado durante la fermentación (Ricca *et al.*, 2007). Las condiciones de cultivo, como concentración de sustrato, temperatura,

pH, agitación, aireación, presencia de compuestos supresores o promotores entre otros afectaran la producción de inulinasas.

La elección del microorganismo para la producción de inulinasas dependerá del uso planeado para la enzima. Una mezcla de inulinasas tipo exo y endo se recomienda para la producción de jarabe de fructosa a partir de inulina vegetal, ya que su acción sinérgica ofrece una mayor tasa de producción (Kango y Chand, 2011). Nakamura (1978) fue el primero en reportar la producción de ambas inulinasas de la cepa *A. niger*. Las cepas que producen exclusivamente endoinulina son de gran interés en la producción de IOS. Las endoinulinasas han sido caracterizadas de una variedad de hongos incluyendo *Pencillium* sp. TN-88 (Nakamura *et al.*, 1997) y *Pencillium purpureogenum* (Onodera y Shiomi, 1988). Es importante caracterizar la acción de la endoinulina en término del GP producido. Las inulinasas de *A. niger* producen los IOS F₃, F₄ y F₅, mientras que las de *Pencillium* sp. TN-88 producen exclusivamente F₃. La tecnología basada en enzimas, sólo será atractiva económicamente, desarrollando métodos de producción de enzimas de bajo costo. El uso de sustratos de bajo costo y de incidencia natural con alta productividad, significarían una reducción en la inversión total del proceso (Kango y Chand, 2011).

2.3.2 PROPIEDADES DE LAS INULINASAS

El origen microbiano de las inulinasas determinará si su funcionamiento es extra o intracelular y definirá muchas de sus características, como peso molecular, solubilidad y temperatura óptima. En la Tabla 5, se muestran las propiedades de varias inulinasas que han sido caracterizadas de diferentes microorganismos. Las inulinasas, obtenidas a partir de hongos, han reportado características diferentes entre sí. Por ejemplo, la termoactividad, que es una de las características de mayor relevancia para la aplicación industrial, deseándose prioritariamente una temperatura alta de funcionamiento, ha arrojado distintos resultados. En el caso de las inulinasas obtenidas a partir de *Pencillium* sp., se reportó un intervalo de temperatura de actividad óptima de 45-50°C (Nakamura y Nakatsu, 1977), por otra parte, para las inulinasas provenientes de *A. niger* fue de 45-55°C (Nakamura *et al.*, 1978). Otros reportes difieren y muestran que

las inulinasas de *A. niger* y *A. fumigatus* presentan una actividad óptima a 60°C de (Gill *et al.*, 2006).

TABLA 5 PROPIEDADES DE ALGUNAS INULINASAS MICROBIANAS

Origen	Forma	PM (kDa)	Intervalo de pH	pH óptimo	Intervalo de Temp.	Temp. óptima	Km (mmol/L)	Actividad específica (U/mg)
<i>Penicillium sp.</i>	EI	60	4.0–7.4	4.5	<50	50	.173	—
	EII	65		5.6		55	.233	
<i>Penicillium sp.</i>	—	—	5.0–7.0	4.4	<45	45	—	—
<i>K. marxianus</i>	Exo	—	—	5.5	—	55	3.92	49
<i>K. fragilis</i>	—	250	—	5.5	—	55	—	—
<i>F. oxysporum</i>	Extra-	300	—	6.2	—	37	.2	—
<i>P. rugulosum</i>	—	—	—	6.0–7.0	—	55	—	—
<i>B. subtilis</i>	—	75	—	5.5	—	55	—	—
<i>F. oxysporum</i>	—	—	—	6.0–7.0	—	37	—	—
<i>Chrysopannorum</i>	—	58	4.5–8.5	—	—	50	—	—
<i>Aspergillus sp.</i>	Endo-	53	—	6.2	—	—	570	150
	Exo-	81						258
<i>F. oxysporum</i>	Extra-	300	—	5.8	—	37	.0167	63.3
	Intra-	300		6.2		30	.02	21
<i>C. acetobutylicum</i>	Extra-	—	—	5.5	—	47	6	—
	Intra-						7	
<i>C. acetobutylicum</i>	—	—	—	4.8	—	—	0.012	—
<i>A. niger</i>	Endo	68.1	—	6	—	50	3.53	350

Sustrato: Inulina vegetal. Modificada de (Pandey *et al.*, 1999)

En el caso del pH, la mayoría de las inulinasas exhiben un óptimo en el intervalo de 4.0 a 5.5 (Vandamme y Derycke, 1983). Sin embargo, Pandey *et al.* (1999) reportaron que las inulinasas de origen fúngico pueden mostrar un pH óptimo desde 4.5 hasta 7.0, las bacterianas de 4.8 a 7.0 y las de levadura de 4.4 a 6.5.

Es necesario considerar que los valores óptimos de temperatura y pH no necesariamente resultaran en los valores de operación a una escala industrial, debido a que factores como la estabilidad de la enzima, el riesgo de contaminación, la solubilidad de la inulina y la posible formación de color modifican las condiciones necesarias para obtener un producto comercial y una producción final económicamente viable. Valores de pH, tan bajos como los óptimos arriba reportados, son recomendados para evitar la

coloración. Por otra parte, temperaturas altas que pueden maximizar la actividad de la enzima, también pueden afectar su estabilidad. La desactivación térmica ocurre por una desnaturalización de la enzima al trabajar en rangos de temperaturas extremas para su estructura. Es necesario evaluar la termoestabilidad y termoactividad de la enzima para determinar una temperatura óptima para un proceso industrial. Una temperatura alta beneficiaría al proceso al incrementar la solubilidad de la inulina, establecida ya como un factor limitante dentro del proceso (Ricca *et al.*, 2007).

El peso molecular de las inulinasas se encuentra relacionado estrictamente con el organismo productor, variando generalmente en órdenes de magnitud menores a 1. Se han reportados valores de 68 kDa para inulinasas de *A. niger*, 53 kDa de *A. ficcum*, 54 kDa de *A. candidus* (Kochhar *et al.*, 1999) y 250 kDa de *K. fragilis* (Kaur *et al.*, 1994). La variación en el peso molecular no sólo se relaciona con el origen de la inulina, sino que su especificidad, ya sea endo u exo, repercutirá en éste.

Pocos reportes han sido publicados sobre la estructura de las inulinasas. Nagem *et al.* (Nagem *et al.*, 2004) determinaron la estructura de la exoinulina de *A. awamori* por cristalografía de Rayos-X de alta resolución. La estructura reveló que la proteína está compuesta por dos dominios: El dominio catalítico N-terminal, de mayor tamaño y compuesto por un plegamiento inusual de hojas beta en forma de propela de cinco paletas, y el dominio C-terminal, plegado en forma de beta sándwich. Su estructura es similar a la invertasa (β -fructosidasa) de *thermotoga marítima* perteneciente a la familia 32 de las glicosil-hidrolasas. La exo-inulina es una glicoproteína que contiene 5 glicosilaciones. Los dos cristales obtenidos de la misma proteína mostraron diferente grado de glicosilación. La estructura de la exoinulina se puede observar en la Figura 2.8, donde se ilustra a cada cuchilla del dominio amino-terminal en distinto color; la cuchilla 1 en amarillo, la 2 en turquesa, la 3 en rojo, la 4 en verde y la 5 en naranja. El dominio carboxilo-terminal se ilustra en azul y la pequeña unión por cadena polipéptida entre dos dominios se representa en rosa.

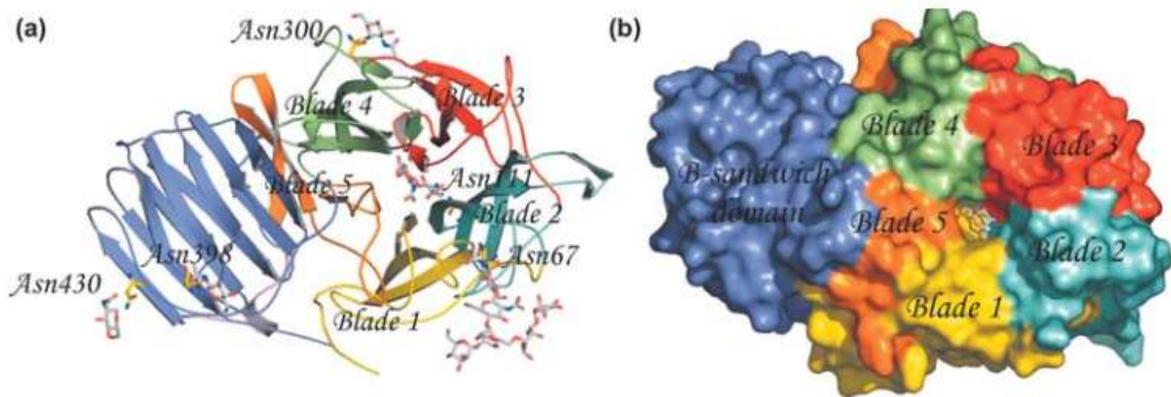


Figura 2.8 (a) Representación gráfica de la estructura secundaria de la exoinulinasa. (b) Representación de la superficie de la exoinulinasa con la molécula de fructosa en el sitio activo.

Tomada de (Nagem *et al.*, 2004)

Basso *et al.* (2010) desarrollaron un modelo de la endoinulinasa de *A. niger* (Figura 2.9), por medio de modelamiento por homología. La estructura en cristal de la *A. awamori* fue utilizada como molde. Simulaciones de dinámica molecular y acoplamiento molecular se llevaron a cabo para establecer las diferencias. Era claro que el modelo, para la endoinulinasa de *A. niger*, revelaría una forma análoga a la estructura de la exoinulinasa de *A. awamori*, pero también se obtuvieron ciertos cambios secuenciales. Las principales diferencias se observaron en el dominio catalítico, entre ellas, que el residuo Asp 41 en la estructura de *A. awamori*, era remplazado por un residuo Glu 43 en el modelo de *A. niger*, lo que sugiere un rol en la selectividad del sustrato para este residuo.

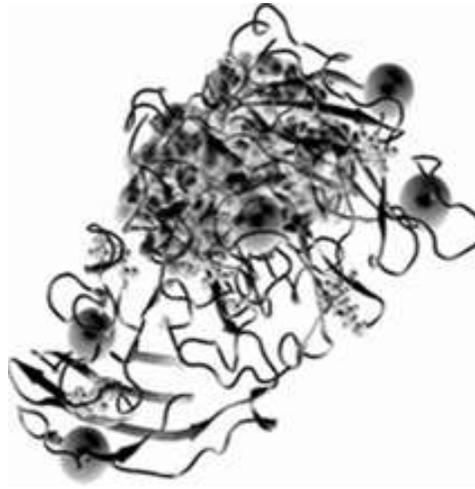


Figura 2.9 Modelo de la endoinulinasa de *A. niger*.

Se muestra el sitio activo en superficie semitransparente y los sitios de glicosilación como esferas grandes.

Tomada de (Basso *et al.*, 2010)

2.3.3 MECANISMO DE REACCIÓN

Alineamientos múltiples de la secuencia genética de inulinasas de origen fúngico revelaron la presencia de secuencias conservadas en las distintas inulinasas. Estas secuencias fueron similares a las observadas en distintas inulinasas de origen bacteriano. La presencia de la secuencia Arg-Asp-Pro (RDP) ha sido encontrada en las secuencias de las fructosil transferasas, las inulinasas, las invertasas y las levanasas. Se ha supuesto que esta secuencia tiene un rol funcional en el acoplamiento de sustrato, así como ser responsable de la especificidad de la enzima frente a residuos fructopiranosiles (Nagem *et al.*, 2004). En 1995, Zhrebtsov evaluó la estructura de sitios activos en inulinasas provenientes de la *A. awamori* VKMF-808. Las estructuras mostraron que los grupos carboxílicos y el imidazol eran participes en la catálisis. Posteriormente, en el 2003, propuso un posible mecanismo para la inulinasa de la cepa bacteriana *B. polymixa* 722. La función enzimática consiste en el rompimiento de los enlaces fructosil β -(2,1). Esta ruptura es efecto de un ataque nucleofílico y electrofílico, combinado y directo, dentro del sitio activo de la enzima. Los grupos de los aminoácidos, propuestos a efectuar el ataque del nucleófilo y del electrófilo en la catálisis, son el imidazol y el sulfidriilo, respectivamente.

El mecanismo propuesto se muestra en la Figura 2.10, en la que se observa que la reacción comienza vía un ataque nucleofílico por parte del imidazol del aminoácido His sobre el carbono en la posición 2. Esta primera secuencia de pasos produce un complejo intermediario tetraédrico que, al ser transformado con la presencia de agua, da lugar a la formación de los productos finales. El grupo sulfidrilo del aminoácido Cys actúa como aceptor o donador de hidrógeno en los distintos pasos del mecanismo.

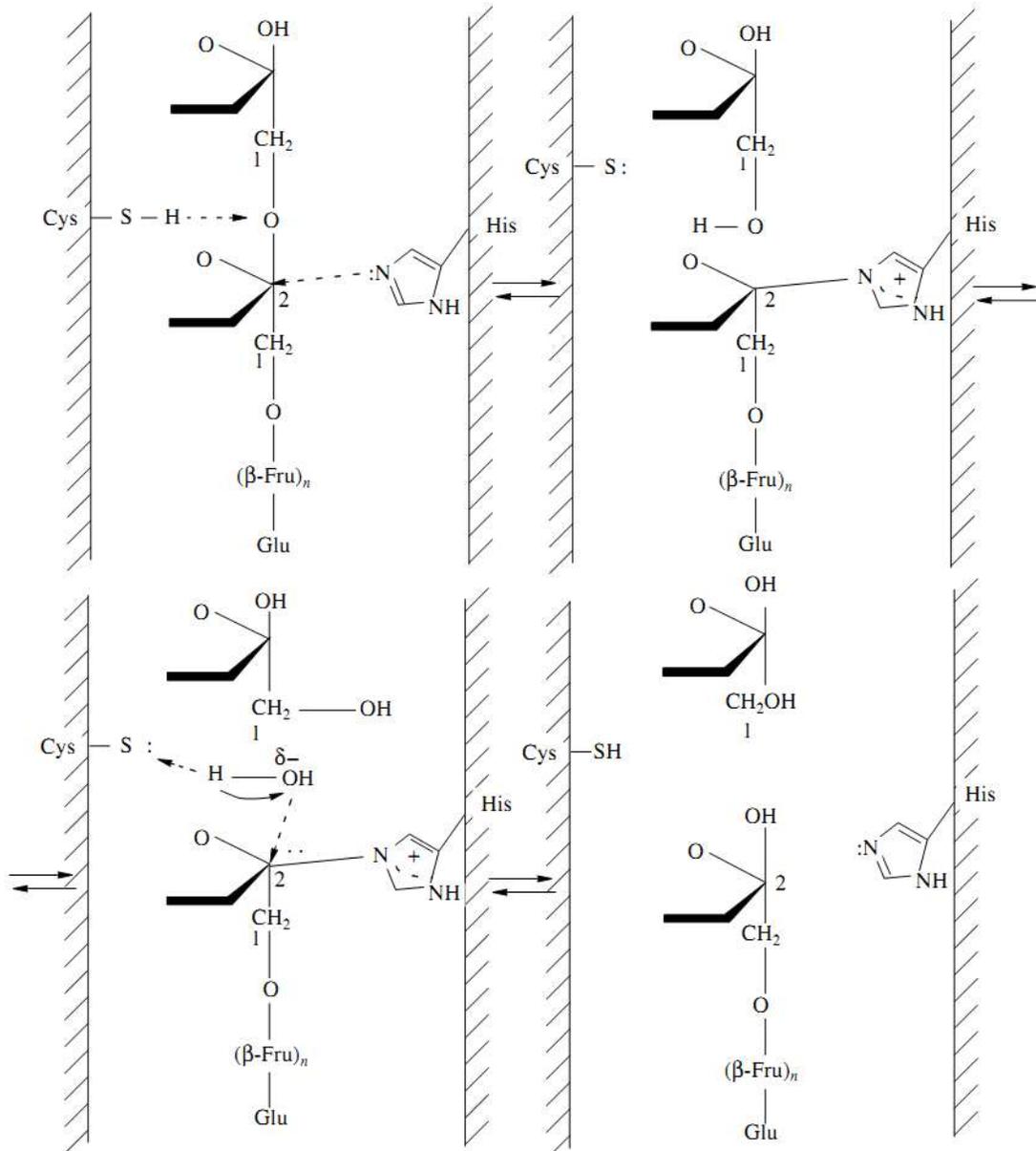


Figura 2.10 Esquema hipotético para el mecanismo de acción de la exoinulinasa de la *B. Polymyxa 722*.
Tomada de (Zherebtsov *et al.*, 2003)

Este mecanismo ha sido propuesto para la acción de una exoinulinasa, pero se asume una acción homóloga para la endoinulinasa al actuar sobre el mismo enlace.

Un punto interesante en el modo de acción de las exoinulinasas ha sido denotado por Snyder y Phaff (1962). Ellos propusieron que dependiendo del pH, la enzima podía exhibir dos modos de acción. Se reportó que a valores pH de 3.0, la enzima atacaba diferentes moléculas de inulina aleatoriamente (baja procesividad), mientras que a valores más altos (5.1-7.0), la enzima atacaba una sola molécula de inulina hasta su degradación total a fructosa y glucosa (alta procesividad).

2.3.4 PROPIEDADES CINÉTICAS

Existe un punto fundamental cuando se trata con las propiedades cinéticas de las inulinasas; el distinto GP de la inulina y su variación misma durante el avance de la reacción no permite una estimación precisa de los parámetros cinéticos y, en general, impide que la cinética sea descrita por una ecuación del tipo Michaelis-Menten (Vandamme y Derycke, 1983). Sin embargo, varios autores como Focher *et al.* (1991) reportaron comportamientos del tipo Michaelis-Menten. Azhari *et al.* (1989) plantearon la necesidad de expresar los parámetros cinéticos de las exo y endoinulinasas en una base distinta. En la Tabla 5, se observan las propiedades cinéticas reportadas de algunas inulinasas.

La concentración de sustrato, en este caso la inulina de origen vegetal, tiene una influencia sobre la rapidez de la hidrólisis debido a muchas razones. Desde un punto de vista cinético, una mayor concentración de sustrato establece una alta rapidez de reacción. Diferentes autores encontraron que la velocidad de reacción se incrementa conforme la concentración de inulina aumenta. No se observó un efecto de inhibición a ninguna concentración, pero a valores de concentración mayores a 12.5% la rapidez ya no cambiaba (Zittan, 1981).

La presencia de inulina, durante el almacenamiento de la enzima, resulta útil, ya que su presencia demostró un efecto estabilizante. Uhm *et al.* (1982) reportaron que el almacenamiento de la inulinasa proveniente de *K. fragilis*, en la presencia de inulina, no

resultó en pérdida de actividad, mientras que en el mismo periodo de tiempo a $T > 10^{\circ}\text{C}$, la enzima sólo retenía 20% de su actividad cuando no había sustrato presente.

La concentración de la inulina presente en una solución acuosa se encuentra limitada por su baja solubilidad. En un proceso industrial existirá la necesidad de utilizar una inulina con bajo GP pero con una mayor solubilidad (Ricca *et al.*, 2007). El GP también afectará la rapidez de la hidrólisis. Vandamme y Derycke (1983) demostraron que la hidrólisis era más rápida con una inulina de chicoria menos procesada con GP igual a 8 comparada con una inulina pura con un GP de 24. Esto puede ser debido a que con un mayor GP hay un menor número de terminales disponibles para que las exoinulinas puedan actuar.

La actividad de las inulinasas también se ve afectada por sustancias inertes presentes en la reacción. En la Tabla 6 se muestran algunos de los inhibidores y activadores reportados para algunas inulinasas. Los iones de Magnesio mostraron ser activadores de la actividad de la inulina de *A. niger* 12 y *Penicillium* sp. estimulando la hidrólisis en 1.33 y 166 veces respectivamente (Nakamura y Nakatsu, 1977). Algunos metales pesados, especialmente el Hg^{2+} , han sido reportados como inhibidores de la inulina, e incluso pueden llegar a hacer indetectable la actividad. Iones metálicos Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} mostraron ser fuertes inhibidores de la inulina de *A. niger* 319 (Chen *et al.*, 1997) .

TABLA 6 INHIBIDORES Y ACTIVADORES DE ALGUNAS INULINASAS MICROBIANAS.

Origen	Inhibidores	Activadores	Referencia
<i>Aspergillus</i>	Mn^{2+} , Fe^{3+}	—	Zittan, 1981
<i>A. ficuum</i>	Hg^{2+} , Ag^{+} , Mn^{2+}	—	Ettalibi and Baratti, 1990; Baratti and Ettalibi, 1987
<i>A. ficuum</i>	Hg^{2+} , Ag^{+} , Mn^{2+} , N-bromosuccinimida	—	Focher <i>et al.</i> , 1991
<i>A. fumigatus</i>	Ag^{+} , Hg^{2+}	Ca^{2+} , Mn^{2+}	Gouda, 2002
<i>Penicillium</i> sp TN-88	Ag^{+} , Hg^{2+} , p-chloromercurilbenzoato	Mn^{2+}	Shitara <i>et al.</i> , 1997
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	NO_2^- , Hg^{2+}	Ba^{2+} , Fe^{3+}	Kaur <i>et al.</i> , 1994
<i>K. sp.</i> Y-85	Hg^{2+} , Ag^{+}	—	Wenling, Huiying and Shiyuan, 1999

Tomada de (Ricca *et al.*, 2007)

2.4 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

Para mejorar los procesos enzimáticos así como la estabilidad de las enzimas, se han realizado, por varios años, investigaciones sobre metodologías que permitan el uso continuo y la recuperación del biocatalizador. En este contexto, 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. Los métodos de inmovilización, de acuerdo a la “International Enzyme Engineering Conference” se agrupan en dos categorías principales: Adhesión y atrapamiento (Sundaram, 1974) y sus subdivisiones se muestran en la Figura 2.11.

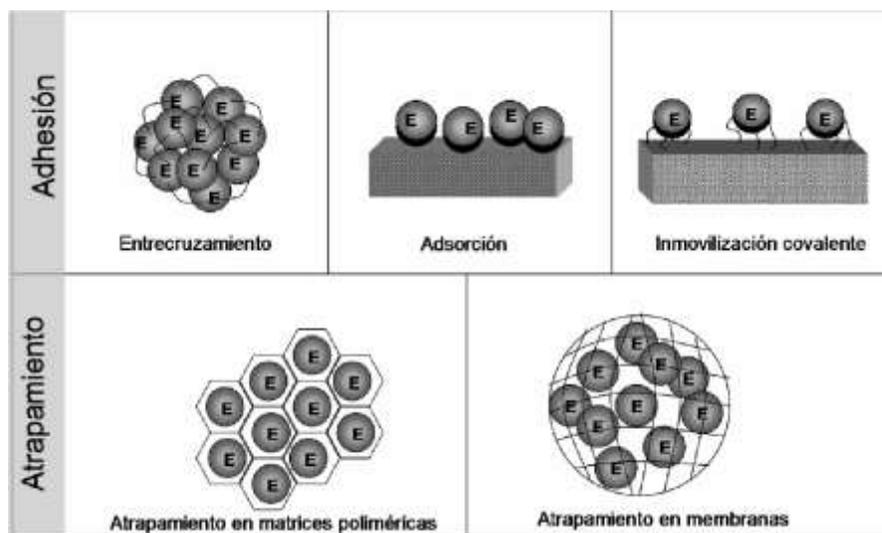


Figura 2.11 Métodos de inmovilización enzimática.

Tomada de Montiel (2008).

El uso de cualquiera de estos métodos para la aplicación de biocatalizadores en reacciones químicas depende de varios factores tales como la naturaleza de la enzima, los reactivos participantes y las condiciones del proceso, así como los efectos del microambiente y los problemas de transferencia de masa resultante de la inmovilización.

La estabilidad y las propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas pueden afectarse directamente debido a cambios conformacionales inducidos por la hidrofobicidad, porosidad, carga superficial u otras propiedades del soporte (Engasser y Horvath, 1976). Indirectamente, la actividad y estabilidad del biocatalizador pueden ser influenciadas por la disponibilidad y densidad de sitios activos, impedimento de los cambios conformacionales de la enzima (Mozhaev *et al.*, 1983), restricciones de la rotación espacial de los sustratos, efectos de partición y limitaciones de transferencia de masa (Riley *et al.*, 1999). 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 reuso.

2.4.1 INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO

La inmovilización por atrapamiento involucra la introducción de la enzima en una matriz o bien encapsularla en membranas semi-permeables tanto orgánicas como inorgánicas. Con ambos métodos, el biocatalizador tiene considerablemente menos contacto con el medio de reacción respecto a la adhesión, pero retiene su flexibilidad y movilidad por el carácter débil de la naturaleza de las fuerzas que intervienen. Una de las desventajas del atrapamiento es la liberación al medio de la enzima durante su aplicación por lixiviación. Este problema puede ser reducido controlando el tamaño de poro de las matrices y membranas. Sin embargo, este tipo de inmovilización presenta problemas de transferencia de materia tanto de sustratos como productos.

2.4.2 ATRAPAMIENTO EN MATRICES

La introducción de enzimas en las cavidades de una red de polímero es un proceso que involucra la polimerización o entrecruzamiento de moléculas precursoras en presencia de una disolución o suspensión de la enzima.

Los polímeros obtenidos por el proceso de calentamiento y subsecuente enfriamiento (gelación térmica) se caracterizan regularmente por una baja estabilidad térmica y mecánica (Nilsson *et al.*, 1987). En este grupo los geles de polivinil alcohol presentan la única excepción, ya que combinan una alta elasticidad con una resistencia a la temperatura hasta 65°C. Este tipo de geles regularmente se obtienen en forma de esferas, mediante un proceso de emulsificación/dispersión en presencia de un aceite como fase discontinua (Metrangolo-Ruiz De Temino *et al.*, 2005).

Las matrices a base de polímeros sintéticos son generalmente superiores a los polímeros naturales en términos de resistencia y estabilidad ambiental.

En este tipo de atrapamiento, la porosidad del soporte, así como sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas, pueden ser fuertemente influenciadas mediante el ajuste deliberado de la composición molecular (Gill y Ballesteros, 2000).

2.4.3 ATRAPAMIENTO EN MEMBRANAS

Este método requiere la formación de cápsulas de membrana en presencia del biocatalizador o bien su inserción en módulos preformados. El primer método produce unidades catalíticas microscópicas que facilitan la transferencia de materia durante la reacción, pero pueden tener efectos negativos sobre la actividad de la enzima encapsulada, mientras que el segundo método proporciona unidades catalíticas relativamente grandes, con gran resistencia mecánica, pero presenta severas restricciones de transferencia de materia y daño a la membrana.

2.4.4 INMOVILIZACIÓN POR ADHESIÓN

La inmovilización por adhesión involucra la formación de agregados macroscópicos por interacción directa entre moléculas de enzima o sobre superficies de soportes orgánicos o inorgánicos. Las ventajas y desventajas de estos dos principios han sido discutidas ampliamente por varios autores (Tischer y Kasche, 1999) (Cao *et al.*, 2003), haciendo énfasis particularmente en la posible pérdida de actividad debido a altas cargas de enzima.

2.4.5 ENTRECruzAMIENTO

Muchas enzimas poseen una tendencia natural a la agregación, particularmente cuando están suspendidas o disueltas en alta concentración (Bunch, 1994). Este es un resultado de las interacciones fisicoquímicas entre sus superficies y ha sido aprovechado en diversas aplicaciones (Harris, 1973). Para propósitos técnicos, la agregación puede ser inducida de manera artificial por disolventes orgánicos, electrolitos, polímeros no iónicos o ácidos (Mandels *et al.*, 1974) y este procedimiento regularmente tiene efectos menores sobre la actividad catalítica, lo cual hace que la agregación sea un proceso promisorio para la inmovilización. Sin embargo, debido a que las interacciones entre las moléculas de enzima son débiles, la estabilidad de la enzima se ve afectada.

La estabilidad de los biocatalizadores agregados respecto al esfuerzo mecánico se puede incrementar mediante la introducción de agentes. Entre muchos posibles agentes químicos entrecruzantes. El glutaraldehído es el más empleado porque reacciona rápidamente y de manera irreversible a pH neutro, o ligeramente básico con los grupos ϵ -amino de la proteína y, regularmente, con los residuos del aminoácido de lisina. Este procedimiento ofrece un incremento en la estabilidad térmica de la enzima, pero ocasiona una disminución de la actividad enzimática, la cual resulta por la fijación de la conformación de la proteína por enlaces inter e intramoleculares (Migneault *et al.*, 2004).

2.4.6 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.

2.4.7 INMOVILIZACIÓN DE INULINASAS

Distintos métodos se han documentado para inmovilizar inulinasas; como matrices en gel, alginato de calcio, agar, gelatina, derivados de celulosa y tubos de Tygon. En la mayoría de los casos fue con el objetivo de producir jarabes ricos en fructosa (Yun *et al.*, 1997). Uno de los primeros trabajos de inmovilización de inulinasa fue desarrollado por Nahm *et al.* (1979), al inmovilizar inulinasa de *K. fragillis* en tubos Tygon por silanización en cloroformo con glutaraldehído al 10%. Después de este trabajo, han seguido muchos bajo la misma línea en otro tipo de soportes. Es posible que las propiedades de la enzima inmovilizada difieran respecto a la libre, referente a la actividad, estabilidad y propiedades cinéticas. Esto se puede deber a la estructura del soporte, así como a sus propiedades físicas o químicas, y al acoplamiento de este con la enzima. En la Tabla 7,

se pueden observar las propiedades reportadas de inulinasas, de diverso origen, inmovilizadas en distintos soportes.

TABLA 7 DATOS DE ACTIVIDAD Y VALORES CINÉTICOS DE INULINASAS MICROBIANAS INMOVILIZADAS EN DISTINTOS SOPORTES

Origen	Soporte	T ópt. (°C)	pH ópt.	Glut. ópt. ¹	Km (mmol/L)	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Derivado de frijol de soya	45	6		0.44	Gupta <i>et al.</i> , 1992
<i>F. oxysporum</i>	Derivado de frijol de mungo	45	6.5		0.25	Gupta <i>et al.</i> , 1992
<i>F. oxysporum</i>	Derivado de clara de huevo de gallina				0.33	Gupta <i>et al.</i> , 1992
<i>F. oxysporum</i>	DEAE-celulosa	37	5.5		0.3	Gupta <i>et al.</i> , 1992
<i>Aspergillus candidus</i>	Celulosa	55	6		1.25	Kochhar, Gupta and Kaur, 1999
<i>A. candidus</i>	Quitina	55	5.5		1.66	Kochhar, Gupta and Kaur, 1999
<i>A. candidus</i>	Caseína	55	6		0.3	Kochhar, Gupta and Kaur, 1999
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	2-aminoethylcelulosa	45	5.5	2%	~0.6	Uhm, Kim and Byun, 1982
<i>K. fragilis</i>	Celulosa	55	5.5			Kaur, 1994
<i>A. ficcum</i>	Quitina	60	4.5	3%	0.36	Rhee and Kim, 1989
<i>A. fumigatus</i>	Quitina	60	5.5		0.5	Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	Caseína	60	5.5		0.4	Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	Arginato de sodio	60	5.5		0.2	Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	Silica	60	5.5		0.33	Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	DEAE-Sephacel (matriz de intercambio aniónico)	60	5.5			Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	QAE-Sephadex A-50 (matriz de intercambio aniónico)	60	6.5			Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	Dowex 1 x2-100 (matriz de intercambio aniónico)	60	5.5			Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. fumigatus</i>	Amberlita IRA-410 (matriz de intercambio aniónico)	60	5.5			Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>A. niger</i> 817	Amino-celulofina	50	5.2			Ogata <i>et al.</i> , 1995
<i>A. niger</i>	Amberlita	50	5.5		~ 22	Rocha <i>et al.</i> , 2006
<i>K. sp</i> Y-85	Poliestireno	55	5	0.03%		Wenling, Huiying and Shiyuan, 1999

Sustrato: Inulina Vegetal. ¹Glut ópt.: Concentración óptima de glutaraldehído.

Tomada de (Ricca *et al.*, 2007)

Algunos autores han reportado sobre ciertas inulinasas inmovilizadas para ser usadas en reactores por lotes (Kochhar *et al.*, 1999), (Rhee y Kim, 1989), (Uhm *et al.*, 1982), mientras que otros han evaluado su desempeño en reactores continuos (Gupta *et al.*, 1992) (Rhee y Kim, 1989) (Wenling *et al.*, 1999) (Nakamura *et al.*, 1995) (Uhm *et al.*, 1982).

2.4.7.1 Inmovilización con alginato de calcio

Los alginatos son polisacáridos aniónicos lineares extraídos de alga café. Contienen proporciones variables de enlaces (1-4) β -D-ácido manurónico (M) y α -L-ácido gulurónico (G) residuos. Los residuos pueden variar ampliamente en composición y secuencia y se encuentran acomodados en un patrón de bloques a lo largo de la cadena. Las regiones homopoliméricas de bloques M y G se encuentran espaciadas con regiones de estructura alternante (bloques MG). La composición y la extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de alginatos.

Una de las propiedades más importantes y útiles de los alginatos es la habilidad de formar geles en la presencia de algunos iones metálicos multivalentes como el calcio. La adición controlada de estos iones técnicamente induce la formación de geles de alginatos insolubles. La afinidad de los alginatos por los iones de calcio y las propiedades de formación de gel, se encuentran estrechamente relacionadas con la fracción total de residuos G, el peso molecular del polímero y la concentración de iones de calcio al tiempo de gelación. Cuando dos residuos G se encuentran adyacentes en el polímero, un sitio de unión se forma para el calcio (Figura 2.12) (Grant *et al.*, 1973). Los hidrogeles de alginato tienen el potencial para ser usados, ya sea para membranas con liberación controlada o sistemas de matrices para fármacos. El alginato de sodio también tiene la capacidad de formar esferas como sistema multiparticulado. La esferonización es una técnica establecida que permite la formación de esferas con ventajas en la regularidad de tamaño y forma y características de superficie suave ideales para membranas. El alginato de sodio ha sido utilizado en la esferonización debido a su abundancia (Sriamornsak *et al.*, 2008).

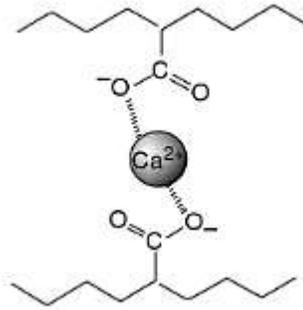


Figura 2.12 Sitio de unión para la formación de alginato de calcio.

Tomada de Prasad y Kadokawa (2009).

2.4.7.2 Inmovilización con co-polímero PVA-PEG

El polivinil-alcohol (PVA) y el polietilenglicol (PEG), ambos son materiales utilizados ampliamente como hidrogeles por sus propiedades. El PEG se caracteriza por su alta biocompatibilidad, mientras que el PVA se distingue por sus buenas propiedades mecánicas (Gibas y H., 2010). El gel de polivinil alcohol es un sistema macroporoso de redes interpenetradas estabilizadas por interacciones físicas. Este se obtiene de un proceso de ciclos de congelado y descongelado (Lozinsky, 1998), en el cual las condiciones para la formación de la estructura y la transición al gel son establecidas mediante la introducción de polietilenglicol. El PVA tiene el beneficio de tener grupos de alcohol suspendidos que proveen sitios de unión para moléculas biológicas, mientras que el PEG tiene menos disponibilidad de grupos funcionales.

La estructura del co-polímero PVA-PEG (Figura 2.13) permite obtener un hidrogel con algunos de los beneficios de ambos. Dependiendo de la proporción de PEG se obtendrá un mayor tiempo de degradación del hidrogel, que representa una gran ventaja sobre el gel homopolimérico de PVA que tiene un tiempo de degradación de tan solo 1 día (Lum y Elisseff, 2003).

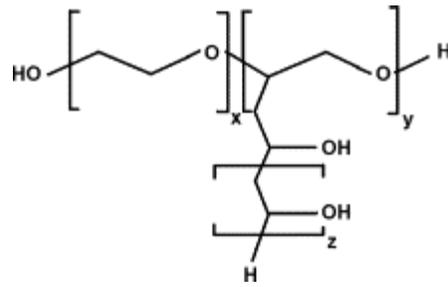


Figura 2.13 Estructura del co-polímero PVA-PEG.

Tomada de (Suhrenbrock *et al.*, 2011)

HIPÓTESIS

Al inmovilizar y determinar las propiedades cinéticas de la mezcla enzimática Novo 960, se obtendrá un biocatalizador que permitiría llevar a cabo la reacción de hidrólisis de la inulina, favoreciendo la actividad de la endo-inulinasa. Esto conllevará a su aplicación y reuso en un sistema continuo.

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar físicamente la enzima inulinasa Novo 960 y determinar sus propiedades catalíticas en la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Inmovilizar la enzima en distintos tipos de soportes
- Determinar el pH óptimo de la reacción de hidrólisis para la enzima inmovilizada.
- Determinación de temperatura óptima de la reacción de hidrólisis para la enzima inmovilizada.
- Determinar las propiedades cinéticas de la enzima inmovilizada.
- Determinar número de reúsos de la enzima inmovilizada.
- Comparar los parámetros cinéticos entre la enzima libre e inmovilizada.
- Evaluar la enzima inmovilizada en un reactor tubular.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

La Enzima Novo 960 (mezcla comercial de endo y exoinulinasas producida por *A. niger*) se obtuvo de la compañía danesa Novozyme.

La inulina de chicoria fue donada amablemente por la empresa danesa Beneo-Orafti.

Todos los compuestos químicos se compraron a través de Sigma-Aldrich con grado analítico y se usaron sin alguna otra purificación.

Para las mediciones espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Lambda 2S.

Para las reacciones por lote, la temperatura y agitación constante se mantuvieron con un controlador de temperatura Heterfig Heto AT110 en conjunto con agitadores magnéticos IKA ETS-d4 fuzzy. En otras ocasiones se usó la agitadora incubadora, New Brunswick Scientific, Innova 4330.

Para las reacciones de ácido dinitrosalicílico (DNS), se usaron controladores de temperatura, IKA RCT basic con IKA ETS-d4 fuzzy.

Para diversas mediciones se usaron:

Pipetas automáticas Finpippete Colour y Gibson Pipetman

pHmetro Beckman Φ 41

Desionizador de Agua, Millipore Simpapak, Simplicity.

Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), HP modelo 1100 acoplado al detector de luz PLC1000; columna Phenomenex Luna 5 u NH₂ 100^a.

5.2 MÉTODOS.

5.2.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Para medir la concentración de proteína en la mezcla comercial Novo 960 se siguió el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La curva patrón se realizó utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

El porcentaje de enzima inmovilizada se determinó por la diferencia entre la concentración determinada de proteína previo a la inmovilización y en los filtrados recolectados posterior a la inmovilización. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Lowry y la curva patrón de BSA usando espectroscopía a una longitud de onda de 750 nm a temperatura ambiente.

5.2.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Para verificar la actividad de la enzima, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de inulina al 5% en reactores batch de 10 ml con 1 mg/ml de enzima. Los productos de la reacción se observaron con el uso de cromatografía de capa fina (TLC), con una fase móvil de Butanol:Etanol:Agua en una proporción 3:2:1 y reveladas con una solución de Orcinol al 1%, H₂SO₄ al 5% y Metanol al 1%.

5.2.3 INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN FÍSICA.

La inmovilización se llevó a cabo en los soportes de silica gel y Lewatit. Se usaron tubos Eppendorf para colocar 1 g de soporte, donde posteriormente se agregó 1 mL de la enzima. La enzima se preparó diluyendo la mezcla comercial Novo 960 al 10% v/v en buffer de acetatos 100 mM pH 5.5. La inmovilización se realizó durante 24 h agitando a velocidad moderada los tubos. El soporte con la enzima inmovilizada se lavó 3 veces con buffer de acetatos 100 mM pH 5.5, para remover la enzima no adsorbida. El soporte con enzima se secó y almacenó en un desecador hasta su uso posterior.

5.2.4 INMOVILIZACIÓN EN ALGINATO DE CALCIO

Para inmovilizar la enzima, se preparó una solución de 10 mL de alginato de sodio al 2% en buffer de acetato 100 mM pH 5.5. La mezcla comercial Novo 960 se diluyó al 10% en el mismo buffer de acetatos y 2 mL de esta solución se agregó a la solución de alginato de sodio. Se utilizó una jeringa dosificadora para gotear la solución sobre una solución de 50 mL de CaCl_2 al 1.5% (p/v). Se permitió la gelificación y formación de esferas de alginato de calcio durante 15 minutos después de gotear. Las esferas eran filtradas y lavadas 3 veces en buffer de acetato 100 mM pH 5.5 y posteriormente almacenadas en 6 mL de este mismo a 4°C hasta su uso.

5.2.5 INMOVILIZACIÓN EN CO-POLÍMERO PVA-PEG

Se prepararon 10 mL de una solución al 15% (p/v) PVA (PM: 30,000-60,000) y 15% (p/v) PEG (PM: 9,000-10,000) en agua a 90°C. Una vez que se obtenía una solución homogénea, se enfriaba a 40°C. A esta temperatura se agregó cuidadosamente 1 mL de NaOH 7M evitando aglomeraciones de gel. Se dejó agitando 30 minutos y se ajustó el pH a 5.5 con HCl 13M. A esta solución se le agregaron 2 mL de la mezcla comercial Novo 960 diluida previamente al 10% en buffer de acetatos 100 mM pH 5.5. La mezcla se goteó en aceite de silicón a -20°C y se permitió la formación de esferas durante 12 h a 4°C. Las esferas se filtraron y lavaron 1 vez con hexano y 2 veces en buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

5.2.6 HIDRÓLISIS DE LA INULINA.

Las reacciones, si no se especifica lo contrario, se realizaron en reactores batch a Temperatura, pH y agitación constante, con un volumen de 5 mL de buffer de acetato 100 mM pH 5.5 con inulina al 0.5% (p/v). Para cada reacción, el peso o volumen de enzima inmovilizada o libre usada, era registrado.

5.2.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores fueron medidos utilizando el método DNS (Bernfeld *et al.*, 1955). En tubos de ensayo se agregaron 100 μL de muestra, 200 μL de buffer de acetato 100 mM pH 5.5 buffer de acetatos y 600 μL de reactivo DNS. Se calentaron en agua hirviendo por 5 minutos y se enfriaron con hielo. Finalmente, se agregaron 4 mL de agua y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Para medir los azúcares reductores producidos en la reacción, se realizó una curva patrón con inulina.

5.2.8 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y PH ÓPTIMOS

El efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la enzima se estudió monitoreando la actividad de la enzima libre y la inmovilizada. En el caso de la temperatura se incubaron reacciones en un intervalo de 30°C a 70°C. En el caso del pH, una vez determinada la temperatura óptima en cada forma de la enzima, se incubaron reacciones a esta T óptima con un pH en un intervalo de 4 a 7 en buffer de acetatos, sin la necesidad de tener que usar otro tipo de buffer. Las muestras de la reacción se tomaron a diferentes intervalos de tiempo y puestas a congelar previniendo la propagación de la reacción. Posteriormente se midió la actividad.

5.2.9 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES CINÉTICAS

Las constantes de Michaelis-Menten para la enzima libre y la enzima inmovilizada se determinaron monitoreando la cantidad de azúcares reductores liberada en la reacción de hidrólisis de inulina modificando la concentración de sustrato en un intervalo de 0.1% (p/v) a 1% (p/v) en las condiciones óptimas determinadas. Los valores de K_m y V_{max} se determinaron a partir de las velocidades iniciales por regresión lineal aplicando la relación Lineweaver-Burk.

5.2.10 TERMOESTABILIDAD

Se determinó la estabilidad de la enzima libre e inmovilizada en función de la temperatura midiendo su actividad a distintos tiempos (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h). Las distintas formas de enzima se pusieron a las condiciones óptimas de temperatura y pH sin la presencia de inulina. Se conservaron a estas condiciones hasta que posteriormente se realizó la hidrólisis en los tiempos determinados. Para cada tiempo se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para la posterior medición de azúcares reductores producidos. A partir de su actividad se determinó su tiempo de vida media.

5.2.11 CICLOS DE REÚSO

El número de ciclos de reúsos de la enzima inmovilizada, fue determinado para los soportes de PVA-PEG y Alginato de calcio. Para cada ciclo se llevó a cabo la reacción hidrólisis por 30 min a 50°C. Entre cada ciclo, la enzima se filtró, se lavó y se realizó nuevamente la reacción por 30 min. En cada reacción se colectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para medir la actividad enzimática.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A partir de trabajos anteriores realizados por colaboradores en el laboratorio, se conoce que la inulina de chicoria usada en los experimentos tiene un GP promedio de 18 unidades y que la mezcla comercial de enzima puede contener endoinulinasa con un peso molecular de 78 kDa, exoinulinasa de 68.1 kDa y posiblemente invertasa de 250 kDa. (Iglesias Martínez, 2011)

6.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Inicialmente, se determinó la cantidad de proteína contenida en la mezcla comercial de inulinasa a través del método de Lowry; utilizando BSA con una concentración conocida para obtener una curva patrón (Figura 6.1), y así tener un estimado de la proteína reaccionante por volumen de mezcla. Se obtuvo un valor de 1.01 μ g/ml. No se puede establecer este valor estrictamente como la cantidad de inulinasa en la mezcla, ya que no se conoce con exactitud la composición de la mezcla comercial, pero se tratará de esta forma para facilitar el manejo de los resultados.

Una vez desarrollado los métodos de inmovilización, se obtuvieron los valores de proteína adsorbida en los soportes de silica gel y Lewatit, así como el desprendimiento de la misma en lavados posteriores. En el caso del silica gel, se observó una adsorción promedio de 43.7% de 5 ensayos, mientras que en Lewatit fue de 50.6% en el mismo número de ensayos. En la Tabla 8, se puede observar un compendio de resultados obtenido para los distintos inmovilizados incluyendo cantidad de enzima cargada, cantidad de enzima inmovilizada y otras propiedades.

TABLA 8 RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA

Tipo de inmovilización	Volumen de mezcla enzimática al 10% (v/v) (mL)	Masa Soporte (mg)	Volumen Soporte (mL)	Proteína determinada (μg Enzima)	Proteína inmovilizada (μg)	Densidad promedio de esfera (mg/cm^3)	Concentración de enzima aparente
Enzima libre	0.05	-	-	50.4	-	-	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Lewatit	1	200	-	1007.8	509.9	-	2.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ soporte
Silica gel	1	200	-	1007.8	440	-	2.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ soporte
Alginato de calcio	4	-	24	4031.4	4031.4	837.6	0.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ esfera
PVA-PEG	4	-	26	4031.4	4031.4	1227.9	0.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ esfera

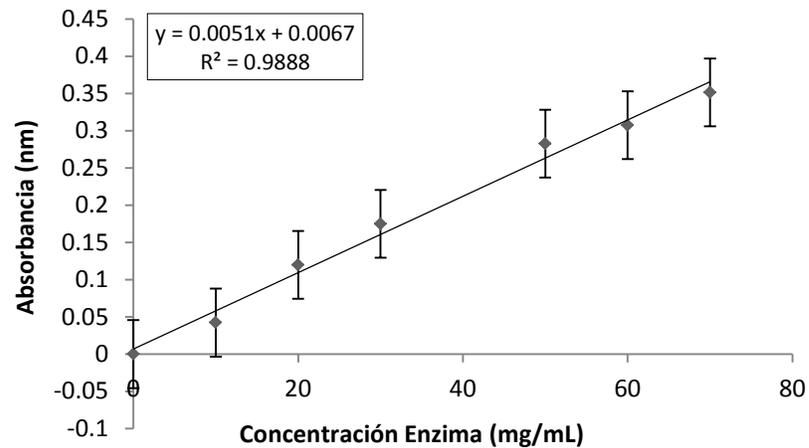


Figura 6.1 Curva patrón por método de Lowry.

6.2 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

Se inmovilizó la enzima por métodos físicos en cuatro distintos soportes; por adsorción en Lewatit y silica gel y por atrapamiento en alginato de calcio y co-polímero PVA-PEG. Cada tipo de inmovilización presentó distintas características y actividad enzimática.

En la Figura 6.2, se muestran las estructuras superficiales de los inmovilizados. En el caso del alginato de calcio se trata de esferas semitransparentes con superficie lisa, de tamaño uniforme en el lote producido y con una resistencia a la deformación moderada. El co-polímero PVA-PEG forma esferas blancas con superficie lisa en casi todo el lote, pero presentando concavidades o deformaciones en contados ejemplares y con una resistencia menor a la deformación que la de alginato. Se observó que esta resistencia a la deformación puede ser modificada variando el peso molecular de PVA o PEG, así como la composición en la preparación de la mezcla.

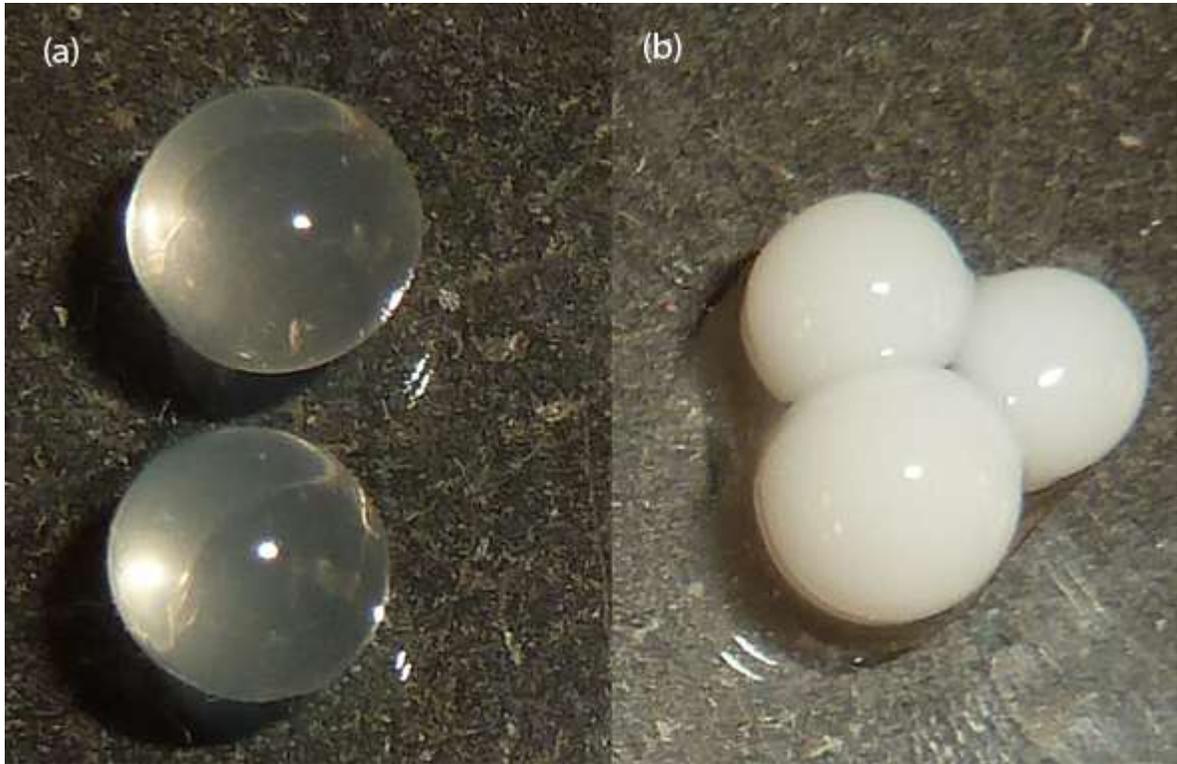


Figura 6.2 Retrato de inmobilizados. (a) Esferas de alginato de calcio
(b) Esfera de co-polímero PVA/PEG

De acuerdo a las imágenes de microscopía de barrido electrónico, la estructura del gel de PVA presenta una heterogeneidad pronunciada, reflejada en la presencia de microporos y macroporos, con diferente geometría, formados durante el proceso de congelamiento (Figura 6.3a), contrastando con la superficie de alginato de calcio (Figura 6.4d), la cual tiene una menor presencia de macroporos. También se muestra el barrido electrónico para silica gel (Figura 6.3b) y Lewatit (Figura 6.4c), para tener una referencia de sus estructura y como estas no presenta porosidad, al menos no en la micrografía de barrido electrónico.

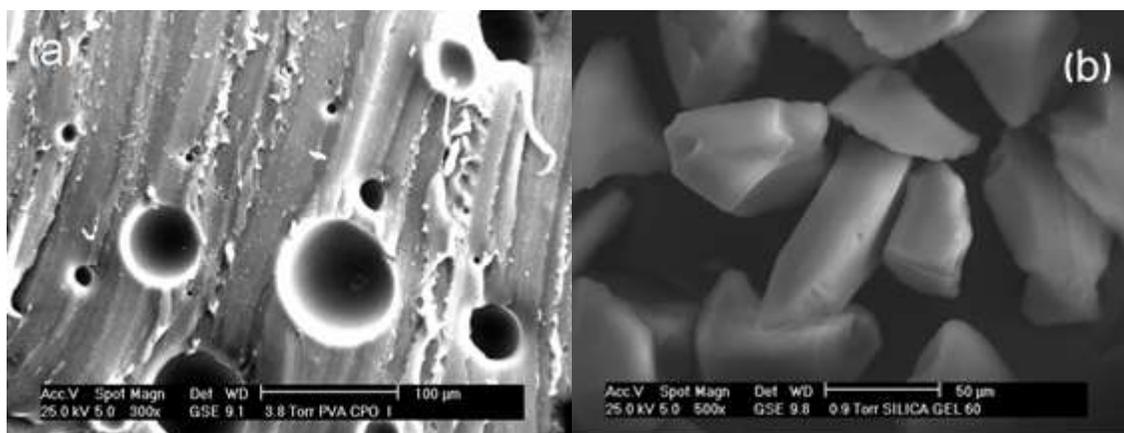


Figura 6.3 Barrido electrónico para (a) PVA-PEG (b) silica gel.

Tomada de Montiel (2008).

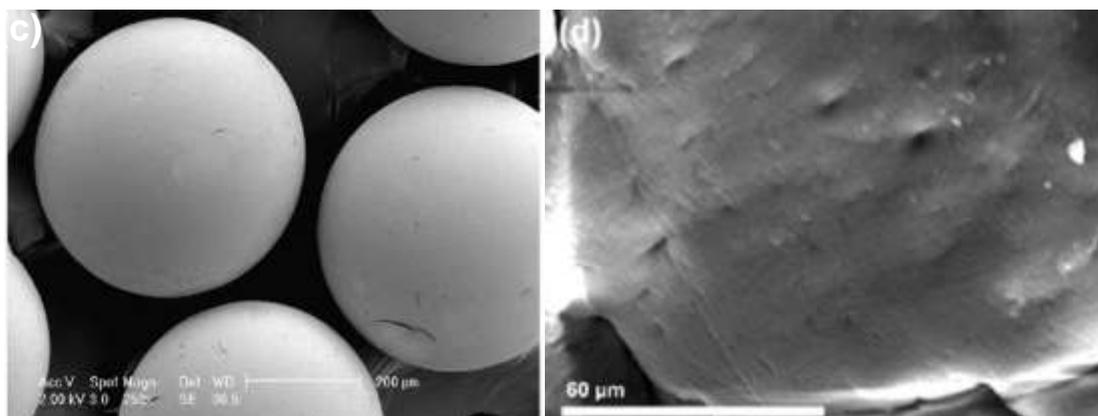


Figura 6.4 Barrido electrónico para (c) Lewatit y (d) Alginato de calcio.

Tomada de Dizge *et al.* (2009) y Pasparakis y Bouropoulos (2006)

6.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Con la finalidad de comparar la actividad de los diferentes inmobilizados con la enzima libre, se realizaron pruebas de actividad enzimática. La aparición de los productos de hidrólisis se observó usando cromatografía de capa fina (TLC). Las pruebas de la enzima inmobilizada en alginato de calcio y en PVA-PEG aparentemente mostraron mayor transformación de inulina comparándola con la inmobilizada por adsorción en silica gel y Lewatit, aunque menor que la enzima libre. En la Figura 6.5, se observan las distintas placas reveladas para comparar cualitativamente la actividad a diferentes tiempos de reacción.

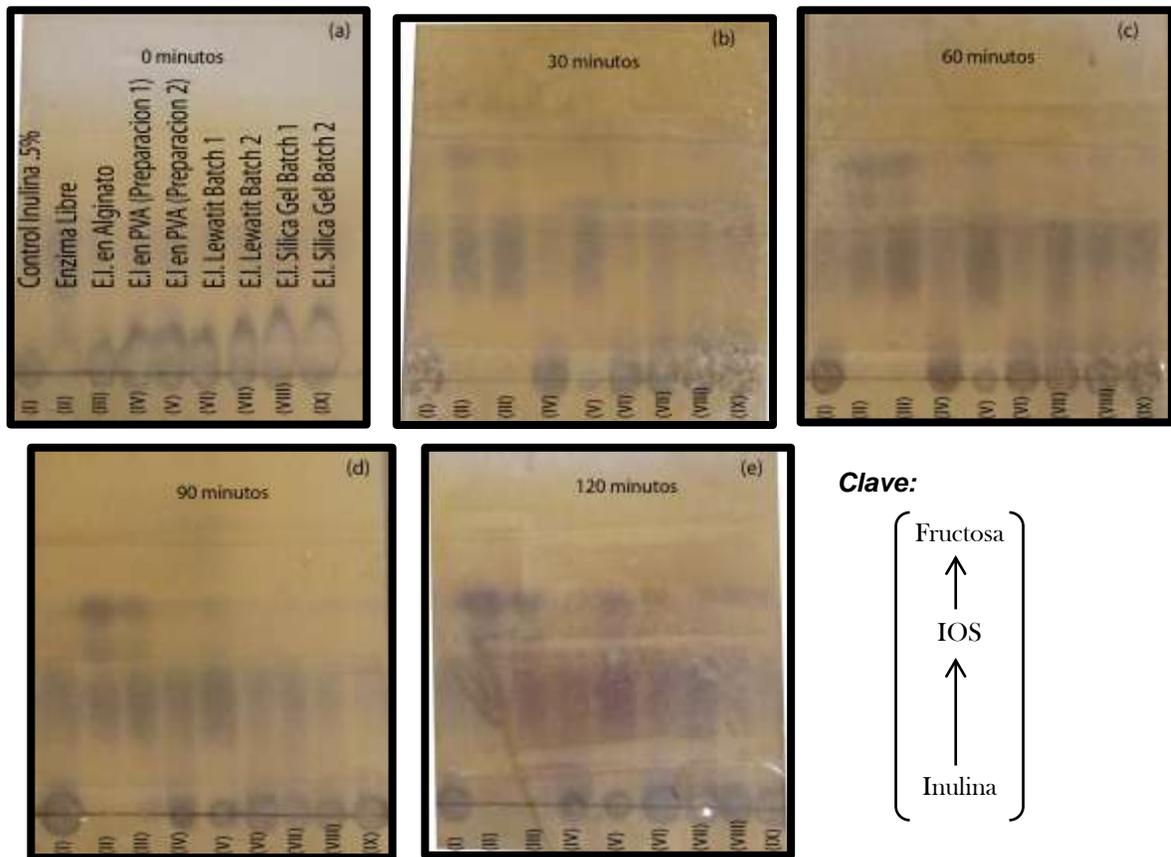


Figura 6.5 TLC para la determinación cualitativa de carbohidratos después de la reacción de hidrólisis enzimática de inulina de los distintos soportes a (a) 0 min (b) 30 min (c) 60 min (d) 90 min (e) 120 min. En todas las cromatoplas se colocaron las muestras en el orden que se encuentran en la primera: I) Control de inulina al 5%. II) Reacción con enzima libre. III) Reacción con enzima inmobilizada en alginato de calcio. IV) Reacción con enzima inmobilizada en PVA (Preparación 1). V) Reacción con enzima inmobilizada en PVA (Preparación 2). VI) Reacción con enzima inmobilizada en Lewatit (Batch 1). VII) Reacción con enzima inmobilizada en Lewatit (Batch 2). VIII) Reacción con enzima inmobilizada en silica gel (Batch 1). IX) Reacción con enzima inmobilizada en silica gel (Batch 2).

Las reacciones se realizaron en reactores batch a una temperatura de 50°C y pH de 5.5.

En las distintas cromatoplacas se puede observar que la actividad varía ampliamente entre los distintos soportes. Para estas reacciones se utilizaron 2 preparaciones de PVA-PEG con distinto porcentaje de polímero, la preparación 1 fue hecha con 10% de PVA-PEG mientras que la preparación 2 fue hecha con 15% de PVA-PEG. Como se puede observar en los resultados, esto afectó la actividad ya que la preparación 2 mostró una mayor actividad. Esto puede ser debido a que la estructura que se formó con la preparación 1 pudo haber liberado la enzima durante el lavado al tener un entrecruzamiento más amplio y por lo tanto un tamaño de poro de mayor tamaño. De cualquier forma, se observó que la preparación 2, así como la enzima inmovilizada en alginato de calcio, mostraron actividad para formar IOS, pero mostraron menor producción al compararlas con la enzima libre. Esta notable diferencia probablemente se debe a la obstrucción del sitio libre en el inmovilizado.

Además de estas preparaciones, se utilizaron distintos lotes de la enzima inmovilizada por adsorción en silica gel y Lewatit. Estos lotes de ambos soportes se dividieron en 2 grupos, dependiendo de la enzima adsorbida en cada soporte; en el primer grupo, denominado Batch 1, se colocaron los lotes con una mayor cantidad de enzima adsorbida; las de menor cantidad enzima absorbida se colocaron en el segundo grupo, denominado Batch 2. Independientemente del grupo utilizado, la enzima inmovilizada en estos soportes mostró una productividad casi nula.

Debido a que la enzima inmovilizada en los soportes de silica gel y Lewatit no mostró un rendimiento deseable, se decidió no continuar las pruebas en esta forma de inmovilización y continuar con el inmovilizado realizado en alginato de calcio y PVA-PEG. La poca efectividad en la inmovilización por adsorción puede ser debido al elevado peso molecular de la enzima, restringiendo su estabilidad en el soporte o a su adsorción en una posición que no beneficiara la unión con el sustrato.

De igual manera, a partir de este punto, se optó por utilizar como sustrato exclusivamente a la inulina de chicoria, ya que al utilizar inulina de agave, la enzima no mostró actividad notable (Figura 6.6). Esto se le adjudica al hecho que la inulina de agave, como muestra la Figura 2.2, presenta un amplio número de ramificaciones, además de poseer un alto peso molecular, haciéndola una molécula que muestra poca facilidad para interactuar con el sitio activo de la enzima al estar inmovilizada. Un

desafortunado tropiezo ya que la inulina de agave podría ser un sustrato para la producción de IOS con un alto valor agregado, partiendo del hecho de que en México, los desechos en la producción de tequila, como las hojas de agave y el bagazo, son ricos en inulina.

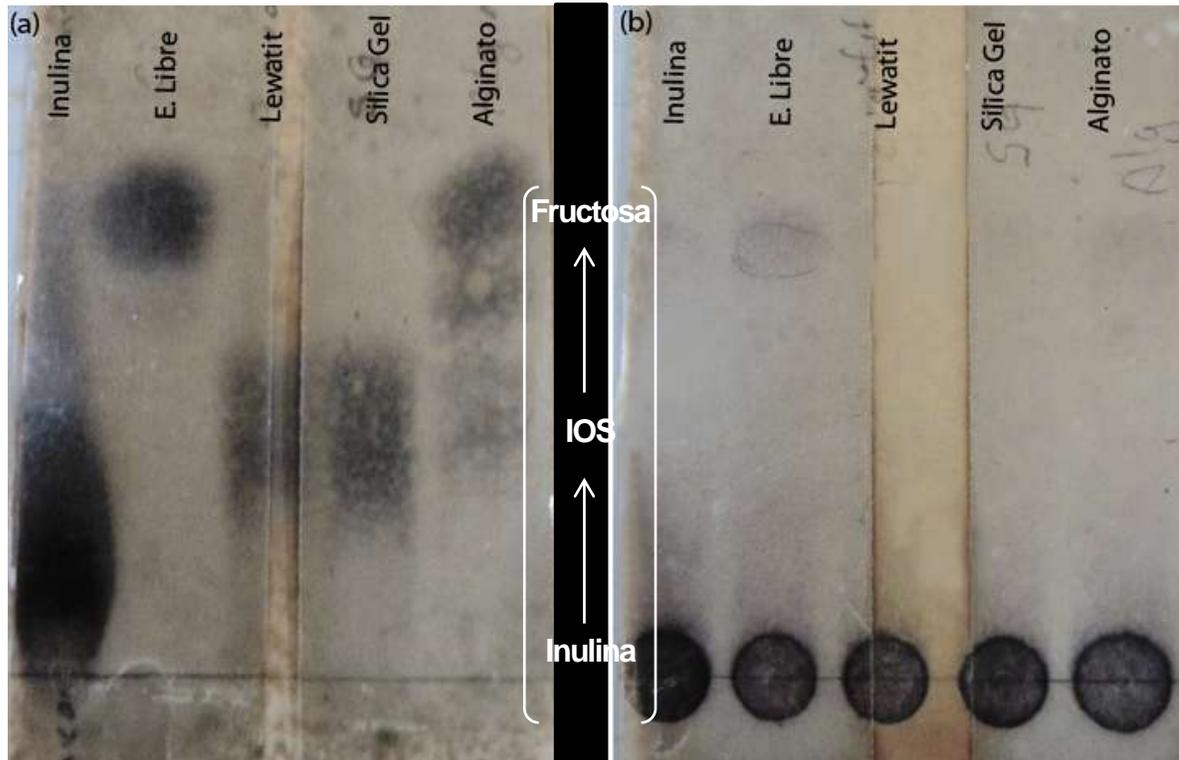


Figura 6.6 TLC para la determinación cualitativa de carbohidratos después de la reacción de hidrólisis enzimática de inulina de (a) chicoria (b) agave.

Las reacciones se realizaron en reactores batch por 30 min a una temperatura de 50°C y pH de 5.5.

6.4 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y PH ÓPTIMOS

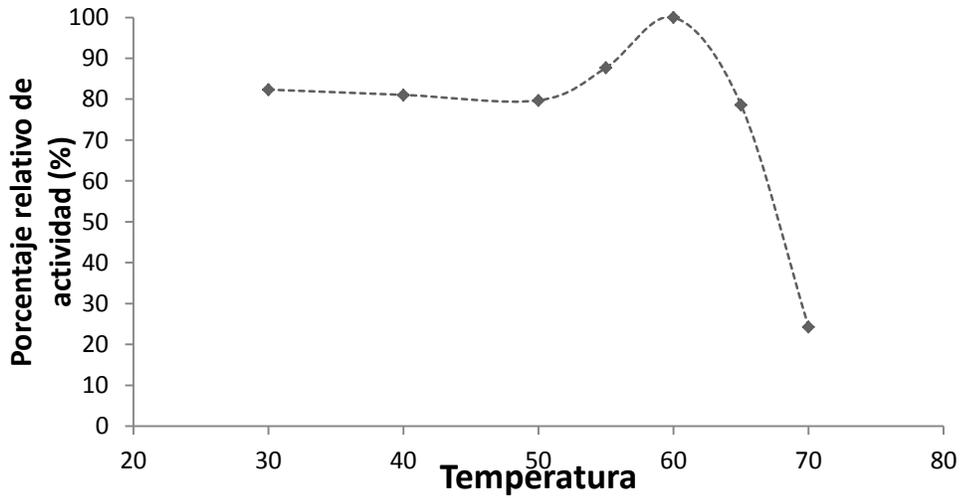
Una vez seleccionados los soportes para la inmovilización, se llevaron a cabo las pruebas para determinar sus condiciones óptimas de acuerdo a su actividad. La actividad de la enzima fue medida cuantificando la producción de azúcares reductores en la reacción durante un tiempo determinado, y fue definida como U [mg azúcares reductores producidos \cdot min⁻¹].

6.4.1 TEMPERATURA ÓPTIMA

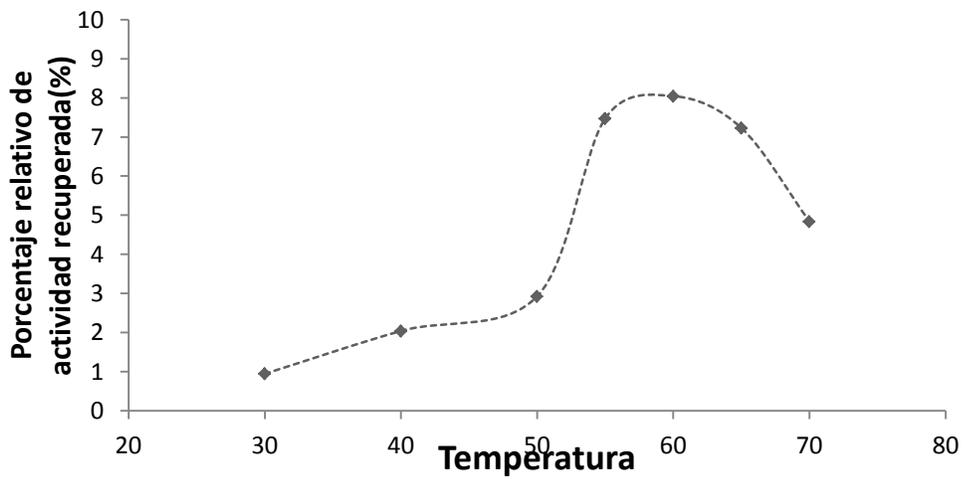
En la Figura 6.7, se muestra una gráfica comparativa de la actividad enzimática entre la enzima libre e inmovilizada en los distintos soportes con respecto a la temperatura. En el caso de la enzima libre, se obtuvo una temperatura óptima de 60°C para la hidrólisis de la inulina de chicoria. Este óptimo de temperatura en la enzima libre ha sido observado en trabajos publicados por Chen, et al (1997) y Ji y Zhao (1998) . A partir del comportamiento observado en la actividad de la enzima libre con respecto a la temperatura, se puede establecer una posible desnaturalización de la enzima a temperaturas mayores a 70°C, donde la actividad es de alrededor del 20% con respecto a la T óptima. Al comparar la actividad en cada forma de la enzima, se puede observar que la inmovilización afecta la actividad enzimática, lo cual será discutido más adelante (p70).

La gráfica de termoactividad de la enzima inmovilizada en alginato de calcio puede ser observado con detalle en la Figura 6.7(c). Al igual que en la enzima libre, se observó una actividad máxima a temperatura de 60°C. En el caso de la temperatura óptima reportada por Catana, *et al.* (2005), para la inmovilización en alginato de calcio, fue de 55°C, pero este punto se encontraba muy cercano a su actividad reportada en 60°C.

(a)



(b)



(c)

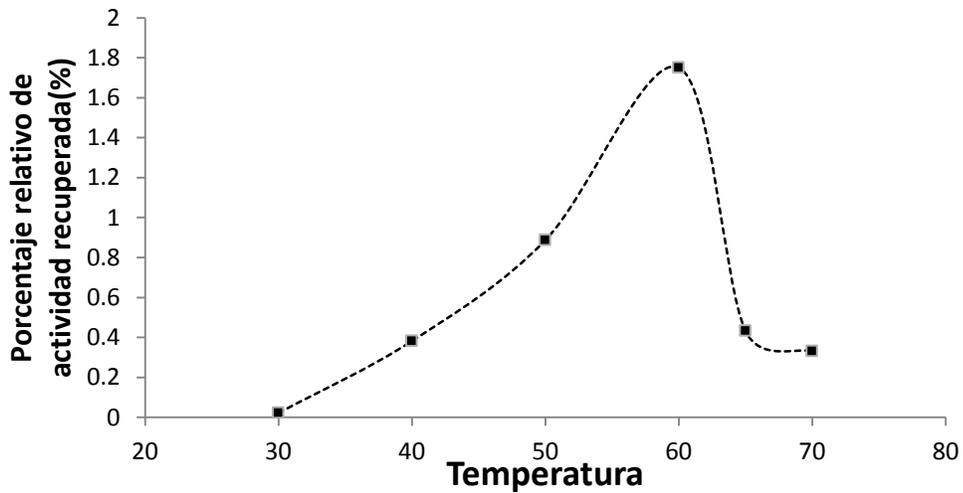


Figura 6.7 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la inulinasa.
 (a) Enzima Libre. 100%: 166 U/mg (b) Enzima inmovilizada en PVA/PEG y (c) Enzima inmovilizada en alginato de calcio.

Las reacciones se realizaron a pH de 5.5 y a una concentración 0.5% de inulina.

En el caso de la inmovilización en PVA-PEG, su estabilidad estructural determino su óptimo a 50°C, ya que a mayores temperaturas se desintegraba el soporte. Se asume la poca estabilidad del soporte debido al contenido de PVA o PEG utilizado en la preparación y posiblemente a las interacciones iónicas entre el buffer y el aglomerado. Para aumentar su estabilidad sería necesario utilizar una preparación con un mayor porcentaje de PVA y PEG en la mezcla de preparación, así como disminuir las interacciones iónicas agregando buffer al momento de la preparación. La Figura 6.7(b) muestra con claridad el comportamiento de la enzima inmovilizada en PVA-PEG, donde se observa un notable cambio de actividad de los 50°C, cuando el soporte se encontraba íntegro en forma, a los 55°C, cuando éste ya había perdido su cualidad de soporte y la enzima había sido liberada. La inestabilidad del hidrogel de PVA-PEG también fue expuesta en el trabajo de Fernandes *et al.* (2008).

6.4.2 PH ÓPTIMO

En la Figura 6.8, se puede observar el comportamiento de la actividad enzimática de la enzima libre e inmovilizada con respecto a distintos pH. Estos resultados coinciden con trabajos como Nakamura *et al.* (1978), en el caso de la enzima libre, mientras que la inmovilización en alginato de calcio y PVA-PEG, al ser comparada con el trabajo desarrollado por Catana *et al.* (2005) y Fernandes *et al.* (2008), muestra una diferencia clara, ya que se reporta un óptimo a pH de 4 y 4.5 respectivamente; este cambio se puede atribuir posiblemente al método de inmovilización, así como el tipo de mezcla comercial utilizada, en ambos casos, Fructozyme L de Novozime.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de reacción, los experimentos siguientes, se llevaron a cabo a estas condiciones.

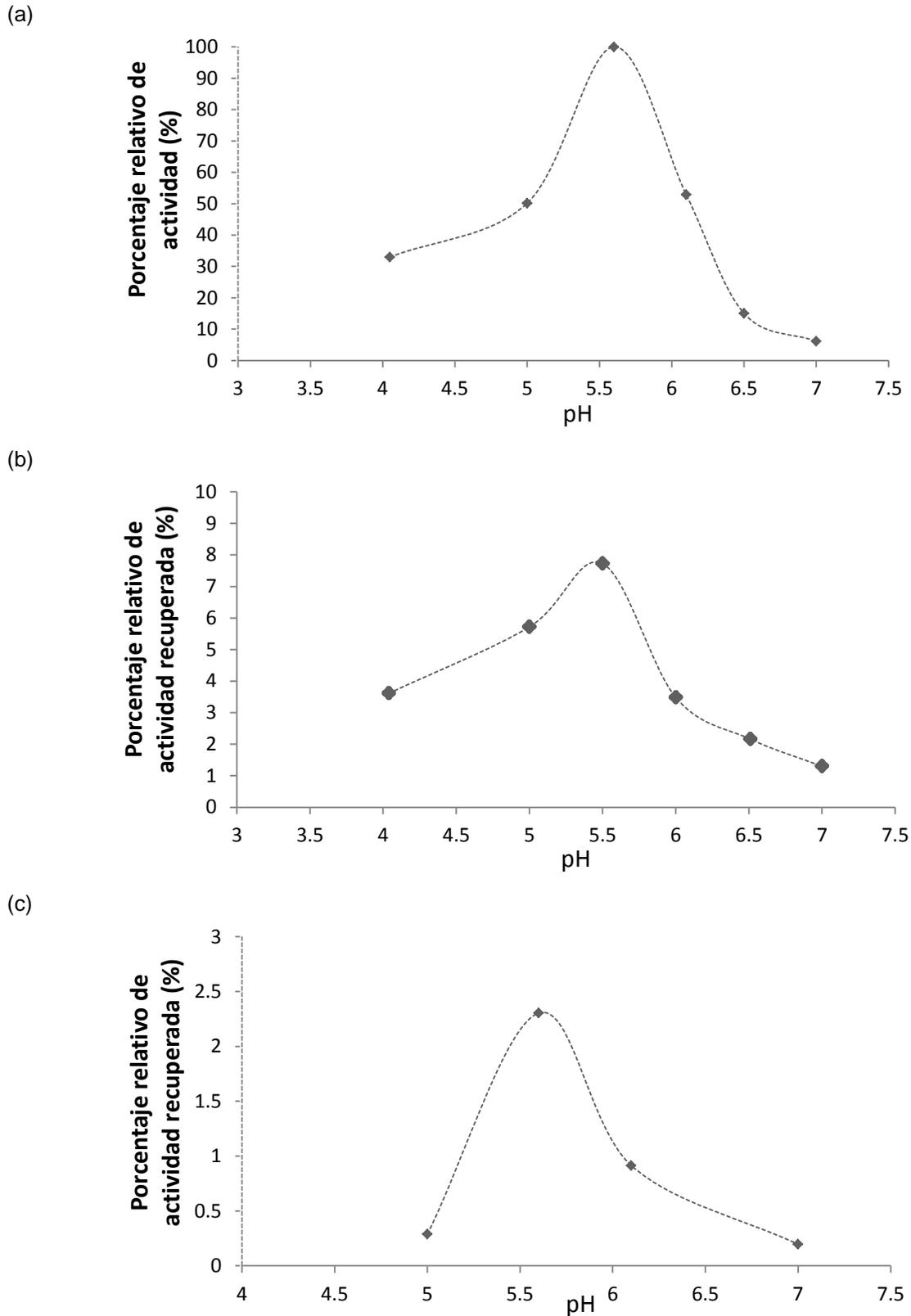


Figura 6.8 Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa.

Se muestra la actividad medida para la (a) Enzima Libre. 100%: 120 U/mg (b) Enzima inmovilizada en PVA/PEG y (c) Enzima inmovilizada en alginato de calcio. Las reacciones se realizaron a una temperatura óptima de (a) 60°C (b) 50°C (c) 60°C y a una concentración de 0.5% de inulina.

6.5 ANÁLISIS COMPOSICIONAL

Para conocer los productos que se obtuvieron en las reacciones, así como la conversión que se tenía de inulina a IOS, se realizó una prueba de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 6.9 y Figura 6.10. Los resultados mostraron que a las condiciones óptimas resultantes de reacción, la enzima libre convierte, en menos de 2 minutos, al 100% de la inulina, principalmente en fructosa (38.57%), glucosa (29.38%) y distintos IOS (32.05%). Lo cual permite corroborar los altos niveles de actividad de la enzima en su forma libre. En el caso de la reacción con alginato de calcio se observó una conversión del 69.29% de inulina y con una transformación conformada exclusivamente de distintos IOS y conformando alrededor de 73.03% de la mezcla final. Esto indica claramente la supresión de la actividad de la inulinasa tipo exo por lo que podría explicar la gran pérdida de actividad que se tiene en la forma inmovilizada, además se puede establecer a este tipo de enzima como la principal promotora de actividad en la enzima libre. La pérdida de actividad en la inulinasa tipo exo, entre muchas posibles causas, se puede deber a la incompatibilidad del sitio activo con el acomodamiento de la enzima en su forma inmovilizada.

Este análisis permite posicionar a la enzima inmovilizada como una importante fuente exclusiva de IOS con una buena conversión de inulina. Es importante mencionar que no se llevó a cabo este análisis en las reacciones de PVA-PEG para evitar una posible obstrucción en la columna ocasionada por alguna traza de este polímero.

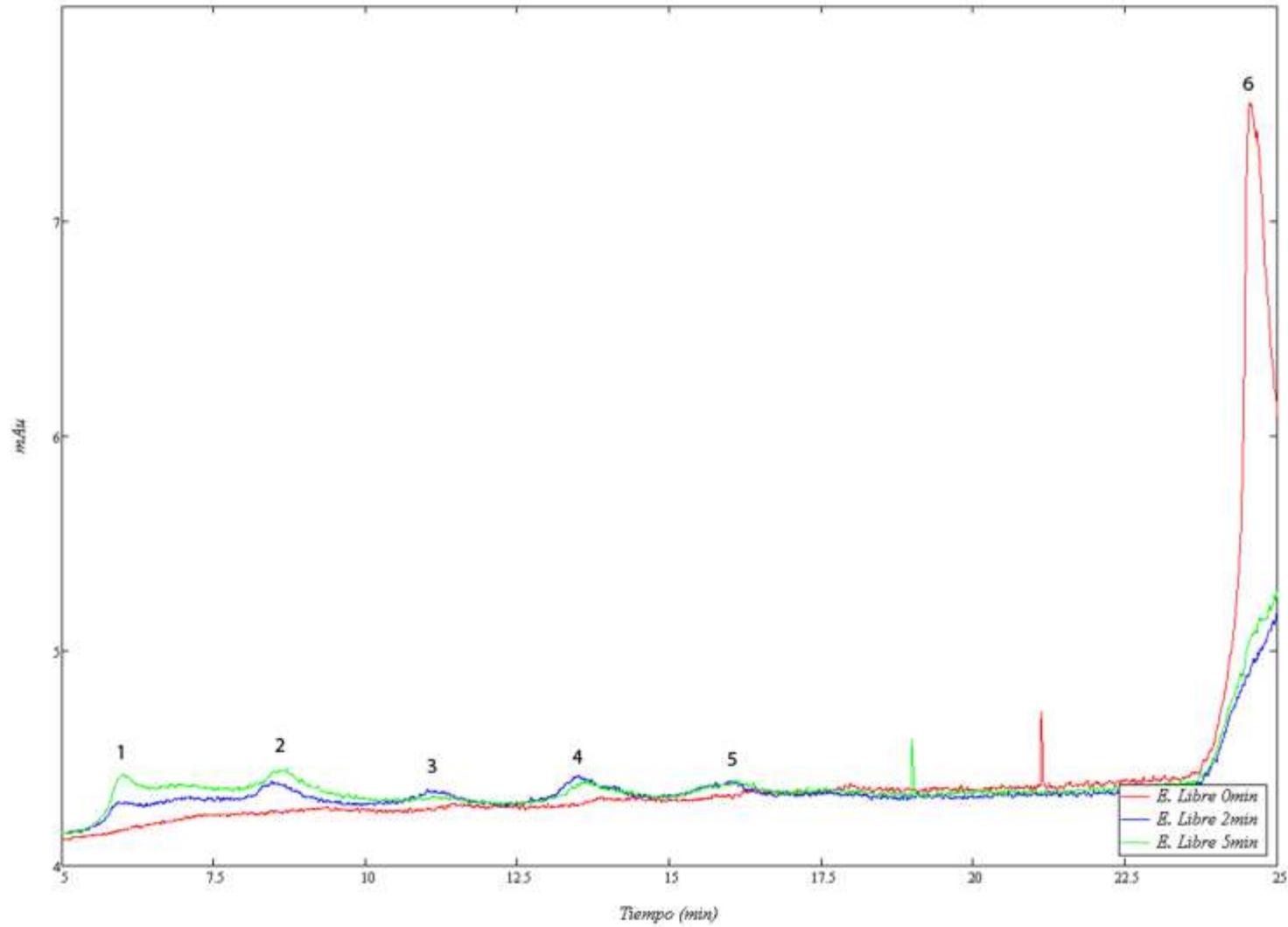


Figura 6.9 Cromatograma de los productos de la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria con inulinasa libre. Se muestran los picos para 1. Fructosa 2. Glucosa 3. Sacarosa 4. Kestosa, Inulotriosa 5. Nistosa, Inulotetraosa 6. Inulina de chicoria. Método $\alpha\zeta$ $\lambda\alpha\rho\epsilon\sigma$, gradiente de agua acetonitrilo 20:80. Columna Phenomenex aminada y detector de dispersión de luz, evaporador 80°C y nebulizador 60°C.

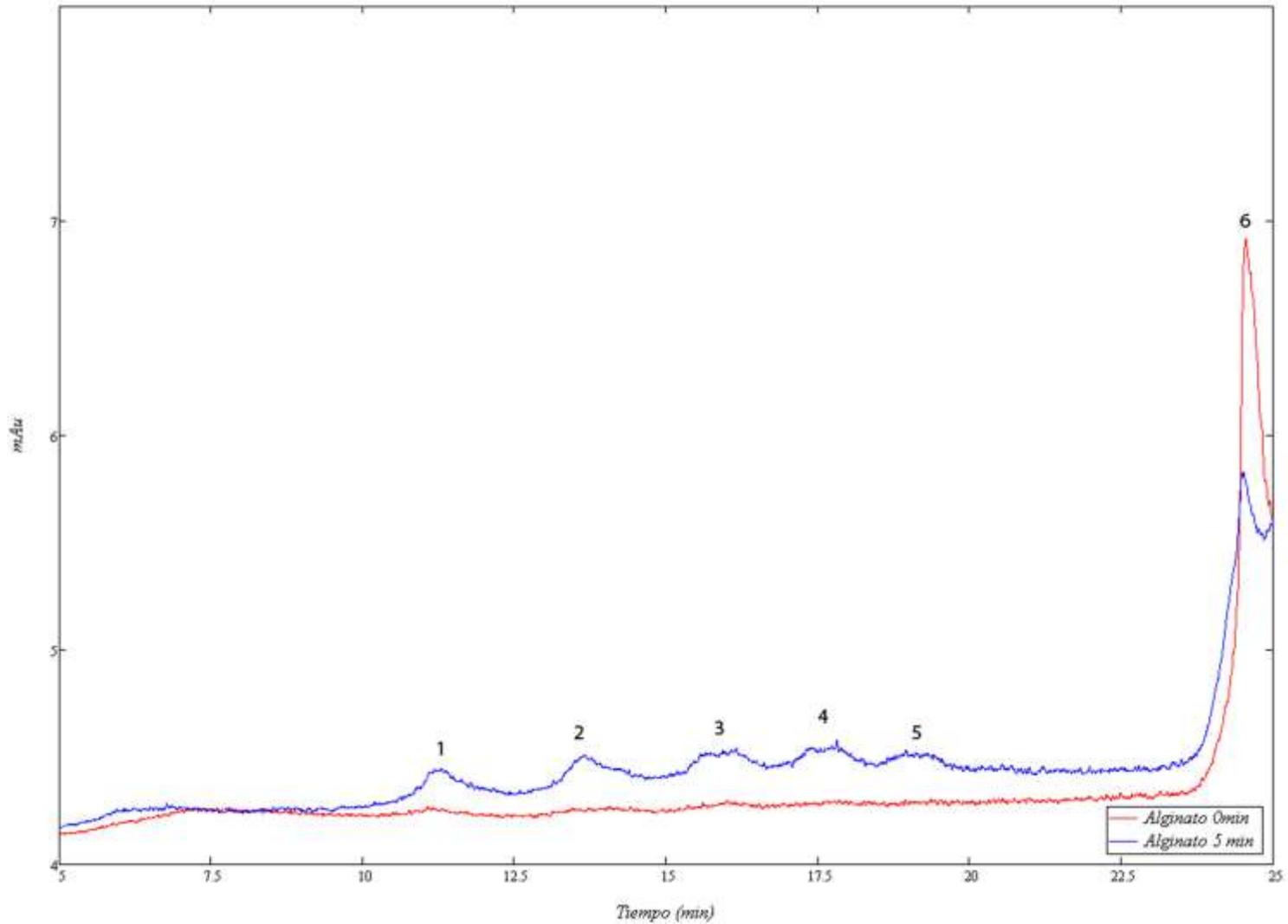


Figura 6.10 Cromatograma de los productos la reacción de hidrólisis de inulina de chicoria con inulinasa inmovilizada en alginato de calcio. Se muestran los picos para 1. Sacarosa 2. Kestosa, Inulotriosa 3. Nistosa, Inulotetraosa 4. Fructofuranosilnistora, Inulopentosa 5. Inulohexosa 6. Inulina de chicoria. Método $\alpha\zeta$ $\chi\alpha\rho\epsilon\sigma$, gradiente de agua acetonitrilo 20:80. Columna Phenomenex aminada y detector de dispersión de luz, evaporador 80°C y nebulizador 60°C.

6.6 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES CINÉTICAS

En la Tabla 9, se muestran los parámetros cinéticos determinados para la enzima libre y los inmovilizados. Se asumió un comportamiento Mikaelis-Menten para obtener las propiedades, bajo la premisa que la concentración de sustrato con la que se trabaja es mucho mayor que la concentración de la enzima, aunque es necesario reconocer que no todas las condiciones se cumplen cabalmente, ya que no existe un sustrato único, sino una serie de sustratos y no existe una sola enzima, sino una mezcla. El comportamiento experimental y el ajuste a la ecuación de Lineweaver-Burk se ilustran en la Figura 6.11 y Figura 6.12 respectivamente. Los resultados obtenidos muestran un K_m y una V_{max} aparente ya que, es necesario mencionar nuevamente, no se cuenta con una enzima pura, sino con una mezcla comercial de composición no conocida. Independientemente, se puede observar una disminución en la eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada con respecto a la libre, lo cual se atribuye a una disminución en el coeficiente de difusión debido al tamaño de poro en el inmovilizado, así como la disponibilidad de sitios activos libres por el acomodo de la enzima en el soporte.

TABLA 9 PROPIEDADES CINÉTICAS APARENTES DE LA INULINASA A CONDICIONES ÓPTIMAS.

Tipo	Actividad (U/mg)	K_m^* (mg/mL)	V_{max}^* (mg/mL·min)	k_{cat}^* (min^{-1})	Eficiencia catalítica [k_{cat}^*/K_m^*] (mL/mg·min)
Enzima libre	166	6.09	206.38	16511	2712
Alginato de calcio	13	5.22	2.79	12.3	0.53
PVA-PEG	3	3.98	8.50	34.5	2.14

* aparente

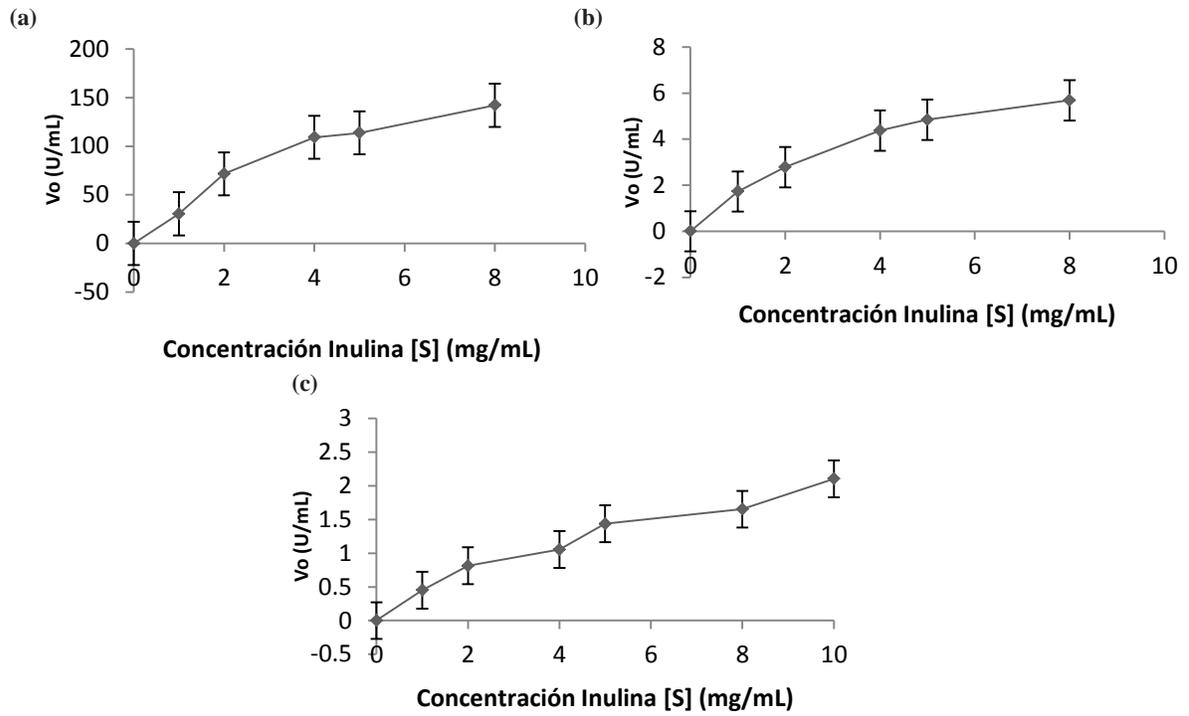


Figura 6.11 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la inulinasa.

(a) Enzima Libre. (b) Enzima inmovilizada en PVA/PEG y (c) Enzima inmovilizada en alginato de calcio. Las reacciones se realizaron a una temperatura óptima de (a) 60°C (b) 50°C (c) 60°C y pH de 5.5

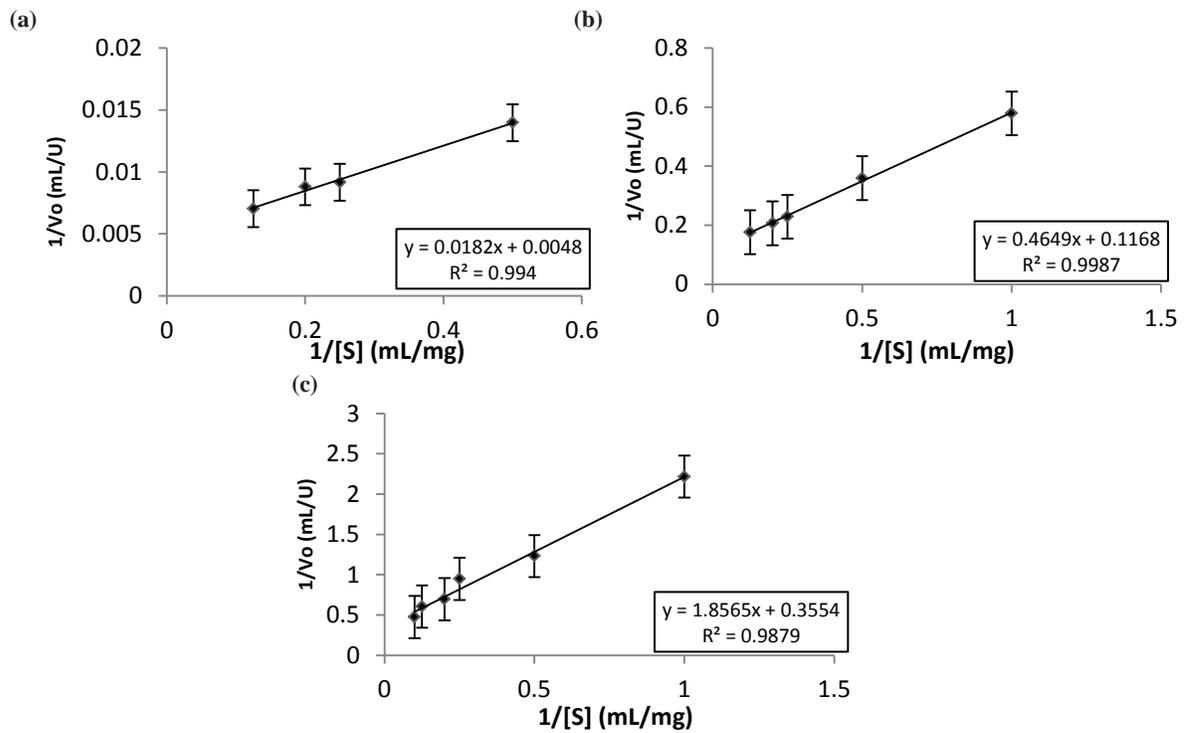


Figura 6.12 Análisis cinético ajustado a la ecuación de Lineweaver-Burk para (a) Enzima Libre. (b) Enzima inmovilizada en PVA/PEG y (c) Enzima inmovilizada en alginato de calcio.

6.7 TERMOESTABILIDAD

El tiempo de vida media de la enzima no pudo ser determinado ya que presentaba actividades estables en el tiempo evaluado, como lo muestran los resultados. Aun cuando había fluctuaciones en la actividad, no eran determinantes para establecer una inestabilidad térmica. No se puede establecer a los inmovilizados (Figura 6.14 y Figura 6.15) como promotores de la termoestabilidad o que la afecten, ya que no existe una diferencia determinante al compararla con la mostrada en la enzima libre (Figura 6.13).

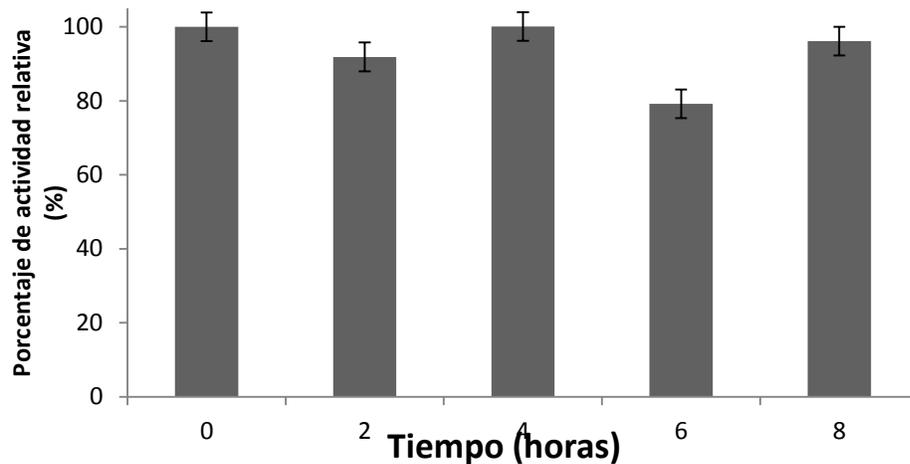


Figura 6.13 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa libre.

Las reacciones se realizaron a una temperatura de 60°C y pH de 5.5 con una concentración de .5% de inulina.

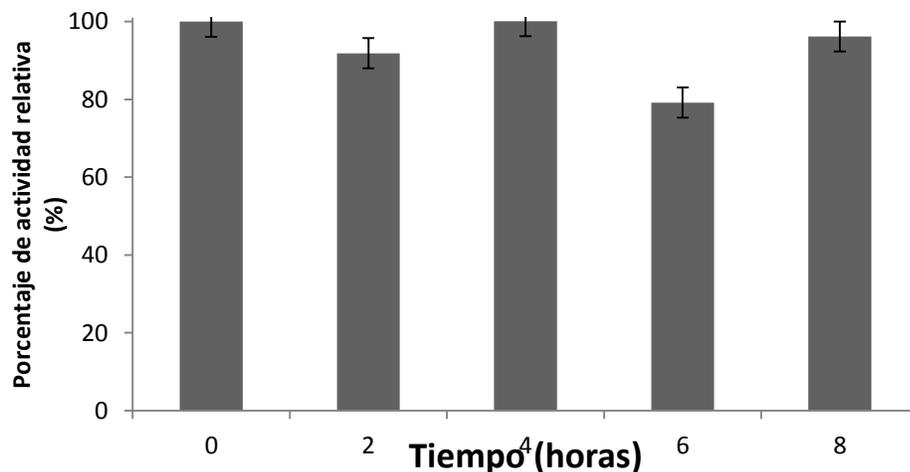


Figura 6.14 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa inmovilizada en Alginato de calcio.

Las reacciones se realizaron a una temperatura de 60°C y pH de 5.5 con una concentración de .5% de inulina.

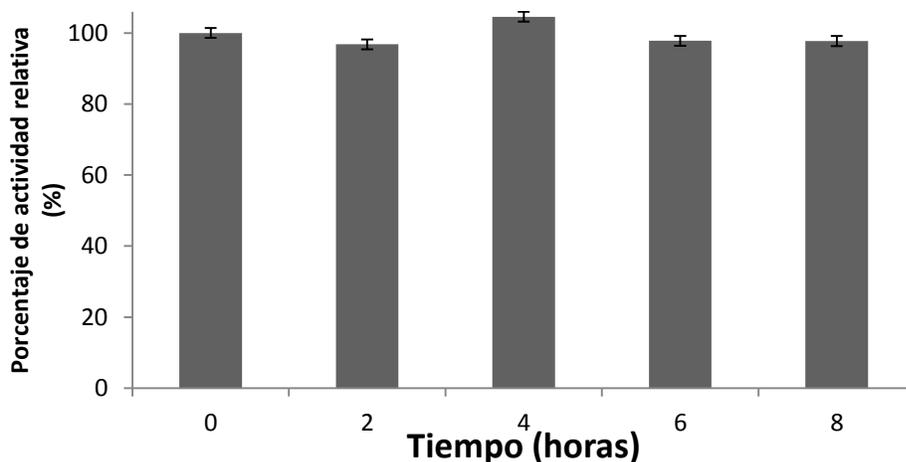


Figura 6.15 Efecto de la termoestabilidad en la inulinasa inmovilizada en PVA-PEG. Las reacciones se realizaron a una temperatura de 50°C y pH de 5.5 con una concentración de .5% de inulina

6.8 CICLOS DE REÚSO

Se determinó el número de reúsos que se pueden obtener para los inmovilizados al usarlos en un sistema por lotes. En la Figura 6.16, se puede observar una caída clara en la actividad de la inulinasa inmovilizada en PVA-PEG la enzima pierde en promedio entre 30% y 35% de actividad por ciclo de reuso, aunque demuestra una actividad considerablemente mejor de reuso al compararla con la enzima inmovilizada en alginato de calcio, ilustrada en la Figura 6.17, donde se observa una pérdida del 70% de actividad tan solo en el primer reuso. Esto se puede atribuir al hecho de que hay una mayor disponibilidad de sitios activos libres y un tamaño de poro mayor en el PVA-PEG que en el alginato de calcio provocando una menor dificultad en la entrada y salida de sustratos y productos. Igualmente, ésta pérdida de actividad podría deberse a una inhibición por producto en ambos casos, donde el producto no permite la entrada de nuevos reactivos a los sitios activos.

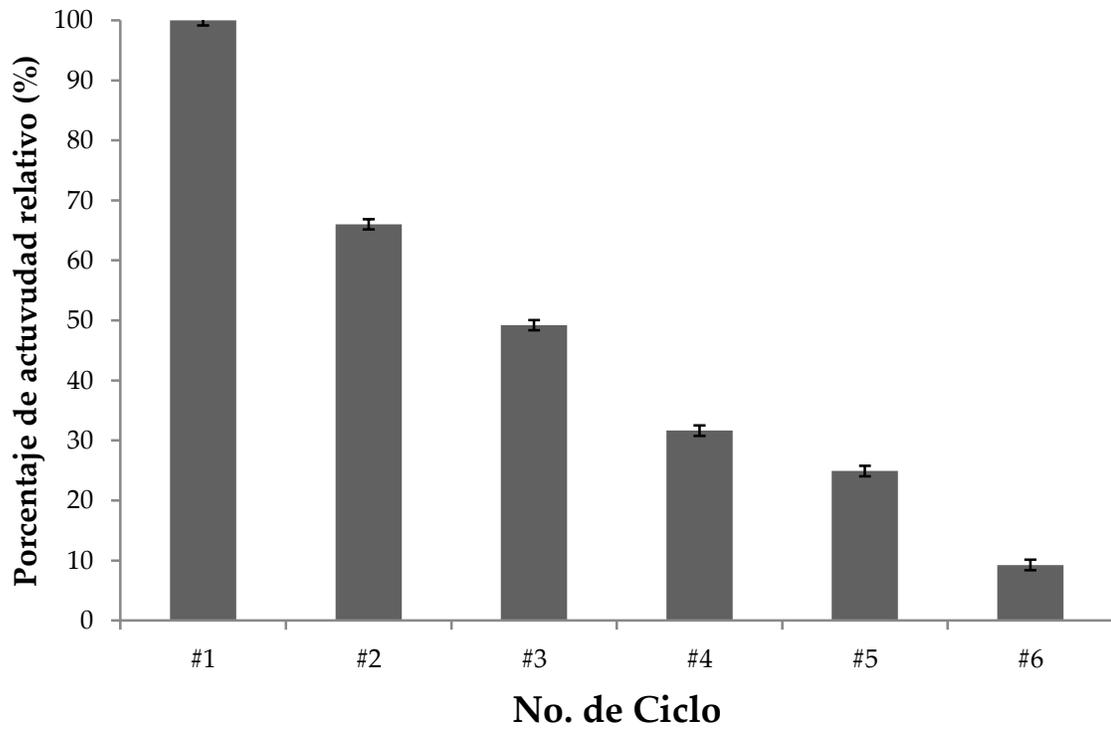


Figura 6.16 Reutilización de la inulinasa inmovilizada en PVA-PEG.

Las reacciones se realizaron a una temperatura de 50°C y pH de 5.5 con una concentración de .5% de inulina

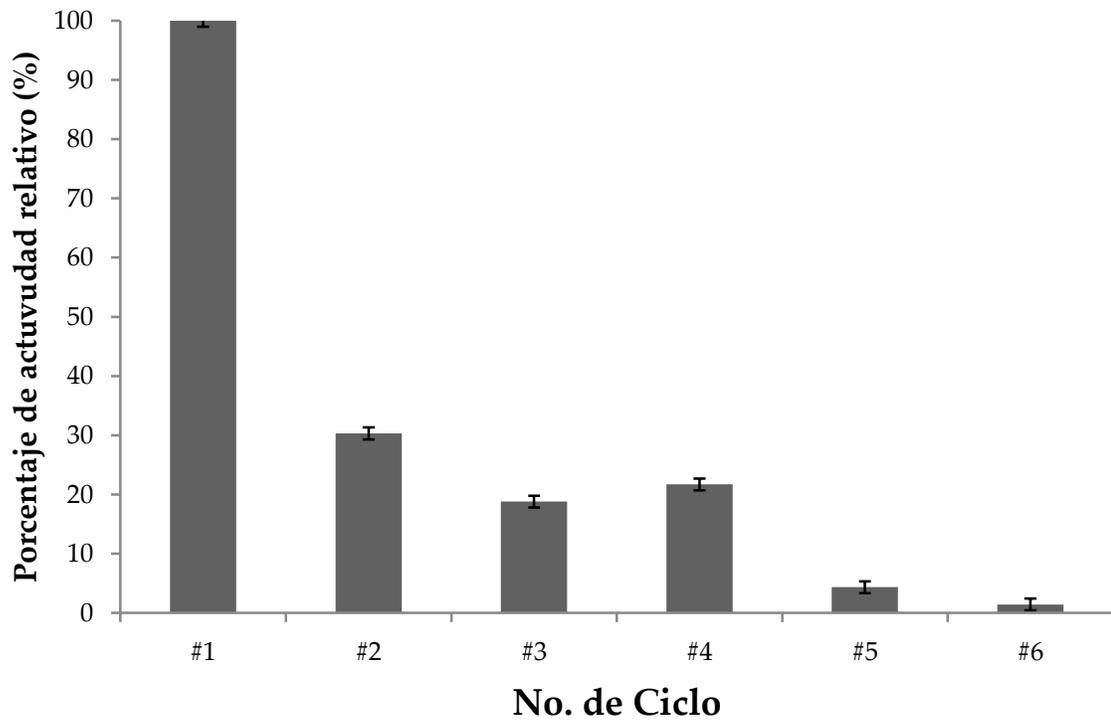


Figura 6.17 Reutilización de la inulinasa inmovilizada en alginato de calcio

Las reacciones se realizaron a una temperatura de 50°C y pH de 5.5 con una concentración de .5% de inulina

6.9 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN UN REACTOR TUBULAR

El reactor fue diseñado exclusivamente para el experimento que se desarrolló y, con el cual, se intentó conseguir un sistema que sirviera de base para un proceso en un reactor tubular a una temperatura constante. Para mantener la temperatura se diseñó un reactor enchaquetado con una corriente de servicio a co-corriente ya que el lecho se encontraba al inicio del reactor por lo que se necesitaba que el cambio de temperatura tuviera mayor efecto sobre la base del reactor. Para propósitos experimentales y economizar el uso de sustrato, el efluente era recirculado a la alimentación y sólo se retiraba la muestra a determinado tiempo, por lo que, estrictamente hablando, sería un reactor de modelación intermitente o batch, ya que no existe entrada ni salida física.

Por esta razón, la Figura 6.18 modela nuestra reacción de la misma forma que lo haría en un reactor intermitente, deteniéndose poco antes de los 20 minutos. Independientemente, se puede confirmar el funcionamiento del soporte en estas condiciones. Los datos del reactor son mostrados en la Tabla 10. El propósito principal de la elaboración del reactor, ilustrado en la Figura 6.19, era demostrar la aplicación del soporte en un reactor tubular y confirmar que la reacción puede llevarse a cabo de esta forma, sin la necesidad de que el soporte estuviera en un medio agitado u otros requerimientos, como aereación o sistema de filtrado. Este reactor tubular podría ser empleado de forma continua y extrapolarlo, a mayor escala si fuera necesario, considerando que ya se tiene las propiedades del soporte y sus propiedades cinéticas.

TABLA 10 PROPIEDADES DEL REACTOR

Propiedad	Valor
Flujo	13 ml/min
[S] ₀	5mg/mL
Soporte cargado	4 g
Tiempo de retención hidráulico	4.45 min
Tiempo de retención	0.25 min.

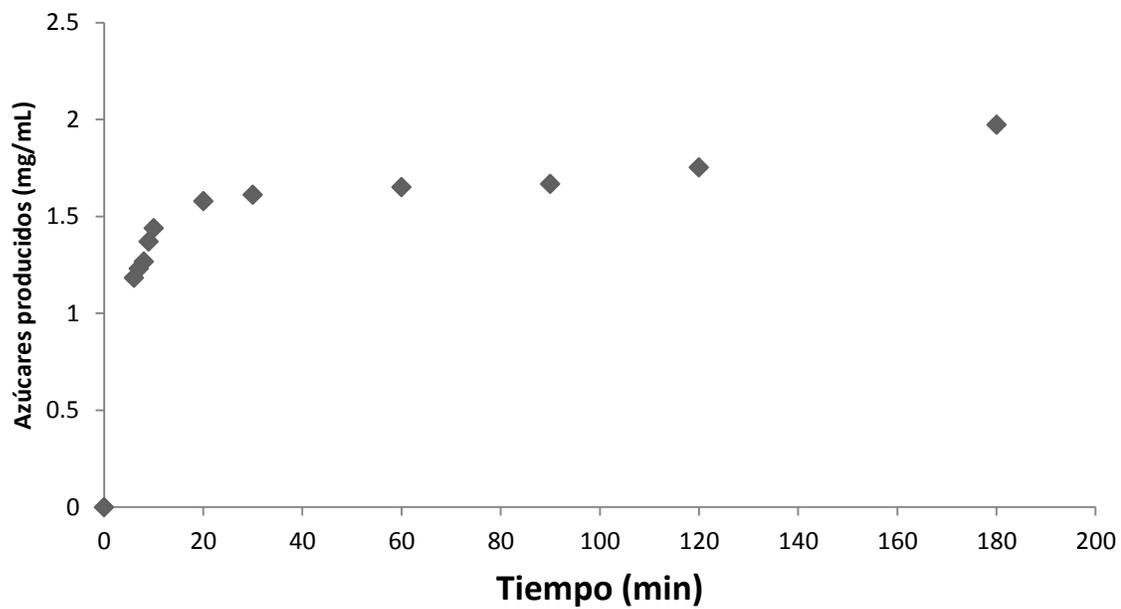


Figura 6.18 Cinética en el reactor tubular.

La reacción se realizó a una temperatura en el lecho de 50°C y un pH de 5.5 con 4 g de soporte.

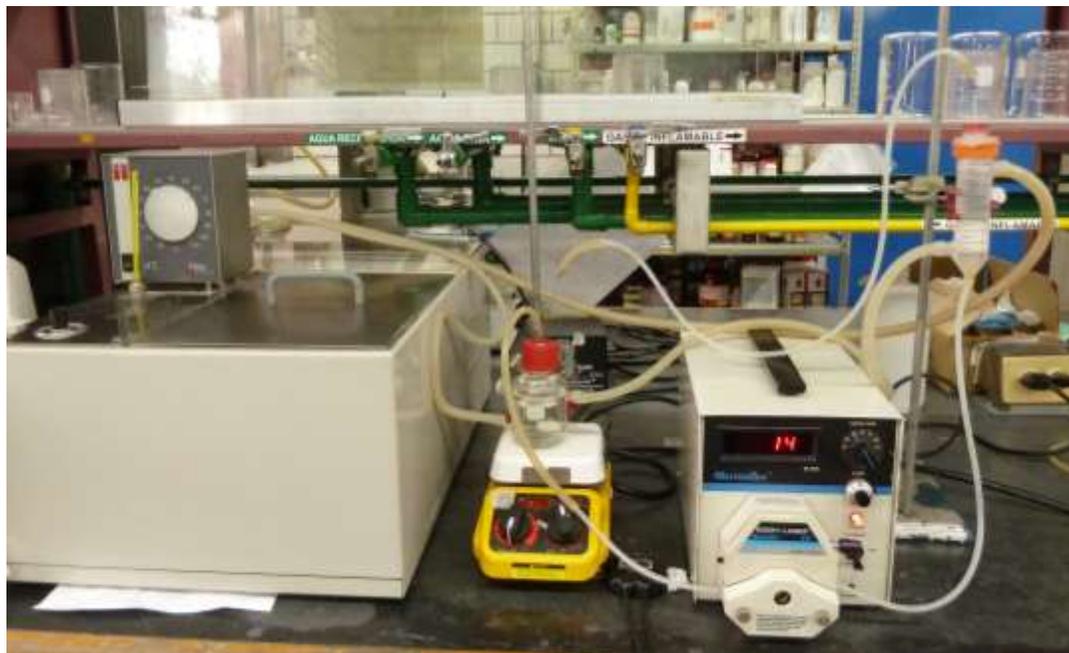


Figura 6.19 Reactor de lecho empacado construido en el Laboratorio-314 del edificio E de la Facultad de Química.

CONCLUSIONES

- ✧ El análisis de la experimentación, evidenció que los soportes utilizados, no permiten que la enzima tenga una actividad benéfica para una producción alta de fructosa ya que, al estar inmovilizada, la enzima mostró una velocidad de reacción notablemente menor. Esta cualidad, al contrario de ser totalmente perjudicial, podría permitir controlar la reacción para obtener determinados productos, como IOS de distintas cadenas.
- ✧ Gracias a los análisis de HPLC de los productos de reacción, con la enzima inmovilizada en alginato de calcio, se puede concluir que éste soporte nos permite tener una producción de IOS controlada, ya que parece suprimir la actividad de la exo-inulinasa al no observar rastros de fructosa ni de glucosa en el análisis. Sin embargo, es necesario identificar el tipo de oligosacáridos producidos y estudiar cuales son los mecanismos que influyen en la selectividad.
- ✧ Se concluyó que las estructuras formadas por el alginato de calcio y el co-polímero PVA-PEG, mostraban condiciones estructurales adecuadas, al permitir la reacción a temperaturas cercanas a la óptima o en la óptima, respectivamente. En el caso del co-polímero PVA-PEG ocurrió una desintegración estructural arriba de los 55°C, pero mostró una mejor eficiencia catalítica con respecto a la T óptima en el alginato de calcio. Sería necesario evaluar las propiedades de este soporte, que permitan optimizarlo para un mejor desempeño

- ⤴ Al conocer que la enzima inmovilizada en alginato de calcio pierde el 70% de actividad en el primer reusó, se concluyó que esta propiedad lo hace un soporte de bajo interés comercial para esta reacción. En el caso del PVA-PEG también pierde alrededor de 30% de actividad por reúso. Sería necesario evaluar que propiedad del polímero es responsable de este comportamiento y modificar su preparación conforme a esto.

- ⤴ El evaluar la enzima inmovilizada en un reactor tubular recirculado, permite concluir que es factible su uso en un proceso continuo sin agitación, lo que incrementaría su estabilidad estructural.

PERSPECTIVAS

- ✦ Optimizar la estructura de los inmovilizados.
- ✦ Evaluar sus propiedades en un reactor continuo y las variables que podrían modificar la producción.
- ✦ Evaluar la producción de IOS que se puede tener usando otros métodos de inmovilizado (entrecruzamiento, matrices, atrapamiento entrecruzado).
- ✦ Evaluar económicamente el uso de la enzima inmovilizada y compararlo con otros procesos para la producción de IOS.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M. y Duhalt, R., 2002. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochem Biophys Res Com*, (295), pp.828-31.
- Azhari, R., Szlak, A.M., Ilan, E., Sideman, S. y Lotan, N., 1989. Purification and characterisation of endo- and exo-inulinase. *Biotechnol Appl Biochem*, (11), pp.105-17.
- Bais, H.P. y Ravishankar, G.A., 2001. Cichorium intybus L – cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *J Sci Food Agr*, (81), pp.467-84.
- Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A., 2000. Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol Bioeng*, 70(3), p.342–348.
- Basso, A., Spizzo, P., Ferrari, V., Knapic, L., Savko, N., Braiuca, P., Ebert, C., Ricca, E., Calabrò, V. y Gardossi, L., 2010. Endo- and Exo-Inulinases: Enzyme-Substrate Interaction and Rational Immobilization. *Biotechnol. Prog.*, 2(26), pp.397-405.
- Beglov, S.J. y Golubev, V.N., 2004. *Method for producing glucose-fructose syrup*. Russia: Patente RU2224026.
- Bellisle, F., Diplock, A.T., Hornstra, G., Koletzko, B., Roberfroid, M., Salminen, S. y Saris, W.H.M., 1998. Functional Food Science in Europe. *Br J Nutr*, (80), pp.1-193.
- Bernfeld, P., Colowick, S.P. y D, K.N., 1955. In Amylases, a and b. *Method Enzymol*, 1, pp.117-18.
- Borole, A., Dai, S., Cheng, C.L., M, R. y Davison, B.H., 2004. Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. *Appl Biochem Biotech*, pp.273-85.
- Bunch, A.W., 1994. High cell density growth of microorganisms. *Biotechnol Gen Eng*, (12), pp.535-61.

- Cao, L.Q., van Langen, L. y Sheldon, R.A., 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol*, 14, pp.387-94.
- Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S. y Fernandes, P., 2005. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. *Food Chem*, (91), p.517–520.
- Chabbert, N., Guiraud, J.P. y Galzy, P., 1985. Protein production potential in the ethanol production process from Jerusalem artichoke. *Biotechnol Lett*, (7), pp.433-46.
- Chen, G., Sun, Z., Wnag, Y. y Qian, X., 1997. Purification and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Weishenwu Xuebao*, (37), pp.362-67.
- Clydesdale, F., 1997. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr Rev*, (55), pp.413-22.
- Coussement, P. y Franck, A., 2001. Inulin and Oligofructose. In S. Sungsoo, ed. *Handbook of Dietary Fiber*. Maryland: NutraSource Inc. p.Chapter 36.
- 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.
- Dizge, N., Keskinler, B. y Barlas, H., 2009. Sorption of Ni(II) ions from aqueous slution by Lewatit cation-exchange resin. *J Hazard Mater*, (167), pp.915-26.
- Engasser, J.M. y Horvath, C., 1976. Diffusion and kinetic with immobilized enzymes. *Appl Biochem Bioeng*, 1, pp.194-204.
- Fernandes, P., Marques, M.P.C., Carvalho, F. y Cabral, J.M.S., 2008. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Wiley Interscience*.
- Focher, B., Marzetti, A.C.P., Beltrame, P.L. y Guardione, D., 1991. Hydrolysis of inulin: A kinetic study of the reaction catalyzed by an inulinase from *Aspergillus ficuum*. *Biotechnol Bioeng*, 6(37), pp.575-79.
- Franck, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr*, 2(87), pp.287-91.
- Franck, A., 2006. Inulin. In *Food Polysaccharides and Their Application*. CRC. pp.335-49.
- Franck, A. y DeLeenHeer, L.2., 2004. Inulin. *Biopolymers*.

Gibas, I. y H., J., 2010. Review: Synthetic Polymer hydrogels for Biomedical Applications. *Chem Chem Tech*, 4(4).

Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. y Cummings, J.H., 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, (108), p.975.

Gill, I. y Ballesteros, A., 2000. *Trends Biotechnol*, 15, p.282–296.

Gill, P.K., Manhas, R.K. y Singh, P., 2006. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus Fumigatus*. *Biores Technol*, (97), pp.894-902.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.A. y Thom, D., 1973. Biological interaction between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.*, (32), p.195–198.

Gupta, A.K., Kaur, M., Kaur, N. y Singh, R., 1992. A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilised on various supports. *J Chem Technol Biotechnol*, (53), p.293–296.

Harris, A., 1973. Cell surface movements related to cell locomotion. In *Locomotion of Tissue Cells, Ciba Foundation Symposium 14*. Amsterdam: Elsevier/North Holland. pp.3-26.

Hidaka, H., Hirayama, M. y and Sumi, N., 1988. A fructooligosaccharides-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric Bio. Chem*, (52), pp.1181-87.

Hond, E.D..G.B. y Ghooos, Y., 2000. Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutr Res*, (20), pp.731-36.

Iglesias Martínez, F.L., 2011. *Hidrólisis enzimática de inulina de chicoria*. Tesis de Licenciatura. Mexico: UNAM.

Ji, Y. y Zhao, X., 1998. Purification and properties of inulinases from *Aspergillus niger* M89. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, (38), pp.120-25.

Kamada, T., Nakajima, M., Nabetani, H., Saglam, N. y Iwamoto, S., 2002. Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides. *Eur Food Res Technol*, (214), p.435–440.

- Kango, N. y Chand, J.S., 2011. Production and Properties of Microbial Inulinases; Recent Advances. *Food Biotechnol*, 3(25), pp.165-212.
- Kaur, N. y Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci.*, (27), pp.703-14.
- Kaur, N., Gupta, A.K., Singh, D.P. y Singh, R., 1994. Production purification and immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem Technol Biotechnol*, (59), p.377.
- Kays, S.J. y Nottingham, S.F., 2008. Chapter 5. Chemical Composition and Inulin Chemistry. In *Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke*. CRC Press. pp.53-96.
- Kim, K. y Hamdy, M.K., 1986. Acid hydrolysis of Jerusalem Artichoke for ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, (28), pp.138-41.
- Kochhar, A., Gupta, A.K. y Kaur, N., 1999. Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *J Sci Food Agr*, (79), p.549–554.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol agent. *J Biol Chem*, 193, pp.265-75.
- Lozinsky, V.I., 1998. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. *Uspekhi khimii*, 6(67), p.641.
- Lozinsky, V., Galaev, I., Plieva, F., Savina, I., Jungvid, H. y Mattiasson, B., 2003. Polymeric Cryogels as Promising Materials of Biotechnological Interest. *Trends Biotechnol*, 21, pp.445-51.
- Lum, L. y Elisseeff, J., 2003. Injectable Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. In *Tissue Eng*. Baltiimore: University of Oulu. p.Chapter 4.
- Mandels, M., Hontz, L. y Nystrom, J., 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol And Bioeng*, 16(11), pp.1471-93.
- Matsumoto, K. y Yamazaki, H., 1986. *Production of fructose syrups*. US: Patente US4613377.
- Metrangolo-Ruiz De Temino, D., Hartmeier, W. y B, A.-S.M., 2005. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kef ir* in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme Microb Tech*, 36, pp.3 - 9.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J. y Waldron, K.C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37, p.790–802.

Montiel Pacheco, C., 2008. *ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN BIOCATALÍTICA DE COMPUESTOS HETEROATÓMICOS POR LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago* EN MEDIO ORGÁNICO*. Tesis Doctoral. Mexico: UNAM.

Mozhaev, V.V., Šikšnis, V.A., Torchilin, V.P. y Martinek, K., 1983. Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnol Bioeng*, 25(8), p.1937–1945.

Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. y López-Munguía, A., 2009. Kinetic behavior and specificity of β -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochem*, (44), pp.801-08.

Nagem, R.A., Rojas, A.L., Golubev, A.M., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N. y Polikarpov, I., 2004. Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori*: ten enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Biol*, (344), pp.471-80.

Nahm, B., Byun, S.M. y Kim, W.Y., 1979. Production of fructose from Jerusalem artichoke tubers by enzymatic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol*, (11), p.283–290.

Nakamura, T., Kurokawa, T., Nakatsu, S. y Ueda, S., 1978. Crystallization and general properties of an extracellular inulinase from *Aspergillus* sp. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, (52), pp.159-66.

Nakamura, T. y Nakatsu, S., 1977. General properties of extracellular inulinase from *Penicillium*. *Nippon Noge Kaishi*, (51), pp.681-89.

Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A. y Ohta, K., 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. *J Ferment Bioeng*, (80), p.164–169.

Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M. y Ohta, K., 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *J Ferment Bioeng*, (84), pp.313-18.

- Nilsson, K., Brodelius, P. y Mosbach, K., 1987. Entrapment of Microbial and Plant Cells in Beaded Polymers. *Method Enzymol*, 135(B), pp.222-30.
- Ohta, A., Ohtsuki, M., Baba, S., Adachi, T., Sakata, T. y Sakaguchi, E., 1995. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructo-oligosaccharides. *J Nutr*, 9(125), p.2417–2424.
- Onodera, S. y Shiomi, N., 1988. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric Biol Chem*, 2569-2576(52).
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N. y Fontana, J.D., 1999. Recent developments in microbial inulinases. *Appl Biochem Biotechnol*, (81), p.35–52.
- Pasparakis, G. y Bouropoulos, N., 2006. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *Int J Pharm*, (323), pp.34-42.
- Phelps, C.F., 1965. The physical properties of inulin solutions. *Biochem*, (95), pp.41-47.
- Prasad, K. y Kadokawa, J., 2009. Alginates-based blends and nano/microbeads. In B.H.A. Rehm, ed. *ALGINATES: BIOLOGY AND APPLICATIONS*. Springer.
- Rhee, S.K. y Kim, C.H., 1989. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. *Biotechnol Lett*, (11), pp.201-06.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S. y Lorio, G., 2007. The state of the art in the production of fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. *Cr Rev Biotech*, (27), pp.129-45.
- Riley, M.R., Muzzio, F.J. y Reyes, S.C., 1999. Experimental and Modeling Studies of Diffusion in Immobilized Cell Systems: A review of the recent literature and patents. *Appl Biochem Biotechnol*, 80(2), pp.151-88.
- Roberfroid, M., Van Loo, J. y Gibson, G., 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr*, 1(128), pp.11-19.
- Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B., Cabral, J. y Fernandes, P., 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chem*, (95), p.77–82.
- Roch-Norlund, A.E., Hultman, E. y Nilsson, L.H., 1972. Metabolism of fructose in diabetes. *Acta Medica Scand Suppl*, (542), pp.181-86.

Ruberfroid, M.B., 1999. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr*, 7S(129), pp.1398-401.

Schorr-Galindo, S., Fontana, A. y and Guiraud, J.P., 1995. Fructose syrups and ethanol production by selective fermentation. *Curr Microbiol*, (30), p.325–330.

Shallenberger, R.S., 1993. *Taste Chem*. London: Blackie Academic.

Snyder, H.E. y Phaff, H.J., 1962. Pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. *J Biol Chem*, (237), p.2438–2441.

Sriamornsak, P., Nunthanid, J., Luangtana-anan, M., Weerapol, Y. y Puttipipatkachorn, S., 2008. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: Effect of the amount and type of sodium alginate and calcium salts. *Eur J Pharm Biopharm*, (69), p.274–284.

Suhrenbrock, L., Radtkea, G., Knopb, K. y Kleinebuddeb, P., 2011. Suspension pellet layering using PVA–PEG graft copolymer as a new binder. *Int J Pharm*, (412), p.28–36.

Sundaram, P.V., 1974. A new method of coupling proteins to insoluble polymers. *Biochem Biophys Res Commum*, 61, pp.717-22.

Tischer, W. y Kasche, V., 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Tibtech*, 17, pp.326-35.

Uhm, T.B., Kim, W.Y. y Byun, S.M., 1982. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose. *Enzyme Microb Technol*, (4), p.239–244.

Van Loo, J., Coussement, P., L, d.L., Hoebregs, H. y Smits, G., 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Cr Rev Food Sci Nutr*, (35), pp.525-52.

Vandamme, E.J. y Derycke, D.G., 1983. Microbial Inulinases: Fermentation process, properties and applications. *Adv Appl Microbiol*, (29), pp.139-76.

Wargowich, M.H., Chem, D.D., Jimenez, A., Steele, V.E., Velasco, M., Stephens, C., Price, R., Gray, K. y Kelloff, G.F., 1995. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer, evaluation of potential chemopreventive agents in rat. *Cancer Epidemiology Biomark Prev*, (5), pp.355-60.

- Wenling, W., Huiying, W.W.L. y Shiyuan, W., 1999. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. *BiochemistryUS*, (34), p.643–646.
- Yun, J.W., Kim, D.H., Uhm, T.B. y Song, S.K., 1997. Production of high-content inulo-oligosaccharides from chivory juice by immobilized endoinulinase. *Biotech. Lett.*, (19), pp.935-38.
- Yun, J.W., Park, J.P., Song, J.P., Lee, C.Y., Kim, J.H. y Song, S.K., 2000. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilised endoinulinase. *Bioprocess Eng*, (22), pp.189-94.
- Zherebtsov, N.A., Abramova, I.N., Shelamova, S.A. y Popova, T.N., 2003. Identification of Catalytically Active Groups in Inulinase Identification of Catalytically Active Groups in Inulinase. *Appl Biochem Microbiol*, 6(39), p.544–548.
- Zherebtsov, N.A., Korneeva, O.S. y Tertychnaya, T.N., 1995. On the mechanism of splitting of b-2,1-fructoside bonds of inulin by inulinase from *Aspergillus awamori* 2250. *Biochemistry (Moscow)*, (60), pp.1205-11.
- Zittan, L., 1981. Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production. *Starch*, (33), p.373–377.