

Tesis de Posgrado

Producción de inulinasas de origen microbiano para procesos biotecnológicos

Vullo, Diana Lía

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vullo, Diana Lía. (1992). Producción de inulinasas de origen microbiano para procesos biotecnológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2536_Vullo.pdf

Cita tipo Chicago:

Vullo, Diana Lía. "Producción de inulinasas de origen microbiano para procesos biotecnológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2536_Vullo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"PRODUCCION DE INULINASAS DE ORIGEN MICROBIANO
PARA PROCESOS BIOTECNOLOGICOS"

AUTORA: Lic. Diana Lía Vullo

DIRECTOR: Dr. Faustino Siferiz

CODIRECTORA: Dra. Celia E. Coto

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Microbiología, Departamento de
Química Biológica, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, UBA.

*Tesis.
2536
ej. 2.*

Tesis presentada para optar al título de **DOCTORA EN CIENCIAS
QUIMICAS.**

Por orden cronológico:

A mis padres,

a Pablo,

a Leti.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Celia E. Coto por haberme dado la posibilidad de la realización de esta tesis, con el asesoramiento continuo, a través de sus consejos, a lo largo del desarrollo de la misma y su interés en mi formación como investigadora independiente.
- Al Dr. Faustino Sifneriz por haber depositado una confianza ciega en mí y en la evolución del trabajo de tesis.
- A la Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich y sus colaboradores del Instituto de Botánica, dependiente de la Secretaría de Estado de Medio Ambiente de San Pablo, Brasil, por haberme recibido cálidamente y posibilitado iniciar los primeros pasos en esta investigación.
- A la Dra. Carmen Sánchez de Rivas por su interés demostrado en este trabajo de investigación y los aportes hacia un mejoramiento del mismo.
- A mis compañeras de docencia, la Lic. Patricia Gadaleta y la Dra. Mónica Wachsmann, por estar siempre a mi lado.
- A mis compañeros de laboratorio, los licenciados Luis Ducrey, Marcela Ferrero, Sandra Ruzal, Adrián Stettler y Jorge Tanioka por brindarme su amistad.
- Al laboratorio de Virología: Dres. Laura Alché, Nélide Candurra, Silvia Coronato, Félix Coulombié, Elsa Damonte, Adriana Descalzo, Susana Mersich y Luis Scolaro, los licenciados Fabián Benencia, Viviana Castilla, Cecilia Courrèges y Carlos Lemos y la Sra Isabel Paz por haber hecho amenos mis días de trabajo y prestarme su ayuda en cada momento.
- A la Dra. Beatriz S. Méndez y sus colaboradoras, las

licenciadas María Julia Pettinari y Mirtha Floccari por el apoyo material y espiritual en mi trabajo.

- Al Dr. Ernesto Massouh, al Sr. Guillermo Assad y los demás integrantes del laboratorio de Inmunoquímica por el apoyo recibido.

- A la Sra. Carmen Castro por su ayuda en la preparación de material estéril, como también a las Sras. encargadas del lavado del mismo.

- Al Lic. Pablo J. Rossi, por su ayuda con el manejo de la computadora y los programas utilizados en la confección de esta tesis, además de su paciencia y comprensión cotidiana.

- Al Sr. Diego D. Rossi por haberme facilitado la impresión de este ejemplar.

- A las abuelas que se ocuparon de Leticia en cada momento.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Las enzimas microbianas y su aplicación en la industria .	1
1.2. Producción de edulcorantes	2
1.3. La inulina, polímero natural de fructosa	4
1.4. Hidrólisis enzimática de inulina	11
1.5. El género <i>Bacillus</i> y su aplicación en la industria .	13
2. OBJETIVOS	17
3. RESUMEN	18
4. MATERIALES Y METODOS .	19
4.1. Determinaciones analíticas	19
4.1.1. Determinación del número de bacterias	19
4.1.1.1. Por medición de Densidad Optica (DO) a 560 nm .	19
4.1.1.2. Por conteo de células viables en placa .	19
4.1.2. Determinación de azúcares reductores .	19
4.1.3. Determinación de fructosa total	20
4.1.4. Determinación de proteínas .	20
4.2. Determinación de actividad enzimática .	20
4.3. Aislamiento de bacterias productoras de	

inulinasas	21
4.3.1. Medio de cultivo . .	21
4.3.2. Relevamiento de cepas productoras	21
4.3.3. Selección de la cepa mejor productora	23
4.3.4. Identificación de la cepa bacteriana seleccionada .	24
4.4. Estudios sobre la cepa seleccionada <i>Bacillus subtilis</i> 430A y la actividad inulinasa encontrada	25
4.4.1. Optimización de temperatura y concentración de sustrato en cultivos en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 430A	25
4.4.2. Estudios de producción de actividad inulinasa en cultivos en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 430A	26
4.4.3. Condiciones de cultivo en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 430A para la recolección de la enzima .	26
4.4.4. Fraccionamiento celular para la localización de la actividad inulinasa en <i>Bacillus subtilis</i> 430A .	27
4.4.5. Purificación parcial de la enzima	27
4.4.6. Determinación de la temperatura óptima de actividad .	27
4.4.7. Determinación del pH óptimo de actividad inulinasa	27
4.4.8. Estabilidad térmica de la actividad enzimática .	29
4.4.9. Determinación de la temperatura de inactivación enzimática	29

4.4.10. Efecto de metales y complejantes sobre la actividad .	29
4.4.11. Especificidad de sustrato .	30
4.4.11.1. Comportamiento de la enzima frente a distintos sustratos	30
4.4.11.2. Determinación de parámetros cinéticos: Km y Vm	30
4.4.12. Efecto del producto final	31
4.4.13. Determinación del peso molecular aproximado	31
4.5. Diseño de un proceso de hidrólisis	32
4.5.1. Proceso en medio líquido .	32
4.5.2. Proceso con enzima fija en un soporte inerte (inmovilizada)	32
4.5.2.1. Inmovilización de la enzima .	32
4.5.2.2. Hidrólisis propiamente dicha	33
5. RESULTADOS .	34
5.1. Aislamiento de bacterias productoras de inulinasas	34
5.1.1. Relevamiento de cepas productoras	34
5.1.2. Selección de la cepa mejor productora	34
5.1.3. Identificación de la cepa 430A .	36
5.2. Estudios sobre la cepa seleccionada <i>Bacillus subtilis</i> 430A y su actividad inulinasa encontrada	40
5.2.1. Optimización de la temperatura y concentración de sustrato en cultivos en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 430A .	40
5.2.2. Estudios de producción de actividad	

inulinasa en cultivos en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 430A	40
5.2.3. Fraccionamiento celular para la localización de la actividad inulinasa endocelular	43
5.2.4. Purificación parcial de la actividad enzimática	45
5.2.5. Determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad .	47
5.2.6. Estabilidad térmica de la actividad inulinasa	47
5.2.7. Determinación de la temperatura de inactivación .	50
5.2.8. Efecto de metales y complejantes sobre la actividad enzimática	50
5.2.9. Especificidad de sustrato	53
5.2.9.1. Comportamiento de la enzima frente a distintos sustratos	53
5.2.9.2. Determinación de los parámetros cinéticos: K_m y V_m	53
5.2.10. Efecto del producto final .	56
5.3. Diseño de un proceso de hidrólisis	60
5.3.1. Proceso en medio líquido .	62
5.3.2. Proceso con enzima fija en un soporte (inmovilizada)	63
5.3.2.1. Ciclos en tubo	63
5.3.2.2. Ciclo en columna	64
6.DISCUSION	67
6.1. Aislamiento de bacterias productoras de	

inulinasas	67
6.2. Propiedades de la actividad inulinasa de <i>B.subtilis</i> 430A .	68
6.3. Similitud con otras actividades descritas en <i>Bacillus subtilis</i> .	73
6.4. Diseño de un proceso de hidrólisis	75
7. CONCLUSIONES	76
8. REFERENCIAS	78

1. INTRODUCCION

1.1. Las enzimas microbianas y su aplicación en la industria

La capacidad de síntesis de los microorganismos cubre un amplio espectro de productos químicos que pueden aprovecharse como tales o bien emplearse para fabricar, a su vez, desde solventes hasta adhesivos, colorantes, líquidos para frenos, dejando los ya bien conocidos sectores alimentario y farmacéutico. En los últimos años la fermentación microbiana ha sido el método escogido para la producción de enzimas, las más versátiles de las macromoléculas. Desde tiempos remotos, las enzimas se han extraído de vegetales y animales, pero su obtención a partir de microorganismos está avanzando aceleradamente. La razón es muy sencilla. Además de tener cortos tiempos de fermentación, medios de crecimiento baratos y procesos de selección simples, resulta fácil mejorar la producción enzimática por manipulación genética o de las condiciones de cultivo.

El estudio de enzimas útiles de origen microbiano y sus aplicaciones biocatalíticas es fundamental para el desarrollo futuro en biotecnología. Según Vandamme y Derycke (1983), las enzimas microbianas pueden ser clasificadas groseramente dentro de tres campos mayoritarios de aplicación:

- a. síntesis de compuestos útiles;
- b. reacciones de bioconversión estereoespecíficas; y
- c. hidrólisis de polímeros "interesantes". Todas estas reacciones pueden llevarse a cabo en condiciones operativas

sencillas con renovación constante de recursos y sustratos (Figura 1).

Actualmente las enzimas de origen microbiano que se comercializan mundialmente son: proteasas bacterianas para agentes limpiadores, glucoamilasa, β -amilasa y glucosa isomerasa para la industria del almidón y renina para la fabricación de quesos.

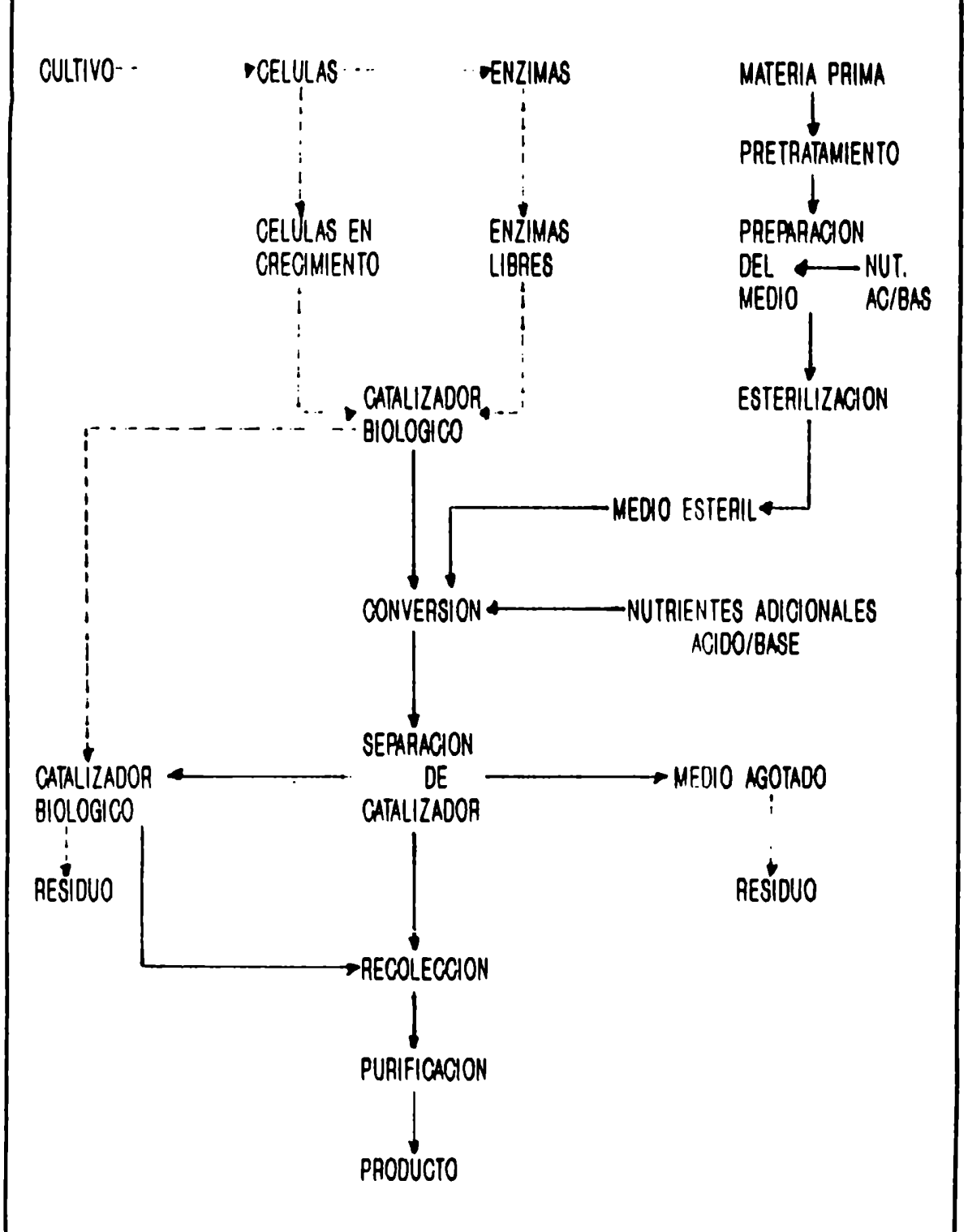
1.2. Producción de edulcorantes

Por siglos el edulcorante por excelencia fue la sacarosa, extraída ya sea a partir de caña o bien de remolacha. Este disacárido posee serias desventajas tales como ser cariogénico, contribuir al desarrollo de la arteriosclerosis, ser causa de obesidad por sobreconsumo, dado su alto contenido calórico y, por supuesto, no es recomendable para los enfermos diabéticos. En el afán de sustituir el consumo de sacarosa, se ha tratado de reemplazarla por edulcorantes sintéticos tales como la sacarina, los ciclohexil derivados, el aspartamo, cuyos valores alimenticios, toxicidad y poder calórico son nulos.

También han sido estudiadas, como edulcorantes alternativos, 1600 a 3000 veces más dulces que la sacarosa, proteínas de sabor dulce, tales como monelina y taumatina, encontradas en plantas tropicales (Crosby, 1976); miraculina, una glicoproteína de un arbusto africano; esteviósido, aislado de hojas de un arbusto paraguayo, llamado "caá he'é" (yerba dulce) o bien osladina. Pero estos compuestos poseen una seria desventaja : no son producidos en las cantidades adecuadas para su industrialización.

FIGURA 1: APLICACION INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS

(Gaden E. L., 1981)



Dentro de los productos naturales que se hallan ampliamente distribuidos en las especies vegetales se encuentra la fructosa. La fructosa es entre 1,5-2,0 veces más dulce que la sacarosa, dependiendo de ciertas condiciones de temperatura, pH y concentración (Tabla 1). Aparentemente la forma piranósida, más estable a bajas temperaturas (Barker, 1976), es más dulce que la furanósida. Esta propiedad hace ideal la utilización de fructosa como endulzante de productos frescos, tales como las bebidas.

La fructosa puede ser preparada como jarabe a partir de almidón de maíz o papa (Figura 2), lográndose los llamados Jarabes de Ultra-Alta Fructosa, los cuales poseen entre un 55% y un 70% del monosacárido, suficiente para endulzar más que la sacarosa en las mismas condiciones. Debido a intereses socio-económicos y políticos, el consumo de estos jarabes de fructosa se halla limitado en Europa, no siendo así en Estados Unidos (Vandamme y Derycke, 1983).

La producción de estos jarabes edulcorantes requiere una serie de pasos según la materia prima elegida. Si se reemplazara esta última por un polímero de fructosa que por hidrólisis total y en un solo paso diera un jarabe enriquecido en un 95% en fructosa, estaríamos frente a una alternativa de mayor rentabilidad.

1.3. La inulina, polímero natural de fructosa

Los polímeros de fructosa, en plantas superiores, conforman un grupo poco conocido químicamente y aún son menos comprendidos fisiológicamente, aunque sus niveles llegan al

FIGURA 2: PRODUCCION DE JARABES DE ALTA FRUCTOSA A PARTIR DE ALMIDON (Bucke, 1980)

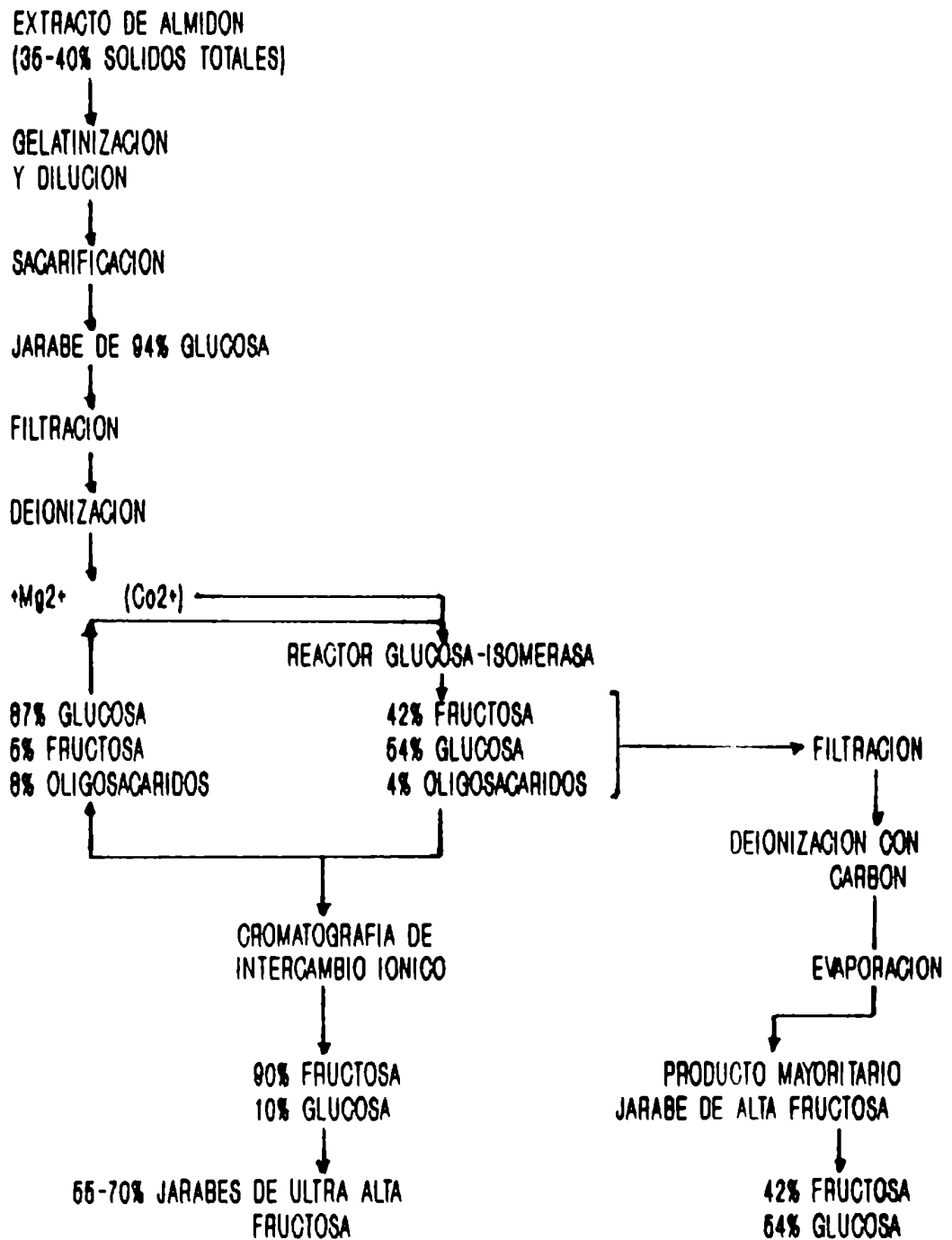
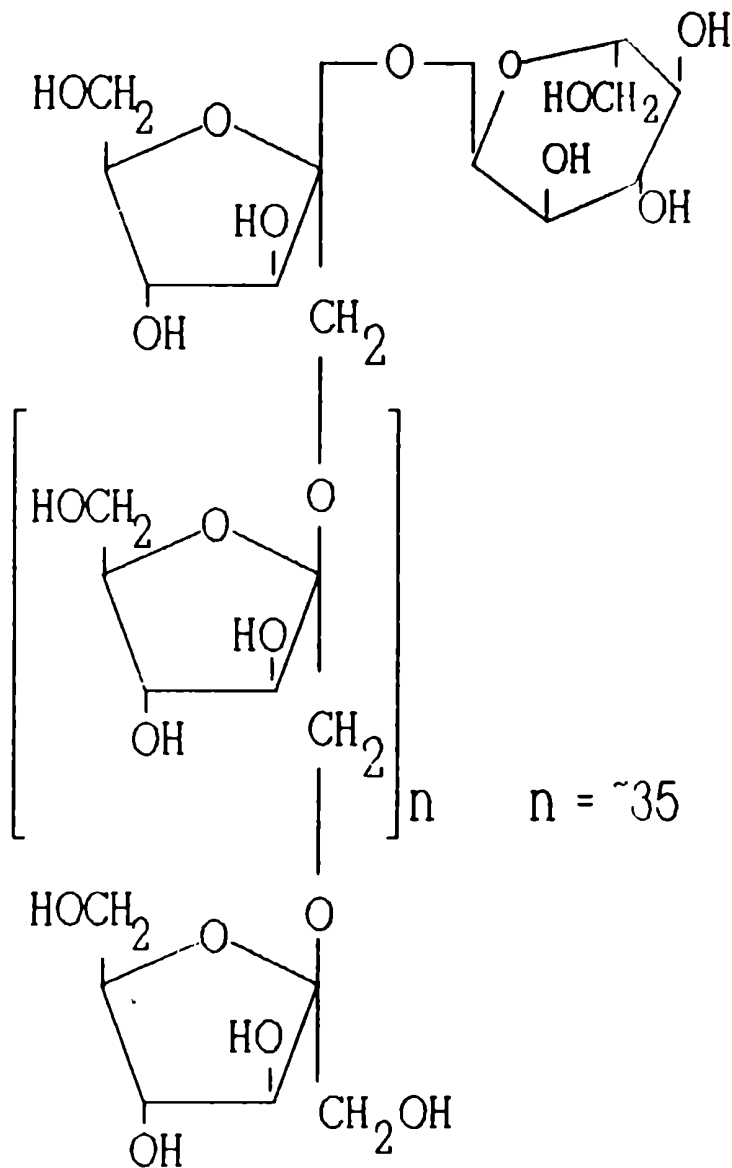


TABLA 1: DULZURA RELATIVA DE ALGUNOS AZUCARES CONOCIDOS
Y SUS JARABES (Zittan et al, 1981)

Fructosa	150
Sacarosa	100
Dextrosa	68
Maltosa	30
Jarabes de Alta Fructosa	88
50% Jarabes de Alta Fructosa. + 50% sacarosa	98

80% del peso seco en algunos tejidos vegetales (Edelman y Jefford, 1968). Dentro de las plantas con flores, los polifruktanos se acumulan como hidratos de carbono de reserva en las familias *Compositae* y *Graminae*. Ejemplos representativos de la familia *Compositae* son el género *Inula*, topinambur (*Helianthus tuberosus* L.), achicoria (*Chicorium intybus* L.), diente de león (*Taraxacum officinale* Weber), dalia (*Dahlia pinnata* Cav.), escorzonera (*Scorzonera hispanica* L.) y cardo (*Cynara cardunculus* L.). Todas ellas acumulan un fructano que se denominó inulina, nombre aparentemente derivado del género vegetal en el cual se encontró. La inulina, como los otros polifruktanos, consiste en una cadena lineal de fructosa ligada por uniones β -(2-1)-fructofuranósidas (Figura 3). Aproximadamente treinta unidades de fructosa y una de glucosa conforman la cadena de inulina, dependiendo, por supuesto, de la especie vegetal, de los requerimientos de la planta y de la estación del año (Bacon y Loxley, 1952; Edelman y Jefford, 1968). La estimación del peso molecular se halla, entonces, complicada. Pollock y colaboradores (1979) encontraron una longitud media de 34 unidades monoméricas en inulina de topinambur, concordante con otros autores (Tauret, 1893; Drew y col., 1928; Kobayashi y col., 1985), de lo cual resulta un peso molecular medio de 5000 a 6000 Dalton. Pero Praznik y Beck (1985), en desacuerdo con estas teorías, debido a que lograron obtener inulinas cuyo peso molecular era mayor de 10.000 Dalton, correspondiente a un grado de polimerización mayor que 40, sostienen que la fuente de inulina y su grado de purificación no sólo influyen sino que además determinan el peso molecular medio y la longitud de cadena del polisacárido.

FIGURA 3 : Molécula de inulina.



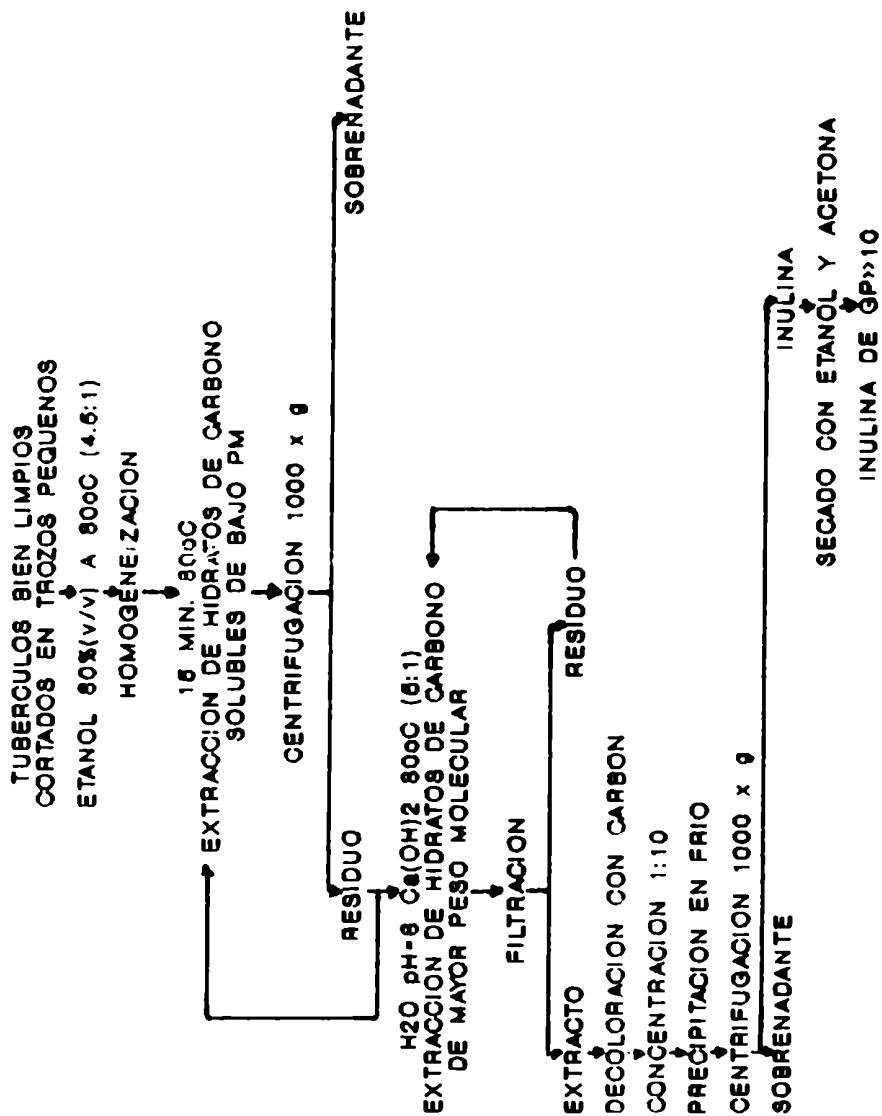
Cada uno de los pesos moleculares determinados por uno u otros autores son solamente puntos estáticos que no reflejan el proceso dinámico que involucra el desarrollo vegetal.

La inulina es poco soluble en agua fría, mientras que es altamente soluble en agua a ebullición, observándose una

solubilidad de 20g/100ml por enfriamiento a 45°C. La cinética de disolución es notablemente lenta, pudiendo acelerarse dicha velocidad al incrementar la temperatura. Es insoluble en solventes orgánicos y, por lo tanto, precipitable con etanol o bien acetona (Vandamme y Derycke, 1983). Se ha observado (Mc Donald, 1946) que dependiendo de la forma en que es precipitada o bien del solvente en el que es disuelta, la inulina modifica su conformación, de manera que no precipita por enfriamiento. Por lo expuesto, podemos pensar en dos formas alternativas: una más soluble en frío que la restante y un equilibrio entre ambas. Su hidrólisis ácida se produce a altas temperaturas (80-100°C) a pH=1-2 durante una o dos horas, produciendo un 5% de difructosadianhídrido por la reactividad de la fructosa a esos valores de pH. La extracción de inulina a partir de tubérculos de dalia, topinambur u otra planta de la misma familia es relativamente sencilla (Figura 4). El rendimiento total es generalmente alrededor de un 10% sobre base total (75% agua, 25% materia seca), es decir un 40% sobre base seca, teniendo en cuenta que un 50% del peso seco es inulina. Esto es independiente de la fuente, siempre que los tubérculos se recolecten en el punto máximo de acumulación de fructanos, o sea, en otoño, cuando la planta entra en periodo de letargo.

La presencia de fructosanos en las plantas no muestra correlación alguna con la presencia o ausencia de almidón. Por ejemplo en el topinambur, las hojas contienen almidón y los tubérculos fructanos, mientras que en los cereales como el trigo, las hojas contienen fructanos y las semillas almidón. En algunas hojas en las cuales se encontraron fructosanos,

FIGURA 4: ESQUEMA DE EXTRACCION DE INULINA DE TUBERCULOS DE COMPUESTAS (*)



(*) Del Instituto de Botánica de San Pablo, Brasil

tales como los pastos *Iris spp.*, la síntesis de almidón se indujo por contacto de las mismas con una solución de sacarosa (Edelman y Jefford, 1968).

1.4. Hidrólisis enzimática de inulina

Es bien conocido que las plantas que acumulan inulina deben hidrolizarla para poder aprovechar sus propiedades de reserva. Esta hidrólisis puede desencadenarse por brotación, congelación, largos almacenamientos, o por la aparición en escena de una enzima involucrada en el proceso: inulinasa (β -(2,1)-fructanhidrolasa). Pero también desde 1900 se ha observado y estudiado el aprovechamiento de inulina por microorganismos ya sean levaduras, hongos o bacterias. Ya Grafe y Vouk en 1913 y Kluyver en 1914 probaron que la levadura *Kluyveromyces fragilis* crece a expensas de inulina, lo mismo que una inulinasa de *Aspergillus niger* fue descrita en 1924 por Pringsheim y Kohn. Ahora, si bien se había comprobado actividad inulinasa, existía la duda de que fuera una invertasa encubierta, debido a que se había encontrado actividad sobre sacarosa, inulina, rafinosa, irisina, gentianosa y estaqueosa. Recién en 1943 Adams logró dilucidar el dilema al determinar actividades inulinasa e invertasa independientes, tanto en pH como temperatura óptimos, en los mismos preparados enzimáticos. Fue a partir de ese momento que los reportes sobre inulinasas microbianas fueron incrementándose aceleradamente (Grootwassink, 1980; Zittan, 1981; Vandamme, 1983; Uhm, 1985 y 1987; Allais, 1986 y 1987; Efstathiou, 1986; Parekh, 1986; Ettalibi, 1990). Sin embargo, solamente dos hacen referencia a actividades inulinasa en el género *Bacillus*

(Uhm, 1985 y Allais, 1987).

Desde que se comprobó la existencia de una β -fructofuranosidasa específica para inulina, la búsqueda de una enzima termoestable capaz de ser utilizada industrialmente para la producción de jarabes de 95% en fructosa, fue y es incesante. La idea de obtener un edulcorante de mejor rendimiento que los existentes en el mercado, en un solo paso, por acción de una sola enzima, a partir de una materia prima abundante en la naturaleza y de fácil extracción, conforma una justificación más que lógica para fundamentar su estudio.

Ya hemos hablado de las ventajas de las enzimas microbianas para los intereses comerciales de las industrias. Pero, ¿cuál es la enzima adecuada? ¿De un hongo, una levadura o una bacteria? Para seleccionarla hay que tener en cuenta ciertos requisitos a cumplir:

1. alta termoestabilidad durante el tiempo requerido para el proceso de hidrólisis;
2. temperatura óptima mayor de 45°C;
3. alta producción y fácil recolección a partir de cultivos celulares obtenidos en un medio de simple formulación; y
4. el microorganismo productor no debe ser patógeno ni liberar ningún tipo de toxina, de manera que no contamine el preparado enzimático a utilizarse en la industria alimenticia.

Los dos primeros pueden cumplirlos la inulinasa de cualquier microorganismo que presente cierta termorresistencia o bien sea termófilo. El tercer requisito circunscribe a aquellos microorganismos productores que exporten la enzima al medio con un alto rendimiento. Por último el cuarto descarta

aquellos microorganismos que sean perjudiciales para la salud como los hongos productores de aflatoxinas u otras micotoxinas. Por todas estas razones el enfoque del estudio desarrollado en este trabajo de tesis se concentró en la selección y caracterización de una inulinasa bacteriana, perteneciente a una cepa no patógena, aislada de fuentes naturales y que, a su vez, sea exportable y termoestable.

1.5. El género *Bacillus* y su aplicación en la industria

Dentro de las Eubacterias, el género *Bacillus* ha sido el grupo de microorganismos elegido para la producción comercial de grandes cantidades de enzimas hidrolíticas solubles y relativamente estables, como por ejemplo: amilasas, proteasas, glucanasas y lipasas. Las cepas industriales son capaces de excretar en gran escala enzimas durante un período relativamente largo mediante el flujo constante de nutrientes frescos. Este género se caracteriza por ser aerobio, formador de endosporas y Gram positivo cuando las células son "jóvenes". ¿Qué es lo que lo hace atractivo para sustituir a *Escherichia coli* en los procesos industriales? Además de sintetizar copias múltiples de proteínas recolectables sin lisis celular, inevitable en *Escherichia coli*, este cocobacilo Gram negativo contiene endotoxinas que deben eliminarse luego del proceso fermentativo.

Bacillus subtilis fue, en un principio, la especie más utilizada en las últimas décadas, pero actualmente está siendo reemplazado por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus stearothermophilus*, los cuales han demostrado una mayor capacidad de producción enzimática además de

una alta termoestabilidad (Ingle y Boyer, 1976; Sonnleiter y Fiechter, 1983; Mèzes y Lampen, 1985). Sin embargo, según Priest (1977), las cuarenta y ocho especies descritas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology secretan una gran variedad de enzimas extracelulares solubles, las cuales reflejan la diversidad de hábitats (Tabla 2). Amilasas que pueden hidrolizar almidón bajo presión a 110°C y proteasas estables y activas a pH=12 son ejemplos extremos de la adaptación enzimática.

Lo observado generalmente en cultivos celulares en lote es que la máxima síntesis de enzimas extracelulares ocurre antes de la esporulación, es decir, durante las fases exponencial tardía y estacionaria temprana. Por lo tanto, en células en plena división celular, las llamadas "jóvenes", es un hecho encontrar la actividad enzimática ligada a la membrana celular. Durante años, los estudios se han volcado hacia la relación existente entre los fenómenos de esporulación y síntesis de exoenzimas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la transición de fase exponencial a fase estacionaria se produce por cambios en las condiciones de cultivo que pueden desreprimir algunos genes reprimidos (Priest, 1977), por lo que puede no haber relación alguna con el proceso de esporulación. El aislamiento de mutantes de esporulación (*spo-*) y de síntesis de exoenzimas han aclarado en parte el nudo del misterio. Algunas exoenzimas son necesarias y complementarias al proceso de esporulación, como las proteasas, por lo que mutantes *spo-* son además deficientes en su síntesis. Por otro lado, la síntesis de enzimas independientes de la esporulación, como amilasas, no es

afectada por una mutación en los genes *spo*.

Todos estos aportes al conocimiento del género *Bacillus* ayudan a manipular los microorganismos en nuestro beneficio, teniendo en cuenta, además, que la mayor parte de las especies no presentan patogenicidad para la especie humana.

TABLA 2: ENZIMAS EXTRACELULARES DEL GÉNERO *Bacillus*
(Priest, 1973)

ENZIMA	ESPECIES	ENZIMA	ESPECIES
1. Carbohidrasas		2. Proteasas	
Agarasa	<i>Bacillus</i> sp.	Froteasa alcalina	<i>Bacillus</i> spp. alcalófilos
α-Amilasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Aminopeptidasa	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. caldolyticus</i>		<i>B. subtilis</i>
	<i>B. licheniformis</i>	Esterasa	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. macerans</i>	Proteasa halofílica	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>B. stearothermophilus</i>	Metaloproteasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>
	<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>		<i>B. licheniformis</i>
	<i>Bacillus</i> spp. alcalófilos		<i>B. megaterium</i>
β-Amilasa	<i>B. cereus</i>		<i>B. polymyxa</i>
	<i>B. megaterium</i>		<i>B. subtilis</i>
	<i>B. polymyxa</i>		<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosac</i>
	<i>Bacillus</i> spp. alcalófilos		<i>B. thermoproteolyticus</i>
Arabinasa	<i>B. subtilis</i>		<i>B. thuringiensis</i>
Celulasa	<i>B. brevis</i>	Serinaproteasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	<i>B. firmus</i>		<i>B. liqueniformis</i>
	<i>B. polymyxa</i>		<i>B. pumilus</i>
	<i>B. pumilus</i>		<i>B. subtilis</i>
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosac</i>
Quitinasa	<i>B. circulans</i>	Serina-metaloproteasa	<i>B. licheniformis</i>
Quitosanasa	<i>B. sp. R-4</i>		<i>B. pumilus</i>
Ciclodextrin-glucano transferasa	<i>B. macerans</i>	3. Penicilinasas	
	<i>B. megaterium</i>	β-Lactamasa	<i>B. anthracis</i>
	<i>B. spp. alcalófilos</i>		<i>B. cereus</i>
Dextranasa	<i>B. megaterium</i>		<i>B. liqueniformis</i>
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. megaterium</i>
Galactanasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Penicilina amidasa	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>	4. Nucleasas y fosfatasa	<i>B. megaterium</i>
α-1,3-Glucanasa	<i>B. circulans</i>	Fosfatasa alcalina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	<i>B. polymyxa</i>		<i>B. cereus</i>
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. subtilis</i>
	<i>Bacillus</i> spp. alcalófilos		<i>Bacillus</i> sp. alcalófilo
α-1,6-Glucanasa	<i>B. circulans</i>		<i>B. amyloliquefaciens</i>
Isoamilasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Deoxirribonucleasa-ribonucleasa	<i>B. cereus</i>
	<i>B. polymyxa</i>		<i>B. pumilus</i>
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. subtilis</i>
Levansacarasa	<i>B. pumilus</i>	3-Nucleotidasa	<i>B. subtilis</i>
Liquenasa	<i>B. subtilis</i>	5-Nucleotidasa	<i>B. cereus</i>
Maltasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>		<i>B. megaterium</i>
Mananasa	<i>B. circulans</i>		<i>B. subtilis</i>
Pectatoliasa	<i>B. polymyxa</i>		<i>Bacillus</i> spp.
	<i>B. pumilus</i>	5. Enzimas bacteriolíticas	
	<i>B. sphaericus</i>	Endo-N-acetilglucosa-aminidasa	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. stearothermophilus</i>	Exo-N-acetilglucosaminidasa	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. subtilis</i>	Endo-N-acetilauramidasa	<i>B. subtilis</i>
	<i>Bacillus</i> spp. alcalófilos	Exo-N-acetilmuramidasa	<i>B. subtilis</i>
Fosfoanasa	<i>B. circulans</i>	N-acetil-muramyl-L-alanina amidasa	<i>B. licheniformis</i>
Felulanasa	<i>Bacillus</i> sp. alcalófilo		<i>B. subtilis</i>
Xilanasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>		
	<i>B. firmus</i>		
	<i>B. polymyxa</i>	6. Lipasa	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. subtilis</i>	7. Fosfolipasa C	<i>B. anthracis</i>
	<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>		<i>B. cereus</i>
			<i>B. thuringiensis</i>
		8. Tiaminasa	<i>B. thiaminolyticus</i>

2. OBJETIVOS

Obtención de una cepa bacteriana termorresistente, aislada a partir de ecosistemas naturales, capaz de producir una actividad inulinasa tal que resulte aplicable en la producción de jarabes de fructosa, a partir de inulina, a escala industrial.

3. RESUMEN

El trabajo de tesis realizado consistió en:

- a. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de inulinasas, termófilas o termorresistentes, a partir de ecosistemas naturales.
- b. Estudios de producción en lote para la selección de la cepa adecuada, a partir de medios de cultivo sintéticos y de composición sencilla.
- c. Caracterización de la actividad enzimática encontrada en la cepa productora con mayor rendimiento, incluyendo localización, fraccionamiento, estabilidad y determinación de los parámetros cinéticos, además de las condiciones tales como termoestabilidad, comportamiento con distintos sustratos, acción de inhibidores y peso molecular estimado.
- d. Diseño experimental, a escala de laboratorio, de un proceso de hidrólisis enzimática de inulina a partir de extractos acuosos de topinambur, en contacto con la inulinasa de *Bacillus subtilis* 430A inmovilizada en un soporte inerte.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Determinaciones analíticas

4.1.1. Determinación del número de bacterias

4.1.1.1. Por medición de Densidad Óptica (DO) a 560 nm: de muestras de 3 ml en un espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch & Lomb.

4.1.1.2. Por conteo de células viables en placa: 0,1 ml de diluciones seriadas al décimo fueron sembradas en placa con medio nutritivo por el método de rastrillado con espátula de Drigralsky e incubadas de 24 a 48 horas a 45°C. El resultado se expresó en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) / ml cultivo.

4.1.2. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por colorimetría mediante el método de neocuproína (Dygert, 1965). El método consiste en la reacción de reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} en medio alcalino, con la consecuente oxidación de los azúcares, siendo complejado el ión Cu^{+} por neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina). El color del quelato es naranja y tiene su pico de absorbancia a 450 nm. La calibración se realizó con una solución patrón de fructosa (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en solución saturada de ácido benzoico.

4.1.3. Determinación de fructosa total

Fructosa total se determinó por el método colorimétrico descrito por Bacon (1948), Gray (1950) y Roe (1934) basado en la reacción de Selinwanoff para cetosas, utilizando resorcinol en presencia de ácido clorhídrico. La solución patrón de fructosa (500 µg/ml) en solución saturada de ácido benzoico se utilizó para su calibración. El color desarrollado experimenta un pico de absorción a 540 nm.

4.1.4. Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método colorimétrico de Bradford modificado por Sedmak (Sedmak y col., 1977). Se basa en la reacción de la unión peptídica con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 disuelto en HClO₄ 0,3 M, que desarrolla color azul detectable por medición de absorbancia a 595 nm. La calibración se realizó con una solución de albúmina bovina fracción V (Sigma) 1 mg/ml.

4.2. Determinación de actividad enzimática

La actividad inulinasa se determinó en una mezcla de reacción con: enzima 0,1 ml, inulina 4% (p/v) 0,05 ml, para lograr condiciones de saturación. Luego de una incubación de una hora a 45°C (salvo en casos indicados), se calculó la cantidad de azúcares reductores formada por hidrólisis del polímero (no reductor).

Se definió una Unidad Enzimática (UE) como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcar reductor (como fructosa) por minuto en las condiciones dadas.

Cabe aclarar que en el caso de mediciones sobre células enteras, a la mezcla de reacción se agregó NaN_3 (azida sódica) a una concentración final de 0,03% (p/v), de manera de inhibir el crecimiento bacteriano.

4.3. Aislamiento de bacterias productoras de inulinasas

4.3.1. Medio de cultivo.

El medio de cultivo (IM) fue formulado de acuerdo al propuesto por Snyder y Phaff (1960) para levaduras, con las modificaciones pertinentes para favorecer el crecimiento bacteriano. Este contiene por litro: K_2HPO_4 1,0 g; hidrolizado de caseína 0,5 g; NaCl 0,1 g; CaCl_2 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; inulina 10-20 g; en los casos necesarios agar-agar 20 g como agente gelificante (IA). Además de estos componentes principales se agregó una solución de vitaminas del complejo B, de manera de lograr una concentración final de: clorhidrato de tiamina 2 ppm; piridoxal 0,5 ppm; riboflavina 2 ppm; ácido p-aminobenzoico 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ácido fólico 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ácido nicotínico 1 ppm; biotina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y una solución de elementos traza a una concentración final de: 0,5 ppm en B y Fe y 0,01 ppm en Zn, Mo, Co y Cu. El pH final se ajustó entre 6,8 y 7,0.

4.3.2. Relevamiento de cepas productoras

La búsqueda de cepas bacterianas capaces de degradar inulina se dirigió a tierra de rizósfera y raíces en descomposición de plantas de la familia *Compositae*, que acumulan el polímero. La Tabla 3 compila las muestras tomadas

TABLA 3: MUESTREO REALIZADO PARA EL RASTREO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE INULINASAS

FUENTE	ORIGEN
Vernonia herbacea (Vell Rusby)	San Pablo, Brasil
Diente de león	Moreno, Provincia de Buenos Aires
Dalia	Buenos Aires, Argentina
Vernonia herbacea (Vell Rusby)	Vicente López, Proia. de Buenos Aires
Diente de león	Ciudad Universitaria, Buenos Aires
Diente de león	Villa Gesell, Argentina

y su procedencia.

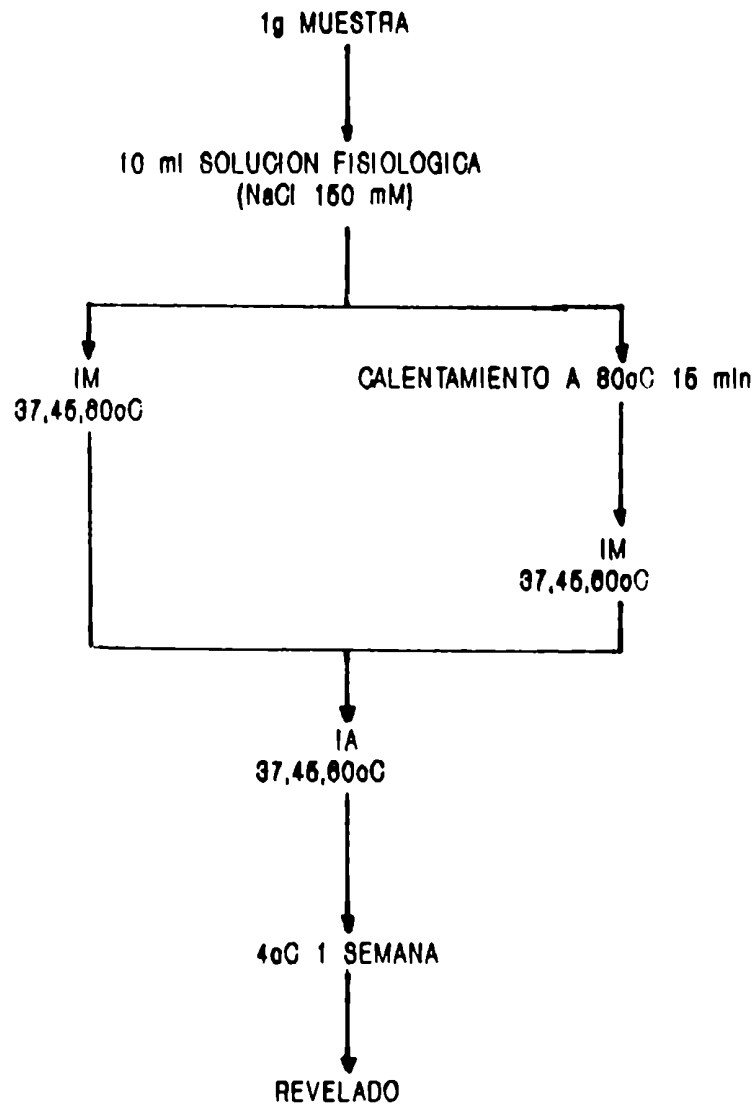
El esquema del relevamiento efectuado se resume en la Figura 5. De manera de obtener inulinasas termoestables, se favoreció la selección de cepas que fueran termorresistentes o termófilas y, además, microorganismos formadores de esporas. Después de suspender 1 g de muestra en 10 ml de SF (NaCl 150 mM). ésta se dividió en dos porciones:

Una parte se inoculó en caldo IM en una relación 1:10 mientras que la otra se calentó 15 minutos a 80°C con el objeto de seleccionar esporas para luego inocular de la misma manera. La incubación se realizó a 37°C, 45°C y 60°C durante 48 horas. A partir de estos caldos enriquecidos, se estriaron placas de medio IA. Luego de una incubación en las mismas condiciones, se procedió a su revelado. Este consistió en almacenar las placas a 4°C, por lo menos una semana, tiempo mínimo requerido para que la inulina precipite y se evidencien los halos de hidrólisis alrededor de las colonias productoras (Figura 6). A partir de ellas se obtuvieron cultivos puros por re-estriado en placa. Los mismos se denominaron según su origen, temperatura de aislamiento y si la muestra fue pasteurizada o no.

4.3.3. Selección de la cepa mejor productora

Los estudios de producción y crecimiento en lote de las cepas seleccionadas en placa, por su mayor halo de hidrólisis, se realizaron a 45°C, en baño con agitación. Para cada valor de tiempo, de intervalos de una hora, se determinó el nivel de azúcares reductores, así como el crecimiento bacteriano.

FIGURA 5: RELEVAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE INULINASAS



4.3.4. Identificación de la cepa bacteriana seleccionada

El microorganismo elegido como mejor productor de inulinasa a la mayor temperatura posible, fue identificado según pruebas bioquímicas recomendadas, con los controles adecuados (Norris, 1981 y Sneath, 1986) y el sistema API (API



FIGURA 6: REVELADO DE COLONIAS PRODUCTORAS DE INULINASAS

50 CHB, Appareils et Procédés d'Identification System S.A., Vercieu, Francia), utilizando *Bacillus subtilis* ATCC6633 como especie tipo.

4.4. Estudios sobre la cepa seleccionada *Bacillus subtilis* 430A y la actividad inulinasa encontrada

4.4.1. Optimización de temperatura y concentración de sustrato en cultivos en lote de *Bacillus subtilis* 430A

El crecimiento y producción de los niveles de azúcares reductores se evaluaron en función del tiempo a: 37°C, 45°C, 50°C y 55°C, lo mismo que en concentraciones de inulina de: 0,05%, 0,10%, 0,25%, 0,50% y 1,00% (p/v) a 45°C de manera de definir el punto máximo para ambos parámetros, a lo largo de cultivos en lote. Se inoculó, en todos los casos un 10% del volumen de medio a partir de un cultivo de 18 horas en igual

volumen de medio a partir de un cultivo de 18 horas en igual medio de cultivo.

4.4.2. Estudios de producción de actividad inulinasa en cultivos en lote de *Bacillus subtilis* 430A

Con las condiciones óptimas de crecimiento en lote, es decir 45°C, 1%(p/v) de inulina, con agitación, un inóculo de 1:10 de un cultivo de 18 horas, se evaluó y caracterizó la actividad inulinasa. Para cada valor de tiempo, en intervalos de una hora, se determinó crecimiento bacteriano, pH, azúcares reductores y actividad enzimática, tanto en sobrenadantes de cultivo como en células enteras resuspendidas en buffer fosfato 0.05 M de pH=7.

4.4.3. Condiciones de cultivo en lote de *Bacillus subtilis* 430A para la recolección de la enzima

Se inoculó *Bacillus subtilis* 430A al 10% (v/v) en un fermentador Gallenkamp de medio litro de capacidad (volumen de medio 150 ml) y fue incubado a 45°C, pH constante mantenido con NH_3 1.5 N, agitación 8 y aireación 600 cm^3/min . Cuando el cultivo arribó a fase estacionaria temprana, correspondiente a una $\text{DO}_{500\text{nm}}$ entre 1.5 y 2.0, que equivale a aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC/ml, fue recolectado y centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana Millipore de 0,2 μm de diámetro de poro, mientras que las células se resuspendieron en 1/10 volúmenes de buffer fosfato 0,05 M pH=7. Ambas fracciones se utilizaron como fuente de enzima.

4.4.4. Fraccionamiento celular para la localización de la actividad inulinasa en *Bacillus subtilis* 430A

Para ubicar la actividad inulinasa endocelular obtenida, se procedió al fraccionamiento expuesto en la Figura 7. Todos los residuos de centrifugación fueron resuspendidos en buffer fosfato 0,05 M pH=7 y pH=8, para luego determinar actividad enzimática en cada una de las fracciones obtenidas.

4.4.5. Purificación parcial de la enzima

A partir de sobrenadantes de cultivo de *Bacillus subtilis* 430A ($2,3 \times 10^9$ UFC/ml) se probaron distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona (20, 40, 60 y 80% (v/v)) como agentes precipitantes, para un único paso de purificación. El precipitado obtenido por centrifugación a $10.000 \times g$ se resuspendió en igual volumen de buffer fosfato 0,05 M pH=7, salvo en el caso de determinación de pH óptimo de actividad. El extracto fue utilizado como fuente de enzima para los estudios que siguen, excepto en los casos específicamente indicados.

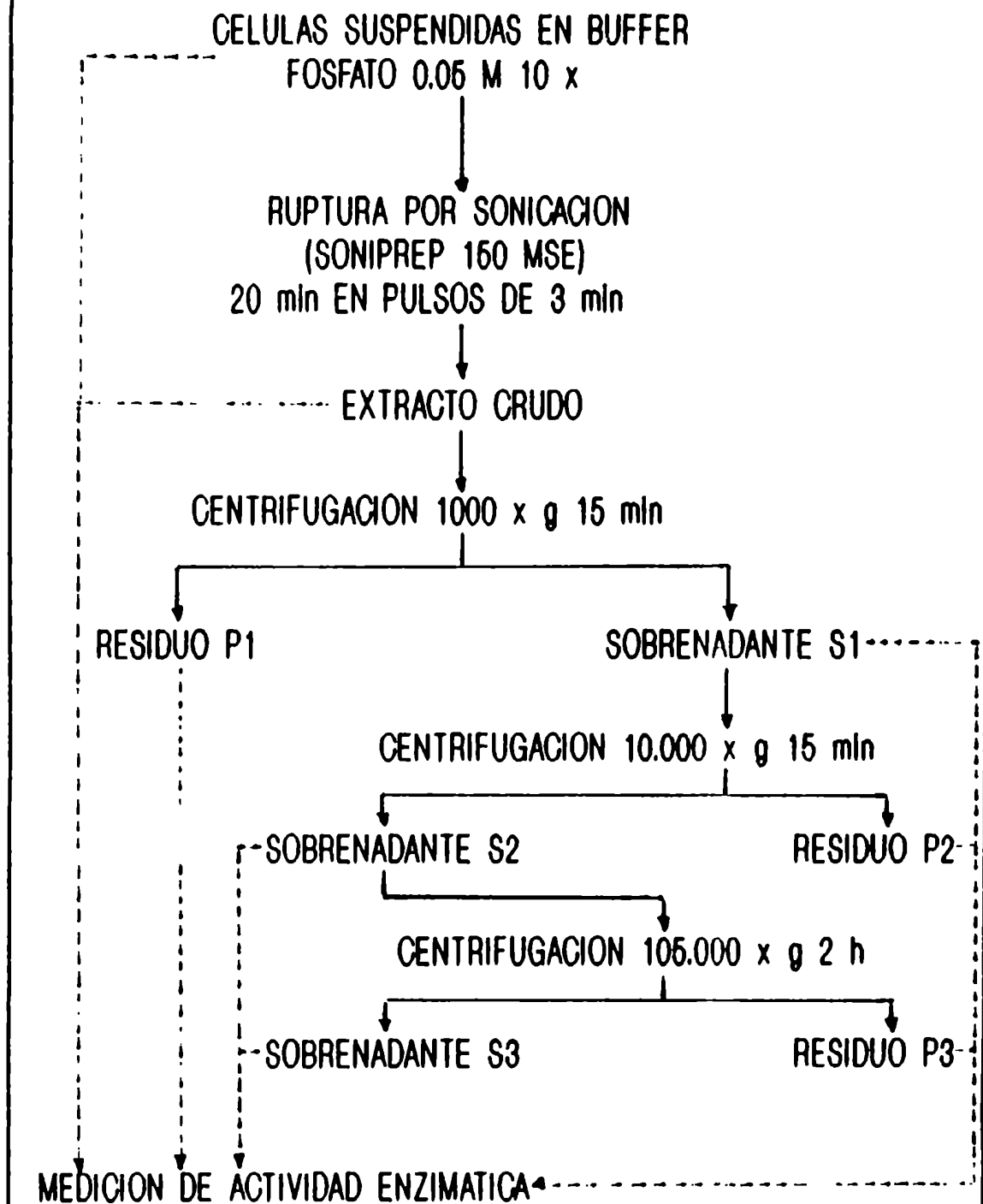
4.4.6. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se determinó actividad inulinasa a 0°C, 2°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C por incubación durante una hora.

4.4.7. Determinación del pH óptimo de actividad inulinasa.

La actividad inulinasa se verificó en un rango de pH desde 3,75 hasta 5,5 con buffer ácido acético acetato de Na 0,1 M y desde pH 5,8 hasta 8,0 con buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1

FIGURA 7: FRACCIONAMIENTO CELULAR DE *Bacillus subtilis* 430A



M a 45°C.

4.4.8. Estabilidad térmica de la actividad enzimática

Se evaluó la estabilidad enzimática en presencia de sustrato, por la liberación de poder reductor, a lo largo de siete horas y a 45°C, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C, con el objeto de estudiar su posible utilización industrial por la persistencia térmica. Este estudio se realizó tanto con sobrenadantes de cultivo como con enzima parcialmente purificada.

4.4.9. Determinación de la temperatura de inactivación enzimática

Por medición de actividad inulinasa a 26°C, 30°C, 37°C, 40°C, 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C, 60°C y 65°C y aplicando una aproximación de la ecuación de Arrhenius (1)

$$\ln k_r = -\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (1)$$

donde k_r es la constante de velocidad de la reacción (actividad específica), E_a es la energía de activación de la reacción, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Así se puede calcular la temperatura de inactivación de la enzima por un cambio de signo en $-E_a/R$, pendiente de la recta resultante de graficar $\ln k_r$ vs. $1/T$ (Alba y col., 1965).

4.4.10. Efecto de metales y complejantes sobre la actividad

Se midió actividad inulinasa agregando a la mezcla de reacción distintas concentraciones de los iones: Hg^{2+} entre

10^{-4} y 10^{-8} M; Ag^+ entre 10^{-4} y 10^{-8} M; Cu^{2+} entre 10^{-3} y 10^{-8} M; Na^+ entre 7.5×10^{-2} y 10^{-3} M; Ca^{2+} 7×10^{-2} y 10^{-4} M; Co^{2+} entre 10^{-2} y 10^{-4} M; Zn^{2+} entre 10^{-2} y 10^{-4} M; Mg^{2+} entre 10^{-2} y 10^{-4} M; K^+ (10^{-1} y 10^{-2} M); Fe^{3+} (10^{-3} y 10^{-4} M); Mn^{2+} (10^{-3} M); Ba^{2+} (10^{-2} y 10^{-4} M) y los quelantes: EDTA entre $2,4 \times 10^{-2}$ y 10^{-3} M y EGTA (10^{-2} y 10^{-3} M).

4.4.11. Especificidad de sustrato

4.4.11.1. Comportamiento de la enzima frente a distintos sustratos

Además de medir actividad enzimática utilizando inulina, se eligieron otros sustratos que poseyeran el mismo tipo de unión glicosídica (por lo menos una), tales como: sacarosa (α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido), melezitosa (O- α -D-glucopiranosil-[1-3]-O- β -D-fructofuranosil-[2-1]- α -D-glucopiranosido) y rafinosa (O- α -D-galactopiranosil-[1-6]- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido), todos en la misma concentración para comparar la liberación de poder reductor.

4.4.11.2. Determinación de parámetros cinéticos: K_m y V_m

Tomando como base la cinética de reacción enzimática descrita por Michaelis-Menten, se midieron las velocidades iniciales de la reacción de hidrólisis, pendientes de las rectas al origen de las curvas Producto vs. Tiempo de incubación. Luego, mediante el gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidades iniciales vs. } 1/\text{concentración de sustrato}$), se determinaron los valores de K_m (inverso de la constante de afinidad) y V_m (velocidad máxima de la reacción) para inulina

y sacarosa como sustratos.

4.4.12. Efecto del producto final

Como el producto final es la fructosa, se agregaron distintas concentraciones del monosacárido a la mezcla de reacción, determinando la actividad enzimática inmediatamente después de su homogeneización. Las concentraciones ensayadas fueron de 0,0% a 0,3% (p/v).

4.4.13. Determinación del peso molecular aproximado

Se utilizó el método de filtración en geles Sephadex en una columna de 1,5 cm de diámetro por 20 cm de largo. Se rellenó con Sephadex G-100 Superfine (rango: 4.000-150.000 D), hinchado y suspendido en buffer fosfato 0,05 M pH=7. Alrededor de 10^{-1} Unidades Enzimáticas, parcialmente purificadas, se sembraron sobre la superficie del gel y se eluyó con el mismo buffer de relleno, recogiendo fracciones de 0,5 ml para su posterior medición de actividad enzimática. La columna fue calibrada previamente con azul dextrano 1% y una solución de CoCl_2 , de manera de determinar los parámetros V_0 (volumen muerto, no ocupado por el gel) y V_t (volumen total de la columna, incluido el gel). Además sobre la columna de Sephadex G-100 se procedió a la calibración de los volúmenes de elución (V_e) con respecto al peso molecular de la proteína. Para ello se utilizaron dos patrones: albúmina bovina (BSA) fracción V (Sigma) de PM=66.000 D y citocromo c de PM=13.300 D. Aplicando la ecuación

$$V_e/V_0 = \log \text{PM} \times k_1 + k_2$$

se determinaron k_1 y k_2 , para luego calcular el PM de la

molécula incógnita.

4.5. Diseño de un proceso de hidrólisis

Se diseñaron dos procesos de hidrólisis dependiendo del tratamiento realizado sobre la enzima:

4.5.1. Proceso en medio líquido

El extracto enzimático parcialmente purificado (51 UE/ l) se incubó a 45°C a lo largo de veinte horas en presencia de inulina en dos concentraciones iniciales: 12% (p/v) (solución saturada a dicha temperatura) y 4% (p/v), para medir finalmente el grado de hidrólisis según:

$$\% \text{hidrólisis} = \% \text{azúcar reductor formado} / \% \text{fructosa total} \times 100$$

Cada reacción se realizó en paralelo con un control sin enzima, de manera de poder determinar el nivel inicial de azúcar reductor.

4.5.2. Proceso con enzima fija en un soporte inerte (inmovilizada)

4.5.2.1. Inmovilización de la enzima

La enzima parcialmente purificada se inmovilizó en una matriz inerte de agar-agar de la siguiente manera: iguales volúmenes de agar 4% (p/v) y enzima, mantenidos a 45°C, se homogeneizaron rápidamente y se enfriaron hasta solidificación. Luego el gel se fraccionó en pequeños cubos y se utilizaron en esa forma para ensayar hidrólisis sobre un extracto acuoso de tubérculos de topinambur, que contiene 0,92% (p/v) en fructanos. Como conservante se utilizó NaNa

0.03% (p/v).

4.5.2.2. Hidrólisis propiamente dicha

Se usaron dos variantes de hidrólisis por lote: la primera se probó en tubo, mientras que la segunda en un sistema compuesto por una columna termostaticada, simulando un reactor. La diferencia entre ambas residió en la facilidad y eficiencia del lavado con buffer fosfato 0,05 M pH=7, que presentó el sistema de columna termostaticada debido a la existencia de las dos aberturas. La reacción en tubo se realizó según: cubos de agar con la enzima atrapada en un volumen aproximado de 3 ml, se incubaron durante 16 horas y media a 45°C con 4 ml de sustrato, al cabo de las cuales se determinó el porcentaje de hidrólisis. La reacción en columna se realizó de la siguiente manera: con la enzima atrapada en cubos de agar de un volumen aproximado de 10 ml, se relleno una columna de 1,5 cm de diámetro por 20 cm de largo, inserta en un refrigerante conectado a un termostato que hacia circular agua a 45°C. Se evaluó el porcentaje de hidrólisis tanto a las 8 como a las 16 horas de incubación. Tanto para la reacción en tubo como en columna se probaron dos ciclos sucesivos separados entre sí por lavados del gel con buffer fosfato 0,05 M pH=7, con el objeto de verificar pérdidas de actividad enzimática.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de bacterias productoras de inulinasas

5.1.1. Relevamiento de cepas productoras

Los resultados del relevamiento efectuado se resumen en la Tabla 4. A partir de las muestras tomadas, por duplicado o triplicado, detalladas en la Tabla 3, se logró aislar 30 cepas bacterianas capaces de crecer en medio IA. Entre ellas, solamente tres (330B, 1'30A y 430A), provenientes de rizósfera de *Vernonia herbacea* (Vell Rusby), fueron productoras de los mayores y únicos halos transparentes de hidrólisis a 45°C. Otros hidrolizaron el polímero sólo a 37°C (230A, 3'30B, 3'30A, 330C, 130D y 130C), ya que no crecieron a temperaturas mayores. Mientras tanto las cepas termófilas y DLVGPAST A y B no produjeron halos. Esto último da idea de la utilización de una fuente de carbono alternativa contaminante de la inulina (mono- y oligosacáridos), confirmado a través del tamaño pequeño de las colonias obtenidas. De manera de ponernos en las mejores condiciones respecto a la termorresistencia enzimática (por lo menos a 45°C), elegimos las cepa 330B, 1'30A y 430A para su estudio posterior.

5.1.2. Selección de la cepa mejor productora

Con el objeto de seleccionar una cepa altamente productora, se estudió la hidrólisis de la fuente de carbono a lo largo del crecimiento bacteriano en medio líquido. Las

TABLA 4: RELEVAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE INULINASAS

FUENTE	CEPA	CRECIMIENTO			
		37oC	45oC	60oC	
Rizósfera de Vernonia herbacea (Vell Rusby)	4'60A	-	+	+	
	1'60A	-	+	+	
	2'60A	-	+	+	
	560A	-	+	+	
	230A	+(H)	-	-	
	330B	+(H)	+(H)	-	
	3'30B	+(H)	-	-	
	430A	+(H)	+(H)	-	
	3'30A	+(H)	-	-	
	1'30A	+(H)	+(H)	-	
	330C	+(H)	-	-	
	130D	+(H)	-	-	
	130C	+(H)	-	-	
VernoTC	-	+	+		
Rizósfera de diente de león	DLVLTC1	-	+	+	
	DLVLTC2	-	+	+	
	DLVLPAST	-	+	+	
	DLCUTC1	-	+	+	
	DLCUTC2	-	+	+	
	DLCUPASTA	-	+	+	
	DLCUPASTB	-	+	+	
	DLCUPASTC	-	+	+	
	DLVGTC	-	+	+	
	DLVGPASTA	+	+	-	
	DLVGPASTB	+	+	-	
	Rizósfera de dalia	DALIATC		+	+
		DALIPASTA		+	+
DALIPASTB			+	+	
DALIPASTC			+	+	
DALIPASTD			+	+	

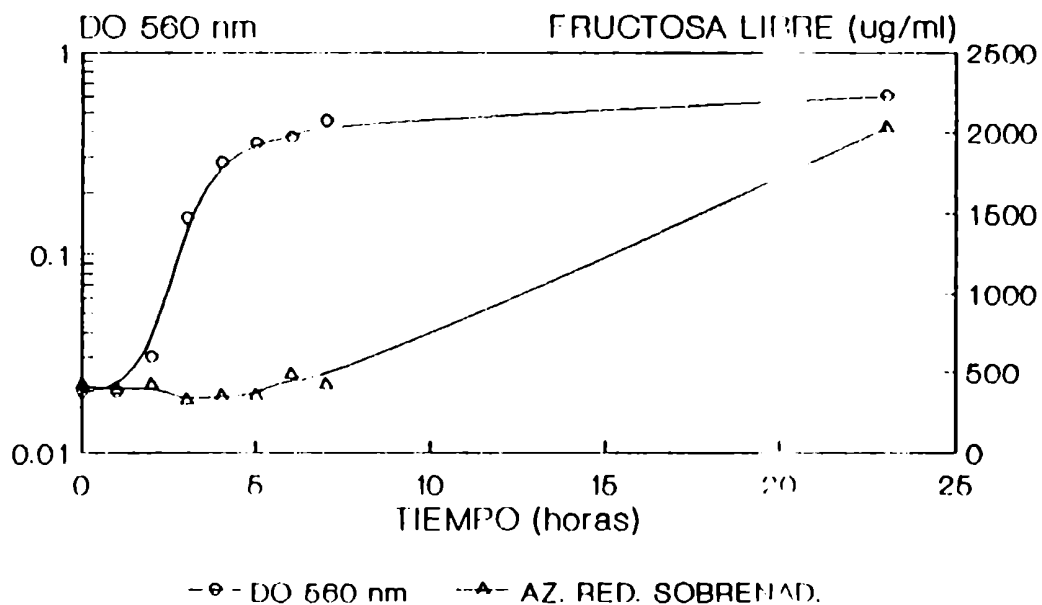
(H): colonias con halos de hidrólisis grandes y definidos.

curvas de crecimiento en lote de las cepas 430A, 330B y 1'30A se exponen en la Figura 8. De ellas podemos inferir que 430A produce azúcar reductor, en forma creciente a partir del sustrato, desde que comienza la fase estacionaria en adelante (luego de 5 horas de cultivo). En cambio 330B y 1'30A lo hacen en fase exponencial, con una disminución en fase estacionaria a valores iniciales y una DO final baja. Teniendo en cuenta el rendimiento cinco veces mayor y pensando en una posterior optimización de la producción, se eligió la cepa 430A como la mas adecuada.

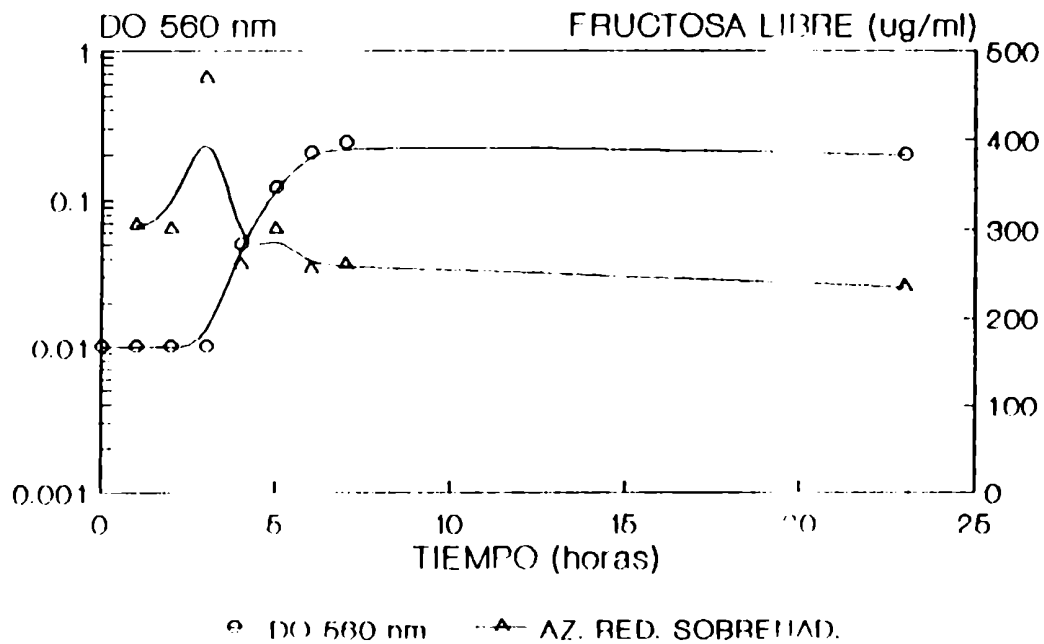
5.1.3. Identificación de la cepa 430A

A partir de los ensayos preliminares practicados, que incluyen pruebas morfológicas y bioquímicas resumidas en la Tabla 5A., y con la confirmación de las 49 pruebas del sistema API (Tabla 5B.), se dedujo que 430A es similar a *Bacillus subtilis*. Con respecto a la caracterización morfológica y bioquímica no existen diferencias entre 430A y *Bacillus subtilis* ATCC6633. De los 49 hidratos de carbono del sistema API, 430A utiliza N-acetilglucosamina como fuente de carbono, mientras que la cepa tipo no puede aprovecharla como tal. El hecho de existir solo una diferencia de todas las pruebas realizadas, la hace poco significativa dentro del contexto de la identificación. Además, dentro de la especie *subtilis*, este hidrato de carbono puede ser degradado por el 50% de las cepas estudiadas en el catálogo API. lo cual nos permite inferir el hecho de que se trata de una cepa perteneciente a la especie *subtilis*.

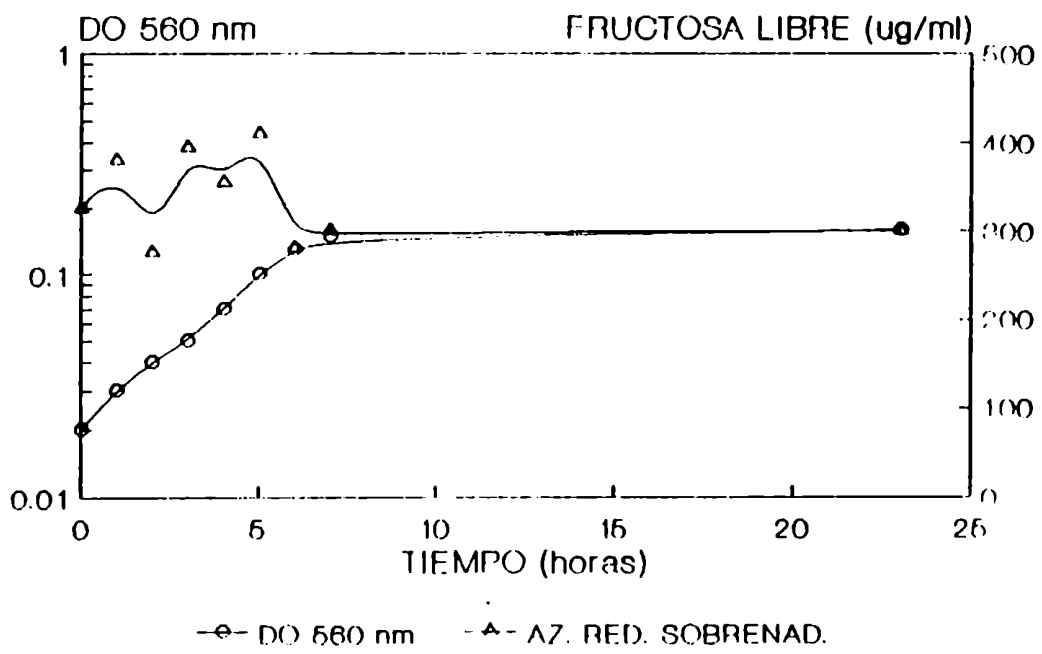
**FIGURA 8: CRECIMIENTO EN LOTE E
HIDROLISIS DE INULINA DE LAS CEPAS
SELECCIONADAS A 45°C**



a. 430A



b. 330B



c. 130A

TAFLA 5: IDENTIFICACION DE LA CEPA 430A

A.		B.		
ENSAYOS PRELIMINARES		B. subtilis ATCC6633	CEPA 430A	
		SISTEMA API	P. subtilis ATCC6633	
		CEPA 430A	CEPA 430A	
Morfología:		glicerol	+	+
Forma bacilar		eritritol	-	-
Gram		D-arabinosa	-	-
Formación de endosporas		L-arabinosa	+	+
Motilidad		ribosa	+	+
Formación de cadenas		D-xilosa	+	+
Esporas: elipsoidales		L-xilosa	-	-
esféricas		adonitol	-	-
cilíndricas		β -metilxilósido	-	-
centrales		galactosa		
subterminales		D-glucosa		
terminales		D-fructosa		
deformantes		D-manosa		
Inclusiones cristalinas		L-sorbose		
Pruebas bioquímicas:		rannosa		
catalasa		dulcitol		
Voges-Proskauer		inositol		
crecimiento en 7%NaCl		manitol		
hidrólisis de caseína		sorbitol		
hidrólisis de almidón		α -metil-D-manósido		
hidrólisis de gelatina		α -metil-D-glucósido		
reducción de nitrato		N-acetilglucosamina		
pH en medio VP >6		amigdalina		
crecimiento a 50°C		arbutina		
crecimiento a 65°C		esculina		
crecimiento anaerobio		salicina		
		celobiosa		
		maltosa		
		lactosa		
		melibiosa		
		sacarosa		
		trehalosa		
		inulina		
		melezitosa		
		D-rafinosa		
		almidón		
		glucógeno		
		xilitol		
		β -gentibiosa		
		D-turanosa		
		D-lixosa		
		D-tagatosa		
		D-fucosa		
		L-fucosa		
		D-arabitol		
		2-ceto-gluconato		
		5-ceto-gluconato		

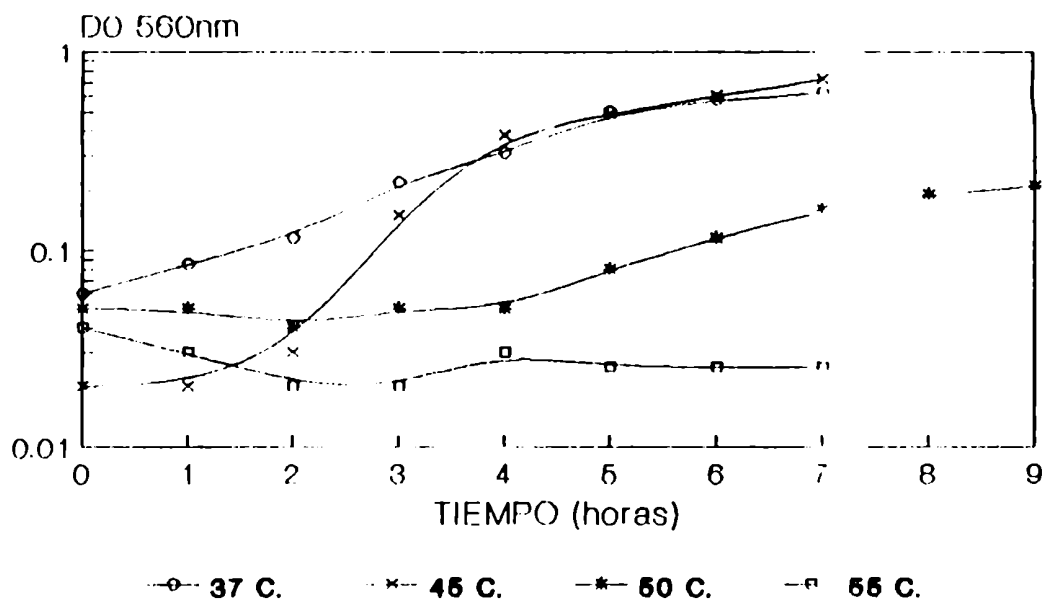
5.2. Estudios sobre la cepa seleccionada *Bacillus subtilis* 430A y su actividad inulinasa encontrada

5.2.1. Optimización de la temperatura y concentración de sustrato en cultivos en lote de *Bacillus subtilis* 430A

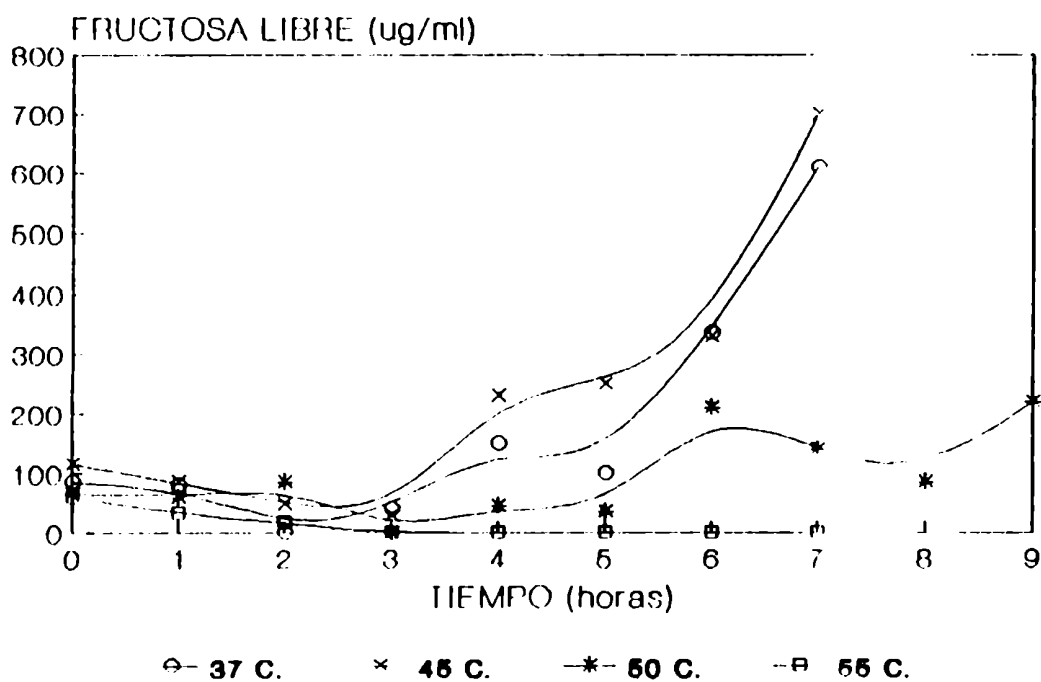
Las curvas de crecimiento en lote a distintas temperaturas corresponden a la Figura 9, de donde se ve claramente que la temperatura óptima de crecimiento ronda los 45°C, dado que la velocidad de crecimiento es mayor, traducida en una mayor pendiente de la fase exponencial. Además se obtuvo un mejor rendimiento en la hidrólisis de sustrato, a iguales tiempos de incubación (700 µg/ml de fructosa en 7 horas). Por otro lado, de la Figura 10 se deduce que la concentración óptima de inulina, tanto para hidrólisis como para crecimiento celular, es de 1% (p/v). El crecimiento bacteriano disminuye aceleradamente junto con la concentración de sustrato y, por supuesto, la producción de azúcares reductores. Es un hecho que al 1% (p/v), la inulina no es el factor limitante del crecimiento debido a la DO obtenida, lo mismo ocurre a menores concentraciones. Es de suponer entonces que la enzima es inducible y que la bacteria necesita una concentración mínima de azúcares de bajo peso molecular como para iniciar el crecimiento y consecuente síntesis enzimática. Estos azúcares se hallarían como contaminantes en la inulina, desde que es un producto natural.

5.2.2. Estudios de producción de actividad inulinasa en cultivos en lote de *Bacillus subtilis* 430A

FIGURA 9: OPTIMIZACION DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO E HIDROLISIS PARA LA CEPA 430A

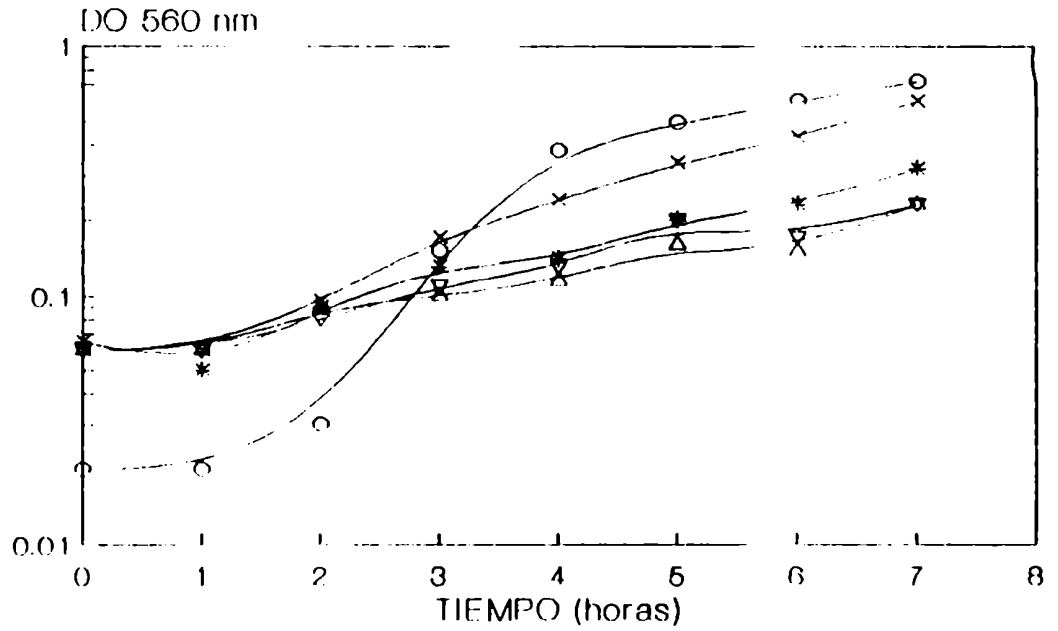


a. DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA

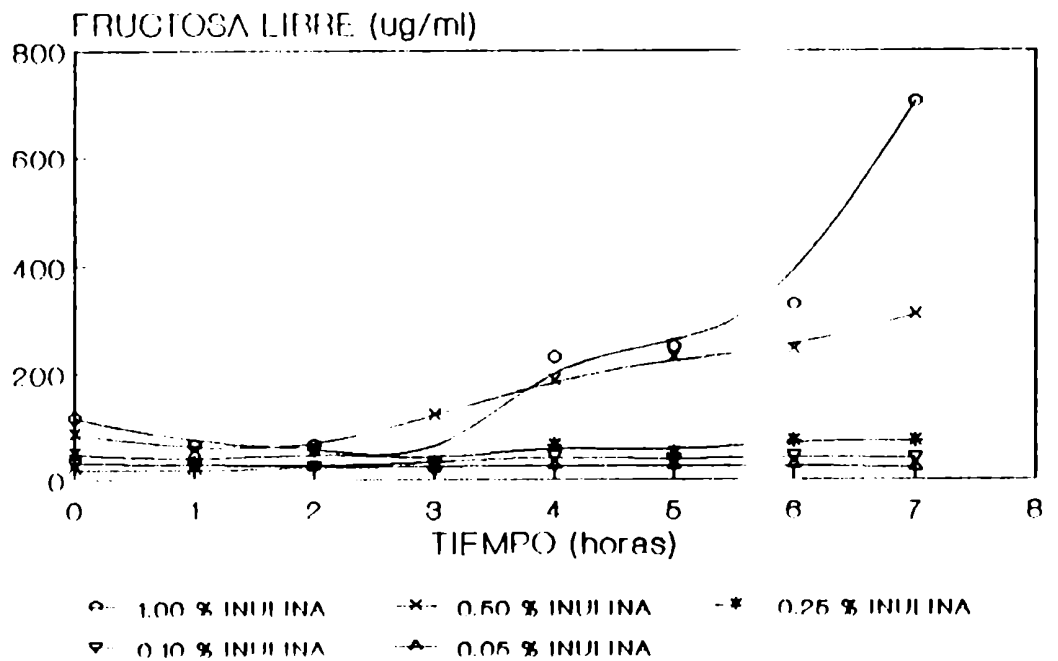


b. AZUCAR REDUCTOR EN SOBRENADANTE

**FIGURA 10: OPTIMIZACION DE LA
CONCENTRACION DE SUSTRATO (INULINA)
PARA LA CEPA 430A**



a. CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR A 45oC



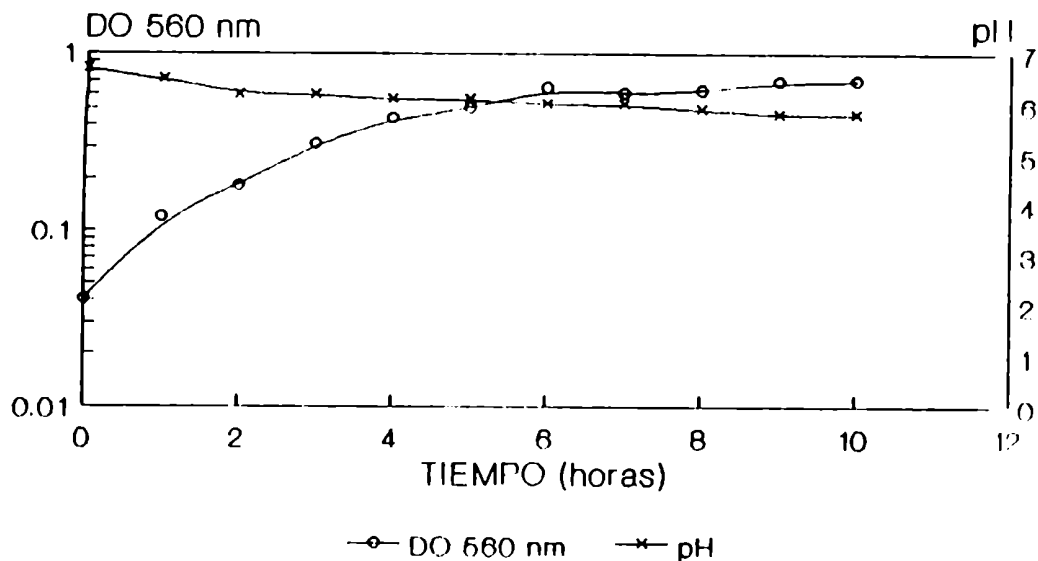
b. AZUCAR REDUCTOR EN SOBRENADANTE

Una vez establecidas las condiciones óptimas de concentración de inulina y temperatura, se determinó la curva de producción de actividad inulinasa, midiendo, además, la variación de pH del medio. En la Figura 11 se exponen los resultados obtenidos. No existe una gran disminución del pH del medio, el cual llega a un valor de 5,8 luego de 10 horas de incubación (Figura 11.a). Desde las 2 hasta las 7 horas de incubación a 45°C, o sea fase exponencial tardía y principios de fase estacionaria (Figura 11.a), se destaca una clara actividad inulinasa exocelular, que decae al entrar en fase estacionaria (15 UE/l en promedio, Figura 11.b). La actividad inulinasa endocelular se mantiene a lo largo de toda la curva de crecimiento bacteriano en un nivel basal (menor que 5 UE/l, Figura 11.b), evidenciándose un leve incremento de la misma en fase exponencial tardía y principios de fase estacionaria. El nivel de azúcares reductores se incrementa desde las 4 horas en adelante, señal de una activa hidrólisis en paralelo con una velocidad menor de consumo por parte del microorganismo (Figura 11.b).

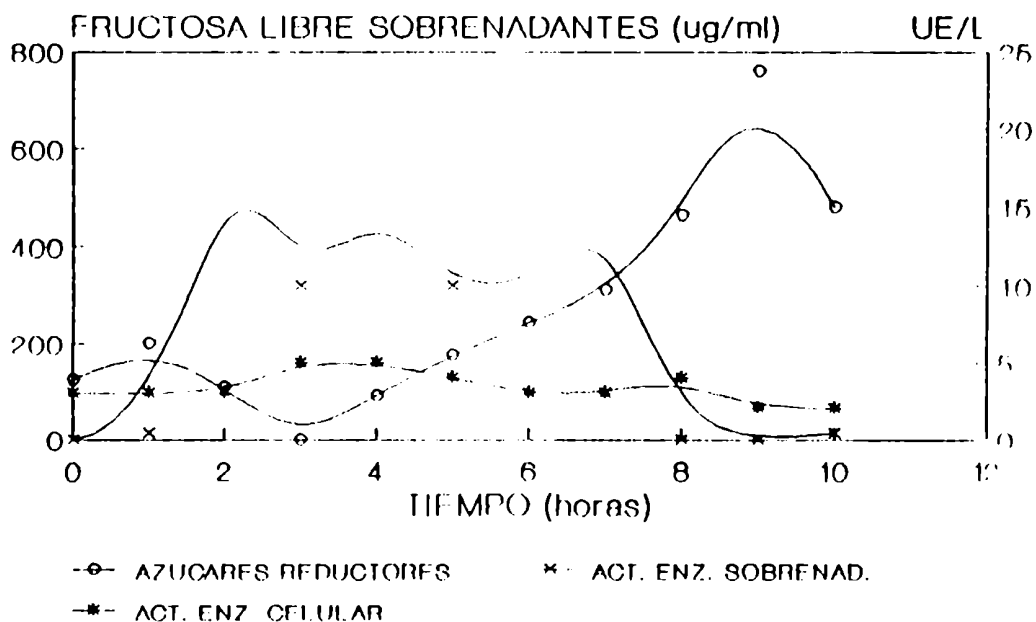
5.2.3. Fraccionamiento celular para la localización de la actividad inulinasa endocelular

De acuerdo con lo observado en la Figura 11.b, la actividad enzimática endocelular presenta un valor basal a lo largo del crecimiento bacteriano y la mayor concentración de enzima es exportada. Con el objeto de establecer con certeza la localización de la enzima endocelular, un cultivo bacteriano se sometió al tratamiento descrito en 4.2.4. Las fracciones obtenidas exhibieron una actividad inulinasa

FIGURA 11: ESTUDIO DE PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD INULINASA EN CULTIVOS EN LOTE DE *Bacillus subtilis* 430A A 45oC



a. CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y VARIACION DEL pH



b. CURVA DE HIDROLISIS Y PRODUCCION ENZIMATICA

detallada en la Tabla 6. Se ve claramente que las fracciones ensayadas a pH=8 poseen una menor actividad enzimática debido a que partimos de un cultivo cuyo número bacteriano es casi 10 veces menor ($3,0 \times 10^9$ UFC/ml) que las fracciones de pH=7 ($2,3 \times 10^9$ UFC/ml). Dicha justificación se verifica a través de la similitud en las actividades específicas obtenidas. A pesar de estas diferencias, en ambos casos un 70% de la actividad es exportada y del resto, un 9% se halla ligado a membrana citoplasmática, mientras que lo demás se encuentra en la fracción soluble, tanto periplásmica como citosólica.

5.2.4. Purificación parcial de la actividad enzimática

El resultado de la purificación de la actividad enzimática por precipitación, en un solo paso, a partir del sobrenadante de un cultivo de $2,3 \times 10^9$ UFC/ml, se resume en la Tabla 7. Se utilizaron dos agentes precipitantes. Con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 85% (p/v) de saturación se logró una precipitación con alto rendimiento, pero un grado de purificación de 4,4, que consideramos bajo para nuestros propósitos. Por otro lado, el hecho de tener que eliminar el residuo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el extracto obtenido por un proceso de diálisis disminuirían el alto rendimiento inicial. Por acción del otro agente, acetona, se concluye que con una precipitación con un 40% (v/v) se obtiene una actividad inulinasa purificada 13 veces y con un alto rendimiento, condiciones necesarias y suficientes para una inulinasa de grado industrial como la que se pretende obtener.

La obtención de rendimientos mayores al 100% no es extraño desde que en el sobrenadante de cultivo (fuente de

TABLA 6: ACTIVIDAD INULINASA EN FRACCIONES SUBCELULARES
DE *Bacillus subtilis* 430A

FRACCION	ACTIVIDAD ENZIMATICA (UE/l cultivo)		ACTIVIDAD ESPECIFICA (mUE/mg proteina)	
	pH=8	pH=7	pH=8	pH=7
cultivo (pH=8, 3.0×10^8 UFC/ml; pH=7, 2.3×10^9 UFC/ml)	6	29.6		
sobrenadante de 10.000 x g	11	25.2	380	360
células enteras	4	7.5	-	-
células sonicadas	4	11.0	-	-
sobrenadante de 1.000 x g (S1)	3	11.6	26	50
residuo de 1.000 x g (F1) (a)	0	0.8	-	-
sobrenadante de 10.000 x g (S2)	3	7.2	36	40
residuo de 10.000 x g (F2) (b)	0	2.0	-	-
sobrenadante de 105.000 x g (S3)	2	4.0	43	40
residuo de 105.000 x g (F3) (c)	0.3	1.0	-	-

(a): células enteras

(b): restos de paredes celulares y células rotas

(c): restos de membranas celulares

enzima) existen productos de la reacción de hidrólisis que pueden inhibir la actividad inulinasa, como se comprobó más adelante.

5.2.5. Determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad

Los perfiles de temperatura y pH conforman las Figuras 12 y 13 respectivamente. De ellos se deduce que la actividad inulinasa máxima se encuentra entre 45 y 50°C y a pH entre 6 y 7. Como la inulina es más soluble en agua desde los 45°C en adelante y estable a pH neutro, estas condiciones aparentemente son las adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial de hidrólisis. Es importante evitar, en la preparación de jarabes, la posible producción de anhídridos de fructosa a valores ácidos de pH y a temperaturas mayores de 50°C.

5.2.6. Estabilidad térmica de la actividad inulinasa

En la Figura 14 se detalla la cinética de estabilidad de la actividad inulinasa a distintas temperaturas de incubación, en presencia de inulina. En la Figura 14a. se verifica el efecto de la temperatura en sobrenadantes de cultivo, a través de una pérdida del 50% de actividad a lo largo de 7 horas, lo que hace suponer una inestabilidad debida a la presencia de proteasas, exportadas por el mismo microorganismo, o bien inhibidores, producto del metabolismo celular. Este hecho aportaría a la caída de la actividad exocelular, vista en la Figura 11.b luego de 7 horas de incubación. En la Figura 14b., en cambio, donde la enzima ha sido parcialmente purificada, la

TABLA 7: PURIFICACION PARCIAL DE LA INULINASA
EXOCELULAR DE *B.subtilis* 430A

AGENTE PRECIPITANTE	ACTIVIDAD ENZIMATICA (UE/l)	ACTIVIDAD ESPEC. (mUE/mg proteína)	R (%)	PUREZA
(NH ₄) ₂ SO ₄ 85% sat.	46	1.600	184	4,4
acetona: 20% (v/v)	20	3.300	80	9,2
40% (v/v)	47	4.700	188	13,1
60% (v/v)	44	2.200	176	6,1
80% (v/v)	33	900	132	2,5
control	25	360		

FIGURA 12: DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE ACTIVIDAD

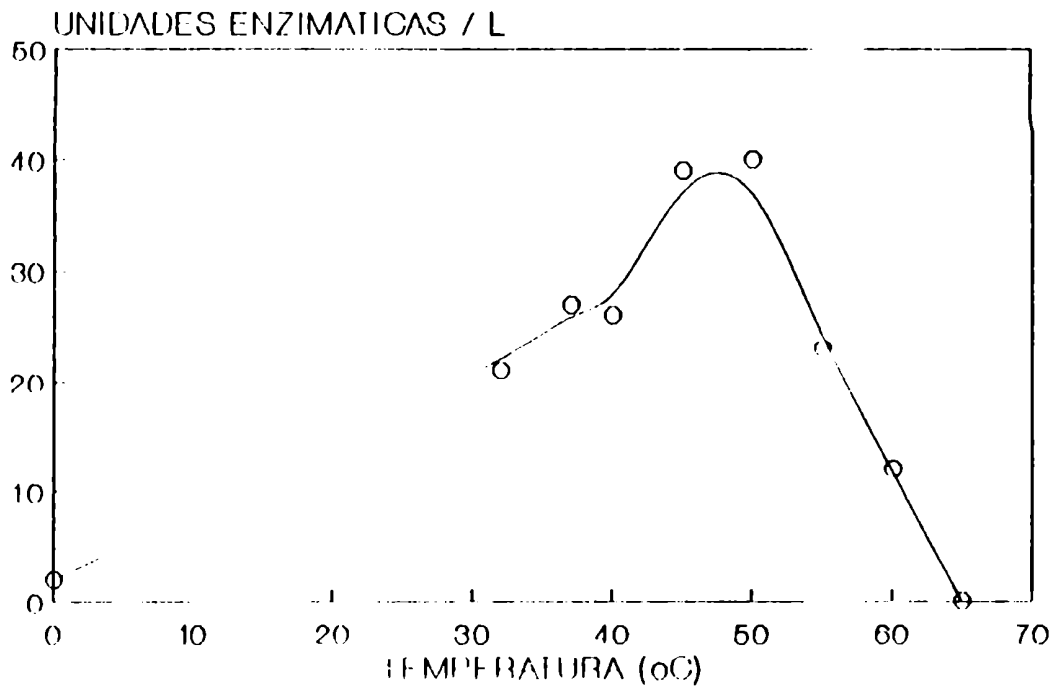
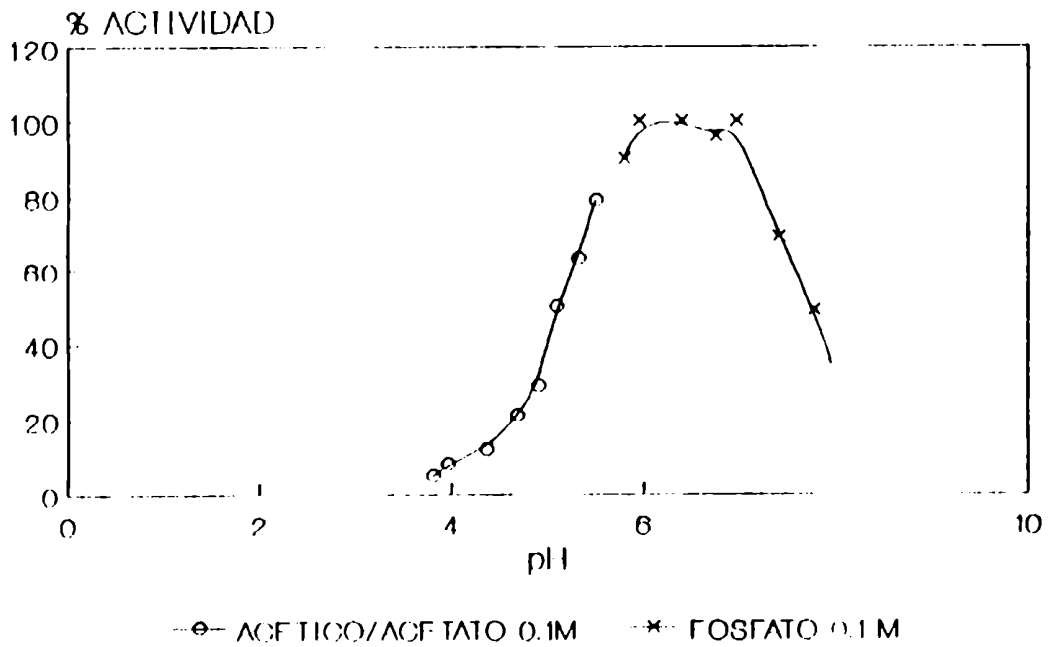


FIGURA 13: DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTIVIDAD INULINASA



pérdida de actividad a 45 o 50°C es del 25%, denotando una alta estabilidad térmica durante ese período y en esas condiciones. Este punto es importante, ya que la hidrólisis a escala industrial requiere como mínimo una incubación de esa duración a dichas temperaturas. La inactivación se evidencia, luego, a temperaturas mayores de 55°C.

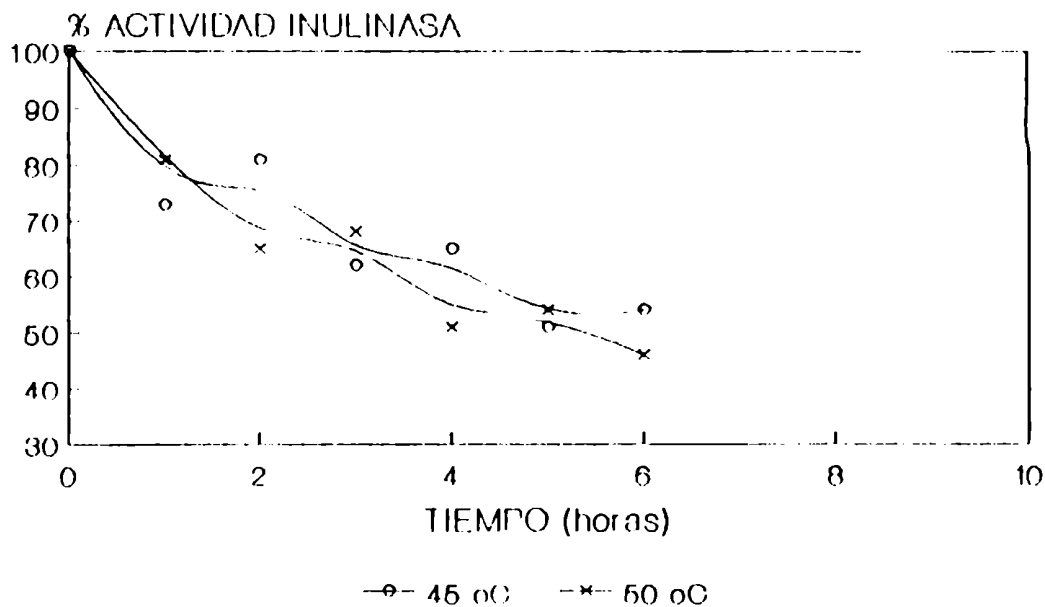
5.2.7. Determinación de la temperatura de inactivación

La Figura 15 es el gráfico de Arrhenius para la actividad inulinasa de *Bacillus subtilis* 430A. Tal como se esperaba, la temperatura de inactivación se encontró alrededor de los 54°C, pudiendo correlacionar estos resultados con los obtenidos en 5.2.6., donde existe una pérdida abrupta de actividad a temperaturas mayores de 55°C. Además este resultado concuerda con dos sucesos: el microorganismo es incapaz de crecer a 55°C en el mismo medio (Figura 9) y la inulinasa es una enzima importante para su desarrollo, pues es la que provee la fuente de carbono.

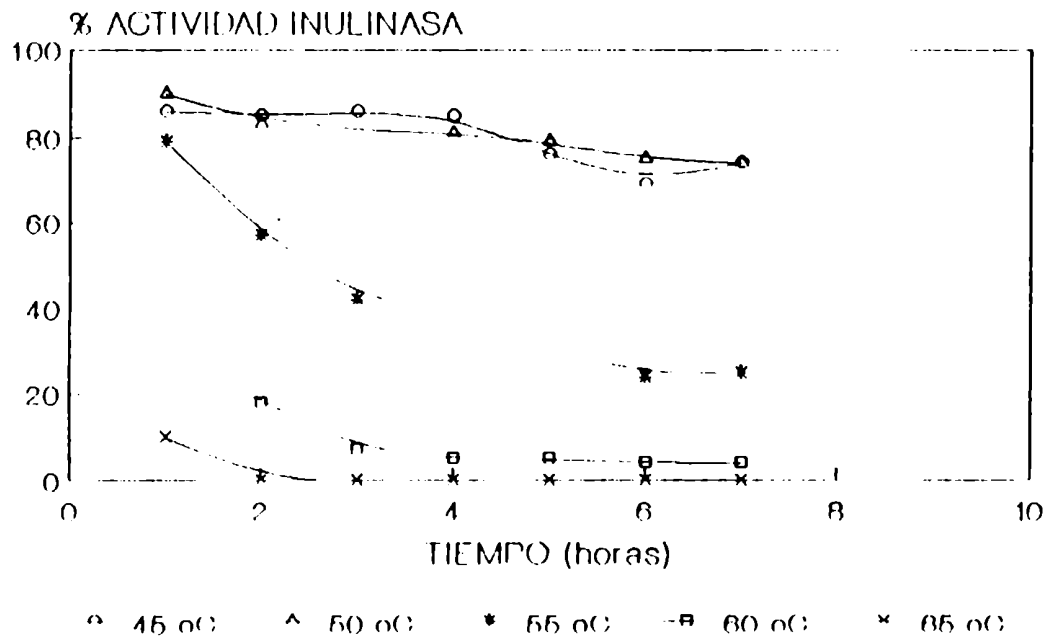
5.2.8. Efecto de metales y complejantes sobre la actividad enzimática

La influencia, en la actividad inulinasa, de los metales y agentes quelantes a distintas concentraciones se detalla en la Figura 16. Una inhibición total es producida por Hg^{2+} , Ag^+ y Cu^{2+} en trazas (10^{-4} M o menores, Figura 16.a) y Na^+ y Ca^{2+} a altas concentraciones (10^{-1} M, Figura 16.b). Una inhibición parcial ocurre por la presencia de Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} (Figura 16.a) y EDTA (Figura 16.b); una leve activación por EGTA posiblemente por la captura de algún agente inhibidor (Figura

FIGURA 14: CINETICA DE ESTABILIDAD TERMICA EN PRESENCIA DE SUSTRATO

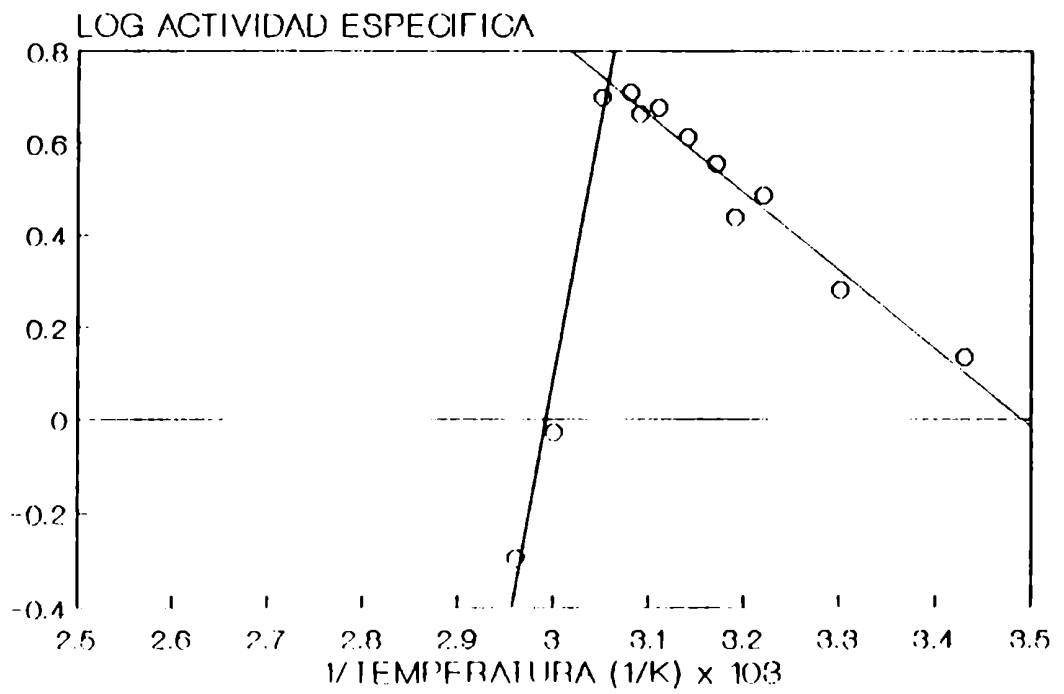


a. EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE 2.3×10^9 UFC/ml



b. EN EXTRACTOS ENZIMATICOS PARCIALMENTE PURIFICADOS A PARTIR DEL MISMO CULTIVO

FIGURA 15: GRAFICO DE ARRHENIUS PARA LA ACTIVIDAD INULINASA EXOCELULAR



16.b); y, por último, no se observó ningún efecto por acción de K^+ , Fe^{3+} (Figura 16.a), Mn^{2+} y Ba^{2+} (Figura 16.b).

5.2.9. Especificidad de sustrato

5.2.9.1. Comportamiento de la enzima frente a distintos sustratos

Al estudiar la actividad enzimática para distintos azúcares usados como sustratos, se llegó a los resultados expuestos en la Tabla 8. De ellos se deduce que la enzima es específica tanto para inulina como para sacarosa y presenta un bajo rendimiento de hidrólisis para rafinosa y melezitosa en las condiciones dadas. El hecho de que sea prácticamente inactiva frente a estos dos oligosacáridos no es casual dado que la unidad fructosa no se halla dispuesta de la misma manera dentro de las moléculas, lo cual hace inaccesible la unión $\beta(2-1)$.

5.2.9.2. Determinación de los parámetros cinéticos: K_m y V_m

A través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción de las Figuras 17.a y 18.a para sacarosa e inulina respectivamente, se compusieron los gráficos de Lineweaver-Burk (Figuras 17.b y 18.b). Como resultado de ellos, se pudieron calcular los siguientes parámetros:

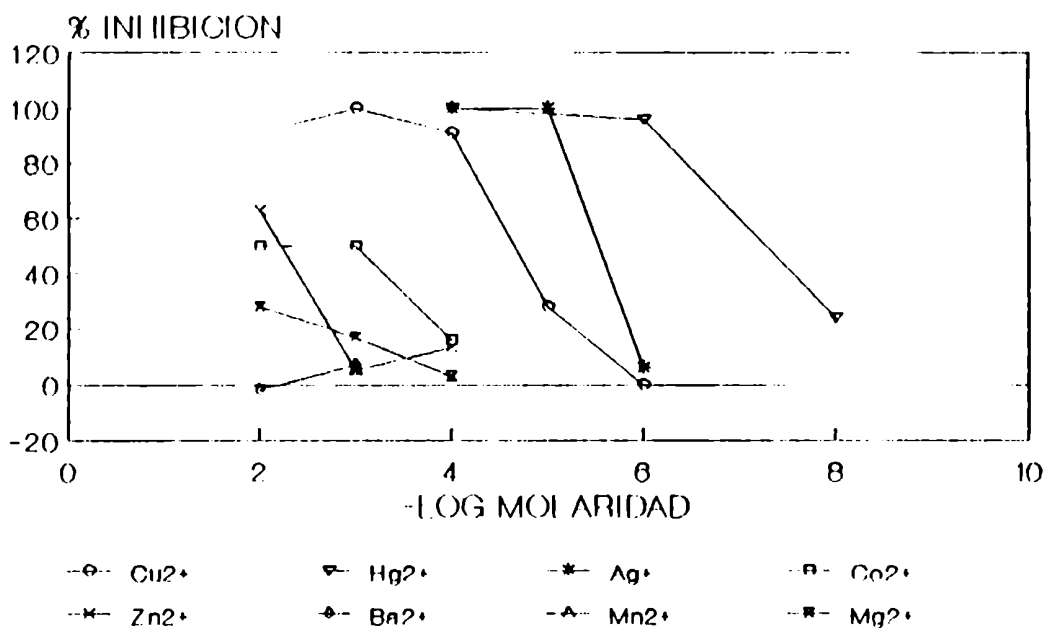
a) sustrato: sacarosa (Figura 17.b)

La inversa de la ordenada al origen es:

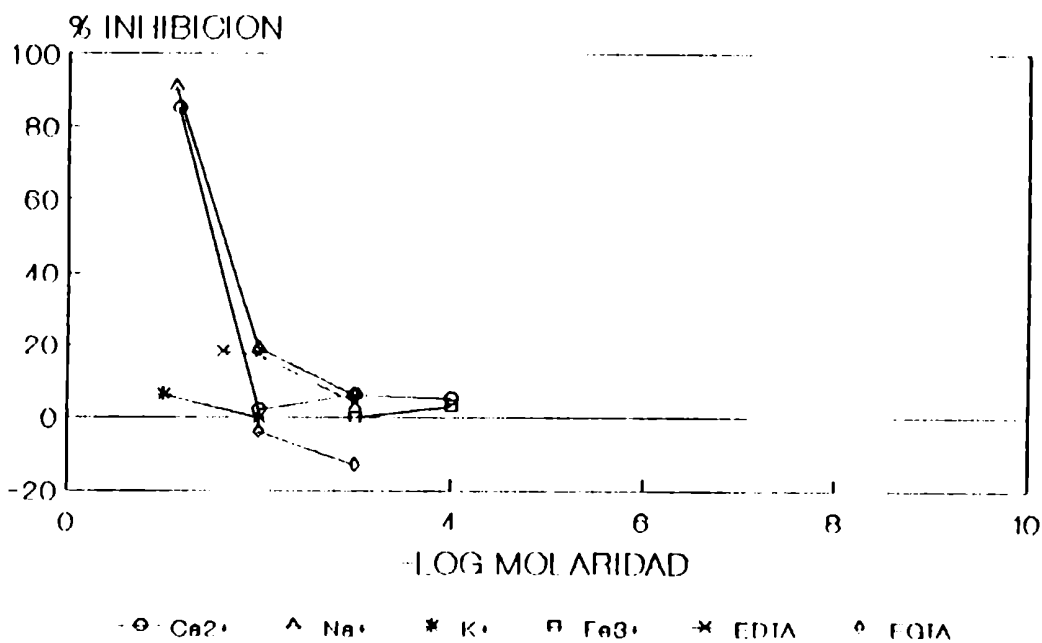
$$V_m = 13,38 \mu\text{g azúcar reductor} / \text{ml min}$$

La inversa de la concentración inicial de sustrato donde se haría nula la inversa de la velocidad inicial es:

FIGURA 16: EFECTO DE METALES Y COMPLEJANTES SOBRE LA ACTIVIDAD



a.



b.

**TABLA 8: COMPORTAMIENTO DE LA ENZIMA FRENTE A DISTINTOS
SUSTRATOS CON EL MISMO TIPO DE UNION GLICOSIDICA**

SUSTRATO	ACTIVIDAD ENZIMATICA (UE/l cultivo)
Inulina 4% (p/v)	59
Sacarosa 4% (p/v)	129
Rafinosa 4% (p/v)	4
Melezitosa 4% (p/v)	3

$$K_m = 56 \text{ mM}$$

b) sustrato: inulina (figura 18.b, Peso Molecular estimado=5500 D)

La inversa de la ordenada al origen es:

$$V_m = 21,43 \text{ } \mu\text{g azúcar reductor / ml min}$$

La inversa de la concentración inicial de sustrato donde se haría nula la inversa de la velocidad inicial es:

$$K_m = 8 \text{ mM}$$

El valor siete veces menor del K_m indica que la enzima es más específica para inulina, ya que la constante de afinidad es mayor. Con estos resultados se puede deducir una relación que se define según:

$$S / I = \text{Unidades Invertasa} / \text{Unidades Inulinasa}$$

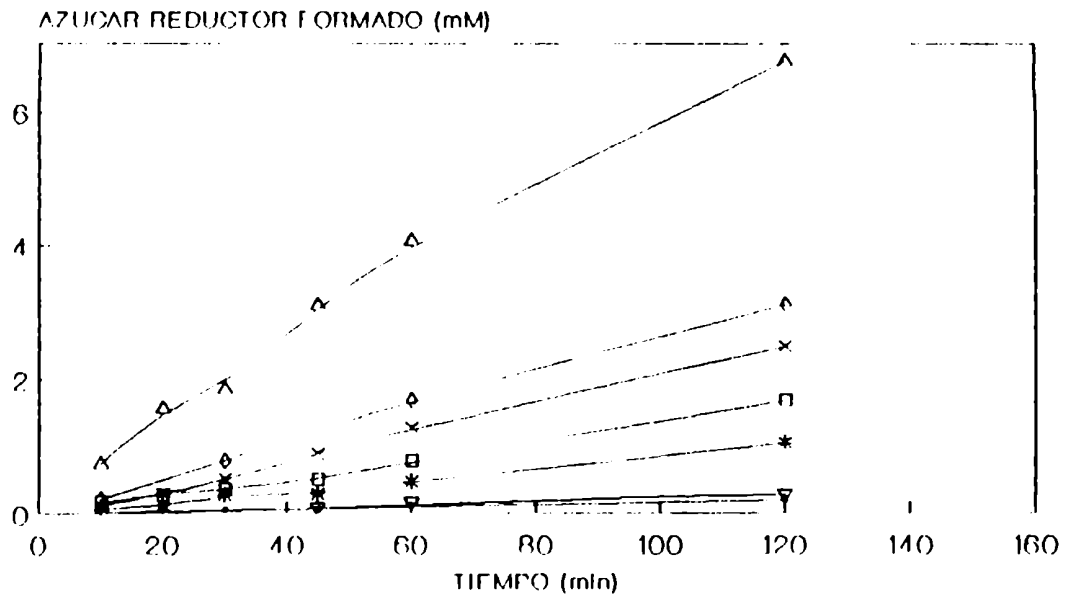
es decir:

$\mu\text{moles sacarosa clivada/ml/min} / \mu\text{moles az.red. liberado /ml min}$
que indica si la enzima en cuestión es una inulinasa verdadera o una invertasa capaz de hidrolizar inulina. En este caso $S/I=0,62$, confirmando que la enzima es una inulinasa, dado su valor menor que 1.

5.2.10. Efecto del producto final

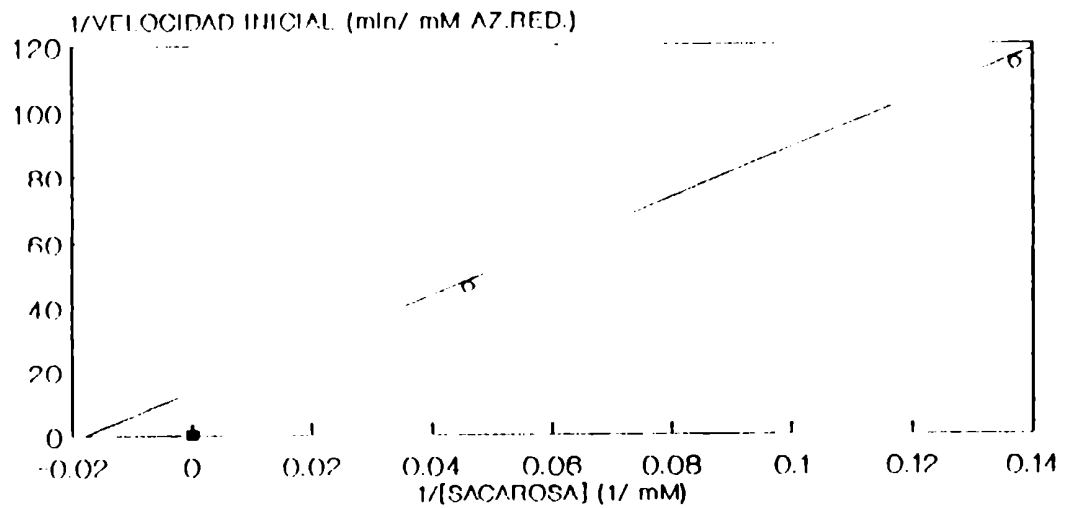
Por el agregado de fructosa, producto final de la reacción de hidrólisis, se estudió una posible modulación de la actividad inulinasa al medir la misma frente a concentraciones crecientes del monosacárido. De los resultados expuestos en la Figura 19 se observó una activación desde un 0,06% (p/v) hasta un máximo en 0,15% (p/v) de fructosa, con un incremento de la actividad en más de un 100%. Luego los valores decaen a los normales y finalmente a cero a

**FIGURA 17: DETERMINACION DE LOS
PARAMETROS CINETICOS DE LA ACTIVIDAD
INULINASA PARA SACAROSA**



**a. DETERMINACION DE LAS VELOCIDADES
INICIALES**

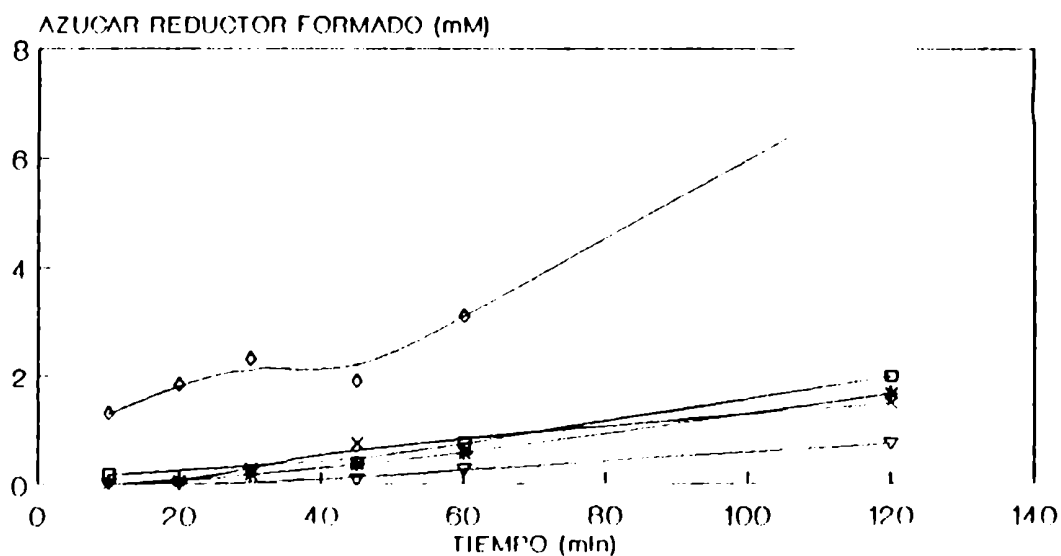
b. GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK



SACAROSA

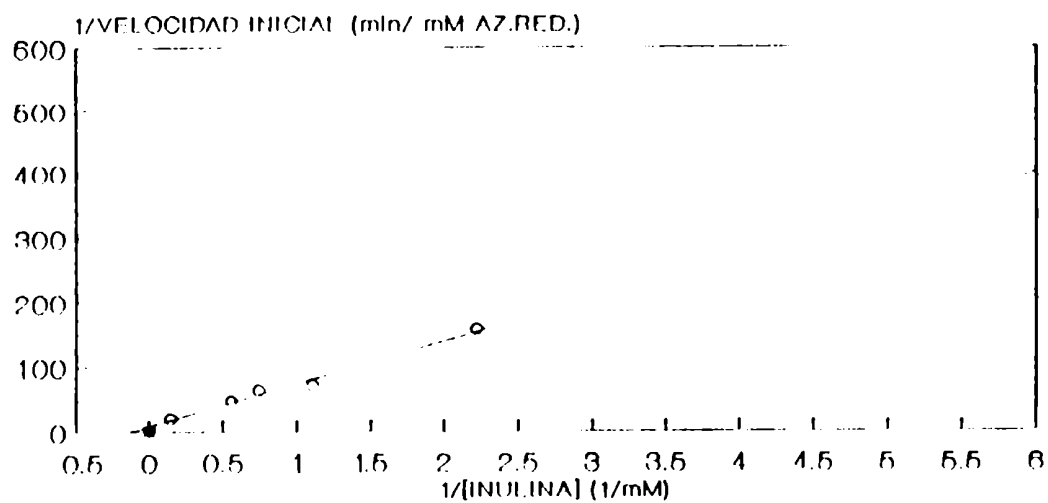
1.5 mM	▽	2.9 mM	*	7.3 mM	"	14.8 mM
×	21.9 mM	△	29.2 mM	▲	117.0 mM	

**FIGURA 18: DETERMINACION DE LOS
PARAMETROS CINETICOS DE LA ACTIVIDAD
INULINASA PARA INULINA**



**a. DETERMINACION DE LAS VELOCIDADES
INICIALES**

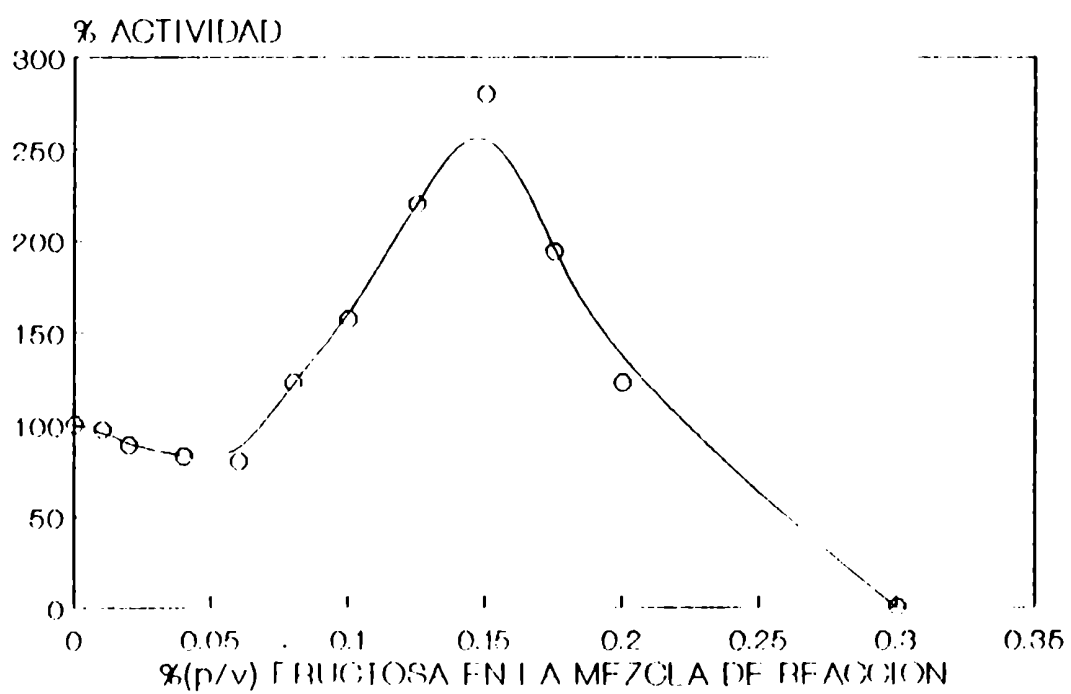
b. GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK



INULINA

0.180 mM	▽ 0.450 mM	* 0.910 mM
□ 1.380 mM	x 1.820 mM	◇ 7.270 mM

FIGURA 19: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA



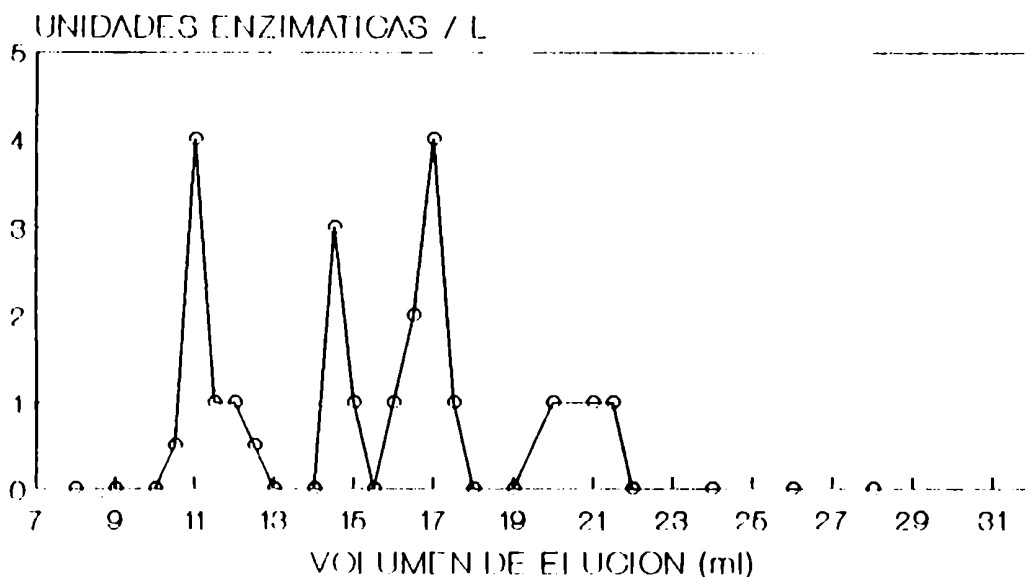
concentraciones mayores de 0,2% (p/v).

Con el objeto de verificar estos efectos moduladores, se efectuaron dos corridas en una columna Sephadex G-100 Superfine: a 20°C equilibrada con buffer fosfato 0,05 M pH=7 y a 20°C equilibrada con fructosa 0,15 % (p/v) en el mismo buffer. Aprovechando el efecto de tamiz molecular, se determinaron los pesos moleculares de los picos obtenidos. Los perfiles de elución se ven en la Figura 20. En la Figura 20.a. se distinguen 5 picos, cuyos pesos moleculares promedio corresponden, según la calibración con los patrones adecuados, a $PM_1 = 88.000$ D, $PM_2 = 77.000$ D, $PM_3 = 52.500$ D, $PM_4 = 36.000$ D y $PM_5 = 19.000$ D. Mientras que con una concentración de 0,15% (p/v) de fructosa se obtuvieron dos picos (Figura 20.b.) de $PM_1 = 71.000$ D y $PM_2 = 36.000$ D. Con la desaparición de los picos de 52.500 D y 19.000 D podemos pensar en una asociación de subunidades de la molécula de proteína, que mantienen su actividad en forma independiente, o bien la inactivación por fructosa de dos de cuatro actividades hidrolíticas. Así mismo, los dos picos de 71.000 D y 36.000 D sugerirían la presencia de dos actividades hidrolíticas separadas. Por lo tanto el patrón de picos obtenido surgiría por la presencia de actividades hidrolíticas independientes, sensibles a fructosa y/o una disociación-asociación de subunidades proteicas moduladas por el monosacárido y la combinación de ambos sucesos, en el caso de que ocurriera el segundo.

5.3. Diseño de un proceso de hidrólisis

Una vez que el estudio sobre la inulinaasa encontrada reveló su estabilidad térmica, fácil recolección en

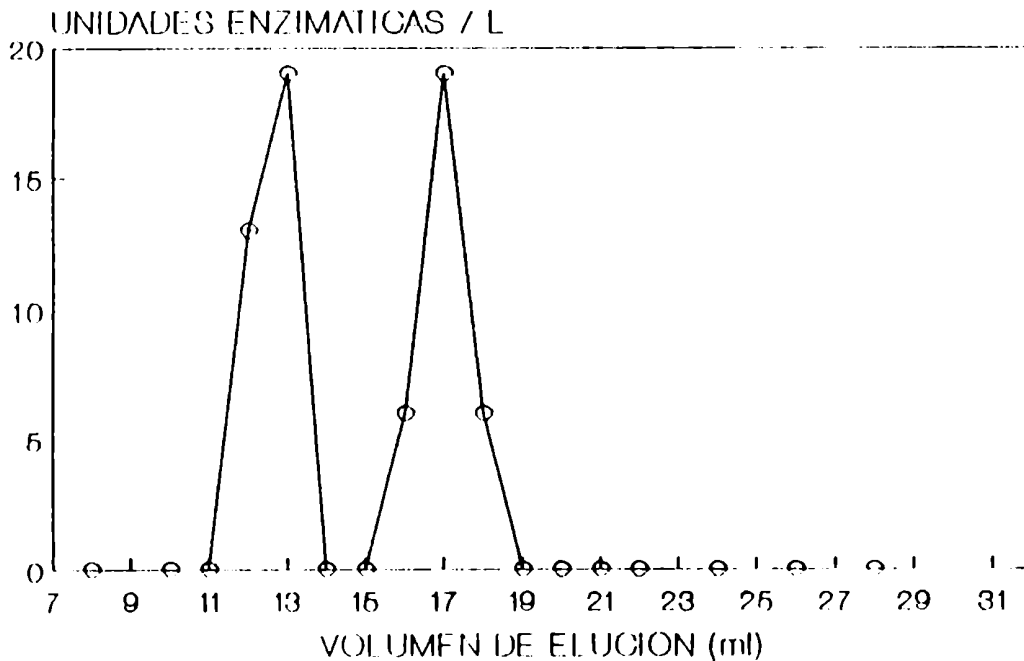
**FIGURA 20: DETERMINACION DEL PM DE
INULINASA DE *Bacillus subtilis* 430A:
ELUCION DE LAS COLUMNAS SEPHADEX G-100**



Vo- 9.5 ml Vt- 28 ml

BUFFER DE ELUCION- FOSFATO 0.05 M pH-7

a. CORRIDA A 20oC



Vo- 9.5 ml Vt- 28 ml

BUFFER DE ELUCION- FOSFATO 0.05 M pH-7

b. CORRIDA A 20oC Y 0.15%(p/v) FRUCTOSA

sobrenadantes de cultivo y las condiciones óptimas de reacción. se evaluó, mediante el diseño de un proceso de hidrólisis, la posible aplicación industrial. El mismo se desarrolló con la enzima tanto en medio líquido como inmovilizada en un soporte inerte y con distintas concentraciones de sustrato y tiempos de incubación, para deducir las condiciones óptimas de trabajo. De esta manera se quiso verificar la utilidad de la enzima en la fabricación de jarabes de fructosa a partir de extractos acuosos de tubérculos de topinambur, a escala de laboratorio.

5.3.1. Proceso en medio líquido

Con el objeto de ensayar un proceso de hidrólisis en medio líquido se eligieron dos concentraciones de inulina. La primera es del 12% (p/v) que corresponde a una solución saturada a 45°C, en nuestras condiciones de laboratorio, distinto del 20% (p/v) descrito (ver Introducción). La segunda (4% (p/v)) corresponde a la solución tal que por dilución con la enzima, llegue a una concentración similar a la obtenida en los extractos acuosos de tubérculos de topinambur u otra planta perteneciente a la familia *Compositae*. A partir de las reacciones en medio líquido ensayadas, se obtuvieron los siguientes resultados con las siguientes soluciones de inulina utilizadas: 12% (p/v) y 4% (p/v) de inulina de dalia (Sigma).

a. Para 12% (p/v): A partir de un Volumen de enzima de 0,7ml y un Volumen de inulina de 0,35 ml, el % (p/v) de Azúcares reductores formado fue de 1,69 con una concentración de fructanos totales, expresada como fructosa de 5,70% (p/v). Por lo tanto el % Hidrólisis fue de 29,7.

b. Para 4% (p/v): A partir de un Volumen de enzima de 0,35 ml y un Volumen de inulina de 0,175 ml, el % (p/v) Azúcares reductores formado fue de 0,71 con un % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa de 1,54. Por lo tanto el % Hidrólisis fue de 46,1.

Se ve claramente que el porcentaje de hidrólisis es mayor a menor concentración de sustrato, lo cual concuerda con la inhibición por producto ya descrita en 5.2.10..

5.3.2. Proceso con enzima fija en un soporte (inmovilizada)

Desde un principio se quiso utilizar un soporte que no se uniera mediante enlaces covalentes al sistema enzimático para evitar cualquier tipo de inactivación. Se ensayaron distintos geles formados con κ -carragenanos- K^+ , pero ninguno dio la consistencia firme a 45°C como para procesarlo y rellenar una columna. Por otro lado, ningún gel formado con el ión Ca^{2+} era útil desde que la actividad enzimática se perdía con altas concentraciones del catión (5.2.8.), por lo tanto ni alginatos- Ca^{2+} ni carragenanos- Ca^{2+} podían utilizarse. Esta es la razón por la cual se prefirió el uso de agar-agar como soporte inerte.

5.3.2.1. Ciclos en tubo

Las condiciones de partida fueron las siguientes:
Las unidades enzimáticas por litro inmovilizadas fueron 100;
el volumen de enzima fue de 3 ml y el de extracto de topinambur de 4 ml.

Los resultados del proceso realizado en dos ciclos sucesivos, con los lavados intermedios fueron:

a. Primer ciclo : El % (p/v) Azúcares reductores formado fue de 0,53. Como el % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa fue de 0.56, se obtuvo entonces un % Hidrólisis de 94.

b. Segundo ciclo: El % (p/v) Azúcares reductores formado fue de 0,16. Como el % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa fue de 0.45, se obtuvo así un % Hidrólisis de 36.

El rendimiento decrece debido a una posible pérdida por difusión de la enzima atrapada en el agar. No obstante se obtuvo un buen rendimiento de hidrólisis en el primer ciclo.

Dada la pérdida producida por un lavado, sería conveniente profundizar el estudio, de manera de encontrar un soporte adecuado que fije la actividad enzimática en forma suficiente para varios ciclos de hidrólisis.

5.3.2.2. Ciclo en columna

El reactor se armó con cubos de gel-enzima de 56 unidades enzimáticas por litro reaccionantes, en un volumen de enzima y de extracto de topinambur de 10 ml cada uno. Se obtuvieron los siguientes resultados en el sistema de ciclos ya descrito:

a. Proceso de incubación de 8 horas a 45°C:

Primer ciclo: Como el % (p/v) Azúcares reductores formado fue de 0,16 y el % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa fue de 0.55 , se obtuvo un % Hidrólisis de 29.

Una vez terminado este primer ciclo, se realizó un lavado con buffer fosfato según lo descrito en Materiales y Métodos.

Segundo ciclo: Con un % (p/v) Azúcares reductores formado de 0,12 y un % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa de 0.27, se calculó el % Hidrólisis de 44.

Al haber una dilución en el extracto debido al remanente

de buffer de lavado. aumentó el rendimiento de hidrólisis por una menor concentración de sustrato. No se observaron grandes pérdidas de la actividad con los lavados.

b. Proceso de incubación de 16 horas a 45°C

Primer ciclo : Con un % (p/v) Azúcares reductores formado de 0,15 y un % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa de 0,34, resultó un % Hidrólisis de 44.

Luego del lavado con buffer fosfato 0.05 M pH=7, se procedió al:

Segundo ciclo: A partir de un % (p/v) Azúcares reductores formado de 0,14 y un % (p/v) de fructanos, expresado como fructosa de 0,26, se calculó el % Hidrólisis de 54.

Se obtuvieron resultados similares al primer proceso, con mayores rendimientos dado el mayor tiempo de incubación.

Por los resultados obtenidos se deduce que en el proceso en medio líquido (5.3.1.), los rendimientos de hidrólisis son menores en iguales condiciones de trabajo.

El proceso de hidrólisis con la enzima inmovilizada favorece la disminución de la concentración local del sustrato, con lo cual la actividad enzimática no se inhibiría. De allí los mayores rendimientos de hidrólisis.

Evidentemente la presencia de casi el doble de unidades enzimáticas en el gel correspondiente al ciclo en tubo, es la causa del 94% de rendimiento en la hidrólisis. Por lo tanto, la cantidad de 100 UE/l marca el límite inferior de la concentración de enzima a inmovilizar.

De las reacciones de hidrólisis ensayadas se pueden resumir condiciones óptimas de trabajo a escala laboratorio:

- *Reactor: columna rellena con cubos de gel-enzima.
- *Enzima: fija en un soporte inerte (en este caso agar-agar), en una proporción 1:1 con 100 UE/l.
- *Sustrato: extracto acuoso de tubérculos de topinambur, previa eliminación de azúcares solubles en etanol (menor PM), cuya concentración expresada como fructosa total final sea 0,92% (p/v).
- *Tiempo de incubación: 16 horas.
- *Conservador: NaNa 0,03% (p/v) final.
- *Cantidad de ciclos por columna: dos.
- *Material de lavado: buffer fosfato 0,05 M pH=7.

Estos ensayos, que podrían ser ampliados a otros soportes, indican, sin embargo, que es factible diseñar un proceso de producción de jarabes de fructosa a partir de inulina usando la enzima inmovilizada, con mejores rendimientos que con la enzima soluble directamente.

6. DISCUSION

6.1. Aislamiento de bacterias productoras de inulinasas.

El principal objetivo del presente trabajo ha podido cumplirse, ya que se encontró una cepa del género *Bacillus* capaz de sintetizar una actividad inulinasa. De acuerdo con los resultados publicados por otros autores, sobre microorganismos capaces de hidrolizar inulina (Grootwassink, 1980; Zittan, 1981; Vandamme, 1983; Uhm, 1985; Efstathiou, 1986; Parekh, 1986; Allais, 1986 y 1987; Oiwa, 1987; Uhm, 1987; Ettalibi, 1990; Gupta, 1990; Haragushi, 1990). Las bacterias reportadas pertenecen a los géneros: *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Flavobacterium*, habiendo sólo dos citas del género *Bacillus*. Como nuestro propósito era aislar una cepa bacteriana productora, que pudiera tener aplicación industrial, su búsqueda se encaró hacia la flora asociada a rizósfera de vegetales ricos en inulina. A partir del relevamiento efectuado vimos que sólo un 10% de las cepas capaces de crecer en el medio de cultivo producían halos de hidrólisis a 45°C.

No es casual que éstas hayan sido aisladas a partir de muestra de rizósfera de origen brasileño dado el clima cálido preponderante en dicho país. La elección de las muestras, así como las temperaturas de selección, se realizaron teniendo en cuenta una cierta correlación entre la temperatura de crecimiento y la termoresistencia de la actividad enzimática, condición indispensable en la industria. La cepa seleccionada,

identificada como *Bacillus subtilis* 430A fue la única que hidrolizó el sustrato en cantidades apreciables y, además, al comienzo de la fase estacionaria en forma creciente (Figura 8). De allí su posterior estudio para un aprovechamiento integral de la cepa.

La actividad inulinasa encontrada en *Bacillus subtilis* 430A, es exportada a fines de la fase exponencial de crecimiento y principios de fase estacionaria de cultivos en lote (Figura 11). Estos resultados se correlacionan con lo descrito por Priest (1977) acerca de la excreción de proteínas del género *Bacillus* en fase estacionaria temprana y una actividad endocelular en la fase exponencial temprana. Esto último concuerda con el hecho de haber encontrado actividad enzimática, tanto en fracción soluble como en membrana celular, durante todas las fases de crecimiento bacteriano, señalándonos el camino recorrido por la proteína al ser exportada.

6.2. Propiedades de la actividad inulinasa de *B. subtilis* 430A

Dentro de las inulinasas reportadas, pocas son de carácter exportable. Se han encontrado enzimas exocelulares de origen fúngico o en mutantes de *Kluyveromyces fragilis* (Tsang y col., 1988 a y b), pero contadas son las de origen bacteriano (Allais y col., 1986 y 1987). La facilidad de obtención de la enzima es un factor importante dentro de la fabricación de jarabes de fructosa a partir de inulina. Asimismo, su purificación debe ser rápida y sencilla, como la ensayada en este trabajo de tesis. Se eligió, entonces, un solo paso de precipitación con acetona por la limpieza del proceso, ya que no

existe la necesidad de una diálisis posterior como en el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En estas condiciones se obtuvo un grado de purificación de 13, suficiente para nuestros propósitos, los cuales se hubieran satisfecho con un mínimo de 10. De esta manera, además, se evitó el uso de columnas con tamices moleculares, que añadirían aún más pasos para la obtención de una inulinasa de grado industrial.

La combinación de temperatura óptima entre $45^\circ\text{C} - 50^\circ\text{C}$, y pH óptimo entre 6 y 7, no ha sido encontrada en otras inulinasas descritas. En las inulinasas bacterianas, si bien la temperatura óptima de actividad llega a 50°C , el pH se halla alrededor de 5.5. Algo similar ocurre en el caso de inulinasa de levaduras o bien fúngicas, cuyas temperaturas óptimas pueden superar los 55°C . Resulta entonces beneficioso trabajar a pH cercano a la neutralidad para prevenir la formación de anhídridos, favorable en medio ácido y altas temperaturas (ver Introducción).

Es importante resaltar la estabilidad de la actividad a las temperaturas de 45°C y 50°C , en presencia de inulina (Figura 14). El hecho de estar presente el sustrato ejercería cierta protección sobre la estructura molecular de la proteína, situación que no se presenta a temperaturas mayores de 55°C .

La temperatura de inactivación de la actividad inulinasa encontrada fue de 54°C (Figura 15), concordante con la bibliografía en que las inulinasas descritas exhiben una temperatura de inactivación entre 55°C y 60°C . En el caso de las de origen fúngico, su actividad se pierde a temperaturas aún mayores de 60°C . Tal es el ejemplo de inulinasas del género

Aspergillus y *Penicillium* (Zittan, 1981).

La actividad se inhibe por concentraciones de 10^{-4} M en Hg^{2+} o Ag^{+} ; y 10^{-3} M de Cu^{2+} , resultado similar al obtenido con inulinasas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* y *Arthrobacter* (Vandamme y col., 1983).

Esta inhibición nos habla de la existencia de grupos -SH en posiciones estratégicas dentro de la molécula, ya sea en el sitio activo o bien en un sitio importante bajo el punto de vista estérico para la reacción.

Las inhibiciones por los cationes Na^{+} y Ca^{2+} podrían ser producidas por la concentración salina relativamente alta (10^{-1} M en cada uno). Estas inhibiciones no han sido descritas anteriormente.

Según los resultados obtenidos de K_m y V_m en 5.2.9.2, la actividad inulinasa encontrada presenta mayor afinidad por la molécula de inulina que por la de sacarosa.

Los valores de K_m pertenecientes a la inulinasa de *Bacillus subtilis* 430A, 8 mM y 56 mM para inulina y sacarosa respectivamente, se encuentran dentro del rango descrito. Los valores de K_m de inulinasa reportados por otros autores para inulina oscilan entre $1,2 \cdot 10^{-2}$ mM para *Clostridium acetobutylicum* (Efstathiou y col., 1986) y 17 mM para *Candida salmencensis* (Vandamme y col., 1983), mientras que para sacarosa están comprendidos en el rango de 4.2mM para *Sterigmatocystes nigra* y 55 mM para *Debaryomyces cantarelli* (Vandamme y col., 1983).

Un detalle a destacar es el comportamiento de la enzima frente a inulina. Este no es del todo "michaeliano", sobre todo a bajas concentraciones de sustrato (Figura 18). Esto

podría justificarse a través de una dificultad de acceso por parte de la inulinasa a la molécula de inulina, polímero de gran tamaño, al principio de la reacción. A medida que las cadenas de fructosa disminuyen su longitud, la enzima tendría una mayor accesibilidad, por cuanto la cinética de hidrólisis tendería paulatinamente a la cinética descrita en la teoría de Michaelis-Menten.

Además de ese comportamiento no "michaeliano", visto en los resultados obtenidos al determinar las velocidades iniciales, como también los cambios en los perfiles de elución en presencia o ausencia de fructosa, y el efecto modulador de la misma en distintas concentraciones, nos indujeron a pensar en un fenómeno de alosterismo. Si bien este fenómeno podría estar presente no significa obstáculo alguno en nuestros objetivos, por lo tanto no consideramos necesaria una profundización de su estudio.

Es un hecho curioso la actividad evidenciada a concentraciones de fructosa entre 0.06 %(p/v) y 0,15 %(p/v). La molécula de fructosa modificaría de tal manera la estructura proteica, que facilitaría su acceso a la molécula de inulina. A concentraciones de fructosa mayores de 0,2 %(p/v), se produce una inhibición de la actividad, estos valores son mayores comparados con los de la inulinasa descrita de *C. acetobutylicum* (Efstathiou, 1986).

A través de esta acción inhibitoria confirmamos lo dicho en 5.2.4. sobre la obtención de un rendimiento mayor al 100% en los pasos de purificación ensayados (Tabla 7). Los sobrenadantes de cultivo poseen fructosa libre, en una concentración tal que inhiben en parte a la actividad inulinasa exocelular.

Al precipitarla y resuspenderla en un medio libre de azúcares estamos recuperando la actividad de esa fracción antes inactiva.

Los pesos moleculares obtenidos concuerdan con los descritos para enzimas exportables del género *Bacillus* (Priest, 1977, Mézes y col. 1985). El pico mayor que ronda los 80.000D, coincide con el tamaño máximo de una molécula capaz de atravesar la porosidad teórica, calculada por la disposición de las cadenas del peptidoglicano de la pared celular. Al no haberse encontrado ningún dato de peso molecular reportado para inulinasas tanto fúngicas como bacterianas o de levaduras, no podemos realizar comparación alguna.

Otro dato que se extrae de los resultados de 5.2.9.2 es la relación entre la actividad hidrolítica para sacarosa y la actividad hidrolítica para inulina del mismo extracto enzimático, denominado S/I. Cuanto más pequeña es esta relación, nos acercamos a lo que se denomina una "verdadera" inulinasa. En este caso, para la actividad encontrada en *Bacillus subtilis* 430A, se obtuvo un valor de S/I de 0,62. En comparación con los valores descritos (Vandamme y col., 1983) de 0 a 9 en el caso de inulinasa y desde 1600 hasta 28000 en el caso de invertasas de levaduras, nuestro valor es uno de los más bajos.

En resumen, podemos enumerar las cualidades de la inulinasa de *Bacillus subtilis* 430A, que la hacen aplicable a procesos industriales de hidrólisis:

- 1- Es exportada al medio de cultivo por el microorganismo, facilitando su recolección y posterior purificación.
- 2- Es precipitable por acetona al 40% (v/v), logrando en un

solo paso purificarla en razón de 13 veces.

3- Su temperatura óptima de actividad, así como su estabilidad a la misma temperatura, y también su rango de pH de actividad máxima, concuerdan con las condiciones adecuadas para la reacción de hidrólisis industrial.

4- Las inhibiciones provocadas por cationes no las consideramos significativas, puesto que ocurren a concentraciones altas, difíciles de encontrar en algún proceso industrial similar.

5- Es altamente específica para el sustrato de interés, inulina, demostrado a través de los valores de Km y S/I, además de las actividades con otros sustratos como sacarosa, melezitosa y rafinosa.

6- Es inhibida sólo por altas concentraciones de fructosa.

Además es importante destacar, desde el punto de vista de la bioseguridad, la inocuidad de la cepa ya que es bien sabido que *Bacillus subtilis* es un microorganismo no patógeno para el hombre. Esto hace posible la manipulación de cultivos, para su posterior procesamiento, en forma segura.

6.3. Similitud con otras actividades descritas en *Bacillus subtilis*

En *Bacillus subtilis*, se han caracterizado tres enzimas con actividad sacarolítica: una sacarasa endocelular (Lepesant, 1972), una levansacarasa exocelular (Lepesant, 1972), y una levanasa exocelular (Kunst, 1977). Las tres hidrolizan sacarosa, pero solamente la levanasa es capaz de hidrolizar inulina. Esta última actividad no se detecta en cepas salvajes de

Bacillus subtilis sino que solamente aparece en mutantes del gen *sacL* (Kunst,1977) y es excretada a fines de la fase exponencial de cultivos en lote. Estas mutantes fueron aisladas por mutagénesis con etil-metán-sulfonato de *B.subtilis* 168 de genotipo *trpc2* (Kunst,1977).

Existen además algunas similitudes como así también algunas diferencias entre la levanasasa descrita y la inulinasa de *B.subtilis* 430A. a saber:

Similitudes:

◦Producción: la actividad específica máxima en sobrenadantes de cultivo de fase estacionaria temprana se encuentra entre 300 mUE/mg.prot y 400 mUE/mg.prot a 37°C para la levanasasa (Martin,1987) y 360 mUE/mg.prot para la inulinasa de *Bacillus subtilis* 430A a 45°C.

◦Peso molecular: el PM de la levanasasa ronda los 73 kD mientras que el de la inulinasa se halla entre 70 kD y 80 kD en su pico máximo. En realidad este hecho no es preponderante ya que todas las exoenzimas del género *Bacillus* se acercan a dichos valores de PM (Priest,1977).

◦Parámetros cinéticos: los Km descriptos de levanasasa para inulina son de 5 mM y para sacarosa es 50 mM (Kunst, 1977). Los obtenidos con inulinasas son 8 mM y 56 mM para inulina y sacarosa respectivamente.

◦Inhibidores: ambas se inhiben en presencia de sales mercuriales en una concentración final de 10^{-3} M para levanasasa (Kunst,1977) y 10^{-4} M para inulinasa.

◦Ambas son inducibles por fructosa.

Diferencias:

◦pH óptimo de actividad: mientras que la actividad máxima

levanasa se encontró a pH 5,5 (Kunst,1977). la actividad máxima inulinasa se halló entre pH 6 y 7.

•no existe una división de actividades de diferentes pesos moleculares en el caso de la levanasa.

Un punto a destacar es que la levanasa solo es detectable en cepas mutantes *sacI* obtenidas en laboratorio, mientras que *B.subtilis* 430A es un habitante natural de la rizósfera de *Vernonia herbacea* (Vell Rusby).

6.4. Diseño de un proceso de hidrólisis

A partir de los resultados obtenidos en 5.3. hemos diseñado un posible proceso apto para la fabricación de jarabes de fructosa. Este incluye la utilización de la enzima inmovilizada en un soporte de agar-agar, ya que se han logrado mejores rendimientos que en medio líquido, además de la posibilidad de la repetición del ciclo. Es importante también que con un extracto acuoso de tubérculos de topinambur, de fácil preparación, que consiste en una solución enriquecida en fructanos, se obtienen altos rendimientos de hidrólisis por pasaje por el reactor. Estos hidrolizados serían los precursores de los jarabes de fructosa a utilizar en la industria alimenticia.

De esta manera constituimos un primer paso para la introducción de nuevas materias primas, que, probablemente, abaratarían costos en la industria de edulcorantes.

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede deducir que:

- A partir de las distintas muestras tomadas se logró aislar una cepa identificada como *Bacillus subtilis* que demostró ser termorresistente y a su vez hidrolizar el sustrato, inulina, en forma comparable con datos publicados por otros autores.
- Estudios de producción enzimática demostraron que *Bacillus subtilis* 430A exporta una inulinasa en fines de fase exponencial y fase estacionaria temprana de cultivos en lote, verificando lo descrito para otras enzimas exportables del género *Bacillus*. Asimismo se encontró una actividad inulinasa endocelular en toda fase de crecimiento, tanto en membrana citoplasmática como en fracciones solubles.
- Se desarrolló un método sencillo para la purificación parcial de la enzima, de manera de eliminar todo interfiriente de actividad, posible de hallar en el medio de cultivo. Este consiste en una simple precipitación con acetona al 40% (v/v) a partir de la cual se obtiene una enzima con un grado de pureza aplicable a procesos industriales de hidrólisis.

Las propiedades estudiadas de la actividad inulinasa exocelular encontrada, tales como temperatura y pH óptimos, termoestabilidad, efecto de metales y quelantes y del producto final, nos hablan de una enzima altamente resistente en las temperaturas de trabajo (óptimas), solamente inhibida por altas concentraciones de fructosa y algunos metales.

- Su peso molecular estimado resulta correlacionarse con los obtenidos para otras enzimas exportables del género *Bacillus*,

dado a la porosidad de la pared celular y a los diferentes mecanismos de exportación involucrados.

- Los parámetros cinéticos calculados (K_m , V_m) así como la relación S/I , nos describen una inulinasa "verdadera", es decir una enzima altamente específica para el sustrato, inulina. capaz de hidrolizar otros cuyo tipo de unión glicosídica sea similar, tales como sacarosa. Esto confirma que la actividad encontrada no es una invertasa activa frente a inulina.

- Con el diseño, a escala laboratorio, del proceso de hidrólisis de inulina podemos pensar en un posible aprovechamiento industrial de la enzima en la producción de jarabes de fructosa.

Cecilio

Codirector

LIC. DIANA L. VULLIAMY

B. REFERENCIAS

- Adams, M., Richtmeyer, K. y Hudson, C.S., 1943. *Journal of American Chemical Society*, 65:1369-1380.
- Aiba, S., Humphrey, A.E. y Millis, N., 1965. *Biochemical Engineering*, Cap.4, 75-106. Academic-Press, Londres.
- Allais, J.J., Hoyos-Lopez, G., Kammoun, S. y Baratti, J.C., 1987. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:942-985.
- Allais, J.J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C. y Baratti, J.C., 1986. Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5):1086-1090.
- Bacon, J.S.D. y Bell, D.J., 1948. *Biochemical Journal* (Londres), 42:397.
- Bacon, J.S.D. y Loxley, R., 1952. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber. *Biochemical Journal* 51:208.
- Barker, S.A., 1976. *Process Biochemistry*, diciembre, 20-25.
- Bucke, A., 1980. En *Recent Developments in Productions and Use of Glucose and Fructose Syrups*, pág.43-68. Applied Science, Essex, UK.
- Crosby, G.A., 1976. *CRC, Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 7:297-333.
- Drew, H.D.K. y Haworth, W.N., 1928. *Journal of Chemical Society*, pág.2690.

- Dygert, S., 1965. Determination of reducing sugars with improved precision. *Analytical Biochemistry*, 13:367-374.
- Edelman, J. y Jefford, T.G., 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytology*, 67:517-531.
- Efstathiou, I., Reysset, G. y Truffaut, N., 1986. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetibutylicum* strain ABKn8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25:143-149.
- Ettalibi, M. y Baratti, J.C., 1990. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.* 54(1):61-68.
- Gaden, E.L., 1981. Métodos de Producción en Microbiología Industrial. Investigación y Ciencia, edición en español de *Scientific American*. 62:106-116.
- Grafe, V. y Vouk, V., 1913. *Z. Garerungsphysiol*, 3:327, mencionado en Snyder y Phaff (1960), *Journal of Microbiology and Serology*, 26:433-452.
- Gray, D.J.S., 1950. *Analyst*, 75:314.
- Grootwassink, J.W.D. y Fleming, S.E., 1980. Non specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continous fermentation, simple recovery method and some other properties. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2:45-53.
- Gupta, A.K., Rathore, P., Kaur, N. y Singh, R., 1990. Production, thermal stability and immobilization of inulinase from *Fusarium oxysporum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 47(3):245-258.
- Haragushi, K., Hayashi, K. y Kasumi, T., 1990. Purification and properties of inulinase from *Arthrobacter globiformis*. *Starch*, 42(1):28-30.

- Ingle, M.B. y Boyer, E.W., 1976. En *Microbiology 1976* (D. Schlessingerld), pág. 420-426, ASM, Washington DC.
- Kluyver, A.J., 1914. Conferencia en la Universidad de Delft, Holanda.
- Kobayashi, S., Schwartz, S.J. y Linebock, D.R., 1985. *Journal of Chromatography*, 319:205.
- Kunst, F., Steinmetz, M., Lepesant, J.A. y Dedonder, R., 1977. Presence of a third sucrose hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: constitutive levanase synthesis by mutants of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Biochimie*, 59:287-292.
- Lepesant, J.A., Kunst, F., Lepesant-Keijzlarova, J. y Dedonder, R., 1972. Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.*, 118:135-160.
- Martin, I., Débarbouillé, M., Ferrari, E., Klier, A. y Rapaport, G., 1987. Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Mol. Gen. Genet.*, 208:177-184.
- Mc Donald, E., 1946. The polyfructans and difructose anhydrides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 2, pág. 253-277. editado por Pigman W.W. y Wolfrom M.L., Academic Press Inc. Publishers, NY.
- Mèzes, P.S. y Lampen, J.O., 1985. The Molecular Biology of *Bacilli*, Vol. II. Cap.6, 151-183. En D.A. Dubman (ed.), Academic Press.
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A. y O'Donnell, A.G., 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, pág. 1711-1742. En Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. y Schlegel, H.G. (ed.), *The Prokaryotes*, Vol. II, Springer

Verlag.

- Oiwa, H., Naganuma, M. y Ohnuma, S., 1987. Acetone-butanol production from dahlia inulin by *Clostridium pasterianum* varY-53. *Agric. Biol. Chem.*, 51(10):2819-2820.
- Parekh, S. y Margaritis, A., 1986. Production of inulinase (β -fructanhydrolase) by *Kluyveromyces marxianus*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(4):1085-1087.
- Pollock, C.J., Hall, M.A. y Roberts, D.P., 1979. Structural analysis of fructose polymers by gas-liquid chromatography and gel filtration. *Journal of Chromatography*, 171:411-415.
- Praznik, W. y Beck, R.H.F., 1985. Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *Journal on Chromatography*, 348:185-197.
- Priest, F.G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3):711-753.
- Pringsheim y Kohn, 1924. *Z. Physiol. Chem.* 133:80, mencionado en Adams y col.(1943).
- Roe, J.H., 1934. *Journal of Biological Chemistry*, 107:15.
- Sedmak, J.J. y Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay of proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry*, 79:544-552.
- Sneath, P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In Sneath, P.H.A., Mair, N.S. y Sharpe, M.E. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William y Wilkins, Baltimore. Vol. II. Sección 13.
- Snyder, H.E. y Phaff, H.J., 1960. *J. Microbiol. Serol.*, 26:433-452.
- Sonnleitner, B. y Flechter, A., 1983. *Trends in Biotechno-*

logy, 1:74-90.

- Tauret, Ch., 1893. C.R., 117:50.

- Tsang, E.W.T. y Grootwassink, J.W.D., 1988 a. Extraordinarily rapid appearance of a β -fructofuranosidase (exo-inulase)-hyperproducing mutant in continuous culture of *Kluyveromyces fragilis*. Journal of General Microbiology, 134:679-688.

- Tsang, E.W.T. y Grootwassink, J.W.D., 1988 b. Stability of exo-inulase production on lactose in batch and continuous culture of a *Kluyveromyces fragilis* hyperproducing mutant. Enzyme Microbiol. Technol., 10:297-301.

- Uhm, T.B., Hong, J.S., Sohn, H.S., Park, M.K. y Byun, S.M., 1985. A constitutive inulase from a *Bacillus*. J. Korean Agric. Chem. Soc., 28(3):131-136.

- Uhm, T.B. y Byun, S.M., 1987. Thermal stability of the multiple charge isoforms of inulase from *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 9(4):287-290.

- US Department of Commerce, National Bureau of Standards, Circular C440, pág. 398-399, 1942.

- Vandamme, E.J. y Derycke, D.G., 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. Advances in Applied Microbiology, Vol. 29, 139-176.

- Zittan, L., 1981. Enzymatic hydrolysis of inulin - An alternative way to fructose production. Starch, 33:373-377.