

2ej
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

“DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE UN SISTEMA DE INMOVILIZACION (GOMA DE ALGARROBO, K-CARRAGENINA-POLIHIDROLES) POR EL METODO DE ATRAPAMIENTO, DE CELULAS CON ACTIVIDAD ENZIMATICA”



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO
P R E S E N T A :
FERNANDO DOMINGUEZ JULIAN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>REVISION DE LA LITERATURA</u>	4
1. <u>Tipos de catálisis</u>	4
1.1. Células	4
1.2. Enzimas	5
1.3. Elección del tipo de catálisis	6
1.3.1 Naturaleza de la conversión	6
1.3.2 Pureza del producto	8
1.3.3 Estabilidad y reutilización	8
1.3.4 Modificación de la cinética de reacción	9
2. <u>Inmovilización</u>	
2.1 Definición	11
2.2 Técnicas de inmovilización	11
3. <u>Galactanas (Extractos)</u>	16
4. <u>Galactomannanas</u>	16
5. <u>Conformación y asociación de carragenina, agarosa y galactomannanas</u>	14
6. <u>Polioles</u>	21
6.1 Definición	21
6.2 Funciones	21
7. <u>Difusión</u>	30
7.1 Celda modificada	30
III. <u>ANTECEDENTES</u>	37
IV. <u>OBJETIVOS</u>	39
1. <u>Objetivo general</u>	39
1.1 <u>Objetivos parciales</u>	40
V. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	41
1. <u>Metodología general para la manufactura del Soporte</u>	41
1.1 <u>Metodología para la manufactura del Soporte con adición de glicerol</u>	42

1.2 Metodología para la manufactura del soporte con adición de propilenglicol	43
1.3 Metodología para la manufactura del soporte de una mezcla de glicerol-propilenglicol	44
2. <u>Metodología para la cuantificación de la resistencia a la compresión</u>	45
2.1 En compresor de hidrocoloides	45
2.2 En compresor universal de materiales	47
3. <u>Determinación del fenómeno de sinéresis</u>	48
4. <u>Determinación del comportamiento del soporte con respecto a la variación del pH, en términos de resistencia a la compresión..</u>	49
5. <u>Capacidad de amortiguamiento y efecto sobre las propiedades del soporte de las soluciones amortiguadoras de fosfatos.....</u>	52
5.1 Capacidad de amortiguamiento del pH en función de la concentración de las soluciones amortiguadoras de fosfatos en presencia de polímeros (K-carragenina-algarrobo)	52
5.2 Capacidad de amortiguamiento del pH en función de su concentración en presencia de células	54
5.3 Efectos de las soluciones amortiguadoras de fosfatos sobre las propiedades del soporte	55
6. <u>Determinación de la actividad enzimática de β-D-galactosidasa en células de E. coli CSH-36</u>	57
6.1 Fundamento	57
6.2 Preparación de reactivos	59
6.3 Pasta celular y suspensión celular de E. coli CSH-36	60
6.4 Procedimiento para determinar actividad enzimática en células libres de E. coli CSH-36	60
6.5 Procedimiento para determinar actividad enzimática en células de E. coli CSH-36 inmovilizadas en K-carragenina-algarrobo, utilizando ONPG como sustrato	61
7. <u>Determinación de proteína</u>	62
7.1 Fundamento	62
7.2 Procedimiento	63
8. <u>Producción de células de E. coli CSH-36 con actividad enzimática de β-D-galactosidasa</u>	64
9. <u>Determinación del factor de peso seco de células de E. coli CSH-36 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	68
10. <u>Conservación de células de E. coli CSH-36 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	70

11. <u>Determinación de la capacidad de atrapamiento del soporte, expresada como resistencia a la compresión con respecto a la actividad de enzima β-D-galactosidasa de células de E. Coli CSH-36</u>	74
12. <u>Influencia del tamaño del soporte con respecto a la actividad de enzima β-D-galactosidasa de células de E. coli CSH-36</u>	75
13. <u>Tratamiento químico de células de E. coli CSH-36 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	76
13.1 Con agente bifuncional (glutaraldehído)	76
13.2 Con agentes oxidantes inorgánicos	78
14. <u>Inmovilización de células de E. coli CSH-36 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	79
15. <u>Producción de células de K. fragilis 55-61 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	82
16. <u>Permeabilización de células de K. fragilis 55-61 con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	83
17. <u>Determinación de actividad de enzima β-D-galactosidasa en células de Kluyveromices fragilis 55-61</u>	84
17.1 Fundamento	84
17.2 Preparación de reactivos	85
17.3 Metodología	85
17.4 Concentración celular	86
18. <u>Secado a presión reducida de células de K. fragilis con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	87
19. <u>Leofilizado de células de K. fragilis con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	87
20. <u>Inmovilización de células de K. fragilis con actividad de enzima β-D-galactosidasa</u>	88
21. <u>Determinación de carbohidratos por el método de Fenol-ácido sulfúrico</u>	89
22. <u>Difusión de carbohidratos (galactosa, glucosa, lactosa) a través del soporte en una celda modificada.</u>	
22.1 Sin células inmovilizadas, a diferentes temperaturas	91

22.2 Con células inmovilizadas sin actividad enzimática a 37°C.....	93
VI. CALCULOS	94
1. Cálculo de la resistencia a la compresión	94
2. Determinación del fenómeno de Sinéresis	95
3. Preparación de solución amortiguadora de fosfatos 0.2M pH 7.5 .	96
4. Cálculo para:	
a) Concentración de células de <u>E. coli CSH-36</u> en suspensión ...	97
b) Concentración de proteína de <u>E. coli CSH-36</u> en suspensión ..	98
c) Actividad enzimática de células de <u>E. coli CSH-36</u>	98
d) Actividad enzimática específica	99
4.1 Cálculo de la actividad enzimática del soporte con células inmovilizadas de <u>E. coli CSH-36</u>	99
4.2 Cálculo de la actividad enzimática de células de <u>K. fragilis 55-61</u>	100
4.3 Cálculo de la actividad enzimática de células de <u>K. fragilis 55-61</u> inmovilizadas en el soporte	100
5. Cálculo del coeficiente de Difusión de carbohidratos a través del soporte	103
VII. RESULTADOS	105
1. Absorbancia contra concentración:	
1.1 Curva patrón de proteína	105
1.2 Curva patrón de peso seco de células de <u>E. coli CSH-36</u>	106
1.3 Curva patrón de lactosa (5%)	107
1.4 Curva patrón de galactosa (2.5%)	108
1.5 Curva patrón de glucosa (2.5%)	109
2. Formulaciones del soporte	110
2.1 Resistencia a la compresión sin y con adición de glicerol (al 3.4% v/v)	111
2.2 Resistencia a la compresión de la formulación seleccionada como soporte con adición de glicerol y propilenglicol	112
3. Resistencia a la compresión de la formulación seleccionada como soporte con adición de una mezcla de glicerol-propilenglicol	113
4. Fenómeno de Sinéresis	114
5. Resistencia a la compresión en función del pH del soporte	117
6. Soluciones amortiguadoras de fosfatos	119
6.1 Capacidad de amortiguamiento en presencia de polímeros	119
6.2 Capacidad de amortiguamiento en presencia de células de <u>E. coli CSH-36</u>	120
6.3 Efecto en las propiedades del soporte.....	121

7. Capacidad de atrapamiento, resistencia a la compresión y actividad enzimática del soporte	122
7.1 Actividad enzimática en función de la longitud del soporte.	124
7.2 Porcentaje de actividad enzimática expresado	125
8. Tratamiento químico de células de <u>E. coli CSH-36</u>	126
9. Estabilidad de la actividad de enzima β -D-galactosidasa inmovilizada en el soporte al almacenamiento en congelación (-10°C)..	127
10. Difusión de Carbohidratos a través del soporte	128
10.1 Sin células inmovilizadas y a diferentes temperaturas	130
10.2 Con células inmovilizadas a 37°C	132
VIII. <u>DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS</u>	133
1. Interacción K-carragenina con galactomannanas	133
1.1 Uso de polioles	136
1.1.1 Uso de glicerol al 3.4%	136
1.1.2 Variación de la concentración de glicerol	137
1.1.3 Uso de propilenglicol	138
1.2 Adición de una mezcla glicerol-propilenglicol	139
2. Cuantificación del fenómeno de Sinéresis	140
3. Resistencia a la compresión con respecto al pH	141
4. Capacidad de amortiguamiento y efecto de las soluciones amortiguadoras de fosfatos	142
5. Capacidad de atrapamiento, resistencia a la compresión y actividad enzimática	143
5.1 Porcentaje expresado de actividad enzimática de <u>E. coli CSH-36</u> con respecto a las dimensiones del soporte..	148
6. Modificación química de células de <u>E. coli CSH-36</u>	148
6.1 Con agente bifuncional	149
6.2 Con agentes oxidantes inorgánicos	149
7. Estabilidad al almacenamiento del soporte con células inmovilizadas de <u>E. coli CSH-36</u>	150
8. Inmovilización de <u>K. fragilis</u> 55-61 con actividad de enzima β -D-galactosidasa	150
9. Difusion de galactosa, glucosa, lactosa a través del soporte ..	152
9.1 Difusión de galactosa (2.5%) sin células inmovilizadas	152
9.2 Difusión de glucosa (2.5%) sin células inmovilizadas	155
9.3 Difusión de lactosa (2.5%) sin células inmovilizadas	157

9.4 Difusión de galactosa, glucosa lactosa a través del soporte a 37°C con células inmovilizadas de <u>E. coli CSH-36.</u>	158
IX. <u>CONCLUSIONES (Extractos)</u>	160
X. <u>LITERATURA CONSULTADA</u>	168
XI. <u>APENDICE I</u>	174

I INTRODUCCION

I. Introducción

El uso de enzimas aisladas, y desde luego el empleo del término "enzima" data de 100 años atrás. Patentes para el aislamiento de renina datan de 1885, y de enzimas detergentes a partir de 1915. Sin embargo, resulta relevante mencionar que de la gran cantidad de enzimas identificadas y estudiadas hasta la fecha, tan sólo 24 enzimas son aceptadas por la F.D.A. en los Estados Unidos para su empleo en alimentos ó se encuentran bajo petición para que se permita su uso (GRASP) a partir de junio de 1983 (54). En la tabla 1 se mencionan las enzimas de mayor importancia comercial a nivel mundial (58).

Las enzimas se obtienen a partir de extractos de plantas, tejidos animales, o bien, de microorganismos, siendo esta última la fuente de mayor explotación (figura 1).

La decisión de emplear células completas para la conversión bioquímica, enzimas aisladas ó inmovilizar ambos sistemas, requiere de la consideración de muchos factores (31), entre ellos son de mención, el grado de dificultad técnica y el costo relacionado al aislamiento en gran escala de la enzima, así como su estabilidad catalítica operacional. Sin embargo con el desarrollo de la Biología

Abreviaciones:

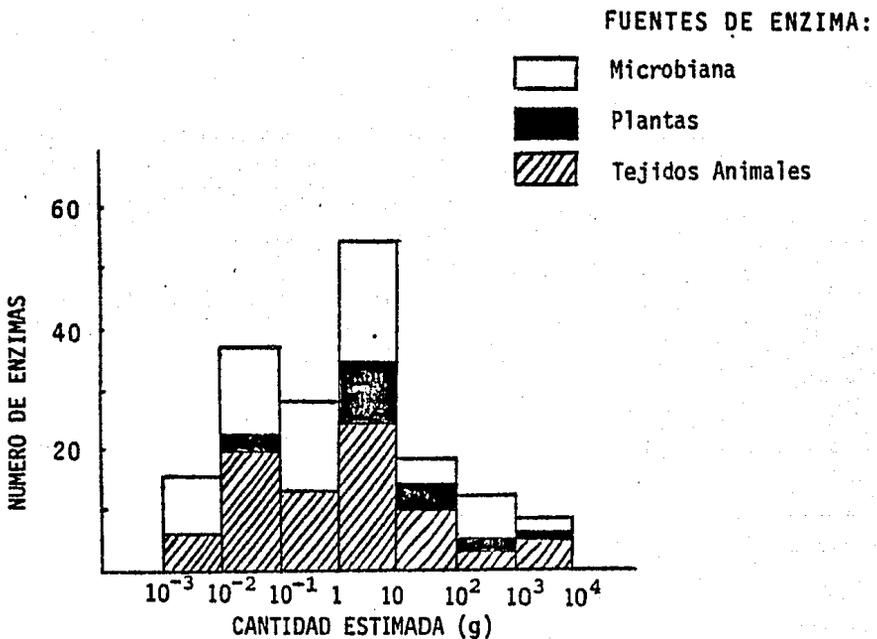
F.D.A. = Food Drug Administration (Administración de Alimentos y Drogas).
GRAS = Generally Recognized as Safe (Generalmente reconocido como seguro).
GRASP = GRAS Petition submitted (Sometida a petición GRAS).

Molecular y de la Genética es posible manipular los niveles de enzimas para reducir la magnitud del problema. Aunque esta posibilidad existe, la F.D.A. no acepta productos clonados de Ingeniería Genética para uso específico en alimentos, dado que todas las nuevas preparaciones de enzimas deben someterse a pruebas toxicológicas y demostrar que son seguras (GRAS). Aunque en el año de 1980 la F.D.A. aceptó la producción de insulina a partir de clones para suministro humano siendo esto en particular causa de una gran polémica (27). Cabe recalcar que la legislación sobre el empleo de enzimas varía de país a país, y muchos países no especifican controles sobre su uso (54).

Tabla 1. Ventas anuales estimadas de las enzimas más importantes en alimentos. (58)

	Ventas estimadas (\$ MM dólares)	
	1985	1990
Glucosa isomerasa	75.5	92.4
Amilasa bacteriana	54.9	67.8
Glucoamilasa	54.9	65.6
Renina	31.8	42.5
Papaína	16.8	18.2
Otras	23.5	30.8

Fig. 1 Estimación máxima de obtención de 140 enzimas comerciales tomando como base el año de 1970. (31)



II REVISION DE LA LITERATURA

Revisión de la literatura:

1. Tipos de Catálisis

Catálisis bioquímica es sinónimo de catálisis por enzimas. La cual es afectada por diferentes estados ambientales en las que las enzimas pueden desempeñar sus funciones. Este intervalo es extremadamente amplio y complejo con respecto a células, en comparación con enzimas altamente purificadas.

1.1 Células

Células y tejidos, se han utilizado como catalizadores durante cientos de años. La gran versatilidad de las células microbianas en particular, tienden al desarrollo de la presente industria de la fermentación. Durante los procesos de fermentación gran número de microorganismos se forman a partir de nutrimentos presentes en el caldo de fermentación. Estos microorganismos durante o después de la fase exponencial de crecimiento, actúan como catalizadores para la síntesis de productos (13), desde simples moléculas como etanol o polímeros extremadamente complejos. Las reacciones implicadas en la síntesis de estos productos, generalmente incluyen deshidrogenación/hidrogenación y requerimientos de ATP. Esto no se debe únicamente a las enzimas, sino a que las células metabolizan los nutrimentos para obtener la energía necesaria para la síntesis. En algunos

casos, sin embargo, una simple enzima presente en la célula se requiere para llevar a cabo la conversión, por ejemplo: la isomerización de la glucosa, modificación de algunos esteroides, la conversión de penicilina a ac. 6-aminopenicilánico.

Recientemente otros caminos se han desarrollado como es la inmovilización de células. Esto se logra por varios métodos, como puede ser por fijación o atrapamiento en poliacrilamida u otros geles (51) o por intercambio iónico o por adsorción (26).

1.2 Enzimas

Las enzimas, particularmente aquéllas que se producen extracelularmente por microorganismos (2), se utilizan como catalizadores en procesos industriales, como el de la cerveza, hidrólisis de almidón, clarificación de jugos de frutas, y fábrica de quesos. Técnicas para la extracción en gran escala y aislamiento de enzima intracelulares (10), hacen posible su uso en reactores como catalizadores (31). En resumen, enzimas solubles en agua pueden inmovilizarse. Esto es posible por adsorción o por ataque químico de la enzima a un soporte de material sólido, obteniéndose enzimas insolubles activas. Enzimas pueden atraparse en geles de poliacrilamida (38) o microcápsulas (9). Enzimas insolubilizadas pueden hacerse en forma de fibras o partículas granulares (28), membranas (23) y tubos (24). Otra

manera de inmovilizar enzimas, es por adsorción o por ataque químico de la enzima a un polímero soluble en agua de alto peso molecular (30), ó solubilizando un soporte sólido en el cual la enzima puede ser fijada (4.).

Por lo tanto es posible distinguir seis tipos de catálisis bioquímica (Tabla 2) (I) células metabólicamente activas, (II) células metabólicamente inactivas, (III) células completas inmovilizadas, (IV) enzimas aisladas, (V) enzimas insolubles inmovilizadas ó enzimas insolubilizadas, y (VI) enzimas solubles inmovilizadas.

1.3 Elección del Tipo de Catálisis

El costo del aislamiento de la enzima y posiblemente de la inmovilización, así como los costos de la fermentación, deben ser balanceados; además de otros factores que afecten la elección del tipo de catálisis y que a continuación se discuten:

1.3.1 Naturaleza de la conversión

Una conversión bioquímica puede requerir la participación de una simple enzima, un complejo enzimático ó muchas enzimas. Si un gran número de enzimas está involucrado el uso de células completas es el indicado. Sin embargo, el estudio de sistemas enzimáticos que requieren fuentes de energía no es muy profundo en la actualidad, y consecuentemente enzimas que requieren de

estas fuentes no pueden usarse en forma aislada sin la adición por separado de cofactores solubles como NAD y ATP. Técnicas para la reutilización de cofactores, se han desarrollado a nivel laboratorio mediante la insolubilización e inmovilización de éstos, pero para fines prácticos a gran escala, no se justifica su uso (53).

Tabla 2. Tipos de Catálisis Bioquímica y Factores de Selección

	Metabólicas
Células	No Metabólicas
	Inmovilizadas
	Soluble
Enzimas	Inmovilizada soluble
	Inmovilizada insoluble
Factores que influyen en la elección.	
-	Naturaleza de la conversión
-	Producción y pureza
-	Estabilidad y reutilización
-	Modificación de la cinética

1.3.2 Pureza del Producto

Cuando se utilizan células, ocurren reacciones alternas que tienden a reducir el rendimiento e incrementar los costos de purificación del producto. En algunos casos estas reacciones alternas pueden reducirse o eliminarse. De Flines (15) describe una serie de reacciones alternas que ocurren durante la modificación de esteroides y las cuales pueden eliminarse. Otro problema que se presenta cuando se utilizan células es la contaminación del producto por compuestos generados durante la lisis de la célula.

Estos problemas pueden evitarse utilizando enzimas purificadas, particularmente si se encuentran inmovilizadas, o bien por modificación química de células ó enzimas (25).

1.3.3 Estabilidad y Reutilización

La dificultad para recuperar enzimas solubles del licor de reacción, usualmente se presenta para reactores por lotes (batch) y de flujo continuo, al operar a altas temperaturas, o al final de la reacción las enzimas presentan muy bajas actividades. Para sistemas de flujo continuo, las enzimas solubles pueden retenerse en el reactor empleando membranas de ultrafiltración (7). Células en suspensión pueden recuperarse del licor de reacción utilizando equipo de separación sólido/líquido o por sedimentación gravitacional. En muchos otros

casos, sin embargo la pérdida de actividad catalítica con el tiempo es demasiado rápida y su reutilización es antieconómica, especialmente si comienza la lisis de la célula. La inmovilización de células o enzimas aisladas, facilita su reutilización catalítica; esto se justifica si la estabilidad catalítica de la célula o enzima inmovilizada es alta. Muchos son los reportes de incrementos de estabilización por inmovilización, pero pocos de éstos dan valores de estabilidad catalítica de la enzima bajo condiciones operacionales (46), (54), (Fig. 2).

Sin embargo, muchas enzimas solubles son muy inestables, grandes incrementos en su estabilidad pueden necesitarse para justificar su inmovilización. Debiéndose tomar en cuenta el costo total del material que se usará como soporte, el costo de la enzima, y el procedimiento de inmovilización, siendo factible calcular el número de veces que la enzima inmovilizada puede reutilizarse en un reactor por lotes (batch), o el tiempo de operación en un reactor de flujo continuo; y el costo si se utilizan células o enzimas. La reutilización es un factor económico que influye directamente en el costo de las formas de catálisis y por lo tanto en el costo total de la manufactura del producto (12), (Figura 3).

1.3.4 Modificación de la Cinética de Reacción

Cuatro de los tipos de catálisis enlistados anterior-

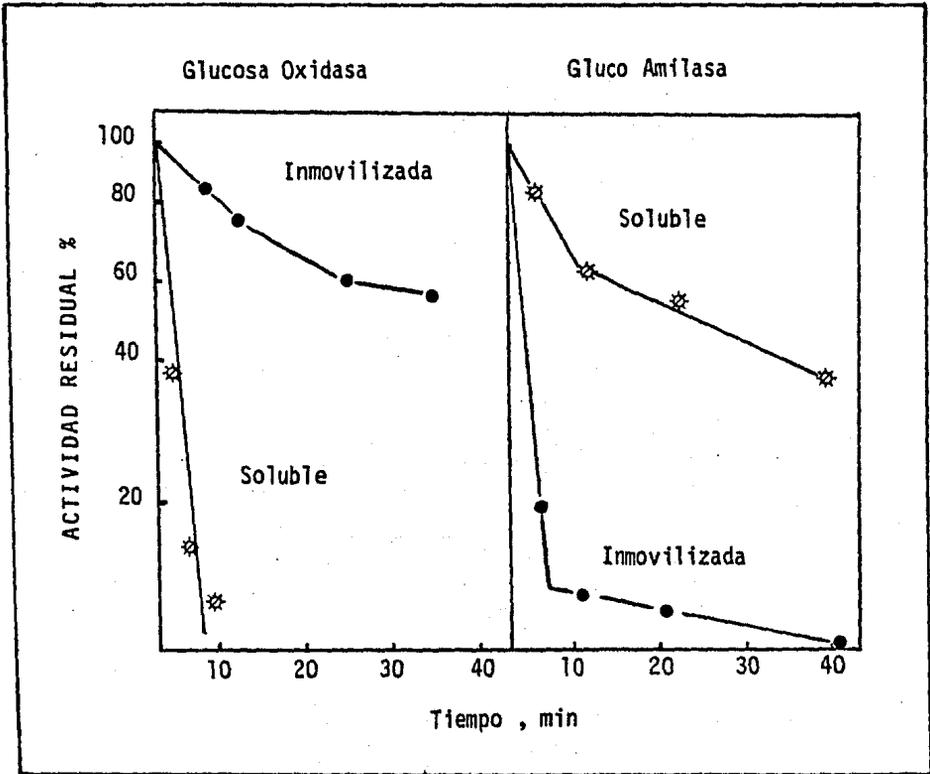


Figura 2. Efecto de la inmovilización en polietilenaamina sobre la termoestabilidad de glucosa oxidasa (61°C) y glucoamilasa (68°C). (54)

mente, de los cuales los tres referentes al uso de células completas y enzimas insolubles inmovilizadas, son catálisis en fase sólida y por lo tanto en una fase diferente al caldo de reacción. Cuando la catálisis es un medio heterogéneo la reacción puede afectarse por gradientes de transferencia de masa de los sustratos a los sitios de catálisis. Para células microbianas, la penetración de sustrato en aglutinamientos de células o películas, puede restringir su crecimiento o formación de producto. La resistencia difusional presente en las células completas es un factor limitante; así como la localización de la enzima en la célula, si se encuentra a nivel de membrana o está contenida en la pared celular (54). En caso de enzimas inmovilizadas en materiales porosos o por atrapamiento limitan la transferencia de masa. En resumen, la actividad de células o enzimas inmovilizadas particularmente con sustratos de alto peso molecular puede restringirse por inaccesibilidad de éstos al sitio activo de la enzima (41).

2. Inmovilización

2.1 Definición

Una célula o enzima inmovilizada se define como células o enzimas cuya localización es en un espacio restringido completamente a una región limitada. (11, 52, 56)

2.2 Técnicas de Inmovilización.

Los objetivos de la inmovilización son: Primero, recuperar la enzima del caldo de reacción fácilmente para reutilizarla, y esto es importante desde el punto de vista económico. Segundo, conferir estabilidad catalítica prolongada al sistema.

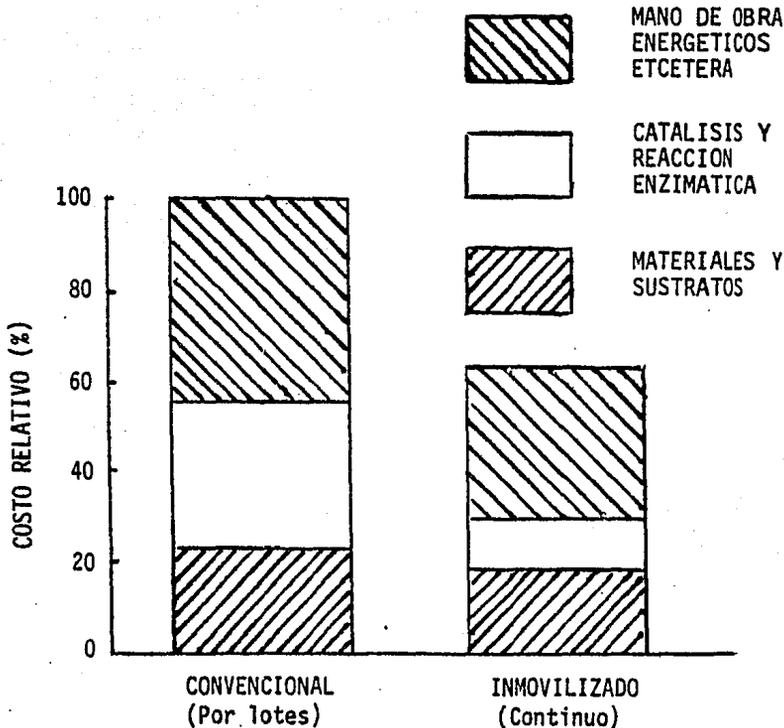


Fig. 3 Comparación del costo relativo de la producción industrial de ácido L-aspártico utilizando células completas de *E. coli* (12).

Muchas técnicas para la inmovilización de enzimas y otras proteínas se han reportado, pero ninguna técnica será de aplicación universal, porque las enzimas difieren significativamente en su composición y características fisicoquímicas. En resumen, las propiedades del sustrato y producto determinan la elección de la técnica de inmovilización.

Las técnicas de inmovilización pueden dividirse en cuatro grupos y pueden combinarse entre ellas (Fig. 4), (52);

1. Atrapamiento o Microencapsulación
2. Adsorción
3. Unión al soporte
4. Entrecruzamiento

En la tabla 3, (6) se resumen algunas de las ventajas y desventajas de estas técnicas de inmovilización. Para mayor información y profundidad se recomiendan una serie de revistas y libros (11, 39, 43, 56, 57):

En particular el método de atrapamiento se basa en confinar enzimas o células en una matriz polimérica (atrapamiento en cristal), o englobadas en una membrana semipermeable (tipo encapsulación). Al inmovilizar por este método las enzimas o células no reaccionan con el soporte, sólo quedan atrapadas en ellos. Los soportes utilizados por esta técnica de inmovilización son: K-carragenina, poliacrilamida, agar, alginato, triacetato de celulosa, etc. (11, 39, 43, 56, 57).

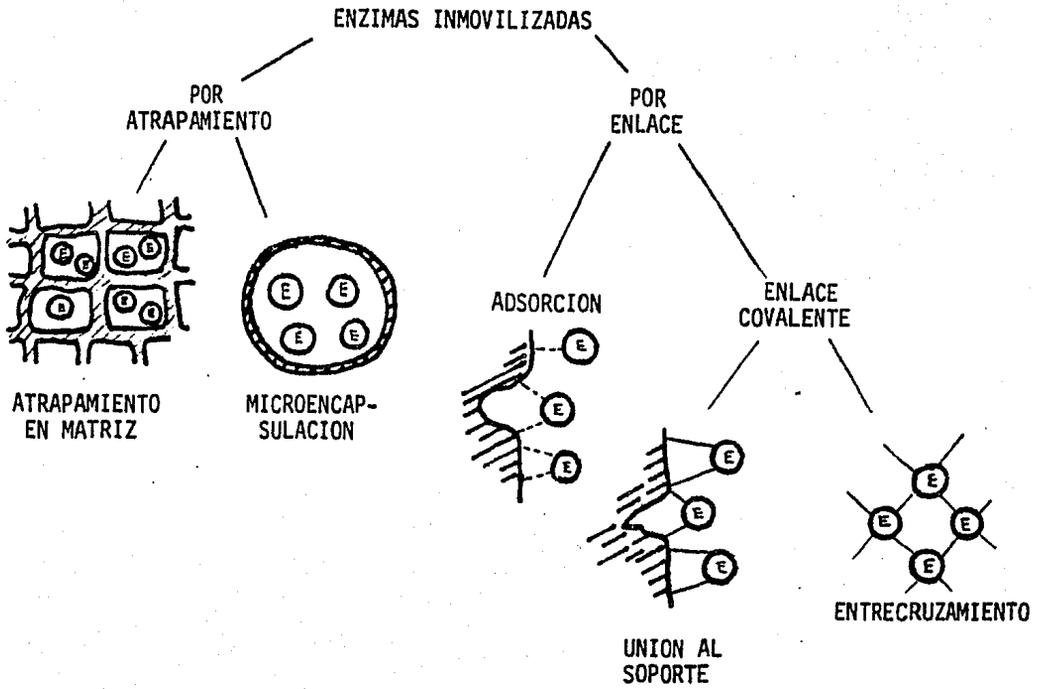


Fig. 4 Técnicas de Inmovilización de Enzimas. (11, 52, 56).

Tabla 3. Comparación de Diferentes Técnicas de Inmovilización (6)

CARACTERISTICA	ADSORCION	UNION AL SOPORTE	ATRAPAMIENTO Y MICROENCAPSULACION	ENTRE CRUZAMIENTO
Preparación	Simple	Difícil	Difícil	Intermedia
Fuerza de enlace	Débil	Fuerte	Intermedia	Fuerte
Actividad enzimática específica	Alta	Intermedia	Baja ^a	Baja
Regeneración del soporte	Posible	Raro ^b	Imposible	Imposible
Costo de la inmovilización	Bajo	Alto	Intermedio	Intermedio
Aplicación General	Sí	Sí	Sí	Sí
Protección a la enzima de proteólisis o ataque microbiano	No	No	Sí	Algunas veces

a) Las bajas actividades específicas se deben posiblemente a fenómenos de difusión.

b) Algunos soportes pueden regenerarse (p.e. vidrio poroso).

3. Galactanas (Extractos)

Los polisacáridos de algas marinas (agar, furcellarano, carragenina, alginato), son extraídos químicamente del material crudo. El extracto líquido es evaporado o bien el polisacárido es precipitado con alcohol, o en el caso del alginato con ácido o iones divalentes antes de secarlo (42).

Su unidad estructural aparece en la Tabla 4, así como su fuente de obtención. Con excepción del alginato, los demás extractos contienen en su estructura grupos éster sulfato (Tabla 5). De éstos la carragenina es el polisacárido más empleado en la industria alimentaria, por sus propiedades funcionales (22). La carragenina es un polisacárido que contiene varias fracciones, de las cuales tres son las más importantes por sus características y se diferencian entre sí por el contenido de grupo éster sulfato, así como de grupos 3,6 anhidro galactósidos (Tabla 6); y de estas tres fracciones, la fracción Kappa es la única que forma geles rígidos con sinéresis baja (1). La estructura covalente del polisacárido K-carragenina aparece en la figura 5. Anderson, N.S. et. al., determinó que la K-carragenina es una doble hélice en estado sólido (figura 6), (16).

Tabla 4.

NOMBRE

<u>EXTRACTOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>FRACCION</u>	<u>UNIDAD ESTRUCTURAL</u>
Agar Agar ^(a)	Gelidium sp.	Agarosa	D-galactosa- β (1,4)- 3,6 anhidro-L-Galactosa α (1-3)
		Agaropectina	
Carragenina ^(a)	Chondrus crispus	Lambda	D-galactosa-2-sulfato- β (1-4)- D-galactosa-2,6 disulfato α (1-3)
		Gigartina sp.	
	Euchema sp.	Kappa	D-galactosa-4-sulfato- β (1-4)- 3,6 anhidro-D-galactosa α (1-3)
Furcellarano ^(a)	Furcellaria sp.	Iota	D-galactosa-4-sulfato β (1-4) 3,6 anhidro-D-galactosa-2- sulfato- α (1-3)
			D-galactosa β (1-4) D-galactosa-4-sulfato α (1-3) 3,6 anhidro-D-galactosa β (1-4)
Alginato ^{(a)(b)}	Macrocystis sp.		D-manoronato, β (1-4)-
	Laminaria sp.		L-guluronato, α (1-4)
(a)(c) <u>Galactomannanas</u>	Pseudomona aeruginosa		D-manosa β (1-4)
	Azotobacter vinelandii		D-galactosa, α (1-6)Enlaces
			Relación Manosa/Galactosa
Algarrobo	Ceratonía siliqua		3.35:1
Tara	Caesalpinia spinosa		3.00:1
	Gleditsia triacanthos		2.50:1
Guar	Cyamopsis tetra gonolobus		1.50:1
	Trigonella foenum-graecum		1.08:1
	Crotalaria mucronata		2.70:1

a) Glicksman, M. Gum technology in the Food Industry

Academic Press, New York (1969)

b) Gorim P.A.J. & Spencer, J.F.I. Can. J. of Chem. (44) 993 (1966)

Linker, A. & Jones, R.S. J. Biol. of Chem. (24) 3845 (1961)

c) Dea, I.C.M. J. Mol. Biol. (68) 153 (1972)

Tabla 5. Contenido de Grupos Ester Sulfato en Galactanas (1).

Galactana	Gpo. Ester Sulfato (%)
Agar	Muy poco
Agaropectina	5 - 10
Furcellarano	12 - 18
Carragenina	20 - 36

Tabla 6. Contenido de Grupos Ester Sulfato y 3, 6 Anhidro en las Fracciones K, i, λ de Carragenina (1).

	Kappa	iofa	lambda
Gpo. Ester Sulfato (%)	25	32	35
Gpo. 3,6 Anhidro (%)	34	30	0

4. Galactomanannas

Estos polisacáridos se obtienen de semillas de leguminosas por procesos de molienda y tamización (42). Su estructura covalente se basa en enlaces $\beta(1-4)$ -D-Manosa con enlaces sustituyentes en posición $\alpha(1-6)$ -D-Galactósidos (16). Se clasifican de acuerdo a su relación manosa-galactosa (Tabla 4).

El análisis de los productos de hidrólisis enzimática (14) en galactomannanas determinaron dos estructuras básicas, y que indican que los grupos sustituyentes galactósidos ocurren en bloques, y en muy raras ocasiones se encuentran aislados, a esta estructura se le denomina región ramificada; la otra estructura denominada región lisa está formada por secuencias de manosa (Fig. 7). Su estructura covalente idealizada aparece en la Fig. 8.

5. Conformación y Asociación de Carragenina, Agarosa y Galactomannanas

Algunos polisacáridos (galactanas) forman geles por un mecanismo que envuelve el entrecruzamiento de cadenas originando múltiples hélices, sujeto a un desdoblamiento selectivo.

Dependiendo de los residuos terminales de la hélice, ésta presentará la habilidad de conformar redes, pero cuando no tienen esta capacidad, la asociación con galactomannanas puede reestablecer esta propiedad de conformar redes. Esta

asociación se denomina como "estructura cuaternaria" del polisacárido y el mecanismo "inducción del ligando de la estructura terciaria" del polisacárido (16).

Estudios de investigación de la conformación geométrica y asociación en estado sólido (fibras), utilizando difracción de Rayos X y dicroísmo infrarrojo (3), y complementados con estudios basados en las propiedades de geles térmicamente reversibles en solución acuosa establecieron el comportamiento conformacional y asociación entre galactanas y galactomannanas.

Las estructuras covalentes de galactanas y galactomannanas aparecen en las figuras 6 y 8 respectivamente, y las cuales pueden experimentar cambios conformacionales como se muestra en la figura 9. Los cambios conformacionales que ocurren durante la licuefacción de geles de agarosa se observan en la figura 10. Estos cambios difieren de los presentados en la K-carragenina únicamente, en que el desplazamiento es totalmente opuesto y presenta una histéresis mayor (Figura 11). En cambio las galactomannanas no experimentan un cambio que sugiera la transición conformacional, cuando son calentadas y enfriadas sus soluciones acuosas (Figura 12). Los cambios en la rotación óptica determinados para la asociación de K-carragenina-algarrobo se muestra en la figura 13, en ella se observa que los cambios conformacionales originados por la asociación sólo influyen en el punto de licuefacción (figura 11). En contraparte,

los cambios experimentados por la asociación de agarosa-algarrobo son muy significativos, ya que su comportamiento es totalmente diferente con respecto al experimentado por agarosa sola (Figura 10).

Estos estudios establecieron que el tipo de asociación no son covalentes, y que existen zonas específicas de asociación entre las hélices de las galactanas y la región lisa de las galactonammanas (Figura 14).

6. Alcoholes Polihidrólicos, Polioles ó Polihidroles

6.1 Definición

El término poliol se aplica a aquéllas moléculas que tienen dos o más grupos hidroxilo (OH^-). Esto excluye a los azúcares, debido al grupo aldehído o cetona presente en su estructura.

6.2 Los polioles se conocen desde finales del siglo pasado; el más conocido, el glicerol se utiliza desde entonces para evitar la desnaturalización de proteínas. Se adicionan para mantener las características de retención de agua del sistema que los contenga, evitando su pérdida durante un largo período de tiempo. Los más empleados en la industria alimentaria son: el propilenglicol, el glicerol, manitol y sorbitol (Figura 15). La estabilidad al almacenamiento de enzimas en soluciones concentradas de polioles, reprime el

crecimiento microbiano por alta presión osmótica (45).

Un breve resumen de las características y aplicaciones aparecen en la tabla 7 y 8, y sirven como criterio para su elección. Furia (21) reporta utilizando la tabla 7 la elección de propilen glicol para concentrados de saborizantes debido a su acción solubilizante y poco volátil.

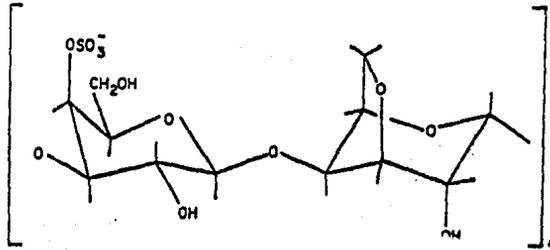


Fig. 5 Estructura covalente de K-carragenina (idealizada) (16).

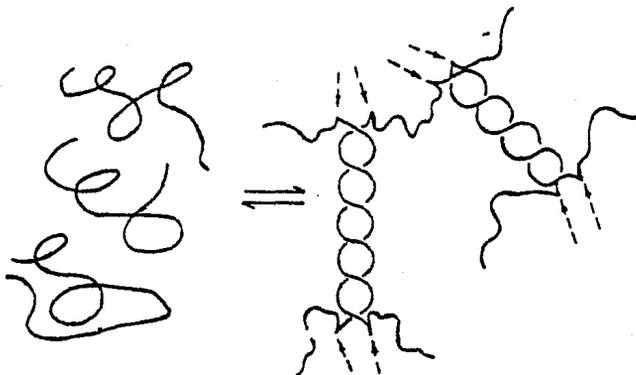


Fig. 6 Modelo para la base molecular de la formación de un gel de k-carragenina e i-carragenina: una red es formada por la combinación de cadenas que originan dobles hélices, y que está influenciada por la distribución de pliegues que marcan su terminación, y que están señalados en la figura por flechas. Especialmente en k-carragenina la red es más estable. (16).

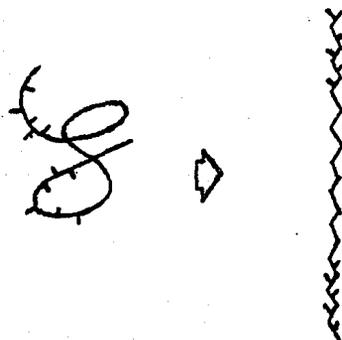


Fig. 7 Conformaciones de una galactomannana y su interconversión hipotética. A la izquierda, en forma enrollada y a la derecha en forma desdoblada. En esta figura los residuos de galactosa (región ramificada) destacan de la cadena continua de manosa (región lisa). Únicamente se representan dos zonas ramificadas y una lisa en la cadena, pero una galactomannana puede contener varias de éstas secuencias en forma alterna (14).

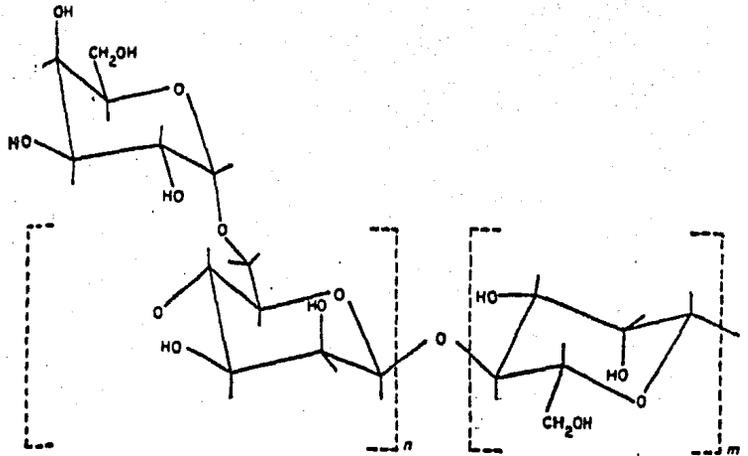


Fig. 8 Estructura covalente de una galactomannana (idealizada) (16).

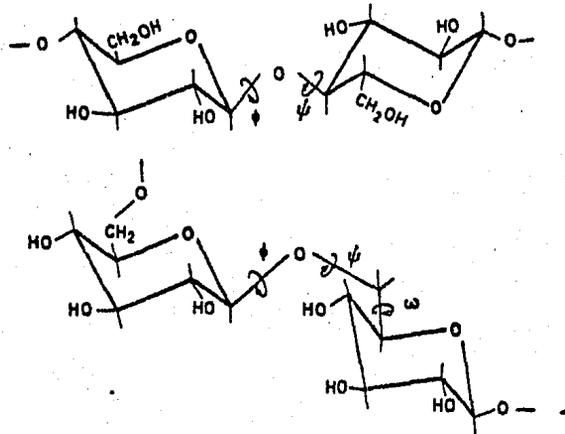


Fig. 9 Angulos rotacionales entre residuos adyacentes. La orientación relativa de residuos adyacentes unidos por enlaces glucosídicos al anillo son definidos por dos ángulos rotacionales ϕ y ψ . Los enlaces 1,6 introducen la posibilidad de rotación cerca de los enlaces en (C-5)-(C-6). (16).

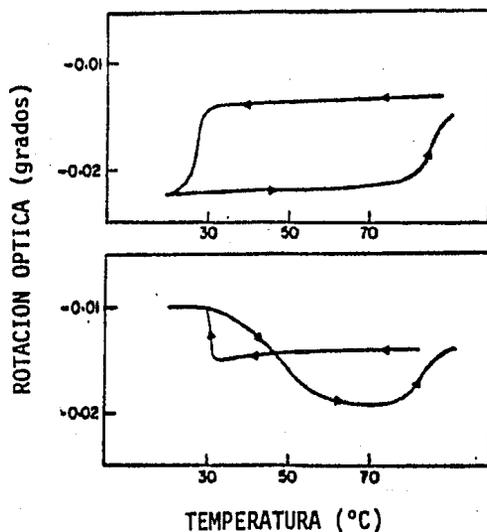


Fig. 10 Comparación de la variación de rotación óptica con la temperatura para agarosa (arriba) y para una mezcla de agarosa (0.05%) y algarrobo (0.01%) (abajo) a 546 nm. (16)

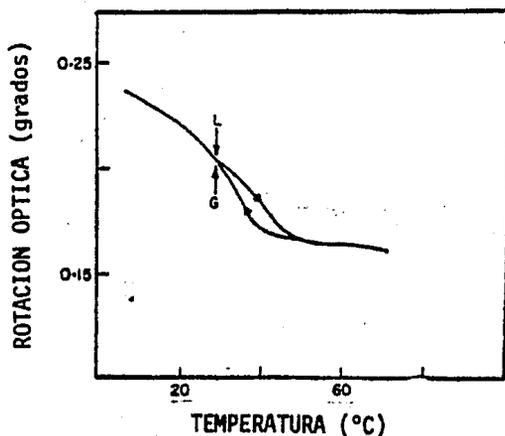


Fig. 11 Variación de la rotación óptica con respecto a la temperatura de k-carragenina (3%) a 546 nm. El punto de gelificación (G) y el punto de licuefacción (L) se señalan con flechas. (16).

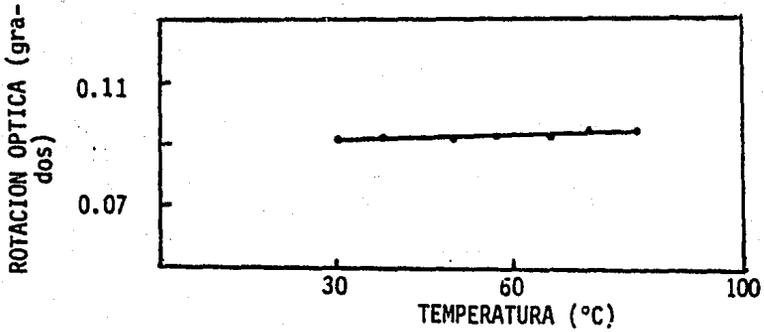


Fig. 12 Variación de la rotación óptica de las galactomannanas (1%) con la temperatura a 546 nm. (16).

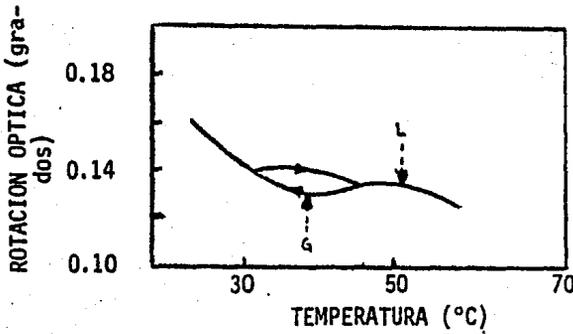


Fig. 13 Variación de la rotación óptica de k-carrageenina (1%) con algarrobo (2%) a 546 nm. El punto de gelificación (G) y el punto de licuefacción (L) se señalan con flechas. (16).

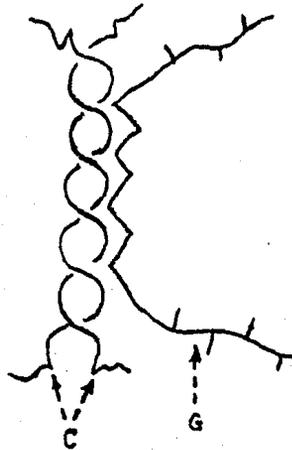


Fig. 14. Modelo propuesto para la interacción entre cadenas de K-carragenina (C) y galactomannana (G). Para explicación de la galactomannana ver la explicación de la figura 7. (16).

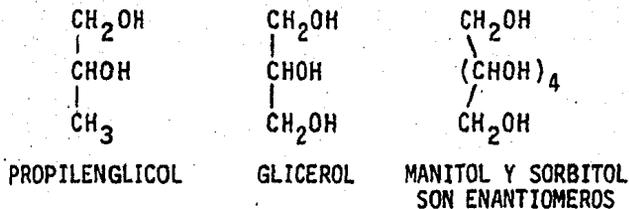


Fig. 15 Polioles más utilizados en la industria alimentaria (21).

Tabla 7 Guía para la selección de polioles más usados en la industria alimentaria farmacéutica (21)

	PG	G	S	M
Modificación de la cristalización		*	*	
Humectante	*	*	*	*
Plastificante		*		
Espesante			*	*
Rehidratación		*	*	
Solubilizante	*			

Abreviaciones: PG = propilenglicol, G = glicerol,
S = sorbitol, M = manitol.

Tabla 8. Enzimas Estabilizadas por Polihidroles. (45)

ENZIMA	POLIALCOHOL	CARACTERISTICA	REF.
Glucoamilasa	10-100% glicerol	T+ (10 min, 60°C)	Moriyama et. al. (1977)
Proteasa	50-70% glicerol	S+ (28 días, 33°C)	Yasumatsu et. al. (1965)
α -amilasa	50-70% sorbitol	T+ (10 min, 80°C)	
aldehido deshidrogenasa	30% glicerol	I+ (20min, iodoacetato)	Bradbury & Jacoby (1972)
Ribonucleasa	10-25% glicerol 25% eritrol 10-40% sorbitol	T+ (Temp. de transición) D+ (urea)	Gerlisma (1968)
Quimotripsinógeno A	10-30% eritrol 10-30% sorbitol	T+ (Temp. de transición)	Gerlisma (1970)
Quimotripsina	50-90% glicerol	P+ (24h, 25°C)	Sokolova et. al. (1971)
Tripsina	30-50% etilenglicol	D+ (urea) T+ (3h, 35°C)	
β -amilasa	50% glicerol	S+ (48h, 37°C)	Banks (1969)

T = estabilidad al calor.

S = estabilidad al almacenamiento.

P = estabilidad contra proteólisis.

D = estabilidad contra desnaturalizantes.

I = estabilidad contra inhibidores.

+ = incremento.

7. Teoría de la Celda Modificada para los Estudios de Difusión

Polímeros naturales o sintéticos son utilizados como matrices en algunas técnicas de inmovilización para atrapar proteínas, enzimas y/o células. Las características físicoquímicas de tales matrices, en forma de geles, pueden tener un efecto sobre las reacciones del material biológico químicamente activo atrapado en el gel.

El tamaño del poro del gel, reflejado por la viscosidad del acarreador debido al tamaño de la molécula y/o a su concentración, pueden afectar la difusión del(los) sustrato(s) o producto(s) y limitar las velocidades de reacción de las células atrapadas y/o enzimas. Por lo tanto, el tamaño del poro del gel es un parámetro crítico en la selección de una matriz para un proceso particular.

Sustratos de bajo peso molecular, así como productos, se pueden difundir fácilmente hacia la matriz, en tanto ésta contenga poros largos y/o anchos. Sin embargo los poros pueden permitir la salida del material activo de la matriz que lo contenga. Es por eso, que la caracterización en términos de difusión, de sustratos y productos reviste gran importancia para la selección y utilización de matrices en forma de geles.

Los estudios de difusión para los sustratos y productos

del presente estudio, se efectuaron utilizando la técnica de la celda modificada originalmente propuesta por March y Weaver (34), y posteriormente utilizada por Friedman (20). Los datos reportados por este último autor se han venido utilizando en la comprensión de los fenómenos difusionales a través de geles (matrices poliméricas).

7.1 March y Weaver (34) han derivado una solución a la ecuación de Fick, basados en la analogía que existe entre la transferencia de calor y la transferencia de masa.

El problema aquí considerado es el de flujo en una dirección, ocurriendo cuando un sólido de longitud ℓ en la dirección x , está en contacto en el plano $x = \ell$, con una solución líquida bien agitada. El plano $x = 0$ es impermeable al flujo o está aislado:

Para que el flujo de masa o calor ocurra en una dirección, es necesario que ambos, sólidos y líquidos sean infinitos en la dirección normal a x , o que sean cuerpos cilíndricos de idéntica sección transversal cuyas superficies laterales sean impermeables al flujo o se encuentren aislados. Esta última condición fue la seguida para el diseño de la celda modificada utilizada para el presente trabajo. Don Juan, M. (18) construyó la celda que se empleó en este trabajo.

Las ecuaciones y condiciones que describen la teoría

de la celda se presentan a continuación:

1. Sea que el líquido se extienda de $x = \ell$ a $x = 2\ell$.
2. El sólido o gel, se extiende de $x = 0$ a $x = \ell$.
3. Se define una función $u(x,t)$ que representa la concentración del soluto A en el sólido, a cualquier espesor x y tiempo t .
4. Se define una función $V(t)$ que representa la concentración de A en el líquido para $t = t$.
5. Por lo anterior, la segunda Ley de Fick es expresada como:

$$D_{AG} \frac{\delta^2 u}{\delta x^2} = \frac{\delta u}{\delta t} = \text{para } t > 0 \quad (1)$$

donde D_{AG} = coeficiente de difusión de A en el sólido.

6. Las condiciones iniciales en la frontera son:

$$\frac{\delta u}{\delta x} = 0 \text{ en } X = 0 \text{ para } t > 0 \quad (2)$$

$$\text{y } \lim_{t=0} u(x,t) = u_0(x) \text{ en } 0 \leq x \leq \ell \quad (3)$$

donde $u_0(x)$ es la concentración inicial del soluto A en el sólido.

7. El contacto del sólido y el líquido en $x = \ell$ (la interfase), da la condición:

$$u(\ell, t) = v(t) \quad \text{para } t > 0 \quad (4)$$

8. Si la concentración inicial de A en el líquido es v_0 , la concentración de A para cualquier tiempo t está dada por:

$$v(t) = v_0 - D_{AG} \int_0^t \left(\frac{\delta u}{\delta x} \right)_{x=\ell} dt \quad (5)$$

9. Por diferenciación de (5) se obtiene:

$$D_{AG} \left(\frac{\delta u}{\delta x} \right)_{x=\ell} = \frac{\delta v}{\delta t} \quad (6)$$

La ecuación (6) expresa el hecho de que el cambio de concentración de A con respecto al tiempo en el líquido, es proporcional al cambio de concentración de A con respecto al espesor en el sólido. La serie de ecuaciones del 1 al 6 representan la teoría de la celda modificada.

10. Para el caso $\lambda = 1$, esto es que el cociente volumen del líquido con respecto al del sólido sea igual a 1. Friedman (20) presenta la solución a las ecua-

ciones del 1 al 6 en forma de:

$$V(t) = \frac{1}{2} - \sum_{h=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} e^{-(2n+1)\frac{\pi^2}{4} \cdot T} \quad (7)$$

donde $T = D_{AG} t / \ell^2$

D_{AG} = coef. de difusión de A en el gel

t = tiempo

ℓ = espesor del gel

March y Weaver (34) presentan la solución como:

$$V(T) = \frac{1}{2} - 0.327 e^{-4.117T} + 0.0766 e^{-24.14T} + 0.0306 e^{-63.68T} + 0.0160 e^{-123T} + \dots \quad (8)$$

En la utilización de la solución, Don Juan, M.J.

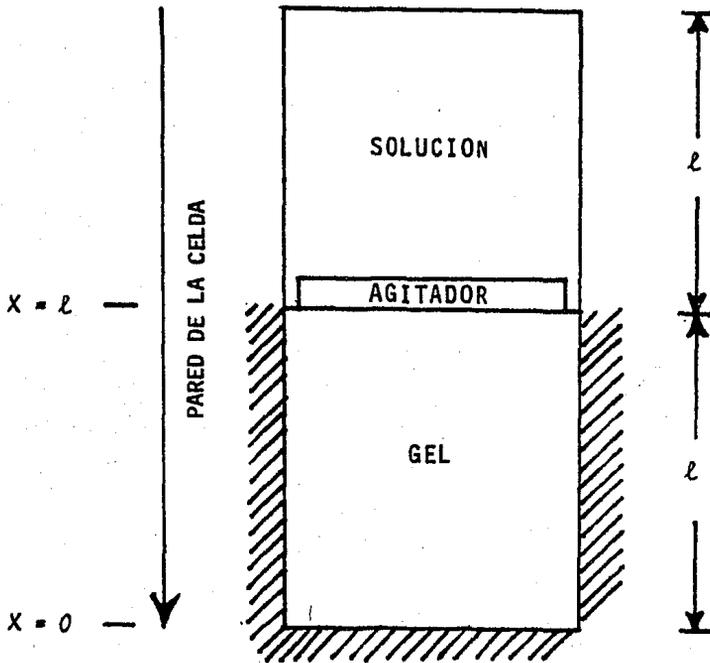
(18) propuso la forma:

$$V(T) = \frac{1}{2} - 0.327 e^{-4.117T} + 0.0766 e^{-24.14T} + 0.0306 e^{-63.68T} + 0.0160 e^{-123T} + \sum_{n=5}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} e^{-(2n+1)\frac{\pi^2}{4} \cdot T} \quad (9)$$

misma que se expandió a 15 términos.

La ecuación (9) permite determinar la concentración de un soluto difundible presente en el líquido, con respecto al tiempo. Si se conoce esta función $V(t)$ experimentalmente así como el espesor del gel l , el coeficiente de difusión a través del gel D_{AG} , se calcula resolviendo la ecuación (9) para T . Don Juan (18) utilizó el método matemático de Newton para calcular el valor D_{AG} , por medio de la ecuación (9). Figura 16.

FIGURA 16: CELDA MODIFICADA
PARA ESTUDIOS DIFUSIONALES EN GELES



III ANTECEDENTES

Antecedentes:

1. Inmovilización de células en k-carragenina.

El método utilizado para la inmovilización de células con actividad enzimática, es el reportado por Tosa et. al. (51), el cual consiste en solubilizar 3.4g de k-carragenina en una solución fisiológica salina a 37 - 60°C; por separado se suspenden 16g (peso húmedo) de células microbianas en solución fisiológica salina a 25 - 50°C. Las dos soluciones se mezclan, y una vez mezcladas se enfrían a 10°C durante 30 minutos.

Para incrementar la rigidez del soporte se sumerge en una solución de cloruro de potasio 0.3M previamente fría.

1.1 Tratamiento con glutaraldehído-etilendiamino.

Este tratamiento es con el objeto de evitar que las células se lizen y otorgar una estabilidad más prolongada al soporte o catalizador. Tratamiento que puede resultar agresivo a la actividad de la enzima de interés; para ello es importante optimizar la concentración, pH, temperatura y tiempo de contacto con el soporte.

Tosa et. al (51) utilizó una amina alifática para reducir la agresividad del glutaraldehído, ya que el grupo aldehído reacciona con los grupos amino de la etilen-

diamino y grupos amino de las células formando puentes intermoleculares. La concentración que utilizó de etilen-diamino fue de 0.12 M y la de glutaraldehído 0.6 M con un tiempo de contacto con el soporte de 30 min. a 5°C pH 7.0.

La actividad retenida para varias enzimas inmovilizadas en k-carragenina y sometidas a este tratamiento, oscilan entre 30 y 70%, y su vida media al almacenarse a una temperatura de 4°C en una solución 0.3 M de KCl es de 50 a 686 días.

IV OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y mejorar la inmovilización de E. coli y K. fragilis con actividad de β -D-galactosidasa, por el método de atrapamiento a través de la interacción de K-carragenina con galactamannanas y uso de polioles.

OBJETIVOS PARCIALES

1. Evitar el fenómeno de Sinéresis.
2. Aumentar la resistencia física del soporte.
3. Evitar que las células lleven a cabo funciones metabólicas que afecten el soporte mediante tratamiento químico después de inmovilizarlas.
 - 3.1 Evitar el tratamiento que se dá al sistema de inmovilización con glutaraldehído-etilendiamino.
4. Caracterización del soporte.
 - 4.1 A diferentes pHs.
 - 4.2 A diferentes concentraciones de soluciones amortiguadoras de fosfatos.
 - 4.3 Cuantificar la actividad de enzima β -D-galactosidasa con respecto a la capacidad de atrapamiento del soporte.
 - 4.4 Cuantificar el coeficiente de difusividad para sustrato(s) (lactosa) y producto(s) (glucosa y galactosa) en el soporte.

V. MATERIALES Y METODOS

1.0 METODOLOGIA GENERAL PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE.

Materiales:

- Balanza analítica (Sartorius).
- Homogenizador de propela (Cafrano).
- Termomezclador (Colora Messtechnick)
- Parrilla eléctrica con sistema de agitación (Corning).
- Agitador magnético.
- Vaso de precipitados de 250 ml (Pyrex).
- Probeta de vidrio de 100 ml (Pyrex).
- Espátula.
- Recipiente de plástico

Sustancias:

- Goma Guar (Química Hércules de México)
- Goma de Algarrobo (Química Hércules de México)
- K-carragenina (Københavns Pektinfabrik, Denmark).
- Cloruro de sodio R. A. (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.

Metodología:

1. Colocar en un vaso de precipitados 94 ml de agua bidestilada.
2. Adicionar 0.9 g de cloruro de sodio y solubilizar totalmente.
3. Adicionar a esta solución, lentamente y con agitación constante con ayuda de un homogenizador de propela, los

casos que a continuación se mencionan;

- a) K-carragenina.
- b) K-carragenina-goma guar.
- c) K-carragenina-goma de algarrobo.

De acuerdo con la Tabla 9 correspondiente a las formulaciones propuestas para el sistema de inmovilización,

4. Solubilizar a temperatura ambiente durante 15 minutos cuidando que la solución quede exenta de grumos.
5. Efectuar la inmersión parcial del vaso de precipitados en Baño María a 45-50°C, homogenizando durante 15 minutos más.
6. Inducir la formación del gel a temperatura ambiente.
7. Excluir la forma geométrica deseada, después de 12 horas de haber gelificado el sistema.
8. Efectuar la cuantificación de resistencia a la compresión después de excluir el sistema (P. ej. paso No. 1 punto 3.0 p. 48).

1.1 METODOLOGIA PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE CON ADICION DE GLICEROL.

Materiales y Sustancias:

- Los mencionados en la Metodología General.
- Glicerol U.S.P. (J.T. Baker).

Metodología.

1. Colocar en un vaso de precipitados 40 ml de agua bides-

tilada.

2. Adicionar 0.9 g de cloruro de sodio y solubilizar totalmente.
3. A esta solución adicionar los siguientes casos que a continuación se mencionan:
 - a) K-carragenina-glicerol 3.4% V/v
 - b) K-carragenina-goma de algarrobo-glicerol 3.4% V/v.
 - c) K-carragenina-goma guar-glicerol 3.4% V/v.
 - d) K-carragenina (1.35 g) - goma de algarrobo (2.51 g) y 10, 20, 30, 40 ó 50% V/v de glicerol.

De acuerdo a la tabla 9 correspondiente a las formulaciones propuestas para el sistema de inmovilización.

4. Adicionar agua bidestilada cuanto baste para 94,0 ml.
5. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la Metodología General a partir del punto No. 4 correspondiente.

1.2 METODOLOGIA PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE CON ADICION DE PROPILENGLICOL.

Materiales y Sustancias:

- Se utilizan los mencionados en la Metodología General, con excepción de goma guar.
- Propilenglicol U.S.P. (J.T. Baker).

Metodología.

1. Colocar en un vaso de precipitados 40 ml de agua bides-

tilada.

2. Adicionar 0.9 g de cloruro de sodio y solubilizar totalmente.
3. Adicionar a esta solución, lentamente y con agitación constante con ayuda de un homogenizador de propela, los casos que a continuación se mencionan:
 - a) K-carragenina (3.86 g) - propilenglicol 3.4% v/v.
 - b) K-carragenina (1.25 g) - goma de algarrobo (2.51 g) y propilenglicol 3.4, 10, 20, 30, 40, 50% v/v.
4. Adicionar agua bidestilada c.b.p. 94 ml.
5. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la Metodología General a partir del punto No. 4 correspondiente.

1.3 METODOLOGIA PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE CON ADICION DE UNA MEZCLA DE GLICEROL-PROPILENGLICOL.

Materiales:

- Se utilizan los mencionados en la Metodología General.

Sustancias:

- Goma de algarrobo (Química Hércules de México),
- K-carragenina (Københavns Pektinfabrik, Denmark),
- Cloruro de Sodio R. A. (J.T. Baker),
- Propilenglicol U.S.P. (J.T. Baker),
- Glicerol U.S.P. (J.T. Baker).

Metodología.

1. Colocar en un vaso de precipitados 59 ml de agua bides-

tilada.

2. Adicionar 0.9 g de cloruro de sodio y solubilizar totalmente.
3. Adicionar 35 ml de una solución homogénea de glicerol-propilenglicol de acuerdo a las formulaciones que aparecen en la tabla 10.
4. Adicionar a esta solución lentamente y con agitación constante, con ayuda de un homogenizador de propela 1.35 g de K-carragenina y 2.51 g de goma de algarrobo.
5. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la Metodología General a partir del punto No. 4 correspondiente.

2.0 METODOLOGIA PARA LA CUANTIFICACION DE LA RESISTENCIA A LA COMPRESION (τ) DEL SOPORTE.

Materiales:

- Compresor de Hidrocoloides (aprobado por A.D.A. Especification No. 11, 4.3.9.4 Compressive Strength, 1980).
- Compresor Universal de Materiales (Instron),
- Vernier (Metromex) Mod. 1472.
- Espátula.
- Cronómetro.
- Balanza Digital (Sartorius).

Metodología.

2.1 CASO I. Compresor de Hidrocoloides (Fig.17).

1. Extruir y seleccionar una población de 10 muestras para

- 1 EMBUDO
- 2 EMBOLO
- 3 ESPECIMEN
- 4 VIDRIO
- 5 CUERPOS SOLIDOS
- 6 SOPORTE
- 7 CRONOMETRO

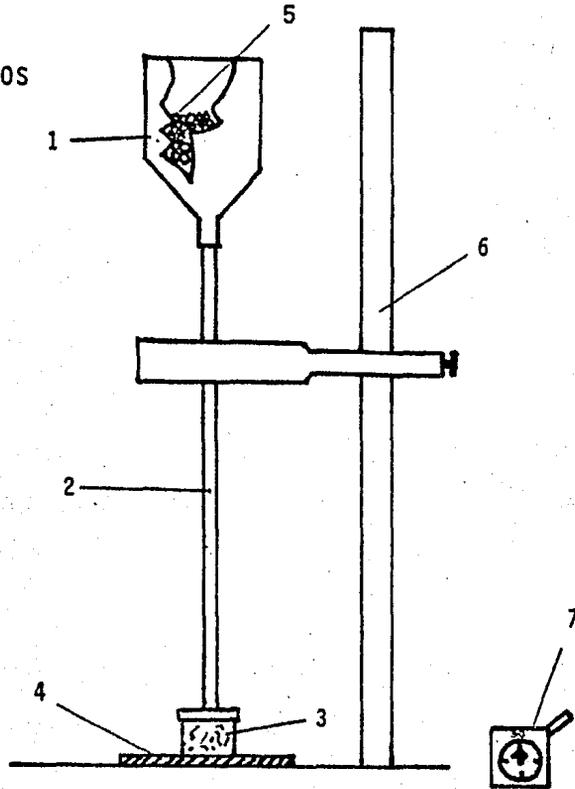


Figura 17: Compresor de sistemas hidrocoloidales
(Compressive Strength Sp. No. 11 4.3.9.4.
D.M.S., 1980).

- efectuar la cuantificación.
2. Determinar las dimensiones del área de contacto de la muestra a cuantificar con el compresor mediante el uso de un Vernier.
 3. Adicionar diferentes cantidades en peso, por espacio de 30 segundos entre cada adición, y así sucesivamente hasta observar la ruptura del gel.
 4. Cuantificar la cantidad en peso referida a la ruptura del gel observada.
 5. Reportar la resistencia a la compresión en unidades de $\overline{\text{Kg}}/\text{cm}^2$.
 6. Efectuar el análisis estadístico de los datos obtenidos calculando:

- a) Media aritmética \bar{X} .
- b) Desviación estandar S.
- c) Varianza V.

2.2 CASO II. Compresor Universal de Materiales (Instron).

Este método sólo se empleó para corroborar los datos obtenidos, en el Caso I para la resistencia a la compresión con respecto a la capacidad de atrapamiento del sistema de inmovilización; de acuerdo con la relación Peso seco células (g): Peso seco polímeros (g) y que presentó las características óptimas de actividad enzimática.

Metodología.

La metodología esta basada en la especificación D-659-54

de la A.S.T.M. (American Society for Test Materials); fijando los siguientes parámetros:

- 1º Area de contacto entre la muestra a analizar y el compresor de materiales (cm^2).
- 2º Velocidad de prueba o de aplicación de la compresión (mm/min).
- 3º Velocidad de la gráfica (mm/min).
- 4º Escala de la compresión ($\overline{\text{kg}}$).

3.0 DETERMINACION DEL FENOMENO DE SINERESIS.

Materiales:

- Balanza Analítica (Sartorius).
- Cajas de Petri (Pyrex).
- Desecador.
- Espátula.

Sustancias:

- Sílica gel (J.T. Baker).
- Cloruro de calcio anhidro (J.T. Baker).

Metodología.

1. Extruir 4 cubos de 1 x 1 x 1 cm de las formulaciones propuestas para el sistema de inmovilización después de 12 horas de haber inducido a la gelificación y que presentaron resistencia a la compresión (Tabla 10).
2. Pesar en balanza analítica y anotar el peso correspondiente.

diente de cada uno.

3. Depositarlos en cajas de Petri (una por cada formulación), adheriéndolos en la parte superior interna de la tapa.
4. En la parte inferior interna de la caja de Petri colocar una sal higroscópica (sílica gel).
5. Unir ambas partes de la caja y depositarla en un sistema de secado, que contenga una sal higroscópica (cloruro de sodio anhidro).
6. Mantener el sistema de secado cerrado (Figura 18).
7. A diferentes períodos de tiempo que se consideren convenientes retirar el espécimen (cubo) y pesarlo; y así sucesivamente cuantas veces sea conveniente, anotando la fecha y tiempo aproximado transcurrido en horas entre la anterior y la determinación subsecuente.
8. Reportar en % de pérdida en peso en función del tiempo en horas.

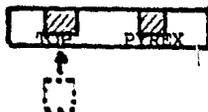
Nota: Se recomienda mantener las sales higroscópicas en óptimas condiciones, evitando que se sobresaturen de humedad presente en el medio ambiente del sistema, cambiándolas periódicamente.

4.0 DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO DEL SOPORTE CON RESPECTO A LA VARIACION DE pH EN TERMINOS DE RESISTENCIA A LA COMPRESION.

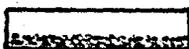
Materiales:

- Matraz aforado de 10 ml (Pyrex).

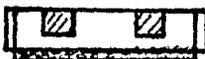
FASE 1



FASE 2



FASE 3



FASE 4

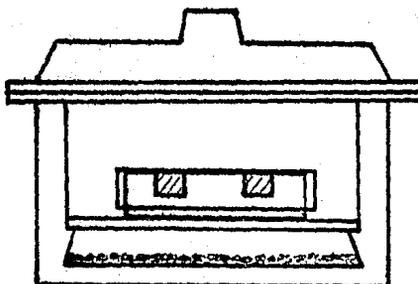


FIGURA 18: Sistema para la cuantificación de sinérisis.

- Matraz aforado de 100 ml (Pyrex).
- Vaso de precipitados de 250 ml (Pyrex).
- Potenciómetro (Corning)
- Los enlistados en la metodología general para la manufactura del sistema de inmovilización.
- Los enlistados en la metodología para la cuantificación de la resistencia a la compresión (Caso I).

Sustancias:

- K-carragenina (Københavns Pektinfabrik, Denmark).
- Goma de algarrobo (Química Hércules de México).
- Propilenglicol U.S.P. (J.T. Baker).
- Glicerol U.S.P. (J.T. Baker).
- Acido fosfórico H_3PO_4 (J.T. Baker).
- Cloruro de sodio R.A. (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (J.T. Baker).
- Agua desionizada.

Metodología:

1. Preparar soluciones amortiguadoras de fosfatos 0.2M en un intervalo de pH 4.0 a pH 9.0, utilizando para su preparación la ecuación de Henderson-Hasselbalch.
2. Adicionar en un vaso de precipitados 59 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0.2M y pH conocido.
3. Adicionar a esta solución 35 ml de una solución de glicerol-propilenglicol correspondiente a la formulación D de la Tabla 10.

4. Mezclar con agitación constante durante 5 minutos, hasta obtener una solución homogénea.
5. Adicionar a esta solución y con agitación constante, con ayuda de un homogenizador de propela 1.35 g de K-carragenina y 2.51 g de goma de algarrobo.
6. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la metodología general para la manufactura del sistema de inmovilización a partir del punto No. 4 correspondiente.

5.0 CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO Y EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES DEL SOPORTE DE LAS SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE FOSFATOS.

- 5.1 PARTE I: Capacidad de amortiguamiento del pH en función de la concentración de las soluciones amortiguadoras de fosfatos en presencia de polímeros (K-carragenina-algarrobo).

Materiales:

- Matraz aforado de 100 ml (Pyrex).
- Vaso de precipitados de 250 ml (Pyrex).
- Homogenizador de propela (Cafrano).
- Termomezclador (Colora Messtechnik).
- Recipiente de plástico.
- Termómetro (Heeke)-10°a 125°C.
- Agitador magnético.
- Parrilla eléctrica con sistema de agitación (Corning).

- Balanza analítica (Sartorius).
- Espátula.
- Cronómetro.
- Potenciómetro (Corning).

Sustancias:

- K-carragenina (Københavns Pektinfabrik, Denmark).
- Goma de algarrobo (Química Hércules de México).
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.

Metodología:

1. Determinar el pH a temperatura ambiente de una dispersión de K-carragenina (1.25 g) y goma de algarrobo (2.51 g).
2. Preparar soluciones amortiguadoras de fosfatos en concentraciones de 0.2, 0.1, 0.05 y 0.01 M a pH determinado en el punto anterior (pH a 20°C = 8.08), utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.
3. Adicionar a 94 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de concentración y pH conocidos, contenida en un vaso de precipitados de 250 ml., 1.25 g de K-carragenina y 2.51 g de goma de algarrobo lentamente y con agitación constante con ayuda de un homogenizador de propela.
4. Determinar el pH de la dispersión a temperatura ambiente, para cada una de las soluciones amortiguadoras de

diferente concentración.

5. Efectuar la inmersión parcial del vaso de precipitados en Baño María, y detectar la variación de pH con ayuda de un potenciómetro en función del incremento de temperatura hasta alcanzar 45°C y con agitación constante durante 30 minutos.
6. Enfriar el sistema a temperatura ambiente.
7. Determinar el pH de la dispersión a temperatura ambiente con agitación constante, y después sin agitación efectuar también esta determinación.

5.2 PARTE II: Capacidad de amortiguamiento del pH en función de su concentración, en presencia de células.

Materiales:

Los enlistados en la Parte I de esta sección, correspondiente a soluciones amortiguadoras de fosfatos (punto 5.1).

Sustancias:

- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.
- Células de E. coli CSH-36 (CIIGB/UNAM)

Metodología:

1. Determinar el pH a temperatura ambiente de una suspensión celular de E. coli CSH-36 en concentración de 3,4%

2. Determinar el pH del sistema de inmovilización en estado de gel a temperatura ambiente.
3. Preparar 100 ml de cada una de las soluciones amortiguadoras de fosfatos en concentración de 0.2, 0.1, 0.05 y 0.01 M a pH determinado en el punto No. 2 (pH a 20°C = 8.15), utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.
4. Adicionar a 94 ml de cada una de las soluciones amortiguadoras de fosfatos de concentración conocida pH = 8.15, 3.4 g de células (peso seco) de E. coli CSH-36.
5. Agitar constantemente con ayuda de un homogenizador de propela hasta obtener una suspensión homogénea.
6. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la Parte I de esta sección, correspondiente a soluciones amortiguadoras de fosfatos, a partir del punto No. 4 que le corresponde.

5.3 PARTE III. Efectos de las soluciones amortiguadoras de fosfatos sobre las propiedades del soporte.

Materiales y sustancias:

Los enlistado en la Parte I de esta sección, correspondiente a las soluciones amortiguadoras de fosfatos.

- Propilenglicol U.S.P. (J.T. Baker).
- Glicerol U.S.P. (J.T. Baker).
- Cloruro de sodio R.A. (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.

Metodología:

1. Preparar soluciones amortiguadoras de fosfatos de concentraciones 0.1 y 0.01M a pH de 8.08 y 8.15, utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.
2. Colocar en un vaso de precipitados 59 ml de solución amortiguadora de fosfatos de concentración y pH conocidos, según sea el caso correspondiente.
3. Adicionar a esta solución 0.9 g de cloruro de sodio y solubilizarlo totalmente.
4. Adicionar 35 ml de una solución homogénea de glicerol-propilenglicol correspondiente a la formulación D de la tabla.10.
5. Los parámetros subsecuentes son los mismos que se mencionan en la metodología para la inmovilización de células de E. coli CSH-36 (punto 14) a partir del punto No. 4 correspondiente.
6. Determinar la actividad enzimática presente en el sistema de inmovilización de acuerdo a la metodología que le corresponde (punto 6.5).
7. El sistema de inmovilización extruido en forma de cubos de 1 x 1 x 1 cm, someterlo después de 7 días de haber inducido a estado de gel y almacenado a 4°C, a agitación constante en 100 ml de agua bidestilada a 200 rpm a 37°C durante 30 minutos, para detectar posible erosión del sistema.
8. Comparar los datos obtenidos contra un testigo del sistema de inmovilización el cual no contendrá solución amortiguadora de fosfatos, sometido a los mismos pará-

metros.

6.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -GALACTOSIDASA EN CELULAS DE E. COLI CSH-36 LIBRES E INMOVILIZADAS EN EL SOPORTE

Método:

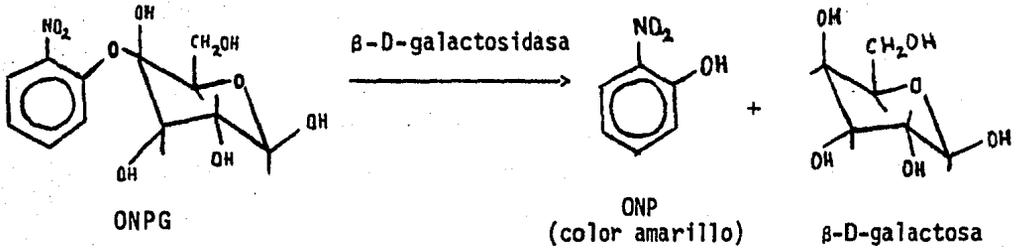
O-nitrofenil- β -D-galactósido para la determinación de actividad de β -galactosidasa de células de E. coli (29)

6.1 FUNDAMENTO:

El cromógeno ONPG es hidrolizado por la enzima β -D-galactosidasa, que efectúa la hidrólisis de la lactosa. Este es un análogo que es usado como sustrato de prueba para la determinación de la enzima β -D-galactosidasa, presente en E. coli. El método descrito es el reportado por Ledeborg J. y por Kuby, S.A. (29) para la preparación y cinética de dicha enzima.

El glicósido (ONPG) intacto a pH 7.0 y en solución amortiguadora de los fosfatos 0.1M es una solución incolora; al ser hidrolizada una molécula de ONPG genera una molécula de galactosa y una molécula de o-nitrofenol (ONP). El ONP libre es sujeto a cambios tautoméricos, en solución alcalina, que originan una coloración amarilla, que puede ser medida colorimétricamente, siendo esta coloración proporcional a la actividad enzimática y al tiempo. La absorbancia óptima de esta coloración es a 410 nm.

Reacción:



Materiales:

- Balanza analítica (Sartorius).
- Espátula.
- Matraz Erlenmeyer 50 ml (Pyrex).
- Pipetas graduadas de 1 ml (Pyrex).
- Pipetas graduadas de 5 ml (Pyrex).
- Tubos de ensayo 13 X 100 mm. (Pyrex).
- Gradilla.
- Probeta graduada de 50 ml (Pyrex).
- Cronómetro.
- Agitador Vortex.
- Espectrofotómetro (Beckman) Mod. 35.
- Válvula de bombeo de seguridad para pipeta.
- Matraz aforado de 250 ml (Pyrex).

Reactivos:

- O-nitrofenil-β-galactosido ONPG (Sigma).
- Carbonato de sodio (J.T. Baker).
- Cloruro de Magnesio (J.T. Baker).

- β -mercaptoetanol (Sigma).
- Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.

Microorganismo:

- Escherichia coli CSH-36 con actividad de β -D-galactosidasa. (CIIGB/UNAM).

6.2 PREPARACION DE REACTIVOS.

- Solución de ONPG (0.068M). Solubilizar 20,5 mg de ONPG/ml de solución amortiguadora de fosfatos (0.1M) pH 7.0, calentar a 37°C con agitación constante hasta solubilización completa.
- Solución de β -mercaptoetanol (3.36M). 1 ml de β -mercaptoetanol solubilizarlo en 3.26 ml de agua bidestilada.
- Solución de cloruro de magnesio (0.03 M). Pesar 0.061 g de cloruro de magnesio y aforar a 10 ml con agua bidestilada.
- Solución de carbonato de sodio (0.5M). En 5.0 ml de agua bidestilada solubilizar 0.53 g de carbonato de sodio y aforar a 10 ml con agua bidestilada.
- Solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) pH 7.0.

Solubilizar 0,1668 g de fosfato dibásico de potasio y 0,2100 g de fosfato monobásico de potasio en 100 ml de agua bidestilada y aforar a 250 ml con agua bidestilada.

6.3 PASTA CELULAR Y SUSPENSIÓN CELULAR DE E. COLI CSH-36.

Tomar 10 ml del medio de cultivo con células (en fase de crecimiento estacionario aproximadamente 18 horas después de inocular el medio) y aforar a 100 ml con agua bidestilada, agitar bien y tomar una parte alícuota de 1 ml y centrifugarla a 3000 rpm durante 30 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender la pasta celular con 1 ml de amortiguador de fosfatos (0,1 M) pH 7.0 por agitación en Vortex. Previamente se determina la densidad óptica a 560 nm y se extrapola en la gráfica de peso seco contra densidad óptica, para conocer la cantidad de células por mililitro (curva patron p. 106).

6.4 PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β -D-GALACTOSIDASA EN CELULAS LIBRES.

1. Mezclar:

- 26 ml de amortiguador de fosfatos 0,1 M pH 7,0,
- 1 ml de β -mercaptoetanol (3,36 M),
- 1 ml de cloruro de magnesio (0,03 M),
- 1 ml de células en suspensión de concentración conocida.

2. Incubar el sistema de reacción con agitación por 3 mi-

nutos a 37°C.

3. Adicionar a la mezcla anterior 1 ml de solución de ONPG (0.068 M) a 37°C y mantener la agitación.
4. Tomar una alícuota de 1 ml cada 30 segundos.
5. Para parar la reacción adicionar la alícuota a 2 ml de solución de carbonato de sodio 0.5 M. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
6. Unidades de actividad enzimática: leer la densidad óptica a 410 nm contra blanco de reactivos.

$$\frac{\text{UNIDADES ONPG}}{\text{G de células}} = \frac{\text{ABS } 410\text{nm (min}^{-1}\text{)} \cdot 30^{\Delta} \cdot 3^{\circ}}{3.5^{++} \text{ , gramo de célula}}$$

Δ = Volumen de reacción total.

\circ = Dilución con carbonato de sodio Na_2CO_3 .

$^{++}$ = Coeficiente de extinción milimolar del ONP

6.5 PROCEDIMIENTO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE ENZIMA β -GALACTOSIDASA EN CELULAS DE E. COLI CSH-36 INMOVILIZADAS EN K-CARRAGENINA-ALGARROBO USANDO ONPG COMO SUSTRATO.

Se sigue el mismo procedimiento que el anterior con excepción de adicionar 0.5 g del sistema de inmovilización (peso húmedo), en substitución del volumen de 1 ml de suspensión de células libres, a la mezcla de reacción.

7.0 DETERMINACION DE PROTEINA.

Método: Determinación de proteína con el reactivo de Folin-fenol (Lowry et. al 33).

7.1 FUNDAMENTO: Se basa en el color azul desarrollado debido a:

- 1) Reacción de Biuret: Las sustancias que contienen dos ó más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura-violeta con sales de cobre en soluciones alcalinas. Es posible que el color se desarrolle por la formación de unión coordinado tetracúprico con dos grupos adyacentes -CO-NH-
- 2) Reducción del reactivo de folin por aminoácidos como tirosina y triptofano presentes en las proteínas.

Materiales:

- Balanza analítica (Sartorius).
- Espátula.
- Pipetas graduadas de 1 ml (Pyrex).
- Pipetas graduadas de 5 ml (Pyrex).
- Matraz aforado de 10 ml (Pyrex).
- Tubos de ensayo 16 X 150 (Pyrex).
- Gradilla metálica.
- Cronómetro.
- Agitador Vortex.
- Espectrofotómetro (Beckman) Mod. 35.

Sustancias:

- Carbonato de Sodio Na_2CO_3 (J.T. Baker).
- Hidróxido de Sodio NaOH (J.T. Baker).
- Reactivo Folin (Sigma).
- Albúmina bovina (Sigma).
- Sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker).
- Tartrato de Sodio y Potasio $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.

Soluciones:

- A = Solución al 2% de carbonato de sodio en hidróxido de Sodio 0.1N.
- B = Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5%.
- C = Solución de tartrato de sodio y potasio 1%.
- D = Solución B + Solución C 1:1.
- E = Tomar 1 ml de la solución D y agregarle 50 ml de la solución A (decentar después de 24 horas de preparada la solución).
- F = Diluir el reactivo Folin con agua bidestilada 1:1.

Solución Estandar: 50, 100, 150, 200 ug/ml de albúmina bovina solubilizada en agua bidestilada (pesar 1 mg/ml y preparar 10 ml de esta solución).

7.2 PROCEDIMIENTO:

1. Tomar 0.1 ml de la suspensión de células para la mezcla de reacción.

2. Aforar con 0.9 ml de agua bidestilada.
3. Añadir 5 ml de solución E (Agitar en Vortex).
4. Reposar durante 10 minutos.
5. Añadir 0.5 ml de solución F (Agitar en Vortex).
6. Reposar 30 minutos y leer a 590 nm contra blanco de reactivos. (El blanco de reactivo se procesa como las muestras, pero se coloca 1.0 ml de agua bidestilada inicialmente).

Nota: Por cada cambio de reactivos ó soluciones efectuar una curva estandar. (Figura 22).

8.0 PRODUCCION DE CELULAS DE E. COLI CSH-36 CON ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales y Sustancias:

- Tubos de ensayo 13 X 100 (Pyrex).
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml (Pyrex).
- Matraces Fermbatch de 2800 ml (Pyrex).
- Mechero Bunsen.
- Asa metálica.
- Gasa.
- Algodón.
- Incubadora New Brunswick. Scientific Co., Mod. G. 24.
- Fermentador de 14 l New Brunswick. Scientific Co. Mod. 19-1410.
- Centrifuga Sorvall Dupont Instruments de alta velocidad con rotor GSA.

- Autoclave AMSCO de México.
- Espectrofotómetro (Beckman) Mod. 35.
- Los enlistados en la metodología de determinación de actividad enzimática de células de E. coli CSH-36 y los enlistados para la determinación de proteína.

Procedimiento:

1. El crecimiento de células de E. coli CSH-36, dependiendo de la cantidad que se necesitara, se realizaba en matraces Erlenmeyer de 250 ml (con 50 ml de medio), Fermbatch de 2800 ml (con 500 ml de medio) o en un fermentador de 14 l (con 10 l de medio). (Fig. 19).

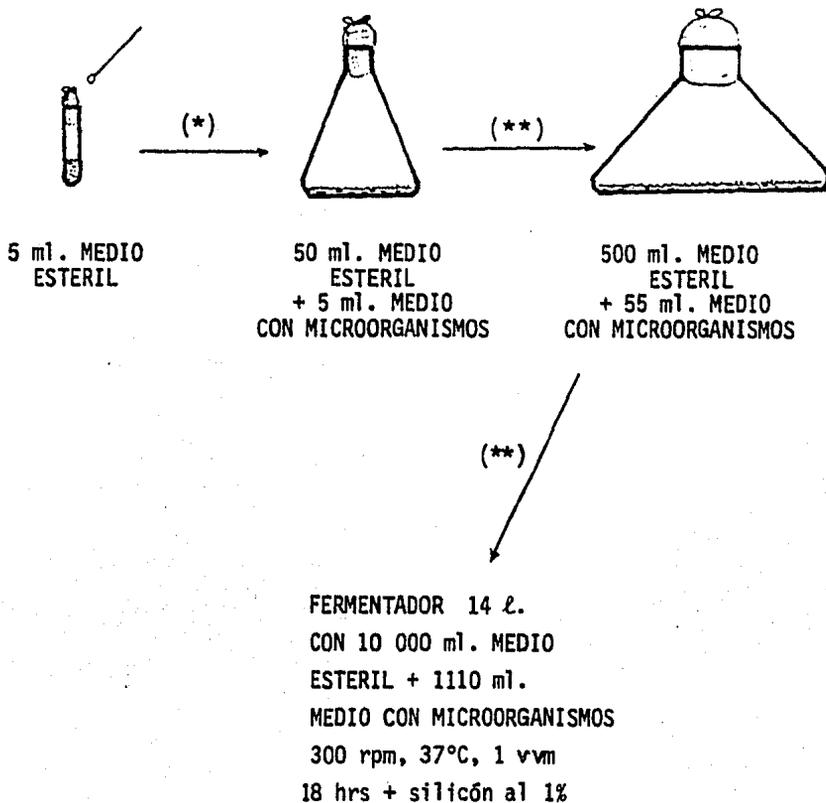
2. Parámetros:

Temperatura	37°C
Tiempo	18 hrs
pH (antes de esterilizar)	7.3
Agitación de matraces	250 rpm
Agitación en fermentador	300 rpm
Aereación en fermentador	1 vvm

3. El medio utilizado es el medio Luria cuya composición es:

Extracto de levadura	5 g
Bactotripton	10 g
Cloruro de sodio	R. A. 10 g
pH	7.3

4. Esterilización del medio se llevó a cabo en un autoclave de AMSCO de México a $15 \frac{lb}{in^2}$ de presión a $121^\circ C$ por espacio de 20 minutos.
5. El inóculo del medio de cultivo correspondió a un 10% v/v proveniente de un cultivo con células incubado durante 12 hrs en medio Luria.
6. La separación de las células del medio de cultivo se efectuó en una centrifuga de alta velocidad con sistema de refrigeración Sorvall DuPont Instruments, utilizando un rotor GSA con 6 compartimentos para botellas de 450 ml cada una, a 13000 rpm durante 15 minutos.
Se elimina el sobrenadante por decantación y la pasta celular se almacena a $4^\circ C$.
7. Se recomienda que durante el proceso de incubación del medio de cultivo para la producción se determine:
 - a) Concentración de células en suspensión a 560 nm contra blanco de medio Luria.
 - b) Concentración de proteína a 590 nm contra blanco de reactivos.
 - c) Actividad de enzima β -galactosidasa a 410 nm contra blanco de reactivos.



(*) 250 rpm, 37°C, 24 hs.

(**) 250 rpm, 37°C, 18 hs.

FIGURA 19: Escalamiento para la producción de células de E.coli CSH-36

9.0 DETERMINACION DEL FACTOR DE PESO SECO DE CELULAS E. COLI
CSH-36 CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA. (13)

Cepa: E. coli CSH-36 (CIIGB/UNAM)

Medio: Luria cuya composición es:

Extracto de Levadura	5 g
Bactotripton	10 g
Cloruro de sodio R.A.	10 g
Agua bidestilada	1000 ml
pH	7.3

Materiales:

- Equipo de filtración millipore.
- Membranas millipore.
- Cajas de Petri (Pyrex).
- Pinzas para crisol.
- Matraz Kitasato de 250 ml (Pyrex).
- Bomba de Vacío.
- Desecador.
- Estufa.
- Balanza analítica (Sartorius).
- Los enlistados en la metodología de determinación de actividad enzimática de células E. coli CSH-36 y los enlistados para la determinación de proteína.

Metodología:

1. Producir células de E. coli CSH-36 con actividad de

β -D-galactosidasa, siguiendo un escalamiento que corresponda a un inóculo del 10% v/v (Fig. 19).

2. Incubar a 37°C durante 18 hrs con agitación de 250 rpm, en el caso de utilizar matraces Erlenmeyer de 250 ml y matraces Fermbatch de 2800 ml. En el caso de utilizar equipo de fermentación de 14 l mantener a 1 vvm de aereación y 300 rpm.
3. Tomar alícuotas de 1 ml cada 2 horas después de 4 horas de haber inoculado el medio de cultivo. No olvidar tomar alícuota en el tiempo cero.
4. Determinar Absorbancia contra blanco de medio Luria y de ser posible determinar actividad enzimática por el método de ONPG, y concentración de proteína.
5. La parte alícuota filtrarla a través de membrana millipore previamente puestas a peso constante en estufa a 105-110°C durante 8 hrs. (Se recomienda hacer este paso por duplicado).
6. Una vez filtrada la parte alícuota, poner a peso constante la membrana que contiene la muestra en una estufa a 105-110°C durante 8 hrs.
7. Establecer el peso por diferencia, y graficar contra la absorbancia (560 nm) que le correspondió, para determinar el valor de la pendiente que será el equivalente al factor de peso seco. (Figura 23).

10.0 CONSERVACION DE CELULAS DE E. COLI CSH-36 CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA MEDIANTE LA PREPARACION DE VIALES O GLICEROLES.

Cepa: E. coli CSH-36 actividad de β -D-galactosidasa. (CIIGB/UNAM).

Medio: Luria cuya composición es:

Extracto de levadura	5 g
Bactotripton	10 g
Cloruro de sodio R.A.	10 g
Agua bidestilada	1000 ml
pH	7.3

Materiales:

- Asa de alambre.
- Frascos viales.
- Pipetas graduadas de 1 ml estériles.
- Mechero Bunsen.
- Tubos de vidrio.
- Cronómetro.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml (Pyrex)
- Gasa.
- Algodón.
- Cinta testigo.
- Agitador Vortex.
- Centrifuga (Solvat)
- Incubadora New Brunswick Scientific, Co., Mod. G-24.
- Autoclave AMSCO de México.

- Espectrofotómetro (Beckman) Mod. 35
- Los enlistados para la determinación de actividad enzimática por el método de ONPG y los enlistados para la determinación de protefna.

10.1 METODOLOGIA: (Fig. 20)

1. Esterilizar dos series de 5 tubos de 13 X 100 cada una. Una de las series esterilizarla sin medio Luria. La otra serie, a uno de los tubos, adicionarle 2 ml de medio Luria; y a los restantes 1 ml de medio Luria a cada uno de ellos, tapándoles con sus respectivas torundas (tapón de algodón envuelto en gasa), a 121°C, 15 $\xrightarrow{\text{lb/in}^2}$ durante 15 minutos.
2. Esterilizar en un frasco vial 1 ml de glicerol, con la tapa parcialmente girada a 121°C, 15 $\xrightarrow{\text{lb/in}^2}$ durante 15 minutos.
3. Esterilizar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, 50 ml de medio Luria, tapado con su respectiva torunda a 121°C, 15 $\xrightarrow{\text{lb/in}^2}$ durante 15 minutos.
4. Enfriar a temperatura de 25°C.
5. Inocular este matraz con 5 ml de medio Luria incubado previamente a 37°C con agitación de 250 rpm durante 24 horas, y que contenga células en suspensión con

actividad (1500 - 2000 unidades ONPG/gramo).

6. Hacer la operación anterior en zona estéril.
7. Incubar el matraz Erlenmeyer a 37°C con agitación de 250 rpm durante 18 horas.
8. Una vez transcurrido el período de incubación, determinar:
 - a) Concentración de células a 560 nm.
 - b) Concentración de proteína a 590 nm.
 - c) Actividad enzimática a 410 nm.De acuerdo con las metodologías respectivas.
9. En la serie de tubos estériles vacíos, colocar 5 ml de la suspensión celular proveniente del matraz; efectuando esta operación en zona estéril.
10. Tapar los tubos con sus respectivas torundas y centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.
11. Separar el sobrenadante por decantación, efectuando esta operación en zona estéril.
12. Repetir la operación del punto 9, hasta agotar el volumen de la suspensión celular contenida en el matraz Erlenmeyer.

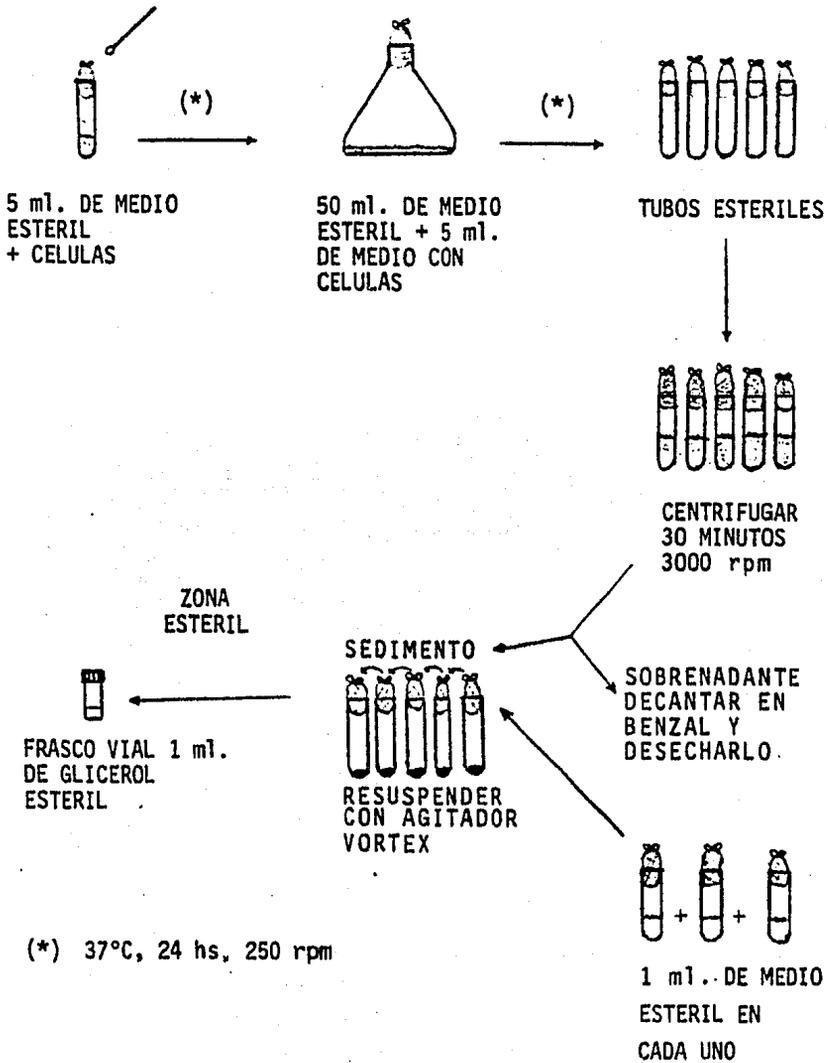


FIGURA 20: Preparación de viales o gliceroles de células de *E. coli* CSH-36.

13. El sedimento (células de E. coli) contenido en los tubos; en uno de ellos adicionar 2 ml de medio Luria estéril y resuspender con agitación en Vortex, transfiriendo esta suspensión al resto de los demás, de uno en uno, en zona estéril.
14. Lavar cuantas veces sea necesario con 1 ml de medio Luria estéril los tubos hasta lograr la transferencia del sedimento agitando en Vortex, en zona estéril.
15. El concentrado celular recibirlo en un frasco vial que contiene un mililitro de glicerol estéril, mezclando perfectamente con Vortex, en zona estéril.
16. Almacenar el frasco vial que contiene el concentrado celular en refrigeración a 4°C y congelación a -15°C.

11.0 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE ATRAPAMIENTO DEL SISTEMA DE INMOVILIZACION EXPRESADA COMO RESISTENCIA A LA COMPRESION (τ) CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -D-GALACTOSIDASA (UNIDADES ONPG/G) DE CELULAS DE E. COLI
CSH - 36.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la manufactura del sistema de inmovilización con adición de una mezcla de propilenglicol - glicerol (punto 1.3).
- Los enlistados en la metodología para la determinación

de actividad de enzima β -D-galactosidasa de células de E. coli CSH-36 (punto 6.0).

- Los enlistados en la metodología para la cuantificación de la resistencia a la compresión (puntos 2.1 y 2.2).

Metodología:

1. Inmovilizar células de E. coli CSH- 36 con actividad de enzima β -D-galactosidasa de acuerdo a la metodología establecida (punto 14.0).
2. Determinar la capacidad de atrapamiento en base a pruebas de resistencia a la compresión, de acuerdo a la metodología establecida (puntos 2.1 y 2.2),

12.0 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL SISTEMA DE INMOVILIZACION CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA DE CELULAS DE E. COLI CSH-36.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la determinación de enzima β -D-galactosidasa de células de E. coli CSH-36.
- Vernier (Scala trade mark) Metromex Mod. S228B.

Metodología:

1. Extraer el sistema de inmovilización después de 12 horas de haber inducido a estado de gel, en forma de cilindros cuyas dimensiones son:

- Forma A:

Diámetro = 0.5 cm

Longitud = 1.0 cm

- Forma B:

Diámetro = 0.5 cm

Longitud = 0.5 cm

2. Determinar la actividad enzimática de β -D-galactosidasa de células inmovilizadas en K-carragenina-algarrobo usando ONPG como sustrato, colocando 0.5 g en peso del sistema de inmovilización para ambas formas (A y B), (punto 6.5).

13.0 TRATAMIENTO QUIMICO DE LAS CELULAS DE E. COLI CSH-36
CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA.

13.1 CON AGENTE BIFUNCIONAL (GLUTARALDEHIDO).

Materiales:

- Espátula.
- Cronómetro.
- Vaso de precipitados de 250 ml (Pyrex).
- Agitador magnético.
- Parrilla con sistema de agitación (Corning).
- Centrífuga de alta velocidad Sorvall Dupont Instruments.
- Rotor GSA con 6 compartimentos para botellas de plástico de 450 ml.
- Balanza analítica (Sartorius).
- Balanza granataria de dos platos.

- Los enlistados para la determinación de actividad enzimática de β -D-galactosidasa en células de E. coli CSH-36 (punto 6.0).

Sustancias:

- Agua bidestilada.
- Glutaraldehído (Merck).
- Los enlistados para la determinación de actividad enzimática de β -D-galactosidasa en células de E. coli CSH-36 (punto 6.0).

Metodología:

1. La pasta celular suspenderla con agitación en un vaso de precipitados de 250 ml con agua bidestilada.
2. Determinar la actividad enzimática de células libres de E. coli CSH-36 (punto 6.4).
3. Mezclar bien la suspensión con agitación constante adicionando el agente químico en concentración de 0.02% V/v durante 7 minutos.
4. Retirar el sistema de agitación y centrifugar la suspensión a 12000 rpm durante 15 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender la pasta celular en agua bidestilada agitando durante 7 minutos.
6. Retirar el sistema de agitación y centrifugar la suspensión a 12000 rpm durante 15 minutos.
7. Decantar el sobrenadante y determinar actividad enzimática a las células libres (punto 6.4).
8. Repetir la operación cuantas veces sea necesario para quitar olores objetables agresivos a partir del punto No. 3 de esta metodología.

13.2 CON AGENTES OXIDANTES

Materiales:

- Potenciómetro (Corning).
- Bureta con llave de teflón de 50 ml (Pyrex).
- Soporte.
- Pinzas para bureta.
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml (Pyrex).
- Los enlistados en el punto 13.1.

Sustancias:

- Agua bidestilada.
- Permanganato de potasio KMnO_4 (J.T. Baker).
- Dicromato de potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (J.T. Baker).
- Yoduro de potasio KIO_3 (J.T. Baker).
- Cloruro férrico $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker).
- Acido Nítrico HNO_3 (J.T. Baker).
- Hidróxido de potasio KOH (J.T. Baker).

Metodología:

1. La pasta celular en un vaso de precipitados de 250 ml suspenderla con agua bidestilada.
2. Determinar la actividad de enzima β -D-galactosidasa de células de E. coli CSH-36 (punto 6.4).
3. Mezclar bien la suspensión con agitación constante, adicionando el agente oxidante en concentración de 0.02% P/v.
4. Con ayuda de un potenciómetro determinar el pH de la

suspensión, adicionando gota a gota y con agitación constante una solución de ácido nítrico (0.001M) hasta alcanzar pH 6.5.

5. Agitar la suspensión por espacio de 5 minutos, y transcurrido este tiempo, neutralizar el ácido adicionando una solución de hidróxido de potasio (0.001M).
6. Los pasos subsecuentes son los mencionados en la metodología de tratamiento químico con un agente bifuncional (punto 13.1).

14.0 INMOVILIZACION DE CELULAS DE E. COLI CSH-36 CON ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la manufactura del sistema de inmovilización con adición de una mezcla de propilenglicol-glicerol (punto 1.3).
- Células de E. coli CSH-36 con actividad de enzima β -D-galactosidasa. (CIIGB/UNAM).

Metodología: (Fig. 21).

1. Solubilizar en un vaso de precipitados previamente, 0.9 g de cloruro de sodio en 30 ml de agua bidestilada.
2. Adicionar 20 ml de propilenglicol y homogenizar la solución por espacio de 5 minutos.
3. Adicionar a esta solución 13.5 ml de glicerol y homogenizar por espacio de 5 minutos más.
4. Incorporar a esta solución lentamente y con agitación

constante con ayuda de un agitador de propela a 250 rpm; 1.35 g de K-carragenina y 2.51 g de algarrobo a temperatura ambiente por espacio de 5 minutos, cuidando que la solución quede exenta de grumos.

5. Transcurrido este período de tiempo, aumentar la velocidad de agitación a 1000 rpm del homogenizador de propela; manteniendo 10 minutos más en estas condiciones el sistema.
6. Efectuar la inmersión parcial del vaso de precipitados en Baño María a 45-50°C, aumentando la velocidad de agitación del homogenizador de propela a 2000 rpm; manteniendo 10 minutos adicionales en estas condiciones el sistema.
7. Transcurrido este lapso de tiempo adicionar una cantidad conocida en peso (g) de células con actividad enzimática previamente tratadas con un agente químico (punto 13.0).
8. Adicionar 32 ml de agua bidestilada.
9. Aumentar la velocidad de agitación del homogenizador de propela a 2500 rpm y mantener el sistema en las mismas condiciones de temperatura (45-50°C), por espacio de 5 minutos más.
10. Inducir la formación del gel a temperatura ambiente.
11. Extruir la forma geométrica deseada, después de 12 horas de haber inducido a estado de gel el sistema de inmovilización.

FIGURA 21: METODOLOGIA ESTABLECIDA

En 30 ml. solubilizar
0.9 g. de NaCl

+

Solubilizar glicerol y
propilenglicol

Algarrobo
K-carragenina

Dispersión a temperatura
ambiente 250 rpm 5 min.

Dispersión a temperatura
ambiente 1 000 rpm 10 min.

Inmersión del sistema de
dispersión a temperatura
de 45°C a 2 000 rpm 10 min.

Pasta celular

+

0.02% glutaraldehído
c.b.p. deodorizar
agitar 7 min.

centrifugar 12 000
rpm 15 min.

resuspender y lavar
con agua bidestilada

centrifugar 12 000
rpm 15 min.

Pasta celular
+ agua bides-
tilada cbp
64 ml.

Dispersión a T=45°C
2 500 rpm 5 min.

extrusión

15.0 PRODUCCION DE CELULAS DE K. FRAGILIS CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la producción de células de E. coli CSH-36 (punto 8.0).
- Microorganismos K. fragilis 55-61 (CIIGB/UNAM)
- Medio de cultivo:

Lactosa	5 %
Fosfato dibásico de potasio	0.3 %
Extracto de Levadura	0.5 %
Sulfato de amonio	0.1 %
pH	5.4

Procedimiento:

1. El crecimiento de células de K. fragilis dependiendo de la cantidad que se necesitara para inmovilizar, se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml (con 100 ml de medio) y matraces Fermbatch de 2800 ml (con 1000 ml de medio).
2. Parámetros:

Temperatura	29°C
Tiempo	18 hrs
Agitación de matraces	250 rpm
3. La esterilización del medio se llevó a cabo en un autoclave de AMSCO de México a 15 lb/in² de presión a 121°C.
4. Los pasos subsecuentes son los correspondientes a la metodología para la producción de células de E. coli

CSH-36 (punto 8.0) a partir del paso No. 6.

16.0 PERMEABILIZACION DE CELULAS DE K. FRAGILIS.

Materiales:

- Espátula.
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml (Pyrex).
- Agitador magnético.
- Parrilla con sistema de agitación (Corning).
- Centrífuga (Solvat).
- Tubos de ensayo.
- Probeta de vidrio de 50 ml (Pyrex).
- Centrífuga de alta velocidad (Sorvall) Dupont Instruments, Co.
- Rotor GSA con 6 compartimentos para botellas de plástico de 450 ml.
- Cronómetro.

Sustancias:

- Tolueno (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 (J.T. Baker).
- Agua bidestilada.
- Preparación de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M
pH = 6.6:
Pesar 0.1523 g de K_2HPO_4 y 1.2419 g de KH_2PO_4 , solubilizar y aforar con 100 ml de agua bidestilada.

Metodología:

1. La pasta celular suspenderla con agitación constante en 25 ml de agua bidestilada en un matraz Erlenmeyer de 125 ml (Pyrex).
2. Adicionar a esta suspensión 15 ml de tolueno y 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.6 0.1 M.
3. Agitar constantemente la suspensión durante 30 ~ 45 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, la suspensión celular distribuiría en tubos de ensayo y centrifugar a 1000 rpm durante 30 minutos.
5. Decantar el sobrenadante.
6. La pasta celular resuspenderla en 100 ml de agua bidestilada y centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos.
7. Decantar el sobrenadante.
8. La pasta celular almacenarla a 4°C.

17.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA DE CELULAS DE K. FRAGILIS. 55-61.

17.1 FUNDAMENTO:

El enunciado en la metodología correspondiente al punto 6.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología correspondiente al punto 6, con excepción del carbonato de calcio.

Microorganismo:

Kluyveromices fragilis con actividad de enzima β -D-galactosidasa (CIIGB/UNAM).

17.2 PREPARACION DE REACTIVOS:

a) Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 6.6. Pesar 0.1523 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y 1.2419 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), aforando con agua bidestilada a 100 ml.

b) Solución de Cloruro de Magnesio (0.03M).

c) Solución de β -mercaptoetanol (3.36M).

d) Solución de ONPG (0.068M).

- La preparación de las soluciones b, c, y d, son las indicadas en la metodología correspondiente al punto 6.2.

17.3 METODOLOGIA:

1. Mezclar en un matraz Erlenmeyer de 50 ml;

18.8 ml de solución (a)

0.7 ml de solución (b)

0.7 ml de solución (c)

0.1 ml de suspensión celular de concentración conocida.

2. Incubar durante 3 minutos a 37°C y añadir 0.7 ml de la solución (d).
3. Tomar una alícuota de 3 ml del sistema de reacción cada minuto, empezando por el tiempo cero que será el blanco de reactivos.
4. Detener la reacción colocando la alícuota contenida en un tubo de ensayo en un baño en ebullición por espacio de 5 minutos.
5. Centrifugar a 3000 rpm 15 minutos y leer contra blanco de reactivos a 410 nm.

·Actividad total = m (pendiente de la regresión lineal)
X Volumen de reacción.

17.4 CONCENTRACION DE CELULAS (C):

1. Para concentración alta: dilución 1:1000
 $(\text{ABS}_{650 \text{ nm}} - 0.041)/0.3125 = \text{g / ml}$
2. Para concentración baja: dilución 2:100
 $(\text{ABS}_{650 \text{ nm}} - 0.006)/0.084 = \text{g / l}$

18.0 SECADO A PRESION REDUCIDA DE CELULAS DE K-FRAGILIS
55-61 CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales y sustancias:

- Espátula.
- Matraz Kitasato de 250 ml (Pyrex) con tapón de hule.
- Bomba de vacío con manómetro integrado.
- Hielo.
- Recipiente de plástico.

Células: K. fragilis. 55-61 (CIIGB/UNAM)

Metodología:

1. Colocar la pasta celular previamente permeabilizada [(punto 16.0) en el caso de K. fragilis] en un matraz kitasato y taparlo con el tapón.
2. Enfriar a 10°C, colocando el matraz Kitasato en un baño de hielo.
3. Conectar el matraz a una bomba de vacío a una presión de 5 mm Hg.
4. Mantener el sistema de secado bajo estas condiciones, hasta observar que las células no se adhieran al fondo del matraz (aproximadamente 15 minutos).

19.0 LEOFILIZADO DE CELULAS DE K. FRAGILIS CON ACTIVIDAD DE
ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales:

- Espátula.

- Matraz Kitasato de 250 ml (Pyrex) con tapón de hule.
- Recipiente de plástico.
- Probeta de vidrio de 50 ml (Pyrex).
- Leofilizador Unitrap Mod. 10-100. Division of Cenco Medical.

Sustancias:

- Etanol (J.T. Baker).
- Acetona (J.T. Baker).
- Hielo seco.

Microorganismo: K. fragilis 55-61 (CIIGB/UNAM)

Metodología:

1. Colocar en un recipiente una solución 1:1 de etanol-acetona.
2. Adicionar a esta solución hielo seco.
3. Colocar en esta solución un matraz Kitasato que en el fondo contenga una pasta celular de K. fragilis [previamente permeabilizadas punto 16.0.], hasta observar que la pasta se torna color blanco.
4. Tapar el matraz kitasato.
5. Conectarlo a un leofilizador a una presión de 0.8 μ Hg a una temperatura de -40°C por espacio de 12 horas.

20.0 INMOVILIZACION DE CELULAS DE K. FRAGILIS CON ACTIVIDAD DE β -D-GALACTOSIDASA.

Materiales y Sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la inmovilización.

de células de E. coli CSH-36 (punto 14.0).

Microorganismo: K. fragilis 55-61 (CIIGB/UNAM)

Metodología:

1. La pasta celular de K. fragilis, permeabilizada (punto 16.0.) y secada (punto 18.0.) o liofilizada (punto 19.0.) inmovilizarla de acuerdo a la metodología establecida en el punto 14.0.

21.0 Determinación de carbohidratos por el método de fenol-ácido sulfúrico: Dubois, M. et. al. (19)

Materiales:

- Balanza analítica (Sartorius)
- Espátula
- Tubos de ensayo 1 x 150 (Pyrex)
- Gradilla
- Pipetas graduadas de 5 ml (Pyrex)
- Válvula de seguridad para pipeta
- Agitador (Vortex)
- Micropipeta (Eppendorf)
- Espectrofotómetro (Beckman) Mod. 35

Sustancias:

- Dextrosa (J.T. Baker)
- Galactosa (Sigma)
- Lactosa (Merck)

- Acido sulfúrico (J.T. Baker)
- Fenol (J.T. Baker)
- Agua bidestilada

El fenol en presencia de ácido sulfúrico puede utilizarse para la microdeterminación cuantitativa de azúcares, metilderivados, oligosacáridos, polisacáridos. El método es particularmente rápido y sensible. Los reactivos son económicos y estables. El color naranja-amarillo es permanente, y no es necesario poner especial cuidado en ella. Las densidades ópticas medidas a 490 nm. cuando son referidas a una curva estandar, previamente construida, dan directamente la concentración del azúcar.

Metodología:

1. Tomar una alícuota de 0.1 ml de la solución de azúcar.
2. Adicionarla en un tubo de ensayo que contenga 2 ml de una solución de fenol al 5%.
3. Pipetear rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, adicionándolo directamente a la superficie del líquido.
4. Agitar perfectamente en Vortex.
5. Dejar en reposo por espacio de 10 minutos.
6. Agitar en Vortex y colocar en un baño de agua manteniendo la temperatura a 25°C por espacio de 20 minutos.
7. Leer absorbancia a 490 nm contra blanco de reactivos.

Nota: La curva estandar del carbohidrato a analizar se

prepara en un intervalo de 16 a 180ug. Se recomienda que por cada cambio de reactivos se prepare una curva estandar.

22.0 Difusión de carbohidratos (galactosa, glucosa, lactosa) a través del soporte en una celda modificada.

22.1 Sin células inmovilizadas a diferentes temperaturas.

Materiales y Sustancias

- Los enlistados en la metodología para la manufactura del soporte con adición de propilenglicol-glicerol (punto 1.3).
- Celda modificada.
- Vaso reactor de 250 ml (Pyrex)
- Bomba de vacío.
- Los enlistados en la metodología para la determinación de carbohidratos (punto 21.0)

Soluciones

- glucosa al 2.5%
- galactosa al 2.5%
- lactosa al 5.0%

Metodología:

1. Preparar el soporte de acuerdo a la metodología descrita en el punto 1.3, adicionando 20 ml de propilenglicol y 15 ml de glicerol.

2. Eliminar burbujas de aire contenidas en el soporte, mediante el uso de vacío por espacio de 30 minutos, manteniendo constante la temperatura de 45°C para evitar que se induzca la gelificación, mientras se lleva a cabo esta operación, y llenar un volumen conocido de la celda modificada.
3. Inducir la gelificación a temperatura ambiente.
4. Después de 12 horas adicionar a la celda agua bi-destilada en igual volumen al ocupado por el gel, y reposar 12 horas más.
5. Retirar el agua contenida en la celda, y secar con papel absorbente la superficie del gel, cuidando que no quede residuo alguno.
6. Colocar un agitador magnético en la superficie cuya longitud abarque el diámetro de la celda.
7. Difundir el carbohidrato de concentración conocida adicionando dicha solución en un volumen igual al ocupado por el gel.
8. Cerrar la celda y mantener el sistema a temperatura de (25, 32 o 37°C).
9. Difundir el carbohidrato con agitación constante de 161 rpm durante 12 horas.
10. Cuantificar la concentración del carbohidrato en la solución cada 4 horas por el método descrito en el punto 21.0.

22.2 Con células inmovilizadas a 37°C.

Materiales y sustancias:

- Los enlistados en la metodología para la inmovilización de células de E. coli CSH-36 (punto 14.0).
- Los enlistados en el punto 22.1

Metodología:

1. La pasta celular de E. coli CSH-36 suspenderla en 100 ml de agua bidestilada.
2. En un reactor con agitación inactivar las células a temperatura de 69-70°C durante 24 horas.
3. Determinar actividad enzimática de β -D-galactosidasa de acuerdo a la metodología descrita en el punto 6.4. Si presentan actividad, repetir el paso anterior hasta total inactivación de las células.
4. Inmovilizar células de E. coli inactivadas, de acuerdo a la metodología descrita en el punto 14.0 en una relación en peso seco de 4:1 células:gomas.
5. Los parámetros subsecuentes son los descritos en la metodología 22.1 a partir del punto número 2 correspondientes.

VI CALCULOS

CALCULOS

1.0 Cálculo de la resistencia a la compresión.

Muestra	Peso (kg)	Area (cm ²)	τ (kg/cm ²)
1	0.567	1.3923	0.4072
2	0.572	1.4042	0.4073
3	0.426	1.3225	0.3221
4	0.425	1.5370	0.2765
5	0.494	1.5780	0.3130
6	0.557	1.4880	0.3751
\bar{X}	(media aritmética)		0.3649
S	(desviación estandar)		0.04
V	(varianza)		10.96%

$$S^2 = \frac{\sum x^2}{N} - \left(\frac{\sum x}{N} \right)^2 = \frac{\sum x^2}{N} - \bar{x}^2$$

$$\frac{\sum x^2}{N} = \frac{(0.4072)^2 + (0.4073)^2 + (0.3221)^2 + (0.3130)^2 + (0.3751)^2}{5}$$

$$= 0.1347$$

$$\frac{\sum x}{N} = \frac{0.4072 + 0.4073 + 0.3221 + 0.3130 + 0.3751}{5}$$

$$= 0.3649$$

$$S^2 = \bar{x}^2 - x^2 = 0.1347 - 0.1331 = 0.04$$

$$V = S/\bar{x} = 0.04 / 0.3649 = 0.1096$$

2.0 Determinación del fenómeno de sinéresis.

Perdida en peso en por ciento.

Para la formulación A de la tabla (11) de la sección de resultados, se tienen los siguientes datos:

$$\text{Día 0 : } A_1 = 0.8767 \text{ g}$$

$$A_2 = 0.8261 \text{ g}$$

$$\text{Día 2 : } A_1 = 0.7600 \text{ g}$$

$$A_2 = 0.7274 \text{ g}$$

$$\text{Día 3 : } A_1 = 0.6173 \text{ g}$$

$$A_2 = 0.6513 \text{ g}$$

Para el día 1 se tiene una pérdida de:

$$(0.8767 + 0.8261) = 1.7028$$

$$(0.7600 + 0.7274) = 1.4874$$

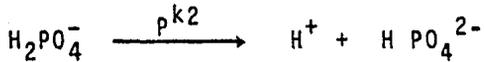
$$\begin{aligned} (1.7028 - 1.4874) &= 0.2154/1.7028 + 0.1264 \times 100 \\ &= 12.64\% \end{aligned}$$

Para el día 2 se tiene una pérdida de:

$$(0.6173 + 0.6513) = 1.2689$$

$$\begin{aligned} (1.4874 - 1.2689) &= 0.2185 + 0.2154 = 0.4339/1.7028 \\ &= 0.2548 \times 100 \\ &= 25.48\% \end{aligned}$$

3.0 Preparación de solución amortiguadora de fosfatos 0.2M
pH 7.5 mediante el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.



$$\text{pK}_2 = 7.21 \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

$$\text{Ka}_2 = 6.2 \times 10^{-8}$$

$$\text{Ka}_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$Y = M \text{ HPO}_4^{2-}$$

$$M \text{ H}_2\text{PO}_4^- = 0.2 - Y$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-7.5}$$

$$1.24 \times 10^{-8} - 6.2 \times 10^{-8} = 1 \times 10^{-7.5} Y$$

$$1.24 \times 10^{-8} = 1 \times 10^{-7.5} Y + 6.2 \times 10^{-8}$$

$$1.24 \times 10^{-8} = 9.3623 \times 10^{-8} Y$$

$$Y = 1.24 \times 10^{-8} / 9.3628 \times 10^{-8}$$

$$Y = 0.1325$$

$$[\text{HPO}_4^{2-}] = 0.1325\text{M}$$

$$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0.2 - Y$$

$$= 0.2 - 0.1325$$

$$= 0.0675\text{M}$$

Preparar 100 ml. de una solución amortiguadora de fosfatos

0.2 M pH = 7.5:

$$0.1 \text{ l} \times 0.2 \text{ M} = 0.02 \text{ MOLES TOTALES}$$

$$0.1 \text{ l} \times 0.1325 \text{ M} = 0.01325 \text{ MOL } \text{H PO}_4^{2-}$$

$$0.1 \text{ l} \times 0.0675 \text{ M} = 0.00675 \text{ MOL } \text{H}_2\text{PO}_4^-$$

$$n = \frac{\text{PESO}}{\text{P.M. } \text{K}_2 \text{H PO}_4} = 0.01325 = \frac{\text{PESO}}{174.183}$$

$$\text{PESO } \text{K}_2 \text{H PO}_4 = 2.3879 \text{ g}$$

$$n = \frac{\text{PESO}}{\text{P.M. } \text{K H}_2 \text{PO}_4} = 0.00675 = \frac{\text{PESO}}{136.091}$$

$$\text{PESO } \text{K H}_2 \text{PO}_4 = 0.9186 \text{ g}$$

4.0 Cálculo para:

a) Concentración de células de E.coli CSH-36 en suspensión a 560 nm. contra blanco de medio Luria.

A partir de la figura 23 de la sección de resultados se tiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Concentración g/ml} &= \frac{\text{Absorbancia} - 0.4790}{764} \\ &= 0.793 - 0.4790 / 764 \\ &= 0.00041 \times 5 \text{ (dilución)} \\ &= 0.00205 \text{ g peso seco/ml} \\ &= 20.5 \text{ g} / 10 \text{ l} \end{aligned}$$

b) Concentración de proteína de E. coli CSH-36 en suspensión a 590 nm. contra blanco de reactivos.

A partir de la figura 22 de la sección de resultados se tiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Concentración mg/ml} &= \frac{\text{Absorbancia} + 0.002475}{0.00241} \\ &= 6.0062 \mu\text{g} \quad \text{_____} \quad 0.1 \text{ ml.} \\ &= 0.006 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 0.1 \text{ ml.} \\ &= 0.0540 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 0.9 \text{ ml.} \\ &= 0.054 \text{ mg proteína} \times 25 \text{ (dilución)} \\ &= 1.35 \text{ mg proteína/ml} \end{aligned}$$

c) Actividad enzimática de células de E. coli CSH-36 a 410 nm contra blanco de reactivos.

A partir de la ecuación del punto 6.5 de la sección de Metodología se tiene:

$$\text{UNIDADES ONPG/g} = \text{Absorbancia (30) (3)/3.5} \times \text{g}$$

Para la obtención de la pendiente, los datos se analizaron utilizando una calculadora Texas Instruments Mod. 57-II obteniéndose:

t	Abs	correlación (c) =	0.9865
0	0	pendiente (m) =	0.1476
0.5	0.074	intercepción (i) =	-0.007
1.0	0.129		
1.5	0.188		
2.0	0.312		

$$\begin{aligned} \text{UNIDADES ONPG/ g célula} &= 0.1476 (30)(3) / 3.5(0.002052) \\ &= 1849.62 \end{aligned}$$

$$\text{UNIDADES ONPG/mg célula} = 1.8496$$

d) Actividad enzimática específica:

$$\begin{aligned} \text{UNIDADES ONPG/mg proteína} &= \frac{0.1476(30)(3)}{3.5} / 1.35 \text{ mg} \\ &= 2.8114 \end{aligned}$$

4.1 Cálculo de la actividad enzimática del soporte con células inmovilizadas de E. coli CSH-36

Para la relación en peso seco 1 a 1 (células:gomas) se tiene para la obtención de la pendiente los datos se analizaron utilizando una calculadora Texas Instruments Mod. 57-II :

t	Abs	correlación (c)	= 0.9970
0	0	pendiente (m)	= 0.0486
0.5	0.028	intercepción (i)	= 0.0026
1.0	0.059		
1.5	0.067		
2.0	0.102		

$$\begin{aligned} \text{UNIDADES ONPG/g} &= 0.0486 \times 30 \times 3/3.5 (0.5) \\ &= 2.4994 \end{aligned}$$

Porcentaje de actividad enzimática expresado:

94.00 g	agua
3.40 g	gomas
+ 0.90 g	NaCl
<u>37.84 g</u>	polioles
136.14 g	soporte

136.14 g soporte + 3.40 g células E.coli CSH-36 = 139.54 g

139.54 g ——— 4214.19 u ONPG inmovilizadas

0.5 g ——— 15.1182 u ONPG inmovilizadas

15.1182 u ONPG ——— 100%

2.4994 u ONPG expresadas ——— 16.53%

4.2 Cálculo de actividad enzimática de células de K.fragilis 55-61.

A partir de la ecuación del punto 17.4 de la sección de Metodología.

Concentración células = Abs 560 nm - 0.041/0.3125
= 0.003185 g/ml.

Para la obtención de la pendiente, los datos se analizaron utilizando una calculadora Texas Instruments

Mod. 57-II

t	Abs	correlación (c)	= 0.994
0	0	intercepción (i)	= 0.019
1.0	0.308	pendiente (m)	= 0.16
2.5	0.621		
3.0	0.780		

$$\begin{aligned} \text{Actividad total} &= m \times \text{vol. de reacción} \\ &= 0.16 \times 21 = 3.36 \text{ U ONPG/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Actividad/g} &= 3.36 \text{ uONPG/ml} / 0.003185 \text{ g/ml.} \\ &= 1054.28 \text{ u ONPG/g célula.} \end{aligned}$$

4.3 Actividad de células K.fragilis 55-61 inmovilizadas.

Para la obtención de la pendiente, los datos se analizaron utilizando una calculadora Texas Instruments

Mod. 57-II

t	Abs	correlación (c)	=	0.99
0	0	intercepción (i)	=	0.0098
0.5	0.100	pendiente (m)	=	0.1784
1.0	0.190			
1.5	0.310			
2.0	0.341			

$$\begin{aligned} \text{Actividad total} &= m \times \text{vol de reacción} \\ &= 0.1784 \times 21 = 3.7464 \text{ u ONPG/ml.} \end{aligned}$$

$$\text{Actividad/g soporte} = 3.7464 / 0.5 = 7.4928 \text{ u ONPG/g.}$$

Porcentaje de actividad enzimática expresado.

94.00 g	agua
3.40 g	gomas
+ 0.90 g	NaCl
<u>37.84 g</u>	polioles
136.14 g	soporte

136.14 g soporte + 3.4 g células k. fragilis = 139.54 g

139.54 g _____ 3 584.55 u ONPG inmovilizadas

0.50 g _____ 13.84 u ONPG inmovilizadas

13.84 u ONPG inmovilizadas _____ 100%

7.49 u ONPG expresadas _____ 58.33%

5.0 Ejemplo del cálculo del Coeficiente de Difusión (D_{AB} $\times 10^{-10}$ m^2/s) para Galactosa (2.5%) a través del soporte (K-carragenina:algarrobo 3.4%):

A. De la curva estandar para Galactosa (Fig. 25):

$$m = 0.0031908$$

$$b = 0.02626$$

B. Para la difusión a una temperatura = 19 °C :

$$y = mx + b$$

$$y = 0.0031908 x + 0.02626$$

$$x = \text{Absorbancia a 590nm.} - 0.02626 / 0.0031908$$

$$\text{tiempo} = 0$$

$$x_1 = 0.106 - 0.02626 / 0.0031908$$

$$= 24.991 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{10^{-6} \text{ g}}{1 \mu\text{g}}$$

$$= 24.991 \times 10^{-6} \text{ g/ml (100) (1000)}$$

$$= 2.4991 \text{ g/100 ml}$$

$$\text{tiempo} = 14 \text{ 288 s}$$

$$x_2 = 0.098 - 0.02626 / 0.0031908$$

$$= 22.483 \mu\text{g/ml}$$

$$= 2.2483 \text{ g/100 ml}$$

$$\text{tiempo} = 28 \text{ 924 s}$$

$$x_3 = 0.095 - 0.02626 / 0.0031908$$

$$= 21.543 \mu\text{g/ml}$$

$$= 2.1543 \text{ g/100 ml}$$

$$\text{tiempo} = 43 \text{ 285 s}$$

$$x_4 = 0.091 - 0.02626 / 0.0031908$$

$$= 20.290 \mu\text{g/ml}$$

$$= 2.0290 \text{ g/100 ml}$$

C. Cálculo de la función V experimental:

$$V_1 = (2.4991 - 2.2483) = 0.2508 / 2.4991 = 0.10036$$

$$V_2 = (2.4991 - 2.1543) = 0.3448 / 2.4991 = 0.13797$$

$$V_3 = (2.4991 - 2.0290) = 0.4701 / 2.4991 = 0.18811$$

D. Cálculo de D_{AB} :

a) Utilizando el programa del Apéndice I:

Datos:

<u>a^2 (m²)</u>	<u>t (s)</u>	<u>V</u>	<u>$D_{AB} \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$</u>
0.0004	14 288	0.10036	2.53499
0.0004	28 990	0.13797	2.60090
0.0004	43 285	0.18811	2.56710

b) A partir del módulo de Fourier:

$$T = D_{AB} \cdot t / a^2$$

$$D_{AB} = T \cdot a^2 / t$$

$$a^2 = 0.0004 \text{ m}^2$$

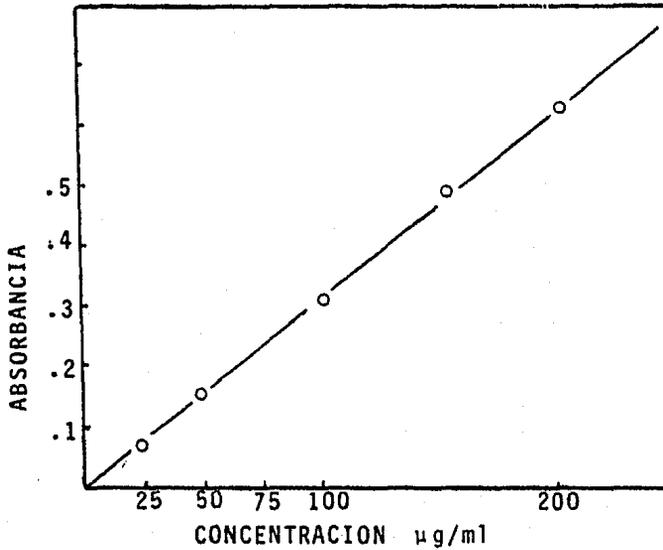
<u>t (s)</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>$D_{AB} \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$</u>
14 288	0.10036	0.00905	2.53499
28 990	0.13797	0.01885	2.60090
43 285	0.18811	0.03860	2.56710

c) Valor promedio :

$$D_{AB} \Big|_{19 \text{ } ^\circ\text{C}} \text{ Galactosa (2.5\%)} = 2.901 \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$$

VII RESULTADOS

FIGURA 22: CURVA ESTANDAR DE PROTEINA (Met. Lowry) a 590 nm.



CONCENTRACION	ABS
0	0
25	0.059
50	0.113
100	0.237
200	0.479

Ec. línea recta: $y = mx + b$

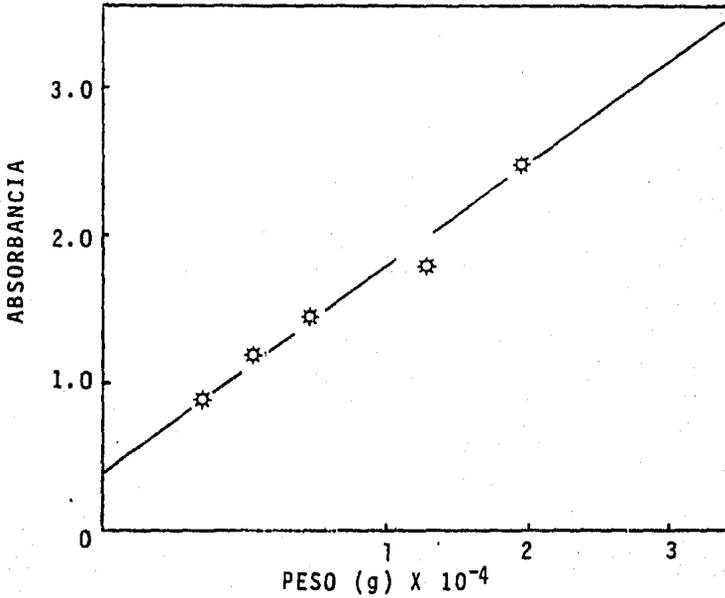
$m = 0.0024$

$b = 0.002475$

$r = 0.999$

CONC. PROTEINA ($\mu\text{g/ml}$) = ABS. 590 nm + 0.002475/0.0024

FIGURA 23: DETERMINACION DE LA CONCENTRACION EN PESO SECO(g) DE CELULAS DE E.coli CSH-36 CON ACTIVIDAD DE ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA.



X	Y
0.0002	0.780
0.0005	1.1720
0.0008	1.3360
0.0017	1.5450
0.0021	2.0900

E. línea recta: $y = mx + b$

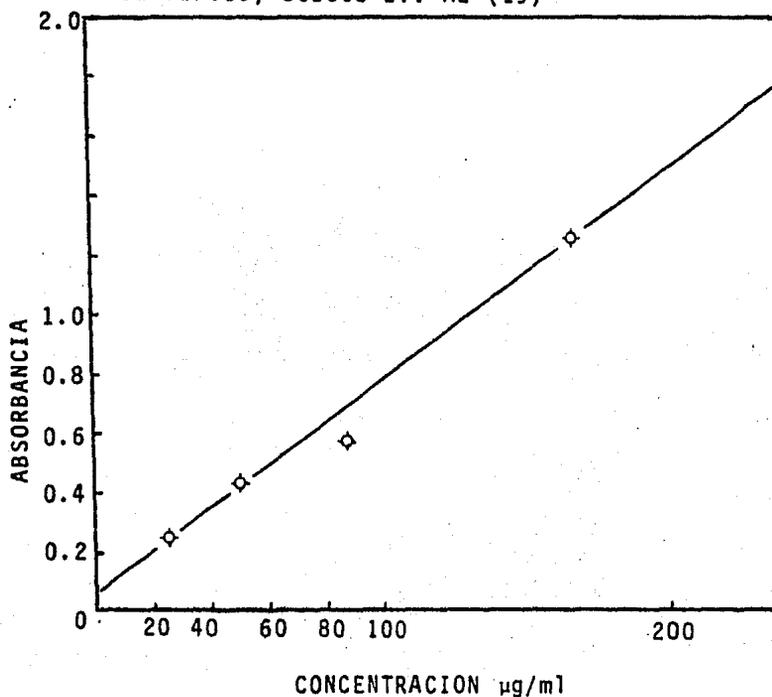
$m = 764$

$b = 0.4790$

$r = 0.9070$

CONC. GRAMOS SECOS/ml = ABS 560 nm - 0.4790/764

FIGURA 24: CURVA ESTANDAR DE LACTOSA 5% (METODO FENOL -ac. sulfúrico) DUBOIS ET. AL (19)



CONCENTRACION	ABS.
0	0
22.5	0.247
45.0	0.455
90.0	0.545
180.0	1.389

Ec. línea recta: $y = mx + b$

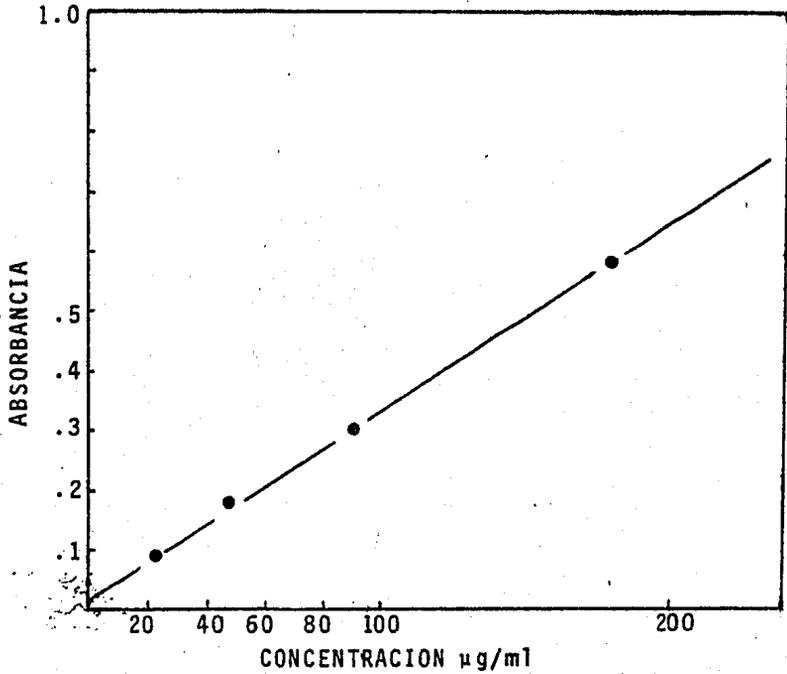
$$m = 7.2677 \times 10^{-3}$$

$$b = 0.0366$$

$$r = 0.9840$$

$$\text{CONC. LACTOSA} = \text{ABS } 490 \text{ nm} - 0.0366 / 7.26 \times 10^{-3} = \mu\text{g/ml}$$

FIGURA 25: CURVA ESTANDAR DE GALACTOSA (2.5%) (METODO FENOL-
ac. sulfúrico) DUBOIS, ET. AL. (19)



CONCENTRACION	ABS.
0	0
22.5	0.098
45.0	0.199
90.0	0.308
180.0	0.595

Ec. línea recta: $y = mx + b$

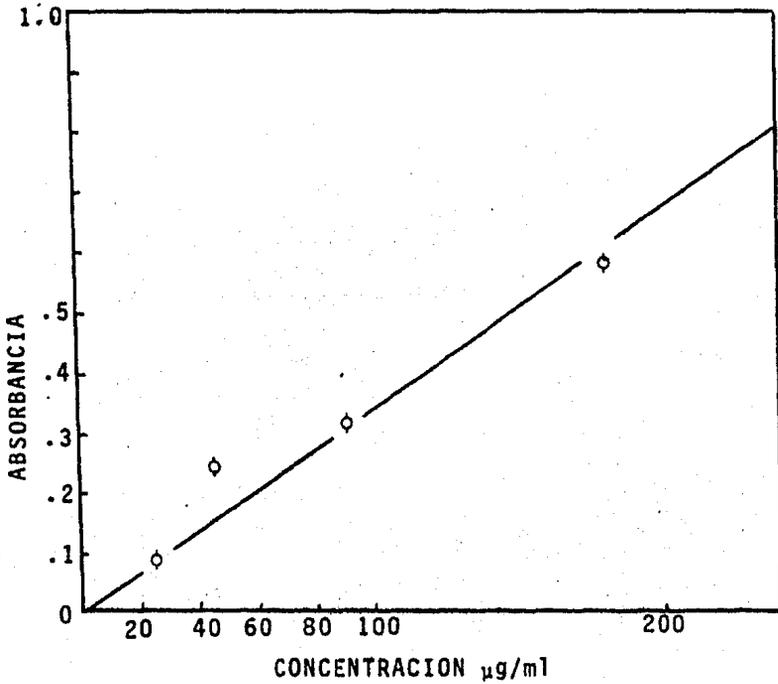
$$m = 3.1908 \times 10^{-3}$$

$$b = 0.02626$$

$$r = 0.9960$$

$$\text{CONC. GALACTOSA} = \text{ABS } 490 \text{ nm} - 0.02626 / 3.1908 \times 10^{-3} = \mu\text{g/ml}$$

FIGURA 26: CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA (2.5%) (METODO FENOL -ac. sulfúrico). DUBOIS ET. AL. (19)



CONCENTRACION	ABS.
0	0
22.5	0.134
45.0	0.239
90.0	0.280
180.0	0.563

Ec. línea recta: $y = mx + b$

$$m = 2.5294 \times 10^{-3}$$

$$b = -6.2727 \times 10^{-3}$$

$$r = 0.9886$$

$$\text{CONC. GLUCOSA} = \text{ABS } 490 \text{ nm} + 6.2727 \times 10^{-3} / 2.5294 \times 10^{-3} = \mu\text{g/ml}$$

TABLA 9 FORMULACIONES PROPUESTAS PARA EL SISTEMA DE INMOVILIZACION

SISTEMA I	K-carragenina (g)	goma de algarrobo (g)
F-1	2.897	0.965
F-2	2.510	1.350
F-3	1.930	1.930
F-4	1.350	2.510
F-5	0.965	2.897

SISTEMA II	K-carragenina (g)	goma guar (g)
F-1	2.897	0.965
F-2	2.510	1.350
F-3	1.930	1.930
F-4	1.350	2.510
F-5	0.965	2.897

Las formulaciones se basaron en tomar 3.4 g. peso seco como 100% para establecer las relaciones, cantidad reportada por Tosa et.al. (51). Se consideró el 12% de humedad para las gomas de acuerdo con las especificaciones del proveedor, para realizar las formulaciones.

TABLA 9-1 RESISTENCIA A LA COMPRESION DE LAS FORMULACIONES PLANTEADAS COMO SOPORTE EN LA TABLA 9.0 SIN Y CON ADICION DE GLICEROL AL 3.4% v/v

	(kg/cm ²)	(kg/cm ²)	(kg/cm ²)	(kg/cm ²)
TKCSP	0.3632			
TKCCP	0.3649			
	SISTEMA I SP	SISTEMA I CP	SISTEMA II SP	SISTEMA II CP
FORMULA 1	0.2084	0.3437	0.1490	0.2819
FORMULA 2	0.2417	0.3640	0.1824	0.2504
FORMULA 3	0.3055	0.3654	*	0.2035
FORMULA 4	0.4015	0.4379	*	*
FORMULA 5	0.1663	0.1614	*	*

TGSP y CP *

TASP y CP *

ABREVIACIONES:

- TKCSP = Testigo de k-carragenina sin poliol.
- TKCCP = Testigo de k-carragenina con glicerol al 3.4% v/v.
- TGSP = Testigo de goma guar sin glicerol.
- TGCP = Testigo de goma guar con glicerol al 3.4% v/v
- TASP = Testigo de algarrobo sin glicerol.
- TACP = Testigo de algarrobo con glicerol al 3.4% v/v.
- SP = Sin glicerol.
- CP = Con glicerol al 3.4% v/v.
- * = No presentó resistencia a la compresión detectable.
- SISTEMA I = k-carragenina - algarrobo.
- SISTEMA II = K-carragenina - guar.

TABLA 9.2 RESISTENCIA A LA COMPRESION DE LA FORMULACION SELECCIONADA PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE CON ADICION DE GLICEROL Y PROPILENGLICOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

% v/v Poliol	TKCCPG ($\bar{k}g/cm^2$)	TKCCPPG ($\bar{k}g/cm^2$)	KCGACPPG ($\bar{k}g/cm^2$)	KCGACPG ($\bar{k}g/cm^2$)
3.4	0.3649	0.2077	0.4356	0.4379
10.0	*	*	1.1970	0.5539
20.0	*	*	*	0.8723
30.0	*	*	*	0.8935
40.0	*	*	*	0.5474
50.0	*	*	*	*

NOTA: La formulación pertenece al sistema I (k-carragenina-algarrobo). Formulación 4 TABLA 9.0

ABREVIACIONES

TKCCPG	Testigo de K-carragenina con glicerol.
TKCCPPG	Testigo de K-carragenina con propilenglicol.
KCGACPPG	K-carragenina-algarrobo con propilenglicol.
KCGACPG	K-carragenina-algarrobo con glicerol.
*	No presentó resistencia a la compresión detectable.

TABLA 10 RESISTENCIA A LA COMPRESION DE LA FORMULACION 4 DEL SISTEMA I (K-carragenina-algarrobo) TABLA 9.0 SELECCIONADA PARA LA MANUFACTURA DEL SOPORTE CON ADICION DE UNA MEZCLA DE GLICEROL PROPILENGLICOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

	GRAMOS GLICEROL / 100 ML	GRAMOS PROPILENGLICOL / 100 ML	τ (Kg/cm ²)
FORM - A	32.659	5.180	0.4688
FORM - B	27.479	10.360	1.2612
FORM - C	22.299	15.540	1.2395
FORM - D	17.119	20.720	1.4916
FORM - E	11.939	25.900	*
FORM - F	6.759	31.080	*

* = No presenta resistencia a la compresión detectable.

Las formulaciones se basaron en considerar que al 30% v/v de glicerol se tiene una concentración de 37.839g (en base a su densidad), tomando como constante esta cantidad en peso.

TABLA 11.: Cuantificación del fenómeno de Sinéresis.

TIEMPO (DIAS)	0		1		2		3	
	PESO (g)	% PERDIDA EN PESO						
FORM-A	1.7028	0	1.4874	12.64	1.2689	25.48	1.0863	36.21
FORM-B	2.0425	0	1.6706	18.21	1.4429	29.36	1.2304	39.76
FORM-C	1.7677	0	1.3054	26.15	1.1036	37.57	0.9151	48.23
FORM-D	1.7211	0	1.1772	31.60	1.0345	39.90	0.9050	47.41
TKC	1.5550	0	0.7049	54.66	1.1706	89.03	0.1004	93.54

Las formulaciones empleadas en este experimento son las enlistadas en la TABLA 10.

TKC = Testigo de K-carragenina sin poliol.

TABLA 11 : Cuantificación del fenómeno de Sinéresis.

TIEMPO (DIAS)	6		15		30		65	
	PESO (g)	% PERDIDA EN PESO						
FORM-A	0.8441	50.43	0.7118	58.20	0.5748	66.25	0.4322	74.62
FORM-B	0.8900	56.43	0.7375	63.91	0.6852	66.47	0.5532	72.93
FORM-C	0.6851	61.24	0.4934	72.09	0.4746	73.15	0.4419	75.00
FORM-D	0.7600	55.84	0.5322	69.08	0.4307	74.97	0.4193	75.00
TKC	0.1004	93.54	0.1004	93.54	0.1004	93.54	0.1004	93.54

Las formulaciones empleadas en este experimento son las enlistadas en la TABLA 10.

TKC = Testigo de K-carragenina sin poliol.

TABLA 11 : Cuantificación del fenómeno de Sinéresis.

TIEMPO (DIAS)	6		15		30		65	
	PESO (g)	% PERDIDA EN PESO						
FORM-A	0.8441	50.43	0.7118	58.20	0.5748	66.25	0.4322	74.62
FORM-B	0.8900	56.43	0.7375	63.91	0.6852	66.47	0.5532	72.93
FORM-C	0.6851	61.24	0.4934	72.09	0.4746	73.16	0.4419	75.00
FORM-D	0.7600	55.84	0.5322	69.08	0.4307	74.97	0.4193	75.00
TKC	0.1004	93.54	0.1004	93.54	0.1004	93.54	0.1004	93.54

Las formulaciones empleadas en este experimento son las enlistadas en la TABLA 10.

TKC = Testigo de K-carragenina sin poliol.

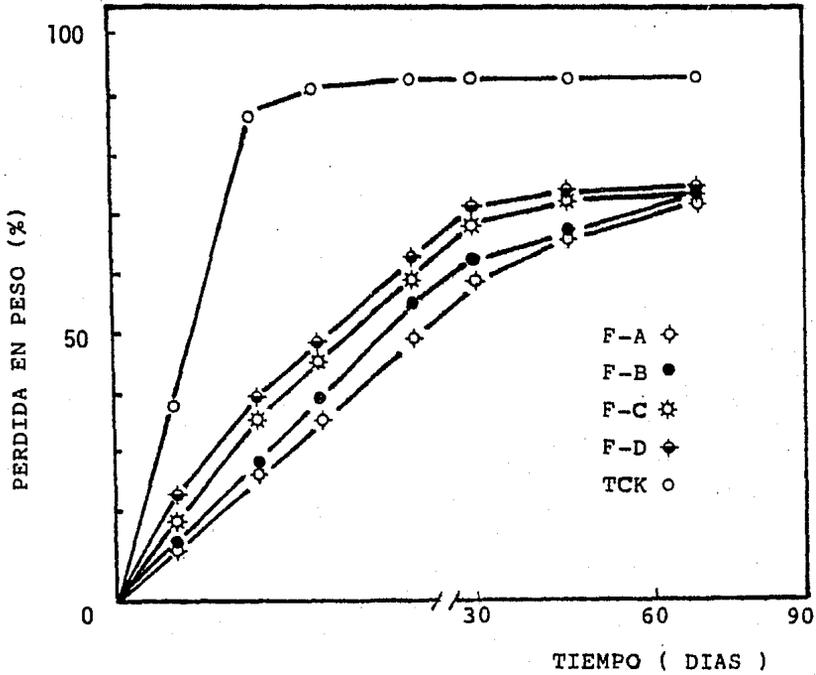


FIGURA 27 : Cuantificación del fenómeno de sinéresis.
Las formulaciones empleadas en este experimento son las enlistadas en la Tabla 10.

TABLA 12. RESISTENCIA A LA COMPRESION EN FUNCION DEL pH DEL SOPORTE

pH	τ (kg/cm^2)	pH	τ (kg/cm^2)
4.0	3.2360	7.0	*
5.0	2.0718	7.5	0.7418
5.5	1.1770	8.0	1.2760
6.0	0.5445	8.5	*
6.5	*	9.0	*

* = No resistió a la compresión.

La composición de la formulación del soporte es: 1.25g K-carragenina, 2.51g algarrobo, 0.9g NaCl, 17.119g glicerol, 20.72g propilenglicol aforados a 100 ml.

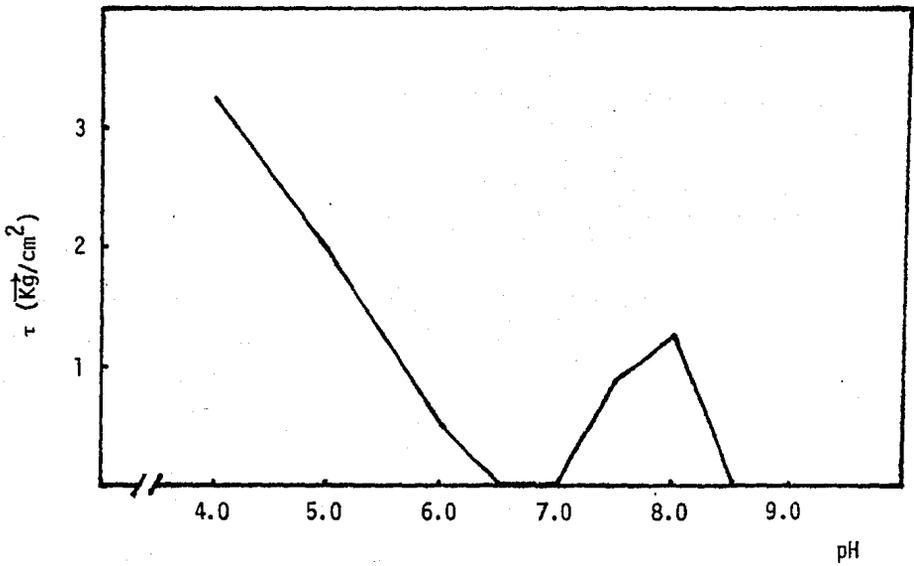


FIGURA 28.: Resistencia a la compresión en función del pH del soporte.

TABLA 13 SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE FOSFATOS
13.1 CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN PRESENCIA DE POLIMEROS
(K-carragenina 1.25g - algarrobo 2.51g)

MOLARIDAD AMORTIGUADOR FOSFATOS	0.2	0.1	0.05	0.01
pH AMORTIGUADOR	8.08	8.08	8.08	8.08
pH AMORTIGUADOR + POLIMEROS S/AGITACION (20°C)	8.07	8.06	8.04	8.00
pH (45°C) 30' DE AGITACION	7.99	8.00	7.90	7.88
pH (20°C) C/AGITACION	8.06	8.06	8.03	8.01
pH (20°C) S/AGITACION	8.08	8.08	8.04	8.03

pH polímeros (20°C) con agitación = 8.08

pH células de E.coli CSH-36 (20°C) c/agitación = 6.65

pH soporte gelificado (20°C) = 8.15

TABLA 13.2 CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN PRESENCIA DE CELULAS DE E.COLI
CSH-36 (3.4% p/v)

MOLARIDAD AMORTIGUADOR				
FOSFATOS	0.2	0.1	0.05	0.01
pH AMORTIGUADOR	8.15	8.15	8.15	8.15
pH AMORTIGUADOR C/CELULAS				
S/AGITACION (20°C)	8.13	8.13	8.11	8.08
pH SOLUCION (45°C) 30 MIN.AGITACION	8.05	7.98	7.98	7.93
pH SOLUCION (20°C) C/AGITACION	8.11	8.11	8.06	8.02
pH SOLUCION (20°C) S/AGITACION	8.12	8.11	8.09	8.04

pH Células E. Coli (3.4% p/v) (20°C) = 6.65

pH soporte gelificado (20°C) = 8.15

TABLA 13.3 EFECTO DE LAS SOLUCIONES AMORTIGUADORAS EN LAS PROPIEDADES DEL SOPORTE

RELACION EN PESO CELULAS : GOMAS		ACTIVIDAD ENZIMATICA				EROSION
(g)	(g)	pH	M	U ONPG/g	τ (kg/cm^2)	
1	: 1	8.15	0.1	2.51	1.1153	MEDIA
1	: 1	8.08	0.1	2.45	1.0167	ALTA
1	: 1	8.15	0.01	2.49	1.1512	BAJA
1	: 1	8.08	0.01	2.47	1.0872	BAJA

ESCALA EROSION: ALTA, MEDIA, BAJA

El soporte se sometió después de 1 semana de inducido al estado de gel a agitación de 200rpm a 37°C durante 30 minutos, para detectar la erosión. Las pruebas de resistencia a la compresión se efectuaron después de 12 horas de haber inducido la gelificación del soporte, así como la determinación de la actividad enzimática siendo las dimensiones del soporte cilindros de long = 1.0 cm. y diam = 0.5 cm. Cantidad colocada 0.5g húmedos.

TABLA 14. RESISTENCIA A LA COMPRESION, CAPACIDAD DE ATRAPAMIENTO Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL SOPORTE

RELACION		τ + (kg/cm ²)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (U ONPG/ g)
PESO SECO CELULAS (g)	PESO SECO GOMAS (g)		
1	: 1	1.0903	2.4994
2	: 1	1.1131	1.5257
3	: 1	1.1534	6.1000
4	: 1	1.1305	9.1028
5	: 1	0.4054	6.0370
6	: 1	0.3796	3.6020

Para cuantificar actividad enzimática se colocaron cilindros de 0.5g. húmedos cuyas dimensiones son longitud 1.0 cm, diámetro 0.5 cm.

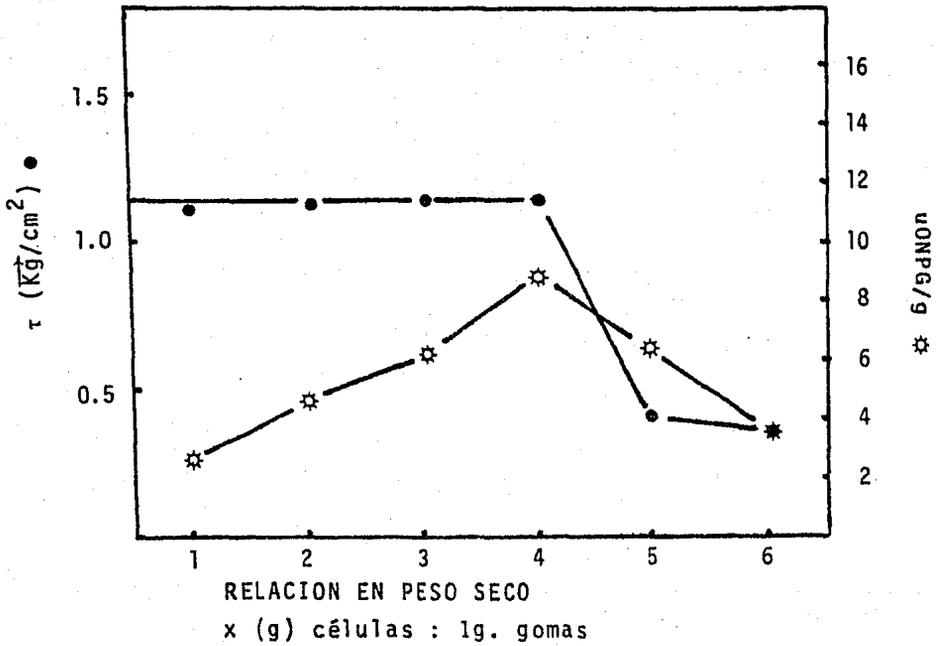


FIGURA 29 : Resistencia a la compresión, capacidad de atrapamiento y actividad enzimática del soporte.

TABLA 14.1 ACTIVIDAD ENZIMATICA (μ ONPG/g) CON RESPECTO A LA LONGITUD DEL SOPORTE

LONGITUD		1.0 cm	0.5 cm
PESO SECO : PESO SECO CELULAS : GOMAS (g) (g)			
1 : 1		2.4994	4.8623
3 : 1		6.1000	12.0864
4 : 1		9.1028	18.1517

Se colocaron cilindros de diámetro = 0.5 cm en todos los casos. Cantidad de soporte colocado para medir actividad 0.5 g. húmedos.

TABLA 14.2 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EXPRESADO

PESO SECO CELULAS (g)	PESO SECO GOMAS (g)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (uONPG inmovilizadas/g)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (uONPG obtenidas/g)	% Expresado
1	: 1	4 219.19	2.4994	16.53
2	: 1	8 438.39	4.5257	15.33
3	: 1	12 657.59	6.1000	14.11
4	: 1	16 876.78	9.1033	16.15
5	: 1	21 095.98	6.0370	8.76
6	: 1	25 315.17	3.6820	4.54

Se colocaron en todos los casos cilindros de 1.0 de longitud y 0.5 cm. de diámetro. Cantidad de soporte 0.5 g húmedos.

TABLA 15. TRATAMIENTO QUIMICO DE CELULAS DE E.COLI CSH-36

ACTIVIDAD NATIVA CELULAS = 1 849.62 uONPG/g

AGENTE QUIMICO		u ONPG/g
CLORURO FERRICO ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	a1 0.02%	SIN ACTIVIDAD
YODATO DE POTASIO (KIO_3)	a1 0.02%	SIN ACTIVIDAD
PERMANGANATO DE POTASIO (KMnO_4)	a1 0.02%	1 544.96
DICROMATO DE POTASIO ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	a1 0.02%	269.26
GLUTARALDEHIDO	a1 0.02%	1 814.30

Se colocó 3.4 g peso seco de células en 100 ml. de solución para el tratamiento químico.

TABLA 16. ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA AL ALMACENAMIENTO DEL SOPORTE EN CONGELACION (-10°C)

TIEMPO (MESES)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (u ONPG / g)
1	9.1028
2	9.0872
3	9.1201
5	9.1035
6	9.1071

Se colocaron cilindros de diámetro 0.5 cm. y longitud 1.0 cm, para medir actividad se utilizan 0.5 g. húmedos.

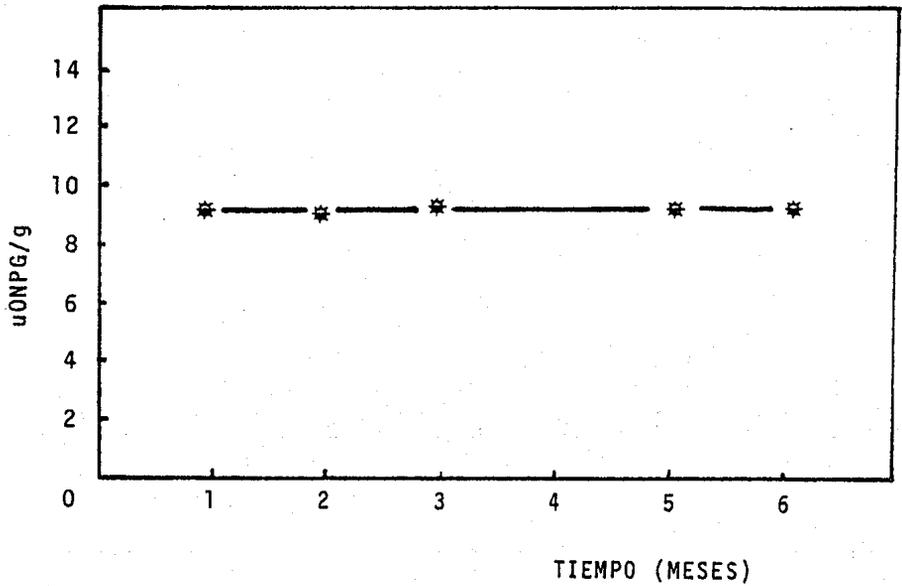


FIGURA 30 : Estabilidad de la actividad enzimática al almacenamiento del soporte en congelación. (-10°C)

**TABLA 17: RESULTADOS DE DIFUSION CARBOHIDRATOS A TRAVES DEL SOPORTE
(K-CARRAGENINA-ALGARROBO 3.4%)**

A) SOPORTE SIN CELULAS:

<u>1. Galactosa (2.5%)</u>	<u>Tiempo(s)</u>	<u>Lectura Espectrofotómetro</u>	<u>Concentración (g/100 ml)</u>
1.1 <u>A 19°C:</u>	0	0.106	2.4991
	14 288	0.098	2.2483
	28 990	0.095	2.1543
	43 283	0.091	2.0290
1.2 <u>A 25°C:</u>	0	0.106	2.4991
	14 580	0.097	2.2170
	28 924	0.094	2.1230
	43 372	0.089	1.9663
1.3 <u>A 32°C:</u>	0	0.106	2.4991
	14 390	0.096	2.1857
	28 950	0.092	2.0603
	43 260	0.087	1.9036
2. Glucosa (2.5)			
2.1 <u>A 25°C:</u>	0	0.137	2.4925
	14 582	0.130	2.2536
	28 869	0.124	2.0488
	43 465	0.122	1.9805
2.2 <u>A 32°C:</u>	0	0.137	2.4925
	14 490	0.130	2.2536
	29 009	0.123	2.0147
	43 297	0.119	1.8782
3. Lactosa (5%)			
3.1 <u>A 32°C:</u>	0	0.395	4.9314
	14 590	0.389	4.8489
	28 987	0.385	4.7938
	43 380	0.382	4.7525

B) SOPORTE CON CELULAS (13.6 g) INMOVILIZADAS

<u>1. Galactosa (2.5%) a 37°C</u>	0	0.106	2.4991
	14 555	0.099	2.2797
	29 004	0.095	2.1543
	43 357	0.090	1.9976
<u>2. Glucosa (2.5%) a 37°C</u>	0	0.137	2.4925
	14 604	0.132	2.3218
	28 907	0.128	2.1853
	43 329	0.125	2.0829
<u>3. Lactosa (5%) a 37°C</u>	0	0.396	4.9452
	28 941	0.387	4.8213
	43 265	0.385	4.7938

TABLA 18: RESULTADOS DEL PROGRAMA DE CALCULO PARA T Y D_{AB},
 COEFICIENTE DE DIFUSION PARA CARBOHIDRATOS A TRAVES
DEL SOPORTE SIN CELULAS INMOVILIZADAS

A) Galactosa (2.5%) T= 19 °C				
tiempo (s)	T	v	D _{AB} X10 ⁻¹⁰ m ² /s	D _{AB} X10 ⁻¹⁰ m ² /s
14 288	0.009055	0.10036	2.5350	
28 990	0.01885	0.13799	2.6009	2.901
43 285	0.03860	0.18811	3.5671	
B) Galactosa (2.5%) T= 25 °C				
14 580	0.01190	0.11290	3.2647	
28 924	0.02300	0.15050	3.1780	3.749
43 372	0.05210	0.21320	4.8049	
C) Galactosa (2.5%) T= 32 °C				
14 390	0.0152	0.1254	4.2112	
28 950	0.0328	0.1756	4.5350	5.026
43 260	0.0685	0.2383	6.3330	

D) Glucosa (2.5%) T= 25 °C

tiempo (s)	T	V	$D_{AB} \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$	$D_{AB} \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$
14 582	0.008122	0.09584	2.2280	
28 869	0.033902	0.17801	4.6974	3.3838
43 465	0.047615	0.20541	4.3819	

E) Glucosa (2.5%) T= 32 °C

14 490	0.008122	0.9584	2.2421	
29 009	0.040364	0.19169	5.5657	4.8977
43 297	0.07453	0.24645	6.8855	

F) Lactosa (5.0%) T= 32 °C

28 987	0.000131	0.02790	0.01877	
43 380	0.000571	0.36270	0.05265	0.035364

TABLA 19: RESULTADOS DEL PROGRAMA DE CALCULO PARA T Y D_{AB},
 PARA CARBOHIDRATOS A TRAVES DEL SOPORTE (3.4%) CON
 CELULAS (13.6 g) DE E. COLI CSH-36 INMOVILIZADAS

A) Galactosa (2.5%) T= 37 °C					
tiempo (s)	T	V	D _{AB} X10 ⁻¹⁰ m ² /s		D _{AB} X10 ⁻¹⁰ m ² /s
14 555	0.006585	0.08799	1.8097		
29 004	0.01884	0.13796	2.5982		2.8540
43 357	0.04502	0.20067	4.1542		
B) Glucosa (2.5%) T= 37 °C					
14 604	0.00356	0.06848	0.9751		
28 907	0.01456	0.12325	2.0147		1.8628
43 329	0.02815	0.16433	2.5987		
C) Lactosa (5.0%) T= 37 °C					
28 941	0.00001	0.02501	0.0013		
43 265	0.00026	0.03062	0.0243		0.0128

VIII DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

1.0 Interacción entre k-carragenina y galactomannanas

Como objetivo general de este trabajo de investigación se estableció mejorar la resistencia física de un soporte de k-carragenina reportado por Tosa et. al. (51), mediante su interacción con galactomannanas y uso de polioles.

Para ello se estableció primeramente, dos sistemas de diferentes formulaciones de k-carragenina -galactomannanas (algarrobo y guar) y que aparecen en la tabla 9.

Las cuales tienen una composición total en peso seco de 3.4g aforados a un volumen de 100 ml.

El criterio de selección se basó en la determinación de la resistencia a la compresión de cada una de las formulaciones establecidas, después de 12 horas de haber inducido la gelificación. Cabe recalcar que el volumen de aforo, la composición en peso, y el tiempo para cuantificar la resistencia a la compresión, se fijan como constantes y prevalecen para estudios de este tipo.

La resistencia a la compresión promedio para las formulaciones de la tabla 9 puede ser estimada de acuerdo al punto 1.0 de la sección de cálculos.

La resistencia a la compresión promedio para un testigo de k-carragenina es de 0.3632 kg/cm^2 , los testigos de goma guar y algarrobo no presentan resistencia a la compresión detectable. Para el Sistema I (k-carragenina-

algarrobo) la resistencia a la compresión promedio se incrementa al disminuir la cantidad de k-carragenina con respecto a la goma de algarrobo, hasta un límite como se aprecia en los datos que aparecen en la tabla 9.1, el valor máximo obtenido para este Sistema es de 0.4015 kg/cm^2 , siendo mayor que el obtenido para el testigo de k-carragenina. En el Sistema II (k-carragenina-goma guar), el valor promedio de resistencia a la compresión máximo obtenido corresponde a la formulación 2 siendo de 0.1824 kg/cm^3 (tablas 9.0 y 9.1), siendo el componente mayoritario k-carragenina de dicha formulación; este valor máximo promedio obtenido para el Sistema II es inferior al presentado por el testigo de k-carragenina (0.3632 kg/cm^2).

Los geles tanto del Sistema I y II como el testigo de k-carragenina, son rígidos y poco flexibles.

Como se estableció en el punto 5.0 de la Revisión de la literatura, Dea, I.C.M., et.al. (16) plantea que existen zonas específicas de asociación entre las hélices de k-carragenina y la región lisa de las galactomananas (Figura 14), estas últimas presentan una relación estructural específica entre sus monómeros de manosa (región lisa) y de galactosa (región ramificada). En la tabla 4 se establece que la relación manosa/galactosa es mayor para algarrobo (3.35/1), mientras que para goma guar es menor (1.5/1)

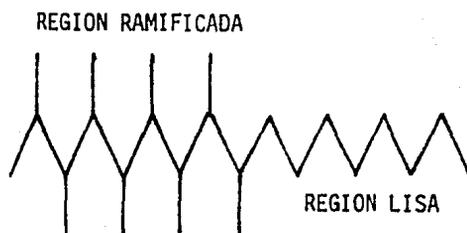


Fig. A Estructura propuesta para goma de algarrobo.

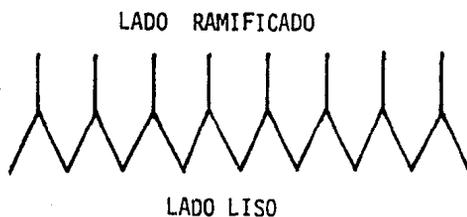


Fig. B Estructura propuesta para goma guar.

Las figuras A y B propuestas por Courtois, J.E. y Le Dizet, P. (14), intentan dar una idea de las diferencias estructurales entre ambas galactomannanas.

Por lo tanto la goma de algarrobo al tener una relación manosa/ galactosa mayor que la de goma guar tendrá una región lisa más definida, favoreciendo la asociación con k-carragenina; ya que la goma guar debido a su estructura al experimentar posibles cambios rotacionales cerca de los enlaces 1,6-D-galactosa presentará impedimentos de tipo estérico para asociarse con k-carragenina al perder el lado liso de su estructura (Figura 9).(37,44)

1.1 Interacción entre k-carragenina y galactomannanas. Uso de polioles.

De acuerdo con las características que presentan los polioles tales como humectancia, rehidratación, solubilizantes, etcétera y que aparecen en las tablas 7 y 8 de la revisión de la literatura; se seleccionó el uso de glicerol y propilenglicol para aportar al soporte características de flexibilidad, retención de agua y plasticidad.

1.1.1 Uso de glicerol al 3.4% v/v

La resistencia a la compresión promedio puede ser calculada de acuerdo al punto 1.0 de la sección de cálculos.

La tabla 9.1 reúne los datos obtenidos para determinar el efecto de la adición de glicerol al soporte. En ellos se aprecia que el testigo de k-carragenina no presentó un aumento en su resistencia a la compresión promedio (de 0.3632 kg/cm^2 a 0.3649 kg/cm^2). El comportamiento tanto para el sistema I (k-carragenina-algarrobo) como del sistema II (k-carragenina-guar) es el mismo presentado sin la adición de poliol, siendo en particular para el sistema I (k-carragenina-algarrobo) la formulación 4 que nuevamente presentó en el valor promedio un leve incremento de 0.4015 kg/cm^2 a 0.4379 kg/cm^2 (9.1% de incremento).

El aumento observado en la resistencia a la compresión tanto por el sistema I y II puede deberse a que el glicerol facilita la dispersión de dichos sistemas, dado que la viscosidad que presentan en solución es muy elevada dificultando su dispersión en comparación con las características de la de k-carragenina cuya viscosidad en solución es mucha menos y se facilita su dispersión; de ahí que los datos promedio para la resistencia a la compresión de k-carragenina son similares con y sin adición de glicerol siendo 0.3649 y 0.3632 kg/cm^2 respectivamente. Aparte de aportar al soporte características de elasticidad por adición del glicerol. La concentración de glicerol al 3.4% v/v se fijó de una manera arbitraria con el fin de establecer que características se observarían por adición de glicerol.

1.1.2 Variación de la concentración de glicerol.

Una vez que se seleccionó la formulación 4 del sistema I (k-carragenina-algarrobo) (tabla 9) para la manufactura del soporte, se procedió a variar la concentración de glicerol en un intervalo de 3.4 al 50% v/v para dicha formulación cuya composición es de 1.35 g de k-carragenina y 2.51g. de algarrobo.

Los datos estimados de la resistencia a la compresión promedio aparecen en la tabla 9.2. A partir de ellos se aprecia que la mayor resistencia a la compresión promedio es 0.8935 kg/cm^2 correspondiente a una concentración de glicerol al 30% v/v.

1.1.3 Uso de propilenglicol

La adición de propilenglicol se hizo en un intervalo de concentraciones del 3.4 al 50% v/v para la formulación del soporte cuya composición es 2.51g. de algarrobo y 1.35g. de k-carragenina. Los datos de la determinación de la resistencia a la compresión aparecen en la tabla 9.2 de la sección de resultados, en ella se aprecia que el valor promedio estimado más alto es de 1.1970 kg/cm^2 para una concentración de propilenglicol al 10% v/v.

Analizando los datos de la tabla 9.2, la adición de propilenglicol aporta una mayor resistencia a la compresión promedio de 1.1970 kg/cm^2 que la presentada por el soporte con igual composición de k-carragenina (1.25g) y de algarrobo (2.51g) y con adición de glicerol (de 0.8935 kg/cm^2), siendo una concentración mayor para este último (al 30% v/v) en comparación con el primero (al 10% v/v).

Los polioles son surfactantes, es decir materiales de superficie activa en donde sus moléculas anfifílicas (que consisten de partes polares y no polares) se ordenan y orientan en la interfase sólido-líquido, en donde sus grupos hidrofílicos (-OH y $-CO_2H$) localizados en la fase acuosa [o grupos lipofílicos usualmente -CH, -CH=, $-CH_2$ o $-CH_3$, son localizados en la fase aceitosa], disminuyen la tensión interfacial sólido-líquido facilitando su solubilización. Por lo tanto, el propilenglicol al tener un segmento terminal $-CH_3$ será menos hidrofílico en comparación con el glicerol; esto explicaría en parte la tolerancia de una concentración menor de propilenglicol con respecto a la de glicerol por parte del soporte, en medio acuoso (17).

1.2 Adición de una mezcla de glicerol-propilenglicol

Se tomó como constante una concentración al 30% v/v de glicerol, que corresponde en peso a 37.839 g/100 ml; variándose en base a esta concentración la relación glicerol - propilenglicol, planteándose las formulaciones que aparecen en la tabla 10 de resultados. En los datos experimentales de dicha tabla se aprecia que el valor máximo promedio de resistencia a la compresión calculado es de $1.4916 \frac{kg}{cm^2}$ correspondiente a la formulación D. En base a lo anterior se establece que la

formulación óptima para el soporte, es la que presenta la siguiente composición en peso: 2.51 g. de algarrobo, 1.35 g k-carragenina, 17.119g. de glicerol y 20.72 g. de propilenglicol.

2.0 Cuantificación del fenómeno de sinéresis

El fenómeno de sinéresis puede estimarse como se indica en el punto 2.0 de la sección de cálculos. Basándose en lo anterior se calculó la tabla 11 de resultados.

En ella se muestra que el soporte que contiene polioles es menos susceptible a exudar en función del tiempo, ya que en un período de 3 días el testigo de k-carragenina (sin polioles) elimina el 95% de su peso, mientras que el soporte que contiene polioles (las formulaciones correspondientes son las que aparecen en la tabla 10 y que presentaron resistencia a la compresión) para el mismo período de tiempo elimina en promedio el 50% de su peso, es decir un 40% menos; eliminando en 65 días el 75% en peso.

Los sistemas hidrocoloidales conformados por redes estructurales, al asociarse entre ellas constituyen un esqueleto básico que contiene atrapada la fase continua de agua. Al aumentar la temperatura, las moléculas dispersas en solución tienden a desdoblarse (dentro de ciertos límites, pues un exceso de temperatura puede depolimerizar la molécula) para conformar estructuras definidas para asociarse; a medida que se reduce la tempera-

tura se induce la formación del gel. Los geles presentan el fenómeno de histéresis durante su formación y licuefacción ya que el perfil de temperaturas a las que llevan a cabo estos dos procesos son diferentes (punto 5.0 Revisión de la Literatura).

El fenómeno de sinéresis implica una contracción del gel ya que su estructura es electrocrática (es decir se estabiliza por cargas), lo que origina un rearrreglo físico de las estructuras que lo conforman provocando un ajuste en la interacción soluto-solubilizante, reflejada en la exudación.

3.0 Resistencia a la compresión con respecto al pH.

Las pruebas de resistencia a la compresión se efectuaron después de 12 horas de haber inducido la gelificación, como se ha efectuado en pruebas anteriores. La resistencia a la compresión promedio con respecto al pH puede ser estimada de acuerdo al punto 1.0 de la sección de cálculos. Los datos estimados aparecen en la tabla 12. La resistencia a la compresión presentada por los geles de pH ácido (4.0-5.0) es mayor que la presentada por los geles de pH alcalino (7.0 - 8.0). A pH ácido los geles son duros y poco elásticos en comparación con los geles alcalinos que son flexibles y elásticos. Después de 7 días de inducido el estado de gel, se efectuó el análisis de los geles, observándose que los geles de carácter ácido presentan fenómeno de sinéresis marcado con

contracción del gel y pérdida del tamaño y rigidez inicial; al extruir cubos (de 1x1x1cm) de estos geles y someterlos a agitación continua (200rpm, 37°C, 10 min) en solución acuosa estos se erosionan. Los geles de pH alcalino son flexibles y elásticos, con poca sinéresis y no se erosionan al agitarlos en solución a 200rpm 37°C 10 min.

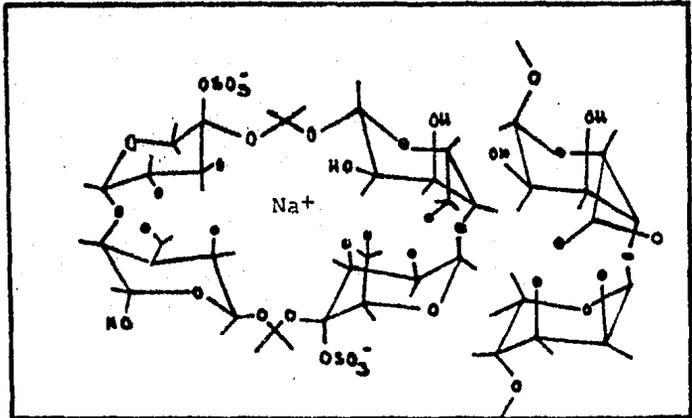
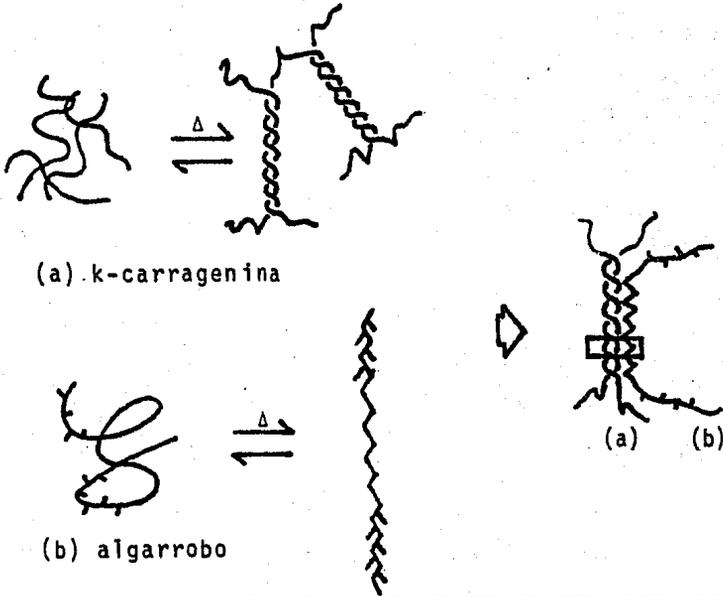
La resistencia máxima promedio para un gel de carácter alcalino fue a pH=8.0 de 1.2760 kg/cm^2 y para un gel de carácter ácido fue a pH=4.0 de 3.2360 kg/cm^2 .

Para pH ácido se sugiere que las interacciones electrostáticas entre los polímeros al conformar y asociarse en estructuras definidas son muy drásticas por la presencia de iones hidronio en solución (H⁺); no conformando estructuras estables, lo que implicará rearrreglos de tipo estructural (fig. 9 Revisión de la literatura) múltiples, lo que tenderá a desestabilizar este tipo de asociación electrocrática. Para pH alcalino Ogawa K. (40) establece que las interacciones de polímeros electrocráticos con los iones en solución son de tipo coordinado, lo que permite una conformación y asociación estructural ordenada, confiriendo una mayor estabilidad del sistema (figura 31).

4.0 Capacidad de amortiguamiento y efecto de las soluciones amortiguadoras de fosfatos

El objetivo de este estudio fue el de estudiar la efectividad de las soluciones amortiguadoras de fosfatos

Fig.31: Modelo de interacción entre cadenas de k-carragenina (galactana) (a) y algarrobo (galactomannana) (b): 16, 37.

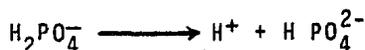


para mantener el pH de la solución constante y de la fase continua de agua que contenga el soporte atrapada cuando este contenga células inmovilizadas, debido a que las enzimas presentan un perfil de actividad en función del pH así como de la osmolaridad de la solución (o fuerza iónica), es decir que la actividad enzimática corresponderá a un intervalo de pH definido, Kuby, A. y Lardy, S. (29) reportan para la enzima β -D-galactosidasa de E. coli un pH óptimo 7.0-7.3 a una concentración 0.14M constante de amortiguador de fosfatos; Morisi, F. et.al. (36) reporta para la misma enzima de E. coli pero inmovilizada en acetato de celulosa un pH entre 6.5-7.5 y para β -D-galactosidasa de levadura entre 6.0-7.0 a una concentración constante 0.05 M de amortiguador de fosfatos. Existen varios ejemplos más, pero no es posible hacer mención de todos ellos. Cabe aclarar, que tanto el pH como la osmolaridad son factores que influyen en la expresión de la actividad enzimática dado que pueden producir cambios en el comportamiento de la enzima, como son cambios conformacionales de la enzima, restricción del acceso al sitio activo.

Los datos experimentales de las tablas 13.1 y 13.2 reflejan que la capacidad de las soluciones amortiguadoras de fosfatos para mantener el pH en solución en presencia de entidades de pH diferente al de ellas (pH células de E.coli CSH-36 a 20°C=6.65 y pH polímeros a 20°C=8.08) se mantiene constante, tanto para una con-

centración de amortiguador de 0.01M como para 0.2M; lo que implica que su capacidad es definida y eficiente, por lo que no hay diferencia entre usar un amortiguador contenido entre este intervalo de molaridades.

En cuanto a los efectos de las soluciones amortiguadoras de fosfatos (0.1 y 0.01M) sobre las propiedades del sistema, las afectan en forma directa; esto se refleja en función del tiempo en una desestabilización del sistema, aunque la actividad de la enzima no le afecta (pH óptimo β -D-galactosidasa de E.coli 7.0-7.3). La determinación de actividad enzimática se efectuó en el tiempo 0 y después de 7 días transcurridos no observándose variación alguna, (tabla 13.3). La desestabilización del soporte se debe a la fuerza iónica aportada por las soluciones amortiguadoras de fosfatos, que no es otra cosa que la medición de la concentración de cargas en solución. La relación entre la fuerza iónica y la molaridad de una solución de sales ionizables dependerá del número de iones producidos y de su carga neta. Es decir que para pH alcalino entre 6.5 - 8.5 tendrá una sal de fosfato una disociación:



si la fuerza iónica está dada por:

$$\frac{I}{2} = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2$$

M = molaridad del ión.

Z = carga neta del ión (independiente del signo)

Σ = sumatoria de.

Una solución 0.1M tendrá una fuerza iónica de 0.3, y para una solución 0.01M la fuerza iónica será de 0.03. Esto traerá como consecuencia que los solutos en la fase continua de agua tenderán a aumentar los rearrreglos de tipo estructural entre polímeros asociados, debido a que contribuirán a interacciones electrostáticas con las estructuras conformadas poliméricas (estructuras electrocráticas).

5.0 Capacidad de atrapamiento, resistencia a la compresión y actividad enzimática

Los datos experimentales que aparecen en la tabla 14 pueden ser estimados de acuerdo a los puntos 1.0 y 4.1 de la sección de cálculos. En ellos se muestra que en el soporte se pueden inmovilizar células de E.coli. CSH-36 con actividad de β -D-galactosidasa hasta seis veces su relación en peso seco. Pero en contraparte la actividad enzimática máxima calculada corresponde a una relación de 4 a 1 (células:gomas) siendo de 9.1028 UNIDADES ONPG/g, así como la resistencia a la compresión promedio es de 1.1305 Kg/cm^2 . Esta capacidad de atrapamiento de 4 a 1 (células:gomas) se seleccionó como la más viable para el soporte, y se procedió a corroborar este dato de resistencia a la compresión obtenido para dicha relación de 4 a 1 en un compresor universal de materiales (punto 2.2 de Materiales y Métodos), siendo el valor obtenido por este método de 1.1023 Kg/cm^2 ; lo que hace confiable ambos métodos de medición (2.1 y 2.2 de Materiales y Métodos). Figura 32.

FIGURA 32 : Prueba de resistencia a la compresión del soporte con células inmobilizadas 4 : 1 (peso células:peso gomas) utilizando un compresor universal de materiales (Instron)

20/5/8

$V_{\text{presión}} : 0.1 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}}$

$V_{\text{gás}} : 10 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}}$

Escala: 20 kg. *Rodriguez*

5.1 Porcentaje de actividad enzimática expresada de células de E.coli CSH-36 relacionado con las dimensiones del soporte en dicha expresión.

Como los datos estimados en el punto 4.1 de la sección de cálculos se construyeron las tablas 14.1 y 14.2; en ellas se observa con lo referente a las dimensiones del soporte que al disminuir a la mitad su tamaño en longitud de 1.0 cm. a 0.5 cm. aumenta la actividad enzimática. Si se considera que la velocidad de transferencia de masa está dada por:

Velocidad de transferencia de masa = Coeficiente de transferencia de masa X Area X Fuerza directriz

$$N_a = K_L A (C_{Ls} - C_L)$$

al mantener constantes la fuerza directriz y el coeficiente de transferencia de masa, al aumentar el área de contacto aumentará la actividad enzimática.

Cabe mencionar que cuando una enzima es inmovilizada, varios factores entran en juego de tal forma que la cinética de la enzima es afectada. Uno de ellos es la velocidad del proceso difusional de las especies que participan, que puede determinar el comportamiento global del sistema, aunado a posibles efectos en el micro-ambiente y complicaciones cinéticas (inhibición por producto o sustrato) (32).

6.0 Modificación química de las células de E.coli CSH-36 con actividad de enzima β -D-galactosidasa.

6.1 Con agente bifuncional (glutaraldehído)

El glutaraldehído es un agente bifuncional porque en condiciones de pH ácido o básico produce una condensación aldólica con los grupos amino de las proteínas, en cambio en condiciones de pH neutro favorece la formación de una base de Schiff, aprovechándose esta última característica para aumentar la estabilidad de las células con actividad enzimática por períodos amplios de tiempo como lo describe Tosa et.al. (51) para varias enzimas inmovilizadas en k-carragenina. Pero algunas proteínas son susceptibles a la inactivación por exposición al glutaraldehído [Wasserman y Hultin (55)], sin embargo cuando se emplea este y otros agentes modificantes es importante minimizar las concentraciones así como sus tiempos de reacción. Los resultados se aprecian en la tabla 15; en ella se establece que el glutaraldehído afecta poco a la actividad de la enzima a una concentración de 0.02% v/v durante 7 minutos de reacción a pH 7.0 en presencia de células de E.coli CSH-36 cuya concentración fue de 3.4g células peso seco/100ml.

6.2 Con agentes oxidantes inorgánicos

También se optimizó tanto su concentración siendo de 0.02% v/v como su tiempo de reacción de 5 minutos a pH neutro (6.0-7.0) para una concentración de células de E.coli CSH-36 de 3.4g peso seco/100 ml. de solución.

Los datos estimados para la actividad enzimática aparecen en la tabla 15, en ella se observa que el agente químico inorgánico menos agresivo es el permanganato de potasio (KMnO_4), pero en función del tiempo se pierde la actividad enzimática de las células debido posiblemente a que los grupos sulfidrilo (-SH) al oxidarse tiendan a formar enlaces disulfuro (-S-S-) bloqueando el acceso al sitio activo de la enzima.

7.0 Estabilidad al almacenamiento de la actividad enzimática de células inmovilizadas de E.coli CSH-36

La tabla 16 reúne los datos obtenidos para la actividad enzimática del soporte; la cual es estable por un periodo estimado de 6 meses hasta la última determinación de actividad enzimática. Además el soporte bajo almacenamiento a 10°C conserva sus características de flexibilidad y elasticidad aparte de la actividad enzimática antes mencionada.

8.0 Inmovilización de células de K.fragilis 55-61 con actividad de enzima β -D-galactosidasa

Con el objeto de probar la universalidad del soporte se procedió a inmovilizar una levadura. La inmovilización de K.fragilis presentó varias dificultades:

- a) Se permeabiliza con tolueno las células de K.fragilis para que la actividad enzimática se exprese.

- b) El tolueno es un solvente orgánico que no permite que el estado del gel del soporte se materialice al intentar inmovilizar las células.
- c) El tolueno es un tóxico y su uso no se permite en la elaboración de alimentos.
- d) La enzima β -D-galactosidasa de K.fragilis se inactiva a 40°C de acuerdo con lo reportado por Morisi, F. et al. (36).

Para solucionar los tres primeros puntos se planteó eliminar el tolueno una vez permeabilizadas las células, secándolas a presión reducida o leofilizándolas (punto 18 y 19 de Materiales y Métodos) reteniendo su actividad inicial después de este tratamiento, estimándose su valor de 1054 u ONPG/g célula (punto 4.2 de cálculos). Una vez eliminado el tolueno se procedió a la inmovilización según la metodología del punto 20.0 correspondiente a materiales y métodos; determinando posteriormente la actividad enzimática en el soporte siendo el valor estimado de 7.4928 u ONPG/g soporte para una relación en peso seco de 1 a 1 (células-gomas). Esta retención de actividad se debe a la presencia de polioles en el soporte, ya que Schmid, R. (45) reporta que estabilizan la actividad de varias enzimas en presencia de aumentos de temperatura por encima de su temperatura óptima de actividad evitando su desnaturalización (tabla 8 Revisión de la Literatura).

Durante la determinación de la actividad enzimática en células de K.fragilis se estableció una prueba cuyo fin

era determinar si el soporte es capaz de retener la enzima β -D-galactosidasa evitando su salida; la cual consistió en el momento de tomar una parte alícuota de la mezcla de reacción enzima-sustrato, una parte se colocaba en un tubo de ensayo y se dejaba a temperatura ambiente, mientras que la otra fracción se colocaba en otro tubo de ensayo y se inhibía por temperatura a 90°C durante 10 minutos. Observándose que la primera de ellas aumentaba su intensidad en la coloración en función del tiempo, en comparación con la correspondiente inhibida por temperatura. Es decir que el soporte no es capaz de retener las enzimas dado que las células inmovilizadas que las contienen están permeabilizadas permitiendo su salida. El soporte en las condiciones de determinación de actividad enzimática no se erosiona.

9.0 Difusión de galactosa, glucosa y lactosa a través del soporte.

9.1 Difusión de galactosa (2.5%) a través del soporte sin células inmovilizadas.

El coeficiente de difusión de galactosa en soluciones acuosas, a dilución infinita y a 25°C se ha reportado en $7.947 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ por Don Juan (18.). Es de esperarse que el valor para la difusividad de galactosa a través del soporte (k-carragenina-algarrobo, polioles), sea menor que el reportado arriba a la misma temperatura. En el presente trabajo, se encontraron valores para la difu-

sividad de galactosa (2.5%) a través del soporte de: $2.901 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $3.749 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y $5.026 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ para 19°C , 25°C y 32°C respectivamente.

La teoría de la existencia de dos fases; líquido-sólido, podría explicar estos resultados. Se asume en esta teoría, que la difusión de soluto ocurre a través del líquido en los poros del gel. Esto generaría tres posibles causas de la disminución del coeficiente de difusión molecular: (a) la parte sólida de la estructura del gel (soporte), reduce parte del área de transferencia disponible, (b) en tanto que la difusión ocurre a través de poros de diámetro reducido, la fricción entre las moléculas del soluto y la pared del poro, reduce el movimiento molecular y (c) la viscosidad del líquido contenido en el gel (soporte) podría ser diferente de la del agua, a la misma temperatura. Friedman (20) observó en sus resultados difusionales de varios solutos a través de geles, que los coeficientes de difusión eran, en todos los casos, menores a los observados en agua.

El orden de magnitud es comparable a valores reportados en la literatura. La tabla 20 muestra algunos de los pocos datos de difusión de solutos a través de geles mismos que se emplean con fines comparativos y de discusión. Como se observa en esta tabla, el único sistema más semejante al empleado en este trabajo es el de glucosa-gelatina. Para este sistema, si se corrige el valor experi-

TABLA 20 : Valores de Coeficientes de Difusión a través de Geles reportados en la Literatura

S I S T E M A		TEMPERATURA (°C)	$D_{AG} \times 10^{-10}$ (m^2/s)	REFERENCIA
UREA-GELATINA	(1.0%)	41	8.59	BOLLMEIR, et.al. (1979)
GLUCOSA-POLIACRILAMIDA		37	1.2	MATSUNAGA, et.al. (1980)
GLUCOSA-AGAR		37	0.5	" "
GLUCOSA-COLAGENA		37	1.0	" "
GLUCOSA-ALGINATO-Ca	(2.0%)	25	6.83	TANAKA, et. al. (1984)
GLUCOSA-GELATINA	(5.0%)	5	2.55	FRIEDMAN (1930)
LACTOSA-GELATINA	(5.0%)	5	1.44	" "
LACTOSA-AGAR	(1.5%)	5	7.39	" "
GALACTOSA-K-CARRAGENINA:ALGARROBO	(2.5%)	19	2.901	ESTE TRABAJO
GALACTOSA-K-CARRAGENINA:ALGARROBO	(2.5%)	25	3.749	" "
GALACTOSA-K-CARRAGENINA-ALGARROBO	(2.5%)	32	5.026	" "
GLUCOSA-K-CARRAGENINA:ALGARROBO	(2.5%)	25	3.769	" "
GLUCOSA-K-CARRAGENINA:ALGARROBO	(2.5%)	32	4.898	" "
LACTOSA-K-CARRAGENINA-ALGARROBO	(5.0%)	32	0.0353	" "

Nota: Los valores de D_{AG} del presente trabajo de investigación se calcularon utilizando un programa de computadora basado en el método de Newton y que aparece en el Apéndice I.

mental por temperatura de 19°C a fin de comparar con los resultados del presente trabajo se obtiene un $D_{AG} (19^\circ\text{C}) = 2.6784 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Este valor es muy comparable al obtenido para la difusión de galactosa a 19°C a través del soporte $D_{AG} (19^\circ\text{C}) = 2.901 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

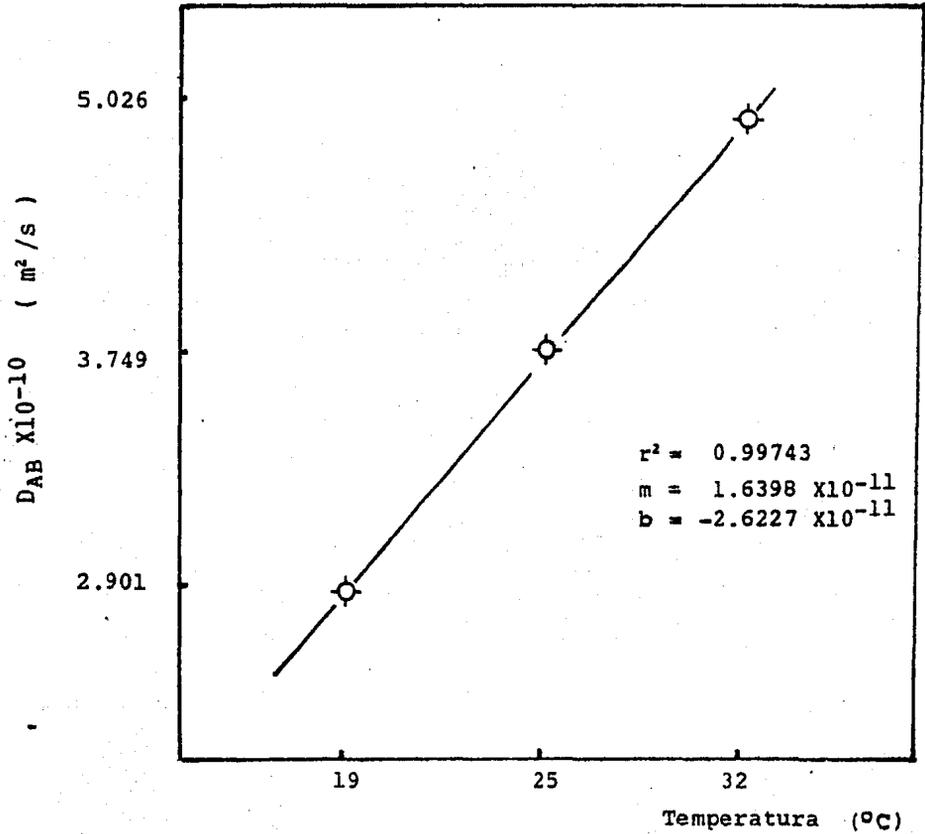
Un aspecto importante de resaltar, es el análisis de los coeficientes de difusión para galactosa con respecto a la temperatura. La relación entre D_{AG} y la temperatura es directamente proporcional, y en este caso sigue una relación lineal como lo muestra la figura 33. Friedman (20) observó un comportamiento similar para el caso del sistema sacarosa-gelatina en el intervalo de 5°C-20°C.

9.2 Difusión de glucosa (2.5%) a través del soporte sin células inmovilizadas

Los valores para la difusividad de glucosa a través del soporte obtenidos en este trabajo son: $3.769 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y $4.898 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a 25°C y 32°C respectivamente. La difusividad de glucosa en agua se reportó de $6.981 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a 25°C por Don Juan (18).

Los valores corregidos por temperatura para el sistema glucosa-gelatina, reportados por Friedman (20) son $2.7335 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a 25°C y $2.7977 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a 32°C. En este caso la comparación entre ambos sistemas: glucosa-k-carragenina: algarrobo y glucosa-gelatina, es acertada en cuanto al orden de magnitud y al intervalo de valores. Las di-

FIGURA 33: DEPENDENCIA DEL COEFICIENTE DE DIFUSION DE GALACTOSA (2.5%) A TRAVES DEL SOPORTE K-CARRAGENINA-ALGARROBO (3.4%) CON RESPECTO A LA TEMPERATURA



ferencias entre los resultados de este trabajo y el sistema glucosa-gelatina, deberán comprenderse dentro del marco de la teoría de las dos fases, explicada anteriormente. Además, se debe señalar que aunque los sistemas son parecidos no son iguales.

Con los dos valores de difusividad para glucosa a través del gel (soporte) sin células inmovilizadas reportadas en este trabajo, no es posible establecer la dependencia de D_{AG} con respecto a la temperatura. Sin embargo, es claro que D_{AG} aumenta conforme aumenta la temperatura, como lo demuestran los datos experimentales.

9.3 Difusión de lactosa (5%) a través del soporte sin células inmovilizadas

El valor del coeficiente de difusión de lactosa a 32°C en este trabajo es de $3.536 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. La difusividad de lactosa en agua a 32°C es de $4.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. En este caso, el valor experimental de difusión de este disacárido a través del gel (soporte) no se compara con los valores reportados en la literatura. La diferencia en la estructura porosa de los geles, podría ser una causa que explicaría estas diferencias. El valor más cercano al obtenido en este trabajo, es el del sistema glucosa-agar reportado por Matsunaga (35).

9.4 Difusión de galactosa, glucosa y lactosa a través del soporte a 37°C con células inmovilizadas de E.coli. CSH-36

Los resultados de difusividad de los solutos empleados en el presente trabajo a través de un gel de k-carragenina: algarrobo (3.4%) con células inmovilizadas (13.6g) de E.coli CSH-36 a 37°C son: Galactosa $2.854 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, Glucosa $1.862 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y Lactosa $1.285 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$.

En todos los casos, los valores son menores que los obtenidos utilizando el gel (soporte) sin células. Esto significa que el coeficiente de difusión molecular se reduce por la presencia de las células.

Para el caso de la galactosa, la reducción en el coeficiente de difusión molecular es del 50.8%, para la glucosa, la reducción de D_{AG} es de 62.6% y para la lactosa, la disminución es del 64.2%.

Los resultados anteriores son explicables de acuerdo a la teoría de las dos fases. Las células reducen el área disponible a la difusión y posiblemente el diámetro de los poros del gel, constituyéndose así en una resistencia adicional a la difusión de los solutos.

Sin duda, los resultados anteriores pueden ser utilizados en la explicación de los fenómenos de transporte de masa de reactores enzimáticos que utilizan enzimas atrapadas en geles.

Como se ha observado en esta parte, resulta muy difícil comparar los resultados experimentales con datos de la literatura ya que estas no son abundantes. Si se aceptan como válidos los enunciados de la teoría de las dos fases, se comprenderán estas dificultades. Existen autores como Tanaka (50), que han reportado que los valores de difusividad de ciertos solutos como glucosa, L-triptofano y α -lacto albúmina, todos ellos con pesos moleculares menores a 2×10^4 daltones se difunden de y hacia esferas de alginato de calcio independientemente de la estructura del gel. Esto significa, que los valores de difusión de estos solutos a través del gel son similares a los de difusión a través del agua. Por lo tanto, sin duda este campo del conocimiento aún tiene innumerables incógnitas por resolver.

IX CONCLUSIONES (EXTRACTOS)

CONCLUSIONES (Extractos)

El objetivo general de este trabajo de investigación como se mencionó anteriormente fue mejorar la resistencia física de un soporte de k-carragenina reportado por Tosa, T. (51) mediante su interacción con galactomannanas y uso de polioles. Por lo tanto, este trabajo se dividió en dos partes: primero desarrollar la composición de la formulación del soporte, y segundo caracterizarlo.

De los resultados experimentales de la primera parte se extrae que:

- 1 La resistencia física a la compresión promedio para un soporte de k-carragenina es de 0.3632 Kg/cm^2 .
- 2 La resistencia física a la compresión promedio para el soporte encontrado como más resistente es de 1.4916 Kg/cm^2 , y cuya composición en peso es: 2.51 g de algarrobo, 1.35 g de k-carragenina, 17.12 g de glicerol, 20.72 g de propilenglicol y 0.9 g de NaCl aforados a 100 ml. de agua.

Con respecto a la segunda parte correspondiente a la caracterización de la formulación del soporte ya mencionado en el punto anterior, se establecieron para tal fin los objetivos parciales (p.40); de los cuales se extrae que:

- 1 El soporte formulado en este trabajo (k-carragenina, algarrobo-polioles), es menos susceptible a presentar fenómeno de sinéresis con respecto al de k-carragenina

reportado por Tosa, T. (51) ya que este último elimina en tres días el 95% en peso, en comparación con el primero que sólo elimina el 25% para el mismo período de tiempo y bajo las mismas condiciones.

1.1 Lo anterior se debe: primero a la presencia de polioles (propilenglicol-glicerol) los cuales tienen la propiedad de retener agua [Furia, T.E. (21)], y segundo a que la conformación y asociación entre k-carragenina y algarrobo aunado a una dispersión más facilitada por los polioles, es más estable que la k-carragenina sola [Dea, I.C.M. (16)].

2.0 El soporte (k-carragenina-algarrobo) presenta una mayor resistencia a la compresión promedio cuando se induce su gelificación en medio ácido, en comparación con la que presenta en condiciones alcalinas (máxima promedio en condiciones ácidas a pH 4.0 de $3.2360 \text{ kg}^+/\text{cm}^2$; máxima promedio en condiciones alcalinas a pH 8.0 de $1.2760 \text{ kg}^+/\text{cm}^2$).

2.1 Este soporte gelificado en condiciones alcalinas presenta las siguientes características: es flexible y elástico, al almacenarlo a 10°C no presenta sinéresis; estable a la agitación no presentando erosión alguna.

- 2.2 Gelificado en condiciones ácidas presenta las siguientes características: es duro y poco elástico, al almacenarlo a 10°C presenta sinéresis con contracción de tamaño, inestable a la agitación después de almacenarlo.
- 2.3 Por las características anteriores es más viable inducir a estado de gel el soporte en condiciones alcalinas.
- 3.0 Las estructuras de polímeros (k-carragenina-algarrobo) que conforman el soporte por asociación entre ellos y cuyo carácter es electrocrático (estabilización por cargas), aunado a la fuerza iónica aportada por las soluciones amortiguadoras de fosfatos, propician modificaciones en las estructuras del soporte que lo desestabilizan por lo que no se recomienda su uso para este caso en particular.
- 3.1 Aunque cabe señalar y dejar bien establecido que el uso de soluciones amortiguadoras de fosfatos obedece a mantener un microambiente propicio para la enzima; para que la actividad enzimática no se vea afectada, tal y como lo recomienda la literatura (ver punto 4.0 de Discusión).
- 3.2 Aunque existe la posibilidad de utilizar otro tipo de amortiguador el criterio que se deriva

del punto 3.0 anterior, se basa en las pruebas de estabilidad de almacenamiento del soporte con células inmovilizadas de E.coli CSH-36 con actividad de β -D-galactosidasa, las cuales demuestran concretamente que dicha actividad enzimática se conserva estable a 10°C y -4°C por espacio de 6 meses o más (período que correspondió a dichas pruebas), sin necesidad de utilizar solución amortiguadora alguna.

4.0 La capacidad de atrapamiento óptima del soporte es de 4 a 1 (peso seco células : peso seco gomas). Basado en los datos de actividad de β -D-galactosidasa de E. coli CSH-36 de 9.1028 uONPG/g y una resistencia a la compresión promedio de 1.1350 kg/cm^2 .

4.1 Si bien es irrelevante decir que en soportes de tipo gel (k-carragenina, agar, alginato, poliacrilamida, etcétera) el factor transferencia de masa es uno de los factores que determinan la expresión de la actividad enzimática, cabe recalcar que otro factor es la naturaleza del soporte y que en este caso en particular resulta inerte e inocuo a la enzima β -D-galactosidasa de E.coli CSH-36, tal y como lo demuestra la estabilidad de dicha enzima inmovilizada en él, por espacio de 6 meses a 10°C y -4°C (en condiciones de congelación el soporte no presenta cristalización alguna que dañe al soporte).

5.0 Para la modificación química de las células de E.coli CSH-36, de los agentes químicos probados, el glutaraldehído resultó el más adecuado para dicho tratamiento en una concentración al 0.02% v/v durante 7 minutos de reacción a pH 7.0 para una concentración de células de E.coli CSH-36 de 3.4 g peso seco por cada 100 ml y cuya finalidad es evitar olores agresivos producidos por lisis celular después de inmovilizar dichas células.

6.0 Si bien es cierto que la inmovilización de células de levadura k.fragilis 55-61 presentó varias dificultades (p.150 Sección Discusión), sirvió para reafirmar:

- a) Que el empleo de polioles aporta estabilidad a las enzimas por incrementos de temperatura por encima de su temperatura óptima de actividad [Schmid, R. (45)] tal y como se demostró al lograr inmovilizar la levadura k-fragilis 55-61 en este trabajo conservando su actividad enzimática.
- b) Que el método de atrapamiento el cual rige el soporte desarrollado en este trabajo sólo es viable para inmovilizar células y no enzimas. Porque el tamaño del poro del soporte es definido y lo suficientemente grande para no retener las enzimas.

- c) Que es bien importante establecer de antemano que si se desea utilizar este soporte (k-carragenina algarrobo) para inmovilizar enzimas purificadas se utilizará conjuntamente con esta técnica, otra técnica o método de inmovilización de los ya señalados (punto 4.0 Rev. de la literatura).

7.0 Con respecto a la caracterización difusional del soporte se extrae que:

- a) El coeficiente de difusión de galactosa (2.5%) a través del soporte (k-carragenina-algarrobo 3.4%) sin células inmovilizadas, se determinó experimentalmente utilizando una celda de difusión modificada. La dependencia de este coeficiente con respecto a la variación de temperatura es lineal y se expresa a través de la siguiente correlación:

$$D_{AG} \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} = 1.6398 \times 10^{-11} \text{ T}^\circ\text{C} - 2.6227 \times 10^{-11}$$

Los valores obtenidos se comparan favorablemente con datos reportados en la literatura para sistemas semejantes, aunque no iguales.

- b) Los valores para el coeficiente de difusión de glucosa (2.5%) a través del soporte sin células para las temperaturas 25°C y 35°C fueron $3.769 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y $4.898 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ respectivamente. No se determinó dependencia de la difu-

sividad con respecto a la temperatura, aunque los resultados obtenidos presentaron comportamiento con respecto a la variación de temperatura similar a los de galactosa. Esto es, la difusividad es directamente proporcional con la temperatura. Los valores son muy comparables con datos de literatura para difusión de glucosa en otros geles.

- c) El resultado para la difusión de lactosa (5.0%) a través del soporte sin células inmovilizadas y a 32°C es de 3.53×10^{-12} m/s. Este valor no se pudo comparar con valores en la literatura ya que: (1) El sistema lactosa-k-carragenina : algarrobo no se ha reportado, (2) Las características de cada gel son las que determinan los valores de difusividad. Lo anterior es explicado en base a la teoría de la existencia de dos fases: líquido-sólido.
- d) En todos los casos anteriores, los valores del coeficiente de difusión de los solutos estudiados a través del soporte, son menores que los valores de difusión de los mismos a través de agua. Este hecho se había reportado ya en la literatura y los resultados del presente trabajo, lo corroboran.

- e) La presencia de células de E.coli CSH-36 inactivadas previamente en la formulación del gel en una relación de 4 a 1 (peso células : peso gomas), da como resultado una relación significativa e importante del coeficiente de difusión. La disminución observada fue del 50.8%, 62.6% y 64.2% para la difusión de galactosa, glucosa y lactosa respectivamente a 37°C.
- f) La difusión de solutos a través de geles, es un proceso complejo en donde intervienen varios factores. La forma de fabricación de un gel, seguramente define la estructura interna del mismo, el tamaño del poro y la porosidad. La temperatura influye significativamente en el coeficiente de difusión, así como la concentración del soluto a difundir. Todas las variables mencionadas anteriormente merecen ser estudiadas con más detalle. Esto permitiría comprender más los fenómenos de transferencia de masa y catálisis en sistemas de enzimas inmovilizadas en geles u otros soportes sólido-porosos.

Perspectivas:

- 1 El presente trabajo de investigación inserto en la realidad, otorga una posibilidad en el desarrollo y mejoramiento de técnicas de inmovilización encaminado a satisfacer las prio-

ridades planteadas dentro del contexto de la Tecnología Enzimática.

- 2 La manufactura del soporte planteado en este trabajo para la inmovilización de células y/o enzimas, es técnicamente viable mediante la aplicación de una metodología detallada y simple que no requiere de personal especializado ni equipo costosa, aunado a que las materias primas están disponibles en el país.
- 3 Es factible estudiar con más detalle los fenómenos de transferencia de masa en catalizadores enzimáticos, ya que los datos de coeficientes de difusión son muy escasos en la literatura y son muy importantes para el correcto diseño de Reactores Enzimáticos.

X LITERATURA CONSULTADA

LITERATURA CONSULTADA

- 1 Anderson, N.S., et. al. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulfates of the Rhodophyceae. Nature 205:1062 (1965).
- 2 Arima, K. Global impacts of applied Microbiology. Starr, M. ed. John Wiley & Sons. New York (1980).
- 3 Atkins, E.D.T. y Parker, K.D. Cyclic triad of hidrogen bonds in a helical polymer. Nature 220:5169 (1970).
- 4 Axen, R., et. al. Chemical fixation of chymotripsin to water insoluble cross-linked dextran (Sephadex G-2000), Biopolymers 9:401 (1970).
- 5 Bollmeier, J.P. y Middleman, S. Hydrolysis of Urea by Gelatin-Immobilized urease: Separation of Kinetic and Diffusion Phenomena in a model Immobilized - Enzyme Reactor System. Biotech. Bioeng., XXI:2303 (1979).
- 6 Brodelius, P. Industrial applications of immobilized biocatalysts. Adv. Biochem. Engineering. Springer-Verlag ed. New York Vol. 10 p. 75, (1978).
- 7 Butterworth, T.A., et. al. Application of ultrafiltration for enzyme retention during continous enzymatic reaction. Biotechnol. Bioeng. XII:19 (1970).
- 8 Carman, P.C. y Haul, R.A. Measurement of Diffusion Coefficients. Proc. R. Soc. 222:109 (1954).
- 9 Chang, T.M. In vivo effects of semipermeable microcapsules containing L-asparginase. Nature 229:117 (1971)
- 10 Charm, S.E. y Mateo, C.C. Scale up of Protein Isolation. Cap. 37 en Methods in Enzimology. Academic Press, New York (1972) Vol. XXI p. 476.
- 11 Chibata, I. Immobilized Enzymes Research and Development. John Wiley & Sons. New York (1978).

- 12 Chibata, I. y Tosa, T. Production of L-aspartic acid by microbial cells entrapped in polyacrilamide gel. Adv. in Applied Microbiol. 22:1 (1977).
- 13 Cooney, Ch. L. Biotechnology. Vol. I, Microbial Fundamentals. Cap. 2, Growth of Microorganisms. Ed. Rehmand Reed. N.Y. (1981). p. 70-85.
- 14 Courtois, J.E. y Le Dizet, P. Isolation of oligomannosides. Carbohyd. Res. 3:14 (1966).
- 15 De Flines, J. Fermentation Advances. Perlman, D. ed. John Wiley & Sons. New York (1976) Cap. 2 p. 72.
- 16 Dea, I.C.M., et. al. Polysaccharide association and conformation. J. Mol. Biol. 68:153 (1972).
- 17 Dickinson, E y Stainsby, G. Colloids in Food. Applied Science Publishers. London (1982). Cap. 1 p. 8-9, Cap. 2 p. 33-34, Cap. 4 p. 132-133.
- 18 Don Juan, M.J. Tesis licenciatura (Ing. Alimentos). "Difusión de carbohidratos en soluciones acuosas y a través de geles" Facultad de Química, UNAM - Fac. Química, U.A.S.L.P. (1985).
- 19 Dubois, M., et. al. Colorimetric method for determination of Sugars and related Substances. Analytical Chem. 28:350 (1966).
- 20 Friedman, L. y Kraemer, E. The structure of gelatin gels from Studies of Diffusion. J. Am. Chem. Soc. 52 (4):205 (1930).
- 21 Furia, T.E. Handbook of Food Additives. CRC Press, Cleveland (1972). Cap. 7 y 10.
- 22 Glicksman, M. Gum Technology in Food Industry. Academic Press. New York (1969) p. 220.
- 23 Goldman, R., et. al. Papain-collodion membranes. I. Preparation and properties. Biochem. 7:486 (1970).

- 24 Hornby, W.E., et. al. Preparation and proprieties of ficin chemical attached to CMC. Biochem. J. 98:420 (1966).
- 25 Ji, T.H. Bifuntional reagents. Cap. 51 en Methods in Enzimology Academic Press, New York (1983). Vol. XVI p. 580.
- 26 Johnson, D.E. y Ciegler, A. Sustrate conversion by fungal spores entrapped in solid matrixes. Arch. Biochem. Biophys. 130:384 (1969).
- 27 Johnson, I.S. Human insulin from recombinant DNA technology. Science 219:632 (1983).
- 28 Kay, G., et. al. Preparation and use of porous sheets with enzyme action. Nature 217:614 (1968).
- 29 Kuby, S.A. y Lardy, H.A. Purification and Kinetics of β -D-galactosidase from E. coli strain K-12. J. Bacteriol. 60:381 (1950).
- 30 Ledingham, H. y Hornby, W. Action pattern of water insoluble α -amylases. FEBS letters 14:313 (1970).
- 31 Lilly, M.D. y Dunnill, P. Enzyme continous isolation. Biotech. & Bioeng. Symp. 3:97 (1972).
32. López Munguía, C.A. Determinación de los efectos de la transferencia de masa en la cinética observada en enzimas inmovilizadas. Rev. Soc. Quím. Mex. 25(5):522 (1981).
- 33 Lowry, O.H., et. al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265 (1951).
- 34 March, H. W. y Weaver, W. The Diffusion Problem for a Solid in contact with a Stirred Liquid. Physic. Rev. 31:1072 (1928)
- 35 Matsunaga, T., et. al., Some Observations on Immobilized Hydrogen-producing Bacteria: behavior of Hydrogen in gel membranes. Biotech & Bioeng. XXII:2607 (1980).
- 36 Morisi, F., et. al. Reduction of lactose content of Milk by entrapped β -galactosidase from Yeast and E. coli. J. Dairy Sci. 9:1125 (1973).

- 37 Morris, E.R., et. al. Conformation and Intermolecular interactions of Carbohydrates chains. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 6:259 (1977).
- 38 Mosbach, K. y Larson, P.O. Preparation and applications of polymer-entrapped enzymes and cells in microbial transformation process. Biotechnol. Bioeng. XII:19 (1970).
- 39 Nelboeck, K. y Jaworek, D. Inmobilized enzymes and principles for their application analytical and preparative purposes. Chimia 29:109 (1975).
- 40 Ogawa, K., et. al. Conformational behaviour of a gel-forming (1→3) - β -D-glucan in alkaline solution. Carbohydrate Res. 23:399 (1972).
- 41 O'Neill, S.P., et. al. Multiple steady states in continuous flow, stirred-tank enzyme reactors. Biotechnol. Bioeng. XIII:319 (1971).
- 42 Pedersen, J.K. Polysaccharides in Foods. Blandshard, M.A., et.al. (eds.) Butterworths Ltd. London (1979). Cap. 14 p. 219.
- 43 Pitcher, W.H.Jr. y Havewala, N.B. Hidrolisis of whey by immobilized lactase. Am. Dairy Sci. 37:9 (1975).
- 44 Ress, D.A. y Scott, W.E. Polysaccharide conformation. J. Chem Soc. 3:469 (1971).
- 45 Schmid, R.D. Stabilized Soluble Enzymes. Adv. Biochem. Engineering. Springer-Verlag (ed.) New York (1978) Vol. 10
- 46 Sharp, A.K., et. al. Kinetics of β -galactosidase attached to porous cellulose sheets. Biotechnol. Bioeng. XI:363 (1970).
- 47 Slade, A.L., et. al. The obstruction effect in the self-diffusion coefficients of Sodium and Cesium in Agar Gels. J. Phys. Chem. 79(9):2840 (1966).

- 48 Spalding, G.E. A sensitive method for measuring diffusion coefficients in agarose gels of electrolyte solutions. J. Phys. Chem. 73(10):3380 (1969).
- 49 Stokes, R.H. An improved Diaphragm-cell for diffusion studies and some tests of the method. J. Am. Chem. Soc. 763 (1950).
- 50 Tanaka, H., et. al., Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. Biotech. & Bioeng. XXVI:53 (1984).
- 51 Tosa, T., et. al. Inmobilization of enzymes and microbial cells using K-carrageenan as matrix. Biotechnol. Bioeng. XX:1697 (1979).
- 52 Wang, D.I.C., et. al. Fermentation and Enzyme Technology. MIT Press ed. New York (1977).
- 53 Wang, S.S. y King, C.K. The use of coenzyme in Biochemical Reactors. Adv. Biochem. Engineering. Springer-Verlag ed. New York (1979). Vol. 12 p. 112.
- 54 Wasserman, B.P. Thermoestable enzyme production. Food Technol. 2:78 (1983).
- 55 Wasserman, B.P. y Hultin, H.O. High yield method for immobilization of enzymes. Biotechnol. Bioeng. XXII:271 (1980).
- 56 Weetall, H.H. Inmobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides. Marcel Dekker ed. Academic Press. New York (1976).
- 57 Wingard, L.B., et. al. Applied Biochemistry and Bioengineering Vol. I. Academic Press. New York (1976).
- 58 Wolnak, B. Bernard Wolnak and Associates Bulletin en Thermo-estable enzyme production. Food Technol. 2:78 (1983).

XI APENDICE I

1LIST

```
5  REM ESTE PROGRAMA CALCULA EL
    COEFICIENTE DE DIFUSION DE UN
    SOLUTO A TRAVES DE UN GEL.
6  REM PROGRAMA ELABORADO POR
    FERNANDO DOMINGUEZ JULIAN
    FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.
10  REM SET AN INITIAL VALUE FOR
    D
20  PRINT "ENTER THE INITIAL VALU
    E OF D ": INPUT DO
30  PRINT " THE CONVERGENCE CRITE
    RIA ": INPUT EPSI
31  PRINT " THE TIME VALUE ": INPUT
    T
35  PRINT " THE V VALUE ": INPUT
    V
38  PRINT " THE LSQUARE VALUE, AS
    QR": INPUT AC
40  REM CALCULATE F(D) AND FP(D)

50  REM F(D) IS CALCULATED BY PA
    RTS
60  REM SET THE CONSTANTS
70  A = 0.327:B = 0.0746:C = 0.030
    6:D = 0.0160
80  E1 = - 4.117:E2 = - 24.14:E3
    = - 63.68:E4 = - 123.
90  D1 = 1.34626:D2 = 1.84912:D3 =
    1.94861:D4 = 1.9680
100 PISQ = 9.8696
110  REM SET THE COUNTER K FOR T
    HE ITERATIONS
120 K = 0
130  REM CALCULATE THE FIRST FOU
    R TERMS
140  FOURT = (A * EXP (E1 * DO *
    T / AC)) + (B * EXP (E2 * D
    O * T / AC)) + (C * EXP (E3
    * DO * T / AC)) + (D * EXP
    (E4 * DO * T / AC))
150  REM COMPUTE THE SUM TERM
160  SUM = 0
170  FOR N = 4 TO 15
180  SUM1 = (8 / PISQ * ((2 * N +
    1) ^ 2)) * EXP ( - ((2 * N +
    1) ^ 2) * PISQ * DO * T / 4 /
    AC)
190  SUM = SUM + SUM1
```

```
200 NEXT N
210 REM COMPUTE F(D)
220 FD = V - 0.5 + FOURT + SUM
230 REM COMPUTE FP(D) BY PARTS.
      FIRST FOUR TERMS
240 FOUDP = - (D1 * T / AC) * EXP
      ( - E1 * DO * T / AC) - (D2 *
      T / AC) * EXP ( - E2 * DO *
      T / AC) - (D3 * T / AC) * EXP
      ( - E3 * DO * T / AC) - (D4 *
      T / AC) * EXP ( - E4 * DO *
      T / AC)
250 REM COMPUTE THE SUM TERM SE
      TTING SUMD=0
260 SUMD = 0
270 FOR N = 4 TO 15
280 SUMD1 = (2 * T / AC) * EXP (
      - ((2 * N + 1) ^ 2) * PISQ *
      DO * T / 4 / AC)
290 SUMD = SUMD + SUMD1
300 NEXT N
310 FPD = FOUDP - SUMD
320 REM THE NEWTON'S METHOD
330 DN = DO - (FD / FPD)
340 FIDI = ABS (DN - DO)
350 IF FIDI < = EPSI THEN 400
360 DO = DN
361 PRINT "DN = " ; DN
362 PRINT "K = " ; K
363 IF K > 50 THEN 400
370 K = K + 1
380 GOTO 140
400 PRINT "THE VALUE OF D" ; DN
410 PRINT "THE NUMBER OF ITERATI
      ONS K= " ; K
420 END
```

IFUN
ENTER THE INITIAL VALUE OF D 73.5E-10
THE CONVERGENCE CRITERIA ?1.0E-15
THE TIME VALUE ?20990
THE N VALUE ?13779
THE SQUARE VALUE, ACCR?4.0E-04

DN	=	3.45549722E-10
K	=	0
DN	=	3.41154702E-10
K	=	1
DN	=	3.36828509E-10
K	=	2
DN	=	3.32590621E-10
K	=	3
DN	=	3.28421279E-10
K	=	4
DN	=	3.24360749E-10
K	=	5
DN	=	3.20408016E-10
K	=	6
DN	=	3.16574793E-10
K	=	7
DN	=	3.12867122E-10
K	=	8
DN	=	3.09293646E-10
K	=	9
DN	=	3.05861070E-10
K	=	10
DN	=	3.02579005E-10
K	=	11
DN	=	2.99440162E-10
K	=	12
DN	=	2.9645959E-10
K	=	13
DN	=	2.93635351E-10
K	=	14
DN	=	2.90968237E-10
K	=	15
DN	=	2.88457782E-10
K	=	16
DN	=	2.86102374E-10
K	=	17
DN	=	2.83899332E-10
K	=	18
DN	=	2.81845011E-10
K	=	19
DN	=	2.7993492E-10
K	=	20
DN	=	2.78163859E-10
K	=	21
DN	=	2.76526020E-10
K	=	22
DN	=	2.750192E-10
K	=	23
DN	=	2.73624011E-10
K	=	24
DN	=	2.72348094E-10
K	=	25
DN	=	2.71178187E-10
K	=	26
DN	=	2.70108226E-10
K	=	27
DN	=	2.69131434E-10
K	=	28
DN	=	2.6824110E-10
K	=	29
DN	=	2.67431047E-10
K	=	30
DN	=	2.66694969E-10
K	=	31
DN	=	2.66026766E-10
K	=	32
DN	=	2.65421166E-10
K	=	33
DN	=	2.64872021E-10
K	=	34
DN	=	2.64376915E-10
K	=	35

K " 20
 DN " 2.6824110E-10
 K " 29
 DN " 2.67431047E-10
 K " 30
 DN " 2.66671067E-10
 K " 31
 DN " 2.66026766E-10
 K " 32
 DN " 2.65421166E-10
 K " 33
 DN " 2.64872021E-10
 K " 34
 DN " 2.64376815E-10
 K " 35
 DN " 2.63928558E-10
 K " 36
 DN " 2.63523789E-10
 K " 37
 DN " 2.63158564E-10
 K " 38
 DN " 2.62829245E-10
 K " 39
 DN " 2.62532484E-10
 K " 40
 DN " 2.62265213E-10
 K " 41
 DN " 2.62024622E-10
 K " 42
 DN " 2.61808148E-10
 K " 43
 DN " 2.61613453E-10
 K " 44
 DN " 2.61438412E-10
 K " 45
 DN " 2.61281092E-10
 K " 46
 DN " 2.61139743E-10
 K " 47
 DN " 2.61012779E-10
 K " 48
 DN " 2.60898762E-10
 K " 49
 DN " 2.60796396E-10
 K " 50
 DN " 2.60704807E-10
 K " 51
 DN " 2.60622039E-10
 K " 52
 DN " 2.60548037E-10
 K " 53
 DN " 2.60481642E-10
 K " 54
 DN " 2.60422079E-10
 K " 55
 DN " 2.60368652E-10
 K " 56
 DN " 2.60320734E-10
 K " 57
 DN " 2.6027776E-10
 K " 58
 DN " 2.60239224E-10
 K " 59
 DN " 2.60204667E-10
 K " 60
 DN " 2.60173608E-10
 K " 61
 DN " 2.60145911E-10
 K " 62
 DN " 2.60121007E-10
 K " 63
 DN " 2.60098685E-10
 K " 64
 DN " 2.60070673E-10
 K " 65
 DN " 2.60046073E-10
 K " 66

THE VALUE OF D2.40060735E-10
 THE NUMBER OF ITERATIONS K=