



12
2ej
300627

Universidad La Salle

Escuela de Química
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Inmovilización y Aplicación de Enzimas y Células

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

Selma Alicia Gutiérrez Vogel



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada, gracias a la dirección del
Dr. Carlos Huitrón, en el Instituto de Investigaciones
Biomédicas y en el Centro de Investigación sobre Fijación
de Nitrógeno de la U.N.A.M.

I N D I C E

CAPITULO	I	INTRODUCCION
CAPITULO	II	CRITERIOS PARA LA SELECCION DE LA FUENTE DE ENZIMAS
CAPITULO	III	PARAMETROS BASICOS DE LA PRODUCCION DE ENZIMAS MICROBIANAS 3.1. Medio de cultivo 3.2. Parámetros fisicoquímicos de la producción 3.3. Selección de la forma 3.4. Hiperproducción de enzimas
CAPITULO	IV	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS Y CELULAS 4.1. Enzimas 4.2. Células
CAPITULO	V	CARACTERISTICAS DE LOS SOPORTES INSOLUBLES PARA INMOVILIZAR ENZIMAS O CELULAS 5.1. Naturaleza del soporte 5.2. Características del soporte

5.3. Mecanismos de interacción
soporte-enzima y soporte-
célula

CAPITULO	VI	METODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS Y CELULAS 6.1. Métodos de inmovilización de enzimas 6.2. Inmovilización de células
CAPITULO	VII	FACTORES QUE DETERMINAN LA ELEC- CION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA A INMOVILIZAR COMO ENZIMA O CELULA
CAPITULO	VIII	APLICACION DE ENZIMAS Y CELULAS INMOVILIZADAS 8.1. Enzimas 8.2. Células
CAPITULO	IX	POTENCIAL DE APLICACION DE BIO- CATALIZADORES EN MEXICO 10.1. Panorama Nacional de la industria enzimática

**10.2. Potencial de aplicación de
la actividad enzimática en
México**

CAPITULO X

CONCLUSIONES

APENDICE I

BIOREACTORES

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I
INTRODUCCION

Las enzimas son proteínas elaboradas por las células animales, vegetales y microbianas, que presentan capacidad catalítica para aumentar en gran medida la velocidad de las reacciones químicas específicas de las células. Este hecho ha constituido un factor importante para la sustitución de los catalizadores inorgánicos por enzimas. (1,2)

Debido al gran número de enzimas que se conocen en la actualidad, aproximadamente unas dos mil diferentes por célula bacteriana, ha sido necesario establecer una clasificación internacional. (Tabla I)

Las enzimas, en ciertos casos, dependen de cofactores, que son moléculas orgánicas (vitaminas, núcleos protéicos, etc.) e - - inorgánicos (iones metálicos y no metálicos) que se encuentran íntimamente relacionados durante la reacción, donde pueden actuar como donadores ó aceptores de electrones, etc. (4)

Para que se lleve a cabo la reacción enzimática, es necesario que el sustrato se una al sitio activo de la enzima, donde se encuentran grupos que enlazan al sustrato y otros que efectúan la catálisis. Los mecanismos de catálisis ó de transformación actualmente conocidos son: a) Acido-base general, b) Catálisis por distorsión, c) Nucleofílico ó electrofílico, donde se - - pueden formar enlaces covalentes transitorios. La existencia del sitio activo hace que la naturaleza del sustrato sea alta-

mente específica para cada enzima. (5)

Los factores que afectan la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente son: a) Temperatura (6-8); b) Potencial de Hidrógeno (9); c) Concentración del sustrato (10); d) Inhibidores enzimáticos (11).

Michaelis y Menten, en 1915, dedujeron la expresión matemática de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima en función de la concentración de sustrato. Esto ha servido para determinar la afinidad de la enzima por un determinado sustrato, así como para detectar la etapa limitante de la velocidad de una vía metabólica. (12,13). Asimismo se llega a determinar el efecto de los inhibidores reversibles sobre la cinética enzimática (14-16)

Los mecanismos de regulación de la producción de enzimas se han dividido en: a) Inducción ; b) Represión por retroalimentación y c) Represión catabólica. (17-19)

Las enzimas pueden provenir de fuentes animales, vegetales y microbianas, éstas últimas, como se verá en el Capítulo II, presentan mayores ventajas, tales como el tiempo de producción, etc. Las enzimas microbianas pueden ser extracelulares, esto es que son excretadas al medio por la célula durante la fermentación ó pueden ser intracelulares, las cuales quedan confinadas

dentro de la célula. Las enzimas extracelulares, al término de la fermentación, son separadas del caldo de cultivo y a través de procesos de operaciones unitarias, como la centrifugación, filtración, etc., son tratadas para obtener una preparación -- comercial que responda a los criterios de pureza y calidad de- seados. (20,21). En el caso de enzimas intracelulares, se -- requiere de una etapa suplementaria, que es la ruptura celular. (22) La Tabla II presenta un diagrama de recuperación de enzi- mas.

Desde el punto de vista práctico, las enzimas han sido utiliza- das por el hombre, aún antes de saber de su existencia. Tal es el caso de la fermentación del pan, del vino, de alimentos fer- mentados a base de soya y arroz y otras fermentaciones más. -- (24-27)

Sin embargo, la aplicación durante este siglo, de las enzimas solubles ha tenido grandes repercusiones económicas a nivel industrial. (28-33). La Tabla III presenta procesos industria- les existentes en Estados Unidos y Japón, que utilizan enzimas solubles (34)

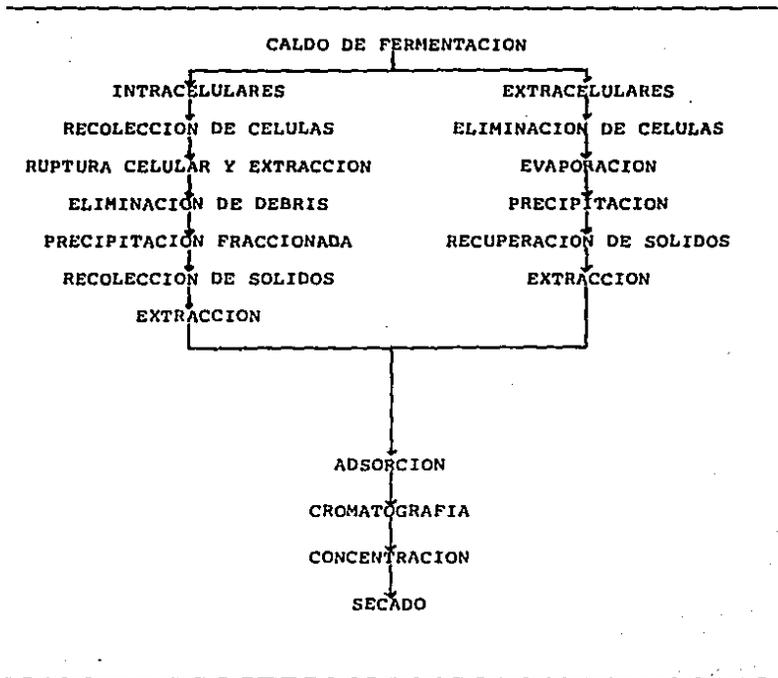
El avance de la tecnología enzimática no solo ha querido entrar en horizontes ya desarrollados, sino que pretende llegar a -- otros campos como el análisis cuantitativo y cualitativo a -- nivel laboratorio clínico (35), análisis de alimentos (36), y

TABLA I
CLASIFICACION INTERNACIONAL DE LAS ENZIMAS

N O M B R E	REACCION QUE CATALIZAN
1. Oxido reductasas	Catalizan la transferencia de hidrógeno.
2. Hidrolasas	Catalizan la introducción de moléculas de agua al sitio específico.
3. Transferasas	Catalizan la transferencia de - - grupos que no sean hidrógeno.
4. Liasas	Catalizan la adición de dobles - - enlaces.
5. Isomerasas	Catalizan las reacciones de isomerización.
6. Ligasas	Catalizan la formación de enlaces con escisión del ATP.

Enzyme Nomenclature, 1973. (3)

TABLA II
DIAGRAMA DE RECUPERACION DE ENZIMAS



Adaptada de Scriban, R. 1984 (23)

TABLA III
USOS INDUSTRIALES DE ENZIMAS SOLUBLES

ENZIMA	SUSTRATO	PROCESO
alfa-Amilasa	Almidón	Producción de dextrinas
beta-Amilasa exo-1, 4-alfa-D-glucosidasa	Almidón	Producción de maltosa
Proteasas	Proteína	Producción de peptonas
Papaína	Proteína de cerveza	Remoción de la turbidez
Remina	Caseína	Producción de quesos
Poligalacturonasa	Pectina	Producción de jugos de frutas
Celulasas	Celulosa	Sacarificación
Triacilglicerol-lipasa	Lípidos	Hidrólisis de Lípidos
beta-D-fructofuranosidasa	Sacarosa	Producción de azúcar invertida
beta-D-galactosidasa	Lactosa	Descomposición de la lactosa
alfa-D-galactosidasa	Rafinosa	Descomposición de la rafinosa
Glucosa-isomerasa	Glucosa-6-fosfato	Producción de jarabes con elevado contenido de fructuosa
Aminoacilasa	N-acil-L-aminoácidos	Producción de L-aminoácidos
Antocianinas	Antocianina	Decoloración de antocianina- glicosidasa
AMP desaminasa	Acido adenílico	Producción de ácido inosínico
Esteroido 11 beta- mono-oxygenasas	Esterol	Producción de esteroides precursores de hormonas

Thomas, D. et al, 1982. (34)

TABLA IV
ALGUNOS USOS ANALITICOS DE LAS ENZIMAS

ENZIMA	SUSTRATO
Glucosa-oxidasa(más peroxidasa)	Glucosa
Ascorbatooxidasa	Acido ascórbico
Alcohol-deshidrogenasa	Etanol
Glicerol-quinasa	Colesterol
Alanina-aminotransferasa	Alanina
Aspartato aminotransferasas	Acido aspártico

Wiseman, A., 1980. (35)

TABLA V
ENZIMAS PARA USOS TERAPEUTICOS

ENZIMA	MODO DE ACCION TERAPEUTICO
L-Asparaginasa	Degrada la asparagina del suero de la sangre, metabolito esencial en la producción de células cancerosas (leucemia).
Lisozima	Disuelve la pared celular de bacterias.
Penicilinasa	Termina con la alergia a la penicilina.
Uroquinasa	Ayuda a disolver coagulos en problemas de trombosis.

Holcenber, J.S. 1982. (38)

otros más (37,38). La Tabla IV presenta algunos usos analíticos de enzimas y la Tabla V usos terapéuticos.

Con el fin de obtener un mejor aprovechamiento de las enzimas solubles que son desechadas al término de un proceso y que potencialmente pueden ser recuperadas y reusadas, la ingeniería enzimática ha propuesto, como lo veremos en capítulos posteriores, la inmovilización de enzimas solubles, así como de células. (39)

La inmovilización de la actividad enzimática, puede traer ventajas, como su utilización en procesos continuos, mayor concentración enzimática por volumen de reactor, etc. El término "enzima inmovilizada" se refiere a la enzima que tiene una localización ó confinamiento en una cierta región del espacio con retención de sus actividades catalíticas, que se puede usar en forma repetida y continua; además de presentar mayor estabilidad operacional que las enzimas solubles. (40)

En 1972, aparece por vez primera la aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas con la producción continua de L-aminoácidos (41), por la acción de la aminoacilasa inmovilizada, así como la producción de ácido aminopenicilínico y de fructosa con la penicilinamidasa inmovilizada y la glucosomerasa inmovilizada respectivamente, en Estados Unidos y Japón. (42) En 1978 aparece la primera aplicación industrial de células inmovilizadas para la producción de aminoácidos

(43). Las células inmovilizadas presentan ventajas sobre las enzimas inmovilizadas como son el aminorar los gastos de - - extracción de las enzimas, aumento de la estabilidad enzimática, cuentan con los cofactores necesarios, para llevar a - cabo las reacciones enzimáticas simples ó en cadena, en su mismo habitat (44).

Sin embargo, hay ciertas dificultades que presenta la inmovilización de enzimas y células que tienen que ser superados, - para que puedan tener un mayor impacto a nivel comercial (45)

Por consiguiente este trabajo tiene por objetivos:

- * El estudio de los lineamientos generales para la producción de enzimas microbianas.
- * Analizar las características de los principales métodos de inmovilización para enzimas y células.
- * Establecer los criterios de selección del uso de la actividad enzimática como enzima inmovilizada ó como célula inmovilizada.
- * Presentar las principales aplicaciones de las enzimas inmovilizadas y de las células inmovilizadas.
- * Dar las perspectivas de la aplicación de las enzimas de interés comercial en México.

CAPITULO II
CRITERIOS PARA LA SELECCION DE
LA FUENTE DE ENZIMAS

2.1. Criterios para la selección de la fuente de enzimas.

Las enzimas pueden provenir de tejidos animales, vegetales y de microorganismos. En la Tabla VI se dan ejemplos de cada una de las fuentes antes mencionadas. Sin embargo, el desarrollo durante los últimos 25 años ha sido primordialmente encauzado hacia las enzimas de origen microbiano, por las siguientes - - razones:

DISPONIBILIDAD:

La gran variedad de microorganismos que existe en la naturaleza, así como la gran cantidad de reacciones que pueden - - llevar a cabo, ha hecho de éstos la elección favorita de los investigadores e industriales. (46)

Estas fuentes microbianas una vez aisladas, seleccionadas y clasificadas, son conservadas por métodos especiales como - la liofilización, sin cambio alguno en su comportamiento en las llamadas Colecciones Microbianas, de donde pueden ser - solicitadas para ser usadas en procesos industriales. (47)

Algunas características deseables de los microorganismos a utilizar es que sea termofílico, que tenga elevada productividad, que sea fácilmente manipulado genéticamente, etc. En la TABLA VII se resumen todas las características dese-

bles. (48,49)

Otras ventajas que tienen los microorganismos, es que pueden utilizar casi cualquier compuesto como fuente de carbono, lo que hace viable el uso de desechos orgánicos industriales y agroindustriales. (50)

TIEMPO DE PRODUCCION:

El tiempo de producción de una fuente microbiana es mucho más corto que el de una fuente de origen vegetal o animal. (51)

La producción de enzimas provenientes de fuentes microbianas se lleva a cabo en un fermentador, que es un sistema totalmente definido, en condiciones controladas. Por otro lado, - las enzimas de fuentes vegetales o animales dependen de condiciones climatológicas (agua, sol, temperatura, etc.) que no son controlables por el hombre. Esta variación en las condiciones de producción puede llegar a afectar el rendimiento - esperado.

CALIDAD:

La calidad de una fuente microbiana será más constante debido a que se tienen condiciones definidas, como se había ya comen-
tado, mientras que una fuente vegetal y animal, al tener varia

ción en los parámetros de producción y conservación, presentará una calidad muy variable.

SUPERFICIE:

La superficie requerida para la producción de enzimas de fuente microbiana, será la que ocupe un fermentador con sus equipos adicionales, que no es ni remotamente comparable a la extensión requerida para el cultivo de una fuente vegetal o para una - - fuente animal.

COSTO:

Este va a depender de la enzima a tratar. Por lo general, las enzimas microbianas son más baratas que las enzimas vegetales o animales. Sin embargo actualmente, hay algunas enzimas vegetales como la papaína, que son más económicas. (52)

Como se ha podido observar, los parámetros antes analizados favorecen la elección de una enzima microbiana.

TABLA VI
ENZIMAS DE DIFERENTES FUENTES ANIMAL, VEGETAL Y MICROBIANA

FUENTE ANIMAL	FUENTE VEGETAL	FUENTE MICROBIANA
Renina	Papaína	Amilasa
Tripsina	Amilasa de Malta	Celulasas
Pepsina	Bromelina	Glucosomerasa
Lipasa	Ficina	Pectinasas
Pancreatina	Peroxidasa	Proteasas
Uroquinasa	Lipoxidasa	Renina Microbiana

Adaptada de Scriban, R. 1984 (23)

TABLA VII
CARACTERISTICAS DESEABLES DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE
ACTIVIDAD ENZIMATICA

1. Es deseable que la enzima sea excretada al medio, para reducir los costos de recuperación.
 2. El microorganismo debe ser termofílico para que la actividad enzimática sea más estable.
 3. El organismo debe poseer elevada productividad y ser genéticamente estable.
 4. La enzima producida debe poseer elevada actividad.
 5. El microorganismo no debe producir sustancias tóxicas.
 6. Debe ser fácil de manipular genéticamente para poder hiperproducir enzimas.
 7. El microorganismo debe ser capaz de resistir elevadas concentraciones de sustrato y de producto.
 8. El microorganismo debe trabajar en un rango de pH y de temperatura fácil de controlar.
-

Adaptada de Kochova-Kratochvilova, A. 1985 (48) y
Cheetham, P.S.J. 1987 (49)

CAPITULO III
PARAMETROS BASICOS DE LA PRODUCCION
DE ENZIMAS MICROBIANAS

3.1. Medio de Cultivo.

A nivel industrial, con el fin de reducir los costos de producción, se tratan de usar desechos agroindustriales como sustratos, para la producción de algunas enzimas (50-53). En la Tabla VIII se encuentran ejemplos de algunos de estos desechos que pueden ser utilizados como sustrato de fermentaciones. Estos medios son de composición compleja y pueden suministrar algunos nutrientes, incluyendo polisacáridos, proteínas, aminoácidos, lípidos, nucleótidos y, en ocasiones, trazas de elementos, vitaminas y varios inductores. Es muy importante que los componentes del medio se encuentran en grandes cantidades, libres de compuestos tóxicos y que la composición del medio sea constante. Sin embargo, es importante recordar que el medio ideal es aquel en el que todos los ingredientes son utilizados por el organismo para la producción de biomasa, energía y producción de las enzimas deseadas. La presencia de elevadas concentraciones de azúcares reductores y/o otros ingredientes pueden causar represión catabólica, pero si se encuentra en la forma y concentración adecuada pueden hacer que la producción de la enzima sea la máxima. Otros requisitos que debe presentar el medio de fermentación es que su viscosidad no sea elevada para evitar problemas de transferencia de masa y oxígeno (54)

TABLA VIII

**DESECHOS AGROINDUSTRIALES QUE PUEDEN SER UTILIZADOS COMO
SUSTRATO DE FERMENTACIONES**

- * Rastrojo y Orote de Maíz
 - * Rastrojo de Sorgo
 - * Bagazo de Caña
 - * Melazas de Caña
 - * Paja de Trigo
 - * Paja de Frijol
 - * Cascarrilla y Paja de Arroz Palay
 - * Suero de Leche
 - * Licor de Maíz
 - * Harina de Pescado
 - * Harina
-

Adaptada de Leal, H. 1985 (53)

3.2. Parámetros Fisicoquímicos de la Producción.

a) Temperatura y pH

Generalmente todos los procesos fermentativos liberan calor, lo que hace necesario un sistema de control de temperatura. Si el microorganismo es termofílico, este control no debe ser tan estricto, lo que aminora los gastos de enfriamiento del fermentador. Es necesario conocer la temperatura óptima de producción de la enzima y crecimiento del microorganismo, con el fin de seleccionar la temperatura óptima a trabajar en fermentador (55)

Al igual que la temperatura, el pH es un parámetro crítico en el crecimiento del microorganismo y producción. Se requiere de un sistema de control, así como el conocimiento del pH más adecuado para obtener los mejores resultados. - (9)

b) Transferencia de oxígeno

Es necesario conocer la demanda de oxígeno del microorganismo para poder seleccionar los parámetros más adecuados de aereación y agitación del fermentador, con el fin de evitar una inhibición en el crecimiento y/o producción. La transferencia de oxígeno del aire al medio de cultivo va a

estar limitada por la viscosidad del medio (56)

3.3. Selección de la Forma.

Existen dos tipos de cultivos. El cultivo semisólido, en el cual el crecimiento del microorganismo se lleva a cabo sobre materiales sólidos sin la presencia de agua libre; y el cultivo sumergido, el cual se realiza con elevada cantidad de agua libre.

El cultivo semisólido se ha utilizado desde hace varios siglos en los países orientales, para la producción de algunos alimentos fermentados (57,58). La Tabla IX presenta algunos de los procesos orientales de cultivo semisólido. Mediante este tipo de cultivo se obtienen únicamente enzimas extracelulares como producto deseable de la fermentación. Estas enzimas pueden -- ser: amilasas, celulasas, proteasas, etc. Sin embargo, el cultivo semisólido es más complejo que el sumergido, en virtud de que la interrelación ambiente-sustrato-organismo tiene diversas limitaciones físicas y, en consecuencia, el sistema reaccionante presenta gradientes de pH, temperatura, humedad, -- etc., que afectan críticamente al sistema (59)

Las características de la fermentación semisólida y del cultivo sumergido se resumen en la Tabla X.

TABLA IX
PROCESOS ORIENTALES DE CULTIVO SEMISOLIDO

PRODUCTO	SUSTRATO	ENZIMA
Tempeh	Soya	Proteasas
Miso	Soya	Proteasas
	Arroz	L-Amilasas
Tapé ketella	Yuca	Amilasas
Ang-kha	Arroz	Amilasas
Ontjom	Cacahuate	Proteasas y Lipasas

Carrizales, V. 1983 (57)

El cultivo sumergido, a su vez, puede ser de dos tipos: el - - cultivo "batch" o en lote; y el cultivo continuo. La principal diferencia entre los dos es que el cultivo continuo está en un estado estacionario (steady-state), esto es, que el crecimiento ocurre a una velocidad constante, así como que las condiciones ambientales permanecen constantes, mientras que en el cultivo en lote hay variación de los parámetros antes mencionados (60;61)

Las características del cultivo continuo del cultivo en lote para la producción de enzimas, se encuentran en la Tabla XI.

El criterio predominante para la elección del tipo de cultivo será el económico, el cual va a depender de la capacidad de - producción de enzimas en el sistema a elegir.

3.4. Hiperproducción de Enzimas.

Cabe mencionar que con el fin de acrecentar el rendimiento en la producción de enzimas se ha recurrido a la hiperproducción de enzimas a través de la genética tradicional (62), para la obtención de cepas que no requieran de inductores así como - que no sufran represión catabólica (63). Por otra parte, la ingeniería genética a través de las técnicas de transferencia y expresión de clones ha hecho posible la hiperproducción de enzimas (64,65), siendo un ejemplo, la hiperproducción de la renina para ser usada en la industria quesera (66,67)

TABLA X
CARACTERISTICAS DE LA FERMENTACION SEMISOLIDA Y DE
LA FERMENTACION SUMERGIDA

CRITERIO	CULTIVO SUMERGIDO	CULTIVO SEMISOLIDO
Conocimientos fisiológicos	Mayor	Menor
Conocimiento tecnológico	Mayor	Menor
Mantenimiento de las condiciones óptimas	Posible	Difícil
Control de los parámetros	Sencillo	Difícil
Energía de mezclado y aereación	Mayor	Menor
Agua requerida	Mucha	Poca
Generación de aguas residuales	Elevada	Nula
Costo de Inversión	Elevado	Reducido
Enzimas Producidas	Diluidas	Concentradas

Adaptada de Oriol, E. 1985 (59)

TABLA XI
CARACTERISTICAS DEL CULTIVO CONTINUO Y DEL
CULTIVO ESTACIONARIO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS

CRITERIO	CULTIVO EN LOTE	CULTIVO CONTINUO
Velocidad de Crecimiento	Variada	Constante
Velocidad de Producción	Variada	Constante
Composición del Medio	Variada	Constante
Posibilidad de Represión Catabólica	Mayor	Menor
Posibilidad de Mutación	Menor	Mayor
Posibilidad de Contaminación	Menor	Mayor
Costo del Equipo	Menor	Mayor
Productividad	Menor	Mayor

Herbert, D. 1961. (60)

CAPITULO IV
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INMOVILIZACION
DE ENZIMAS Y CELULAS

4.1. Ventajas y Desventajas de las Enzimas Inmovilizadas.

Hasta hace una década, las enzimas han sido usadas en forma soluble en procesos por lote, lo que trae como consecuencia que al finalizar la fermentación deseada la enzima activa -- quede como parte integrante del medio de cultivo. Este hecho causa que la enzima sea un contaminante más a separar del producto deseado, así como que su proceso para recuperarla y reusarla sea técnicamente muy difícil, así como costoso. Asimismo, las reacciones enzimáticas con enzimas libres sólo pueden ser llevadas a cabo en procesos por lote ("batch"), lo que -- presenta una menor productividad que la obtenida en un proceso continuo (68)

Cabe mencionar que hay enzimas que no son de interés para ser recuperadas, como son las proteasas usadas en detergentes, -- las amilasas y proteasas usadas en la industria panificadora, etc., ya que forman parte integrante del producto; sin embargo, hay gran cantidad de enzimas que únicamente intervienen -- en la conversión y formación del producto, como son la -- -- B-galactosidasa, la papaína, etc., que sí son de gran interés industrial para ser recuperadas y usadas, debido a su elevado costo de obtención y recuperación. (21) Este hecho ha impulsado a la ingeniería enzimática a desarrollar métodos de inmovilización con el fin de que la enzima sea fácilmente recuperada y reusada.

El término "enzima inmovilizada" se define como la enzima que tiene una localización o confinamiento en cierta región del espacio, con retención de su actividad catalítica y que se reusa en forma repetida y continua.

El término de localización o confinamiento de la molécula de la enzima puede tener diferentes significados, dependiendo si la enzima está unida covalentemente a un polímero insoluble, si está adsorbida a un soporte insoluble de naturaleza orgánica o inorgánica o si está atrapado o microencapsulado en geles o membranas sintéticas. La palabra "continuo" se enfatiza ya que la enzima puede ser usada en un sistema continuo, en donde un sustrato es inyectado a un reactor de forma continua y el producto es removido también de forma continua. (69)

Las ventajas que presentan las enzimas inmovilizadas son: (70)

- 1) Son enzimas más baratas, ya que pueden ser reusadas.
- 2) Se pueden usar en proceso continuo.
- 3) Los productos quedan libres de las enzimas.
- 4) La formación del producto es más controlada.
- 5) Las propiedades de las enzimas pueden ser alteradas favorablemente (71)
- 6) Los problemas del efluente pueden ser disminuidos.
- 7) Pueden servir de modelos para el estudio de los enlaces enzima-membrana.

Sin embargo, hay ciertas desventajas que presentan las enzimas inmovilizadas, que deben ser superadas para que su uso a nivel industrial se incremente cada día, y son:

- 1) Pueden limitar la transferencia de masa, lo que puede ocasionar un rendimiento bajo en la reacción. (72)
- 2) La existencia de un microambiente, dificulta la regulación correcta del proceso (73) y
- 3) Puede haber un efecto sobre la cinética enzimática así como la selectividad de la enzima (74)

4.2. Ventajas y desventajas de las células inmovilizadas.

Como ya se había mencionado, las enzimas microbianas pueden ser clasificadas en 2 grupos: Las extracelulares (excretadas por la célula al medio de cultivo) y las intracelulares -- (retenidas por la célula durante la incubación). Con el fin de utilizar las enzimas intracelulares, es necesario extraerlas de las células microbianas. Para eliminar la necesidad de extraer las enzimas de las células y utilizar sistemas -- multienzimáticos, se ha propuesto la inmovilización de las células. (75) Las células inmovilizadas pueden ser definidas por sustitución del término "enzima" por "célula" en la definición dada para enzimas inmovilizadas, esto es, las células inmovilizadas son las células que tienen una localización o confinamiento en cierta región del espacio, con retención de

sus actividades catalíticas y que se usan en forma repetida y continua (69). Las células inmovilizadas pueden estar en crecimiento, en forma latente o muertas, pero la actividad enzimática es mantenida en estado activo. (76)

Chibata (77), opina que las reacciones con células inmovilizadas son ventajosas cuando:

- 1) La enzima es intracelular.
- 2) Las enzimas extraídas de las células son inestables durante y después de la inmovilización.
- 3) La célula no contiene enzimas que interfieren en el proceso o que puedan ser inactivadas o removidas previamente.
- 4) Los sustratos y los productos no sean compuestos de elevado peso molecular.

En estos casos, se pueden esperar las siguientes ventajas de las células inmovilizadas:

- 1) No se requiere de un proceso de extracción y/o purificación. (78)
- 2) El rendimiento de la actividad enzimática en la inmovilización es elevado. (77)
- 3) La estabilidad operacional es generalmente elevada. (77)
- 4) El costo de la enzima es más bajo (79)
- 5) Puede ser posible la aplicación de reacciones multienzimáticas. (80)

Sin embargo, hay algunas desventajas que presentan las células inmovilizadas, que tienen que ser superadas para poder ser usadas, y son:

- 1) Las células contienen gran cantidad de enzimas que catalizan reacciones no deseadas (la mutación o el tratamiento de célula puede disminuir los niveles de actividad de las enzimas no deseadas). (81)
- 2) La pared celular y la membrana celular de células intactas, generalmente previenen la permeación de los sustratos, productos y otras reacciones de los componentes en y fuera de la célula. (82)
- 3) Desprendimiento de las células de la matriz durante la fermentación. Estas células libres compiten con las inmovilizadas y crecen, lo que disminuye la productividad y el rendimiento. (83)
- 4) Dentro de la matriz existen determinadas condiciones diferentes a las del sistema total, lo que hace difícil su regulación. (84)

Como se ha podido vislumbrar en este capítulo, será necesario encontrar soluciones adecuadas a las desventajas que presenta la inmovilización, para que su impacto industrial sea mayor.

CAPITULO V
CARACTERISTICAS DE LOS SOPORTES INSOLUBLES PARA
INMOVILIZAR ENZIMAS O CELULAS

Como se ha visto a lo largo de la presentación del trabajo, la potencialidad del uso de enzimas y células inmovilizadas presenta una nueva y fascinante tendencia en la biotecnología. (85). El propósito de este capítulo será discutir los criterios y estrategias más importantes para la selección del soporte a usar en la inmovilización.

5.1. Naturaleza del Soporte.

Los soportes utilizados para la inmovilización de enzimas y - células pueden estar divididos en dos grandes categorías: orgánicos e inorgánicos. Aunque hay una gran cantidad de literatura que desea mostrar la superioridad de cada tipo (86-92), comúnmente es aceptado que los soportes orgánicos son mejores, debido a que proveen una gran variedad de grupos reactivos -- sobre su superficie, como son grupos carboxilo, amino, hidroxilos, etc. (93,94). Los soportes orgánicos, a su vez, pueden ser divididos en soportes de polisacáridos, de proteínas y -- polímeros sintéticos. Dependiendo del tipo de subunidad, los soportes de polisacáridos pueden ser subdivididos en celulosa y sus derivados y dextran, mientras que los polímeros sintéticos pueden ser divididos en polímeros de acrilamida, copolímeros de fenol y formaldehído (resinas fenólicas) y copolímeros de estireno y polímeros de poliestireno. En la Tabla - XII se encuentra la clasificación antes mencionada.

Los soportes inorgánicos, que comprenden varios óxidos y sus combinados, exhiben una elevada termoestabilidad y buenas -- propiedades de flujo. En solución, su superficie se hidroliza

y los grupos hidroxilo formados pueden reaccionar directamente con grupos carboxilo o amino de la superficie de la enzima o célula (96)

5.2. Características del Soporte.

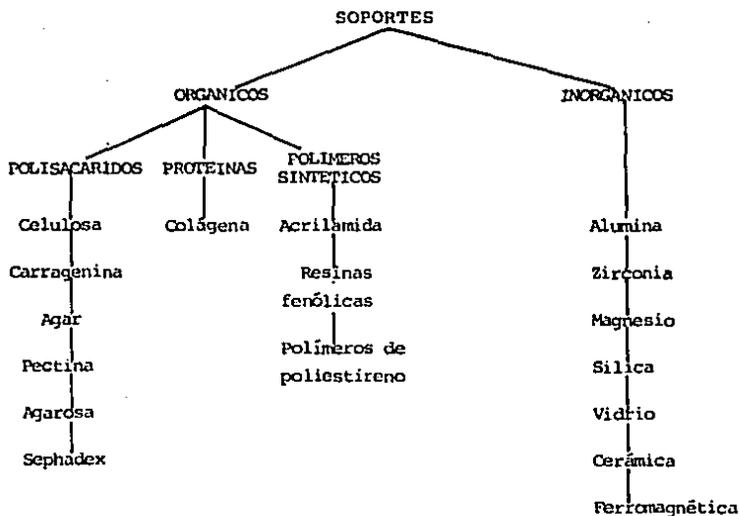
El principal criterio que debe ser tomado en cuenta para la elección del soporte es que éste no sea tóxico a la célula o a la enzima, para que ésta (enzima o célula) pueda seguir desarrollando su función normal. (97)

Es absolutamente necesario que el soporte sea capaz de retener una elevada concentración de enzimas o células. La capacidad de retención del soporte puede ser calculada como la diferencia entre la cantidad de enzimas o células inicialmente añadidas al soporte y la cantidad que no reaccionó con el soporte y que por tanto fue lavada. (98)

En la inmovilización de enzimas, si es muy elevado el porcentaje (%) de enzima por gramo de soporte, decrece la actividad por interacciones proteína-proteína; en contraste con esto, un incremento de la concentración de célula de 10^6 por ml de gel no causa decremento de la actividad microbiana (99)

Es muy conveniente, también, saber la carga exacta de la superficie del soporte, así como su composición y presencia -

TABLA XII
CLASIFICACION DE SOPORTES PARA INMOVILIZACION



Kolot, F.B. 1981 (95)

de grupos reactivos específicos. Esto proveerá la información básica sobre el tipo de interacción y de enlace que debe esperearse entre la enzima y el soporte, y la célula y el soporte. El soporte debe tener la capacidad de formar gran cantidad de dichos eniaces. Conjuntamente con lo antes mencionado, los -- soportes deben ser estables a rangos amplios de pH y temperatura en el que el proceso se desarrollará (100)

Se desea la presencia de soportes con elevada porosidad, debido a que aumentan la superficie de retención, así como la -- difusión del sustrato(s) y producto(s) a la enzima y a la -- célula (101,102)

El soporte debe ser estable a elevadas presiones y debe tener forma y tamaño definido. Esto hace que la operación del reactor sea más fácil, así como que ayuda a obtener una elevada velocidad de flujo del sustrato. (103)

Es necesario que el soporte sea relativamente barato y de preferencia que pueda ser regenerado. Sin embargo, este último -- requisito no siempre es posible cumplirlo. La Tabla XIII -- resume los factores que intervienen en la elección del soporte.

5.3. Mecanismos de Interacción Soporte-Enzima y Soporte-Célula

Existen 5 tipos diferentes de interacción responsables de la inmovilización de enzimas y células (99):

- 1) Interacciones electrostáticas entre la enzima o célula cargada y el soporte cargado.
- 2) Formación de enlace iónico entre grupos amino (NH_2^+) y grupos carboxilo (COOH^-) de la superficie de la enzima o célula y un grupo reactivo de la superficie del soporte.
- 3) Formación de enlace covalente parcial entre grupos amino o carboxilo de la superficie de la enzima o célula y grupos hidroxilo (o silanol disociado) de la superficie del soporte como en el caso de vidrios y cerámicas.
- 4) Atrapamiento físico, donde los poros del soporte son menores al tamaño de la enzima o célula, por lo que la célula o la enzima queda dentro del polímero y donde los nutrientes pueden entrar y los productos salir.
- 5) Formación de enlace covalente entre grupos reactivos de la superficie de la enzima o célula y especialmente grupos muy reactivos de la superficie del soporte.

En este último caso, los grupos del soporte son activados por medio de agentes acoplantes, por ejemplo, los grupos carboxilo pueden ser convertidos a ésteres, los cuales pueden reaccionar directamente con grupos amino, formándose de esta manera un enlace de amida.

Los tres primeros mecanismos aparecen de forma espontánea y son comunes para todos los soportes, mientras que para lograr el enlace covalente se requiere de agentes acoplantes especiales como son gluteraldehído, carboimida, etc. (75)

Todos estos mecanismos son muy importantes para poder evaluar la capacidad de retención de la enzima o célula al soporte; - sin embargo, siempre se tiene que tomar en cuenta que tanto - las enzimas o células no pierdan sus propiedades al ser inmovilizadas.

TABLA XIII

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ELECCION DEL SOPORTE

A. Factores que afectan la capacidad de enlace:

- 1) Densidad de la superficie de los sitios de unión.
- 2) Porosidad.
- 3) Distribución de las cargas electrostáticas.
- 4) Balance de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

B. Factores que afectan la expresión de la actividad enzimática por los enlaces enzimáticos:

- 1) Tamaño de la partícula enzimática a inmovilizar.
- 2) Forma y estructura del soporte.
- 3) Distribución de la carga.
- 4) Resistencia en la difusión del sustrato y del producto.
- 5) Distribución del flujo del reactor.

C. Otros factores:

- 1) Regeneración del soporte.
- 2) Facilidad de atrapamiento de la enzima.
- 3) Estabilidad de operación.
- 4) Inerte químicamente.
- 5) Costo

Vieth, W.R. et al, 1974 (103)

CAPITULO VI
METODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS
Y CELULAS

6.1. Métodos de Inmovilización de Enzimas.

Cuando se pretende aplicar un método de inmovilización, es de vital importancia mantener la actividad catalítica de la enzima, que depende de una conformación específica y de la interacción del centro activo. Por lo tanto, es necesario - mantener la estructura nativa lo más posible, así como evitar que los grupos funcionales del centro activo reaccionen durante el proceso de inmovilización.

Todo método de inmovilización debe llevarse a cabo bajo condiciones suaves, con el fin de evitar la desnaturalización - de la enzima, debido a que la estructura terciaria de la enzima es mantenida por fuerzas débiles como los puentes de hidrógeno, los hidrofóbicos y los puentes iónicos. Hay algunas excepciones a estas restricciones, ya que algunas proteínas pueden ser renaturalizadas al cambiar las condiciones de la solución, pero si las condiciones son muy drásticas, puede ocasionarse la oxidación de los grupos sulfhídricos, lo que causa una desnaturalización irreversible.

Con los fundamentos antes mencionados, la intención de este capítulo no es proveer una extensiva bibliografía de métodos, de los cuales existen amplias revisiones (104-106), sino - - resaltar las ventajas y desventajas de los diferentes métodos.

Antes de comenzar a discutir las técnicas de inmovilización, es necesario proceder a establecer un esquema de los diferentes métodos. Fig. 1.

A. Inmovilización por adsorción.

El término adsorción se puede definir como la adhesión de la proteína a la superficie de un soporte que no tiene la capacidad para formar el enlace covalente. El enlace o enlaces formados entre la proteína y el soporte durante el proceso de adsorción van a depender de las propiedades de la superficie y de la química del soporte (108,109) Tabla XIV. El método se basa en poner en contacto a la enzima con el soporte bajo las condiciones necesarias para que ocurra el enlazamiento.

Las características que presenta la adsorción son:

- 1) Es un método simple.
- 2) Puede ser aplicado a una gran variedad de soportes, orgánicos e inorgánicos (90;111). En la Tabla XV se encuentran algunos ejemplos de soportes orgánicos e inorgánicos.
- 3) Los soportes pueden ser modificados para aumentar la adsorción con el acoplamiento de cofactores como el fosfato de piridoxal (112).

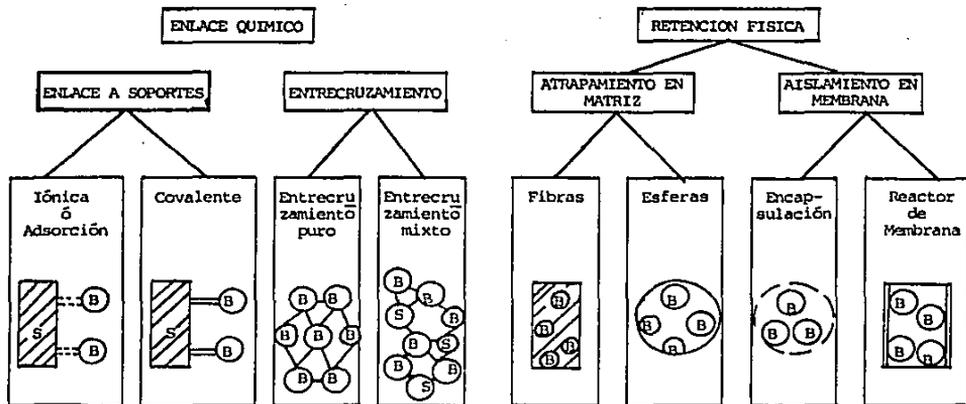


FIG. 1 Principales tipos de biocatalizadores inmovilizados

S = Soporte

B = Biocatalizador (enzima ó célula)

TABLA XIV
FACTORES QUE AFECTAN LA ADSORCION

1. Cargas de la superficie de la proteína
 2. Area del soporte
 3. Diámetro del poro del soporte
 4. Peso molecular y dimensiones de la proteína
 5. Sistema de solventes
 6. pH
 7. Temperatura
-

Baum, et al. 1975 (110)

TABLA XV
ALGUNOS SOPORTES PARA LA INMOVILIZACION POR ADSORCION

ALUMINA	CM-SEPHADEX
AMBERLITA CG/50	COLAGENO
BENTONITA	DEAE-CELULOSA
GELES DE FOSFATO DE Ca	DEAE-SEPHADEX
CARBON	VIDRIO
CM-CELULOSA	SILICA GEL

Adaptada de Anamicher, et al. 1980 (90) y
Arinbasarova, A. et al. 1982 (111)

- 4) Una ventaja del proceso de adsorción respecto al método de enlace covalente es la mínima distorsión necesaria de la enzima para lograr el enlace, así como la posibilidad de obtener una mayor actividad catalítica de la enzima retenida.
- 5) La enzima puede ser removida del soporte con relativa facilidad debido a que no se requiere la ruptura de enlaces químicos.
- 6) Presenta la ventaja económica de que el soporte puede ser usado de nuevo.
- 7) La desventaja que presenta este método radica en que las enzimas están unidas por enlaces físicos débiles, como son los enlaces iónicos, las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals, que pueden ser rotas con relativa facilidad por cambios de pH, temperatura o fuerza iónica con la concomitante desorción de la enzima (108)

Una variación al proceso de adsorción es llevar a cabo el tratamiento con agentes bifuncionales, como puede ser el glutaraldehído. La combinación de estos dos procesos, adsorción y entrecruzamiento, conduce a la obtención de una preparación enzimática inmovilizada que es estable por formación de enlaces covalentes. El glutaraldehído es el agente particularmente usado, debido a que es de bajo costo y gran disponibilidad (113).

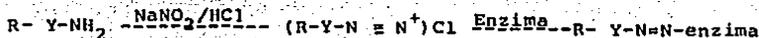
Aunque el proceso de adsorción no es del todo favorable y se puede considerar como una técnica muy fácil de aplicar, de preferencia debe estar referido a sistemas de enzima-soporte, donde el pH óptimo de adsorción esté cerca del pH en el que se va a usar la enzima. La adición de un proceso de entrecruzamiento puede ayudar a la estabilización del sistema enzima-soporte. (114)

B. Inmovilización por enlace covalente.

Las enzimas, en virtud de que están compuestas por cadenas de aminoácidos, tienen una serie de grupos disponibles para el enlace covalente (Tabla XVI). La inmovilización por este proceso puede ser clasificada en 3 métodos: método diazo, método peptídico y método de alquilación. (107)

a) Método Diazo

Se basa en la unión de las proteínas de la enzima con el soporte a través de grupos diazo. Los soportes que contienen grupos amino-aromáticos se diazonan con ácido nitroso y se reactiva el derivado diazo de la siguiente forma: (115)



R-Y: Soporte

Los grupos funcionales de la enzima que participan son: Grupos amino libres, el grupo imidazol de la histiúina y el grupo fenólico de la tirosina.

Los soportes usados por este método son: Grupos - - amino-aromáticos de polisacáridos, copolímeros de - amino-ácidos, poliacrilamida, poliestireno, copolímeros de L-ácido etilenmaléico y vidrio poroso.

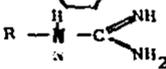
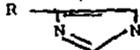
b) Método por Enlace Peptídico

A través de este método se forman puentes peptídicos entre la proteína de la enzima y el soporte (116-119)

Se puede lograr a través de estos procedimientos:

- 1) Los soportes insolubles que contienen grupos carboxi pueden ser convertidos a derivados - reactivos a través de ácido azídico, clorhídrico, isocianato, etc., ya que estos derivados sí tienen la capacidad de reaccionar con los grupos amino libres de la enzima, formando el enlace peptídico.
- 2) Se pueden llegar a usar reactivos de condensación, con la carboimidida y el reactivo de - - Woodward, para enzimas y soportes que contengan

TABLA XVI
RESIDUOS REACTIVOS Y PROTEINAS

R — NH ₂	GRUPO AMINO DE LISINA Y NITROGENO TERMINAL DE GRUPOS AMINO.
R — SH	GRUPO SULFHIDRILO DE LA CISTEINA.
R — COOH	GRUPO CARBOXILO DEL ASPARTATO Y GLUTAMATO, ASI COMO GRUPOS CARBOXILO TERMINALES.
	GRUPO FENOLICO DE TIROSINA.
	GRUPO GUANIDINO DE ARGININA.
	GRUPO IMIDAZOL DE HISTIDINA.
R — S — S	GRUPO DISULFURO DE CISTEINA.
	GRUPO INDOL DE TRIPTOFANO.
CH ₃ — S — R	GRUPO TIOETER DE METIONINA.
R — CH ₂ OH	GRUPO HIDROXILO DE SERINA Y TREONINA.

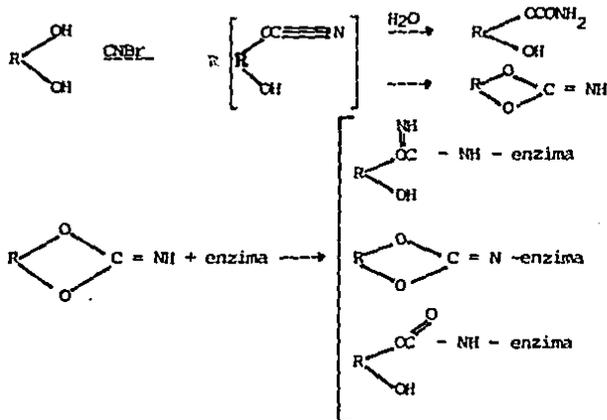
R: radical

Srere, P.A. et al, 1976 (94)

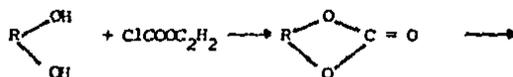
d) Derivado de Isocianato:



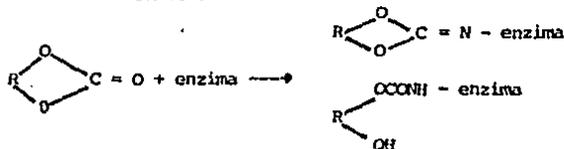
e) Polisacáridos activados con CNBr:



f) Derivados de carbonato de celulosa:



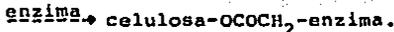
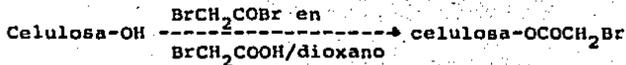
celulosa etilcloroformato.



grupos amino o carboxi libres. En la Tabla XVII se presentan las reacciones de los métodos por enlace peptídico.

c) Método de Alquilación:

Se basa en la alquilación de grupos amino, grupos fenólicos o grupos sulfhídrido de una enzima con grupos reactivos del soporte tal como el haluro.



Las características que presenta el enlace covalente son:

- 1) Los diferentes métodos causan alteraciones en la estructura conformacional y en el centro activo de la enzima, lo que resulta en una disminución de la actividad y/o cambios en la especificidad al sustrato. (113)
- 2) Sin embargo, este tipo de enlace es más fuerte, lo que evita que la enzima no se desprenda aún en la presencia de sustratos o soluciones de elevada fuerza iónica (121)

- 3) Su preparación es más complicada, lo que puede traer como consecuencia que la enzima pueda desnaturalizarse durante la inmovilización.
- 4) Desde el punto de vista económico es un método caro de preparación, así como que el soporte no puede ser -- usado de nuevo.
- 5) Puede ser aplicado a gran cantidad de soportes, orgánicos e inorgánicos (Tabla XVIII)

C. Inmovilización por entrecruzamiento.

Se basa en la formación de enlaces químicos, entre las moléculas de enzimas por medio de agentes bi-o-multifuncionales. Se puede llevar a cabo también entre la enzima, el soporte y el agente bio-multifuncional.

La inmovilización de enzimas por este método tiene las siguientes características: (105,107,123)

- 1) Es un proceso demasiado difícil de controlar para obtener productos de determinado tamaño de agregación y propiedades mecánicas.
- 2) Se usa generalmente en la fijación de las enzimas a

TABLA XVIII
 SOPORTES POLIMERICOS POR LA INMOVILIZACION POR
 ENLACE COVALENTE

Celulosa	Copolímero de acrilamida y ácido acrílico	Vidrio Poroso modificado
Sephadex	Copolímero de anhídrido maléico y butanodiol dirinil éter	
Dextrán	Poliámidas	
Colágena		

Adaptada de Messing, A. 1978 (122)

cristales y a agregados macromoleculares similares, de estructura bien definida.

- 3) El enlace que se forma entre el agente y la proteína puede llegar a alterar la estructura de la enzima, -- cambiando su reactividad.
- 4) En algunos casos, llega a reaccionar el agente con grupos pertenecientes al sitio activo de la enzima, lo que disminuye la actividad.
- 5) Es un proceso caro y no hay posibilidad de usar de nuevo el soporte.
- 6) Como ya se mencionó, se puede usar este método de entrecruzamiento junto con el de adsorción para fortalecer la adhesión de la enzima al soporte.
- 7) Los agentes usados están en la Tabla XIX

D. Inmovilización por Atrapamiento

Como los procesos de adsorción, los procesos de atrapamiento son relativamente simples. La técnica se basa en la oclusión de la enzima dentro de la red estructural de la matriz de un polímero

TABLA XIX

**ALGUNOS AGENTES BI-O-MULTIFUNCIONALES PARA LA INMOVILIZACION
POR ENTRECruzAMIENTO**

Glutaraldehído	Diisocianato de Hexametileno
Tolueno 2,4 Disocianato	1,6 Bis Yodoacetamida Hexano
Etil Cloro-formato	1,4 Bis Yodoacetamida Butano
Dimetil Adipimidato	1,5-Difluoro-2,4,Dinitrobenzeno

Adaptada de Mosbach, K. 1976 (105) y
Chibata, I. 1978 (107)

y es efectuada mezclando la enzima con los monómeros apropiados e iniciando la reacción de polimerización. Las características que presenta son: (124-128)

- 1.- Tiene la ventaja que la enzima no participa directamente de la formación de la estructura, lo que hace que aparentemente no pierda actividad.
- 2.- Sin embargo, la actividad enzimática puede dañarse durante el proceso de la reacción de atrapamiento, o cuando las interacciones del polímero causen desnaturalización.
- 3.- Los materiales que pueden ser usados son: poliacrilamida, polivinilpirrolidona, almidón, resinas de silicón, carragenina, colágena, alginatos y resinas epóxicas.
- 4.- Las técnicas de oclusión están limitadas por el hecho de que sólo se pueden utilizar cuando el sustrato tiene un peso molecular bajo, para que éste pueda difundirse a través de la matriz.
- 5.- La resistencia difusional a la penetración del sustrato perturba la cinética de la actividad enzimática. (129)

- 6.- Otra desventaja de la formación del gel es que se requiere de granurarlo con el fin de obtener una forma física adecuada de la enzima atrapada.

E. Inmovilización por Microencapsulación.

Este método se lleva a cabo cuando las enzimas son envueltas en cierto tipo de membranas semipermeables.

Son características de este método las siguientes (105,107):

- 1.- Las enzimas no pueden salir de la membrana; sin embargo, los sustratos externos pueden atravesar la membrana libremente para ser aprovechadas o metabolizadas por las actividades enzimáticas correspondientes.
- 2.- La membrana semipermeable separa a la enzima del ambiente extracelular para evitar pérdida de la enzima o para evitar contacto externo con las macromoléculas.
- 3.- Se establece un equilibrio entre la cantidad de sustrato que está dentro y fuera de la microcápsula.
- 4.- La concentración de la enzima dentro de la cápsula va a depender de la solubilidad del sistema a inmovilizar.

Como se ha visto a lo largo de la presentación de los métodos de inmovilización de enzimas, cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas con respecto a los otros, lo que hace que la elección dependa de la aplicación que se le vaya a dar a la enzima inmovilizada. En la Tabla XIXa se presenta una comparación de los diferentes métodos de inmovilización (103).

Por ejemplo, las aplicaciones a gran escala requieren un soporte disponible y un procedimiento de inmovilización simple y barato. Se requiere obtener también enzimas inmovilizadas con estabilidad física y con propiedades mecánicas deseables.

F. Efectos de la Inmovilización.

A continuación se mencionan las consecuencias de los métodos de inmovilización:

- 1.- La actividad enzimática usualmente se pierde durante la inmovilización, tanto por desnaturalización de la enzima como por la oclusión que se da a los sitios activos de la enzima. (130)
- 2.- En el caso del método de adsorción no se causa desnaturalización de la enzima; sin embargo, la ausencia de -- enlaces más fuertes es una desventaja. (131)

TABLA XIX a
COMPARACION DE LAS DIFERENTES TECNICAS DE INMOVILIZACION

CARACTERISTICA	ADSORCION	ATRAPAMIENTO	ENLACE COVALENTE	ENTRECRUZAMIENTO
PREPARACION	SIMPLE	DIFICIL	DIFICIL	DIFICIL
FUERZA DEL ENLACE	DEBIL	DEBIL	FUERTE	FUERTE
ACTIVIDAD ENZIMATICA	BAJA*	BAJA	ALTA	BAJA
REGENERACION DEL SOPORTE	POSIBLE	IMPOSIBLE	IMPOSIBLE	IMPOSIBLE
COSTO DE INMOVILIZACION	BAJO	MODERADO	ALTO	MODERADO
APLICACION GENERAL A DIFERENTES ENZIMAS	SI	SI	NO	NO

Vieth, W.R. 1974. (103)

* En el caso de enlace iónico con resinas como DEAE-Celulosa existen datos con elevadas actividades enzimáticas.

- 3.- El soporte puede afectar a la enzima en virtud de su hidrofobicidad, porosidad, carga y forma (95)
- 4.- Hay presencia de efectos difusionales internos y externos. (132)
- 5.- El soporte también puede acarrear efectos de partición debido a su carga. (133)
- 6.- Hay modificación del pH óptimo de la enzima, debido al microambiente que se forma alrededor de la enzima(134)
- 7.- Los efectos difusionales y electrostáticos pueden alterar profundamente las propiedades de la enzima. (135)

6.2. Inmovilización de Células

Para las células, también existen artículos de revisión muy amplios (136-140), por lo que en esta parte del capítulo -- únicamente haré hincapié en los puntos más importantes de cada uno de los métodos empleados.

A. Inmovilización por Adsorción:

La adsorción, como ya se ha mencionado, es en principio un proceso reversible y barato. Las células son enlazadas por

medio de varios puntos, lo que hace que quede más fuertemente unida al soporte. Esto repercute en un proceso de adsorción - más eficiente, pero a la vez a un proceso más dificultoso de desorción. Más aún, la interacción entre una célula y la superficie sólida es un proceso completo. De estudios realizados con células de mamíferos es sabido que las células se - - adhieren a la superficie de forma reversible durante un - - período corto de tiempo, pero esta reversibilidad es perdida con el transcurso del tiempo. La interacción primaria entre la célula y la superficie sólida debe de alguna forma inducir a una interacción secundaria irreversible (141). El proceso de adsorción puede ser estudiado con respecto a las propiedades del soporte o de las células. Los factores importantes - cuando se discuten las propiedades de las células son: la composición de la pared celular, la carga y la edad. En cuanto al soporte, son: composición, carga y área superficial y tamaño del poro. La relación entre el volumen de la célula y el área superficial es punto crítico para el proceso de adsorción (142)

Aunque la adsorción de células a superficies sólidas no es una novedad, ya que se encuentran en sistemas naturales -- (143;144), se requiere de investigar las condiciones necesarias para obtener una interacción óptima.

La adhesión celular generalmente se lleva a cabo por el simple bombeo de una suspensión celular a través del lecho del adsorbente (145). Debido a las leves condiciones usadas, - - pueden ser obtenidas con facilidad preparaciones de células viables. Una desventaja con la adsorción es el riesgo de la desorción. Esto último, puede ser retomado con una ventaja si se requiere de cambiar la preparación celular cuando su actividad haya declinado y, por lo tanto, la matriz puede ser reusada (111). En la Tabla XX se dan algunos de los microorganismos inmovilizados por este método.

Inmovilización por Enlace Covalente:

Este método generalmente no es usado para la inmovilización de células, dadas las desventajas ya mencionadas para las - enzimas inmovilizadas por este proceso, al igual que el de entrecruzamiento.

B. Inmovilización de Células sin Soporte:

Cuando la síntesis de enzimas adaptativas cesa, algunas enzimas son estables y siguen teniendo actividad aún en la célula ya no viable. Con la finalidad de no perder esta actividad, se usan diversos métodos para mantenerla. En este caso, se considera el sistema como enzima inmovilizada y estas células - llevan a cabo una sola reacción (69).

Dentro de los métodos más comúnmente usados está: el calor, agentes floculantes, etc. (140)

C. Inmovilización por Atrapamiento:

Este es el método más ampliamente usado para la inmovilización de células. El atrapamiento puede llevarse a cabo por medio de polímeros sintéticos y naturales, dentro de los cuales destacan:

a) Atrapamiento en Polímeros Sintéticos

Gran variedad de polímeros han sido usados. Los polímeros sintéticos más comúnmente usados son los de acrilamida. - La Tabla XXI enlista algunos organismos atrapados en derivados acrílicos, así como el producto de la reacción.

Las características de este tipo de inmovilización son:

- 1) Existe estabilidad química, debido a los enlaces covalentes, lo que hace que no esté limitada la aplicación a diferentes medios de reacción (172)
- 2) Dado que los monómeros, así como las condiciones de polimerización (173) pueden llegar a ser tóxicos para la célula, se ha estudiado la posibilidad de llevar a cabo una prepolimerización antes

TABLA XX
CELULAS INMOVILIZADAS POR EL METODO DE ADSORCION

SOPORTE	CELULA	PRODUCTO DE LA REACCION	REF.
Resina de intercambio aniónico	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	146
Astillas de madera	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	146
Cerámica	<u>Acetobacter</u>	Acido Acético	146
Antracita	<u>Pseudomonas</u> sp.	Degradación de fenol	146
Carbón activado	Cultivo mixto.	Tratamiento de agua residual	146
Fibra de vidrio	<u>Zyomonas mobilis</u>	Etanol	146
Vidrio poroso controlado	Cultivo mixto	Metano	146
Vidrio poroso	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	146
Vidrio	<u>Aspergillus niger</u>	Acido cítrico	147
Vidrio	<u>Fusarium moniliforme</u>	Acido giberílico	148
Cerámica	<u>Arthrobacter globiformis</u>	Esteroides	149
Resina de intercambio iónico	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	150

de añadir a las células. Este método ha hecho en el caso de Saccharomyces cerevisiae que retenga su actividad glicolítica (151)

3.- Presentan ventajas operacionales, ya que son resistentes a las condiciones de trabajo del reactor, evitando que - haya desprendimiento de las células (173)

4.- Elevadas concentraciones celulares dentro de la matriz llegan a cambiar la estabilidad mecánica del polímero (174)

5.- Pueden llegar a presentar problemas de limitación de difusión (175)

6.- El rendimiento de la actividad enzimática es moderado; se han obtenido valores alrededor de un 56% de actividad (176)

7.- Pueden ser inmovilizadas células en estado viable (177)

b) Atrapamiento en Polímeros Naturales

1.- Colágena

La colágena es la principal constituyente de cartílagos y de otros tejidos conectivos. Puede ser solu-

bilizada a bajo pH y reprecipitada a elevado pH (178). En la Tabla XXII se muestran algunos ejemplos de organismos atrapados con este material.

2.- Polímeros de Carbohidratos

Agar y Agarosa.- Estas sustancias han sido comúnmente usadas en inmunolectroforesis para el atrapamiento de anticuerpos. Uno de los problemas que han presentado es que la temperatura de gelatinización es muy elevada, lo cual puede afectar a la célula. La Tabla XXIII da algunos ejemplos de organismos atrapados por este método.

Capa-Carragenina.- Este es un heteropolisacárido que contiene unidades estructurales de sulfato de B-D-galactosa y 3,6-anhidro L-D-galactosa. Este polímero es soluble en agua a temperaturas entre los 40 y 60°C y la gelatinización ocurre al enfriarse a -- temperatura ambiente.(194)

TABLA XXI
 CELULAS INMOVILIZADAS CON DERIVADOS DE ACRILAMIDA

MICROORGANISMO	PRODUCTO DE LA REACCION	REF.
<u>Arthrobacter globiformis</u>	Prednisolona	155
<u>Achronobacter aceris</u>	NADP	162
<u>Achronobacter butyri</u>	Glucosa-6-fosfato	165
<u>Bacillus sp.</u>	Bacitracina	171
<u>Brevibacterium ammoniagenes</u>	C ₆ A	164
<u>Brevibacterium ammoniagenes</u>	NADP	163
<u>Escherichia coli</u>	Glutation	159
<u>Escherichia coli</u>	L-triptofano	167
<u>Kluyvira citrophila</u>	Ampicilina	166
<u>Mycobacterium phlei</u>	Esteroides	153
<u>Penicillium chrysogenum</u>	Penicilina G	169
<u>Pseudomonas putida</u>	L-citrulina	158
<u>Pseudomonas testosteroni</u>	Esteroides	170
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	151, 154
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Glutation	156, 168, 160
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	NADH	157
<u>Streptomyces sp.</u>	Tilosin	152
<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>	Fructosa	161

TABLA XXII

EJEMPLOS DE CELULAS INMOVILIZADAS EN COLAGENA

MICROORGANISMO	PRODUCTO DE LA REACCION	REF.
<u>Acetobacter sp.</u>	Acido acético	179
<u>Aspergillus niger</u>	Acido cítrico	179
<u>Corynebacterium libium</u>	Acido glutámico	179
<u>Corynebacterium simplex</u>	Prednisolona	179
<u>Klebsiella pneumoae</u>	Amonio	179
<u>Serrátia marcescens</u>	Acido 2-cetoglucónico	179
<u>Streptomyces griseus</u>	Candidicina	179
<u>Erwinia herbícola</u>	L-tirosina	180
<u>Brevibacterium flavuum</u>	L-glutamato	181

TABLA XXIII
CELULAS INMOVILIZADAS EN AGAR Y AGAROSA

ORGANISMO	PRODUCTO DE LA REACCION	POLIMERO	REF.
<u>Rhizopus stolonifer</u>	Progesterona	Agar	182
<u>Propionibacterium sp.</u>	Vitamina B ₁₂	Agar	183
<u>Corynebacterium sp.</u>	Esteroides	Agar	184
<u>Catherantus roseus</u>	Ajmalicina	Agarosa	185
<u>Daucus carota</u>	Ajmalicina	Agarosa	185
<u>Datura innoxia</u>	Ajmalicina	Agarosa	185
<u>Zymomonas mobilis</u>	Etanol	Agar	186
<u>Saccharomyces beijemus</u>	Etanol	Agar	186
<u>Streptomyces sp.</u>	Tilosina	Agar	152
<u>Streptomyces tindaes</u>	Nikomicina	Agar	153
<u>Anabaena cylindrica</u>	H ₂ y NH ₃	Agar	187
<u>Anabaena sp.</u>	H ₂	Agar	188
<u>Rhizopus nigricans</u>	Progesterona	Agar	189
<u>Methanogenic bacteria</u>	Metano	Agar	190
<u>Arthrobaacter globiformis</u>	Esteroides	Agar	149
<u>Catharanthus roseus</u>	Ajmalicina	Agarosa	191

Se pueden preparar las siguientes formas: bloques, camas y membranas. No sólo un cambio de temperatura, pero también el contacto con iones monovalentes como el K^+ , Rb^+ , Cs^+ y NH_4^+ conducen a la gelatinización. (195)

La Tabla XXIV presenta algunos de los organismos que han sido atrapados con este polímero natural.

Las características de estos métodos de atrapamiento con polímeros naturales basados en la gelatinización son:

- 1.- En el caso de la gelatinización térmica el rango de temperatura de aplicación está limitado, por lo que se han estudiado nuevos métodos que usen condiciones más suaves. (201)
- 2.- Se han encontrado elevados rendimientos de células viables después de la inmovilización. (202)
- 3.- Se incrementa la resistencia de transferencia de masa hacia el interior y exterior de la célula, lo que - - causa una menor actividad y productividad. (203)
- 4.- Se han reportado mejores rendimientos en inmovilización con capa-carragerina que con poliacrilamida. (204)

- 5.- Debido a que la estabilidad mecánica es baja, se han propuesto métodos para hacer a las partículas más -- rígidas con el uso de geles combinados de carragenina y poli(acrilamida).(205)
- 6.- Se ha podido comprobar que al añadir iones de potasio la cantidad de células que se liberan por efectos mecánicos durante la fermentación, decrece -- hasta en un 10%.(203)
- 7.- Con el fin de incrementar la porosidad del gel, para evitar problemas de transferencia de masa, se ha propuesto el uso de fosfato tricálcico.(206)

Atrapamiento con Alginato.- Este método está considerado como una gelatinización iónica trópica, que se lleva a cabo por entrecruzamiento iónico de cadenas poliónicas con -- iones multivalentes.

El método más popular es el entrecruzamiento del alginato con iones de calcio (207). En la Tabla XXV se presentan -- algunos de los organismos atrapados por este método.

TABLA XXIV
CELULAS ATRAPADAS EN CARRAGENINA

ORGANISMO	PRODUCTO DE LA REACCION	REF.
<u>Brevibacterium flavum</u>	Ac. L-málico	192
<u>Candida tropicalis</u>	Acidos decanóicos	193
<u>Escherichia coli</u>	L-alanina	194
<u>Pseudomonas dacunhae</u>	L-alanina	194
<u>Zymomonas mobilis</u>	Etanol	195
<u>Saccharomyces bayanus</u>	Etanol	195
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Glicerol	196
<u>Pseudomonas dacunhae</u>	L-alanino	197
<u>Brevibacterium flavum</u>	L-melato	198
<u>Penicillium urticase</u>	Patulina	199
<u>Corynebacterium dismutans</u>	Alanina	200

Las características de este método son:

- 1.- Se ha visto que a una concentración de 2% de alginato se obtienen elevadas actividades -- enzimáticas. (224)
- 2.- La estabilidad operacional es buena. (225)
- 3.- Se presentan problemas de transferencia de masa cuando las partículas de alginato son mayores - de 2.5 mm de diámetro. (226)
- 4.- La estabilidad mecánica de las partículas es - buena, especialmente en la columnas empacadas y de lecho fluidizado (227)
- 5.- El método está limitado por la inestabilidad del polímero al estar en contacto con complejos anió nicos, como es fosfato, citrato, etc. Esto ha -- causado que se desarrollen métodos de estabiliza ción covalente para alginatos. (228)

- 6.- Se ha podido determinar que en algunos casos el atrapamiento con alginato es más favorable que con capa-carragenina, ya que este último puede causar inactivación de la actividad enzimática, debido a la temperatura a la cual se realiza el atrapamiento (229)
- 7.- Se pueden obtener elevados porcentajes de actividad catalítica (221)
- 8.- El método de inmovilización es muy suave, así como que se pueden llegar a atrapar células viables de diferente origen (230)

Como se ha podido vislumbrar a través de las ventajas y desventajas de estos métodos, los procedimientos de inmovilización de células que usan alginatos y carragenina son los más prometedores, ya que no hay riesgo de toxicidad y las condiciones de preparación son más suaves.

D. Efectos de la Inmovilización.

- 1.- Cuando se lleva a cabo la inmovilización a través del uso de polímeros químicos, cabe suponer que habrá un decrecimiento en la actividad enzimática, así como en

el número de células viables. (231)

- 2.- El uso de monómeros, como glutaraldehído, como precursores de la inmovilización por polimerización, puede ser más tóxico que el uso de oligómeros y polímeros, ya que puede haber permeabilidad del monómero hacia el interior de la célula. (232)
- 3.- La pared y membrana celular de células intactas, generalmente previenen la permeación de los sustratos, productos y otras reacciones de los componentes en y fuera de las células. (191)
- 4.- Existen también efectos de difusión, dados por la presencia de los polímeros usados para la inmovilización. (233)
- 5.- Pueden darse efectos electrostáticos entre el soporte y la célula. (234)
- 6.- Finalmente, hay modificación del pH óptimo de la célula, debido a que se forma un microambiente. (235)

TABLA XXV
CELULAS ATRAPADAS EN ALGINATO

ORGANISMO	PRODUCTO DE LA REACCION	REF.
<u>Rhizopus stolonifer</u>	Progesterona	182
<u>Gluconobacter oxydans</u>	Ac. glucónico	208
<u>Anabaena ATCC 27893</u>	Amonio	207
<u>Clostridium acetobutylicum</u>	Acetona y Butanol	209
<u>Hansenula polymorpha</u>	Formaldehido	210
<u>Gluconabacter oxydans</u>	Dihidroxiacetona	211
<u>Pseudomonas denitrificans</u>	N ₂	214
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	212
<u>Daucus carota</u>	Periplogenina	213
<u>Nocardia rhodocrous</u>	Esteroides	215
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Etanol	216
<u>Candida tropicalis</u>	Degradación	158
<u>Metharosaruna barberi</u>	Metano	217
<u>Clostridium beijerenczii</u>	Solventes	218
<u>Providencia sp. PCM 1298</u>	-cetoácidos	219
<u>Zycononas mobilis</u>	Etanol	220
<u>Clostridium acetobutylicum</u>	Acetona y Butanol	221
<u>Kluyveromyces fragilis</u>	Etanol	222
<u>Lactobacillus delbrueckii</u>	Ac. L-láctico	223

CAPITULO VII
FACTORES QUE DETERMINAN LA ELECCION DE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA A INMOVILIZAR COMO ENZIMA O CELULA

Como ya se mencionó, en capítulos anteriores, existen enzimas intracelulares y extracelulares. Si se trata de una enzima extracelular, las posibilidades de uso del catalizador son dos: - - enzima libre ó enzima inmovilizada. En el caso de una enzima intracelular son tres: enzima libre, enzima inmovilizada y - - célula inmovilizada.

En el caso de una enzima que forma parte integrante del producto, como son las amilasas del pan, las proteasas de los detergentes, etc., no se pretende inmovilizarlos. Sin embargo, cuando hay interés de reuso de la actividad enzimática y más aún de - que se usen en procesos continuos, en reactores que contengan una elevada concentración catalítica, si se desea inmovilizar las. (77)

Debido a que como se discutió en el Capítulo IV, las enzimas inmovilizadas (extracelulares ó intracelulares) presentan -- mayores ventajas sobre las enzimas libres, para la actividad enzimática extracelular solo cabe la posibilidad de inmovilizarla como enzima. En el caso de las enzimas intracelulares, lo que determinará la naturaleza de la actividad enzimática a inmovilizar será:

1) Tipo de Reacción:

Si la reacción es monoenzimática existe la posibilidad

de que sea llevada a cabo por la enzima inmovilizada - ó la célula inmovilizada. Si se desea usar células - inmovilizadas por presentar mayores productividades - que las enzimas inmovilizadas, será necesario disminuir ó eliminar las reacciones no deseadas que puedan darse por la presencia de otras actividades enzimáticas dentro de la célula. (236)

Si la reacción es multienzimática, se descarta la posibilidad del uso de la actividad enzimática como enzima, ya que sería un proceso muy caro la obtención y la inmovilización adecuada para cada una de las enzimas, junto con sus correspondientes cofactores, que toman parte en la reacción, así como la complejidad - del manejo del sistema durante el proceso. (237)

Debido a esto, la producción de esteroides y hormonas sólo es llevada a cabo por células. Las células inmovilizadas han demostrado mayores ventajas, sobre las células libres, como es una elevada productividad, -- etc. (42)

2) Naturaleza del Sustrato.

Si se usan sustratos de elevado peso molecular, sólo cabe la posibilidad de la actividad enzimática como

enzima, ya que éstos no podrían permear la pared celular de las células lo que ocasionaría bajos rendimientos. Si se usan sustratos de bajo peso molecular como el caso de la producción de L-aspártico a partir de ácido fumárico, se ha visto que el sistema inmovilizado como célula presenta mayores productividades que el presentado como enzima inmovilizada(238)

3) Pureza.

Si se requiere de una elevada pureza para su uso en procesos terapéuticos ó farmacéuticos, convendrá -- inmovilizarla como enzima, ya que las células contienen gran cantidad de enzimas que puedan catalizar -- reacciones no deseadas. Asimismo, los fragmentos -- celulares desprendidos durante el proceso pueden -- aparecer como contaminantes del producto final (239)

4) Estabilidad.

Si la enzima intracelular pierde estabilidad durante la extracción, purificación y posterior inmovilización, convendrá inmovilizarla como célula y no como enzima (77)

5) Difusión.

Existe una limitación en la difusión de los sustratos y de los productos cuando se usa una actividad enzimática inmovilizada. Sin embargo, esta limitación se --acentúa notablemente en el caso de las células, ya --que además se presentan los efectos de permeación a --través de la pared y membrana celular. (240)

6) Costo.

La actividad enzimática inmovilizada como célula, es más barata que como enzima, ya que desaparecen los --procesos de extracción y purificación. Así como se --obtiene mayor producción por volumen de reactor(21)

7) Rendimiento.

La capacidad de inmovilización por gramo de soporte es mayor en células que en enzimas, lo que trae como ventaja que se puedan usar reactores más pequeños --con igual actividad (99)

Como se ha visto en lo anterior expuesto, hay ventajas y des--ventajas para la inmovilización de la actividad enzimática --

como enzima o célula.

Lo que determinará el uso de una y otra, debe ser estudiado de nuevo en cada aplicación concreta y bajo condiciones similares con el fin de obtener datos comparativos para su elección.

CAPITULO VIII
APLICACION DE ENZIMAS Y CELULAS INMOVILIZADAS

Hasta hace una década, las enzimas han sido usadas en forma soluble en procesos por lote, lo que trae como consecuencia que al finalizar la fermentación deseada, la enzima activa - queda como parte integrante del medio de cultivo. Este hecho causa que la enzima sea un contaminante más a separar del pro ducto deseado, así como que su proceso para recuperarla y usarlo de nuevo sea técnicamente difícil y costoso.

Asimismo, las reacciones enzimáticas con enzimas libres sólo pueden ser usadas en procesos por lote, lo que representa una menor productividad que la obtenida en un proceso continuo.

Cabe mencionar que hay enzimas que no son de interés para ser recuperadas, como son las proteasas usadas en detergentes, ya que forman parte integrante del producto; sin embargo, hay - gran cantidad de enzimas que únicamente intervienen en la con versión y formación del producto, como es la β -galactosidasa, la papaína, etc.

Este hecho ha impulsado el desarrollo y aplicación de siste- mas inmovilizados en la producción y aplicación de compuestos de interés comercial

En este capítulo haré énfasis en la aplicación de las células

inmovilizadas y no tanto de las enzimas inmovilizadas, de las cuales existen amplias revisiones (34-38).

De estas últimas sólo haré mención de las aplicaciones más recientes.

8.1. Aplicación de Enzimas Inmovilizadas.

Dentro de las aplicaciones más recientes están:

- a) El uso de lactasa para remover la lactosa de la leche, así como producir jarabes a partir del suero que se -- desecha de la industria lechera. (241,242)
- b) La papaína (EC 3.4.22.2) es usada en la producción de cerveza para prevenir la precipitación del complejo - proteína-polifenol y de proteína-taninos. La enzima - es cara y es posible que en un futuro la legislación pueda restringir su uso, por lo que se ha impulsado aceleradamente el desarrollo de un proceso que utilice la enzima inmovilizada. (243)
- c) El uso de enzimas en la industria de la despectinización y clarificación del jugo de manzana ha sido identificado como necesario, por lo cual se pretende implantar sistemas que usen enzimas inmovilizadas por - la ventaja que presentan estas con respecto a las en-

zimas libres. (244)

- d) Otro campo que ha sido revelación para la aplicación de enzimas libres e inmovilizadas es la producción de fragancias. (245)
- e) El uso de sistemas inmovilizados de enzimas en análisis para la determinación de úrea, glucosa, ácido úrico, piruvato, lactato, citrulina, creatinina, glicerol y colesterol ha tenido gran éxito comercial. (246)

Se construyó un electrodo para detectar penicilina basado en β -lactamasa (EC 3.5.2.6) atrapada en una membrana semipermeable en la base de un electrodo de pH. Sin embargo, deben determinarse las condiciones necesarias para que haya respuesta en un - corto tiempo.

Se aisló glucosa oxidasa de Aspergillus niger y se inmovilizó en poliacrilamida. Fue utilizada en la determinación de glucosa en sangre, dando buenos resultados (248). Asimismo, para análisis clínicos, fue inmovilizada la aminoacilasa en poliacrilamida con enlace carboimida (249) y la acetoquinasa y fosfotransacetilasa fueron inmovilizadas en vidrio de poro controlado, el cual fue optimizado para aumentar la cantidad de enzimas inmovilizada por gramo de vidrio poroso. (250)

- f) Se utilizó un sistema inmovilizado en nylon de glucosa-oxidasa-catalasa y lactato-oxidasa-catalasa para la producción de ácido glucónico y pirúvico respectivamente. Los resultados fueron muy favorables, y se obtuvo una conversión de D-glucosa a ác. glucónico de más del 90% de rendimiento y de ácido pirúvico de más del 47%. (251)

8.2. Aplicación de Células Inmovilizadas.

A. Carbohidratos

a) Producción de Jarabes

La aplicación industrial mayor de células inmovilizadas es el uso de la glucosa isomerasa para la producción de jarabes de elevado contenido de fructosa; que comenzó en Japón con la Sanmatsu Kogyo, Co. y en 1966 con la Standard, Brands, Inc.

Actualmente, se usan a nivel comercial la enzima inmovilizada como la célula inmovilizada. Sin embargo, por las ventajas que presentan las células inmovilizadas sobre las enzimas inmovilizadas, como lo es la reducción en los costos de producción hasta de un 40%, por ahorro en mano de obra y concentración catalítica por litro de reactor,

la industria se está inclinando por el uso de células inmovilizadas (238)

b) Hidrólisis de Lactosa.

La lactosa es un disacárido que se encuentra en la leche. La industria alimenticia está interesada en su hidrólisis a través de la lactasa debido a la posibilidad de convertir este azúcar relativamente insoluble y de bajo poder - edulcorante en una mezcla de monosacáridos, que no cristalizan y que tienen mayor poder edulcorante, como son la - glucosa y la galactosa.

Las células de Saccharomyces anamensis con actividad de B-galactosidasa fueron inmovilizadas en alginato de Ca^{++} , reteniendo una actividad del 78.6% en relación a las células libres. La temperatura óptima de la actividad de B-galactosidasa inmovilizada varió de 50 a 37°C.

Una nueva especie de L. anamensi que contiene actividad de B-galactosidasa, fue inmovilizada con éxito en agar. La actividad recobrada cuando se usó 2.5% de agar para - la inmovilización fue de 68.6% en relación con las - - células libres (253)

Actualmente existe un sistema que reduce el costo de - hidrólisis del suero en 0.5 centavos de dólar/libra de suero, en relación a un proceso convencional. La hidrólisis se lleva a cabo en pocos minutos y el tamaño de la planta es mucho menor (254)

B. Aminoácidos

a) Producción de Ac. L-aspártico

El ácido aspártico es ampliamente usado, no sólo en medicinas, sino como aditivo de alimentos. Recientemente, el aspartamo, un dipéptido del ácido aspártico y metilester de L-fenilalanina, fue comercializado como un edulcorante sintético de bajas calorías. Debido a esto la demanda de ácido L-aspártico está incrementándose, ya que -- viene a ser materia prima para la síntesis del dipéptido.

El ácido aspártico ha sido producido industrialmente por Tanabe Seiyaku Co., Ltd., a través de una reacción estacionaria, usando células intactas de E. coli con elevada actividad de aspartasa. Sin embargo, el proceso tuvo desventajas a nivel industrial porque un proceso estacionario implica incubación de la mezcla que contiene el sustrato y la célula o enzima microbiana.

En 1973 se obtuvo con éxito la industrialización de un -
proceso continuo que utiliza un sistema de células micro-
bianas inmovilizadas. (255)

El proceso actual utiliza la mutante EAPC-7, derivada de
E. coli 11303, con actividad elevada de aspartasa inmovi-
lizada en capa-carragenina.

Fue necesario estudiar un método para eliminar la activi-
dad de fumarasa, presente en esta mutante. Se encontró -
que el mejor método es poner las células inmovilizadas -
en un medio que contenga 50mM de ácido aspártico a 45°C
durante 1 hora. Se observó que la actividad de fumarasa
fue totalmente eliminada sin inactivación de la aspartasa.

La productividad (g/h/l) de la preparación inmovilizada
de las células de EAPC-7, de ác. L-aspártico fue seis
veces mayor que la presentada por las células "padres"
(236)

b) Producción de L-arginina.

El sistema inmovilizado de células viables inmovilizadas
de Serratia marcescens fue aplicado a la producción de -
L-arginina. Se observó que la limitación en la difusión -
del oxígeno a través del gel, afectaba la productividad,

por lo que se inyectó oxígeno puro al sistema y se controló el pH. Se obtuvo una elevada productividad, así como estabilidad operacional elevada, por lo cual se sugiere como un buen sistema de ser aplicado a nivel industrial (221)

c) Síntesis de Alanina.

Se inmovilizaron células viables y no viables de Corynebacterium dismutans en gel de poliacrilamida. La síntesis de aminoácidos fue predominante para alanina (85%) y el restante 15% de la síntesis correspondió a ác. aspártico y ác. glutámico (257)

C. Acidos.

a) Acido Glucónico.

El ác. glucónico y sus derivados tienen un amplio uso en la industria alimenticia y farmacéutica y en compuestos de limpieza.

El ácido glucónico ha sido convencionalmente producido a escala industrial por fermentación estacionaria por el hongo Aspergillus niger (258)

Este proceso es eficiente, pero requiere de control de pH que resulta en la formación de sales del ácido glucónico. El ácido debe por tanto ser separado de sus sales, por lo que se incrementa el costo del proceso.

Otra alternativa podría ser el uso de Gluconobacter oxydans, que también ha sido aplicado a la manufactura del ác. glucónico. Este microorganismo es capaz de producir ác. glucónico a valores muy bajos de pH y por lo tanto no es necesario un proceso de neutralización del producto final. Sin embargo, los gluconatos formados en la fermentación de G. oxydans son frecuentemente oxidados a ácidos cetoglucónicos que deben ser removidos del producto final (259)

La inmovilización se presenta como un método atractivo para obtener elevadas concentraciones celulares, con el fin de obtener oxidación rápida de glucosa. Las células vivas de G. oxydans fueron inmovilizadas en un soporte de nylon fibroso. El ác. glucónico libre fue continuamente producido en un reactor tubular de células inmovilizadas durante 6 meses, con una productividad volumétrica de 5g/l /h con 100 g/l de glucosa, como sustrato y a concentraciones de 80 g/l de ác. glucónico (260)

b) Acido Itacónico.

El ác. itacónico es usado en la manufactura de resina de poliéster o plástico y viene a ser un sustituto del ác. acrílico.

Las células vivas de Aspergillus terreus fueron atrapadas en gel de poliacrilamida. Se usó un reactor continuo, donde se obtuvo un rendimiento máximo de 60 mg/h/40 g. de gel. La vida media del catalizador fue de 10 días. (261)

c) Acido Maleico

Para la producción de ác. maleico se inmovilizó Brevibacterium flavum con capa-carragenina y se elevó la estabilidad de la actividad de fumarasa al añadir un polímero policatiónico (tanino).

La producción de ác. L-maleico en estas condiciones fue de 42.2 Kg/l . por columna de 1,000 l . y se incrementó en 3 veces en comparación del B. flavum inmovilizado -- únicamente con capa-carragenina, y en 25 veces más que el P. ammoniageres inmovilizado en poliacrilamida. (262)

d) Acido Corísmico.

El corismato, uno de los intermediarios clave de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, es excretado por la mutante Enterobacter aerogenes 62-1. Se ha demostrado - que la bacteria inmovilizada en gel de poliacrilamida - acumula ácido corísmico en cantidades comparables a las obtenidas en células libres. La biosíntesis consiste en una reacción compuesta de 20 pasos enzimáticos. (263)

e) L-Cetoácidos.

Recientemente ha habido un gran interés en el uso potencial de los L-cetoácidos para el tratamiento de uremia crónica.

La síntesis química no es posible desde el punto de vista comercial, por lo complejo del proceso de síntesis, por lo que se ha pensado que un método prometedor es la producción de L-cetoácidos por medio de amino-oxidasas, que transforman los aminoácidos a los correspondientes cetoácidos. El costo actual de las oxidasas disponibles provenientes de fuente animal (riñón de cerdo, veneno de víbora) es elevado, por lo cual se pretende usar una fuente microbiana como fuente de amino-oxidasas.

Las células de Providencia sp. PCM 1298 fueron inmovilizadas en alginato de calcio y formaron 80 mg. de ác. --- L-ceto-alfa y metrolbutírico a partir de L-metionina por g de gel de preparación. La productividad dependió directamente del tamaño de las partículas de gel, ya que se observó limitación en la transferencia de oxígeno.

El decremento en la actividad de la L-aminoácido-oxidasa durante la operación, fue compensado por reincubación de las células inmovilizadas en medio fresco de crecimiento, lo cual hizo posible el uso del sistema por un mes. (264)

f) Acido Acético

El vinagre ha sido producido desde el siglo XVII por el llamado "proceso rápido", que es el proceso más antiguo a base de células viables inmovilizadas naturalmente. Sin embargo, actualmente se pretende reemplazar este sistema con metodologías nuevas.

Las células de Acetobacter aceti fueron inmovilizadas en capa-carragenina y fueron colocadas en un reactor de -- lecho fluidizado. Al cabo de 2 días, el número de células en el gel alcanzó 100 veces el número inicial, en un medio de crecimiento. Fueron trasladadas a un medio de producción, obteniéndose la máxima actividad de pro-

ducción de ác. acético de 40 mg/ml de gel/l con suministro de oxígeno puro. Se observó que el oxígeno fue el factor limitante para el crecimiento y producción de las células (265)

Por otra parte, las células de Acetobacter acetii fueron absorbidas en cilindros de cerámica porosa comercial. La capacidad máxima de retención fue de 2.5 mg de biomasa (p.s.) por gramo de cerámica. Se obtuvo una velocidad de producción de ác. acético de 10.4 g/l/h con suministro de oxígeno puro. (266)

g) Producción de Acido Cítrico

Las funciones típicas del ác. cítrico en la industria de los alimentos es la de ser amortiguador de pH, sinérgico con los antioxidantes, prevenir las reacciones de oscurecimiento, saborizante e inhibidor del crecimiento microbiano.

Se inmovilizaron las células de Saccharomycopsis lipolytica en gel de poliacrilamida. El proceso de inmovilización no causó un decremento en la actividad, y la velocidad de producción fue de 50 mg/l/h. La producción de ác. cítrico fue de 38 g/l, representando un rendimiento de 51% (p/p) basado en la utilización de glucosa.

En comparación con las células libres, se observó que la velocidad de producción en las células inmovilizadas es menor y se ha sugerido que esto puede ser debido a la diferencia de condiciones fisicoquímicas que rodean a la célula (267)

h) Producción de Acido Láctico

El ác. láctico tiene una gran gama de aplicaciones en la industria de los alimentos. Aún más, la producción biotécnica de ác. láctico podría ser un alimentador potencial para la síntesis química vía lactonitrilo y para los polímeros de lactida.

Las bacterias productoras de ác. láctico no producen CO_2 , por lo que el carbono es más eficientemente utilizado en la fermentación de ácido láctico que en la fermentación de etanol.

Las células vivas de Lactobacillus delbrueckii fueron atrapadas en esferas de alginato de calcio. El rendimiento máximo obtenido de ácido láctico fue de 97%, del cual más del 90% correspondió a ác. L-láctico.

La vida media del catalizador en operación continua fue de 100 días y se perdió únicamente 10% de la actividad durante el almacenamiento del biocatalizador en el biorreactor a 7°C durante 5 meses (268)

Asimismo, se ha estudiado la posibilidad de usar el suero del queso, como sustrato de la fermentación, ya que es un subproducto del que se producen a nivel mundial 4×10^{10} Kg por la industria quesera y del cual se desecha más de la mitad. Para ello, las células de Lactobacillus bulgaricus fueron inmovilizadas en un biorreactor de fibra hueca. Se bombeó un permeato de suero conteniendo 46 g/l de lactosa suplementada con 10 g/l de extracto de levadura a una velocidad de 0.2-2.5/h. La productividad, a una concentración celular de 100 g/l, fue de 1.5 a 5 g de ácido láctico por litro por hora (269)

i) Producción de ácidos L,W-dodecanoico y L,W-tridecanoico.

Las células de la mutante 576 derivada de la cepa Candida tropicalis 1230 fueron inmovilizadas en capa-carragenina. Se observó que la producción de los 2 ácidos estuvo en función del tiempo de incubación (193)

D. Antibióticos.

a) Producción de Nikomicina.

El antibiótico nikomicina es producido por el micelio de Streptomyces tendae Tu 901 inmovilizado en alginato de calcio, tanto en forma continua como estacionaria. Se observó que la velocidad de producción se incrementó linealmente con el incremento en la velocidad del flujo del medio de cultivo. La adición de L-isoleucina L-leucina incrementaron significativamente la velocidad de producción. (270)

b) Producción de ác. 6-aminopenicilínico.

El ác. 6-aminopenicilínico es precursor en la síntesis de antibióticos semisintético. Las células de E. coli conteniendo la enzima penicilín-aminohidrolasa (EC3.5.1.11) fueron inmovilizadas en la superficie modificada de un copolímero macroporoso, obteniéndose buenos resultados en la actividad de la enzima.

Las células pudieron ser usadas también en varias conversiones de bencilpenicilina a 6-APA en un reactor de tanque agitado (271)

c) Producción de Rifampicina.

La rifampicina B es un antibiótico producido por Nocardia mediterranei. Puede ser degradado por una simple serie de reacciones químicas (oxidación e hidrólisis) a rifampicina S, que ha servido como un intermedio importante para la producción a gran escala de derivados semisintéticos.

El derivado más importante es rifampicina con un amplio espectro y uso terapéutico particular para el tratamiento de tuberculosis.

La rifampicina S ha sido convencionalmente preparada de la rifampicina B, por método químico. La conversión química de rifampicina B a rifampicina S, sin embargo, requiere de un sistema de solventes orgánicos, oxidantes artificiales y condiciones fuertemente ácidas, lo que resulta en rendimientos no satisfactorios.

Es por ello que la biotransformación presenta mejores ventajas que el proceso químico convencional. Se basa en las siguientes reacciones:



Rifampicina S

Las células de Mucicola sp. ATCC 20620 con actividad de rifampicinooxidasa se inmovilizaron por copolimerización con acrilamida. La célula completa fue desengrasada con tratamiento con acetona para reducir la resistencia difusional a través de la membrana celular. La recuperación de la actividad enzimática después de inmovilización fue de 50%.

Se piensa que pueda ser una ruta con potencial de ser usada a nivel industrial. (272)

Se usó un sistema continuo de producción de rifampicina B, el cual dio un incremento de 22 a 30 veces del obtenido en un sistema comparable de forma estacionaria. -- Esta alta productividad se debió a una elevada densidad celular de 550 g/l (272 a)

d) Producción de Patulina

La patulina es un antibiótico potente que ha ido ganando

prestigio en el mercado.

Las esporas de Penicillium urticae fueron inmovilizadas en capa-carragenina y fueron puestas a germinar " in situ " por incubación en un medio de cultivo.

La producción de antibiótico fue llevada a cabo en un fermentador continuo de tanque agitado. Se observó que si en el medio de cultivo hay presencia de una fuente de nitrógeno, como puede ser el extracto de levadura, la producción de patulina se prolonga hasta las 440 -- horas. (199)

E. Vitamina B₁₂

La vitamina B₁₂, el compuesto orgánico más complicado no polimérico de estructura conocido en la naturaleza, tiene una gran cantidad de aplicaciones en el campo de la medicina, así como en la nutrición humana y animal.

Actualmente la producción de B₁₂ por método químico es imposible y sólo se produce por fermentación (273). Las células de Propionibacterium sp. AKU 1251 fueron inmovilizadas, en estado viable, en alginato de calcio.

La producción de B₁₂ y el crecimiento de las células inmovilizadas pudo ser incrementado por incubación en un medio que contenía elevadas concentraciones de fuentes de carbón y nitrógeno.

La presencia de precursores de la B₁₂, como el sulfato -- cobaltoso y el 5,6 dimetil bencilimidazol, junto con el -- surfactante Tween 80, aumentaron notablemente la producción de B₁₂, alcanzando un rendimiento de 20 mg/l de medio (224)

F. Solventes.

a) Fermentación Acetona/Butanol.

Se inmovilizaron las células de Clostridium acetobutylicum en alginato de calcio y se usó un sistema simple continuo que fue alimentado con un medio de glucosa -- que soporta la fermentación acetona-butanol, pero que impide el crecimiento microbiano. Usando esta técnica, la relación biomasa/butanol fue reducida a 2% (p/p) -- comparada al 34% que se tenía en cultivo tradicional -- estacionario.

En estado estacionario, el butanol fue el mayor producto final con un coeficiente de rendimiento de 0.20 -- (g/g glucosa).

La productividad de butanol fue de 16.8 g/l -día en estas condiciones.(209)

Por otro lado, se inmovilizaron células vegetativas y esporas de Clostridium acetobutylicum en alginato de calcio. Se usó un sistema continuo.

El rendimiento de butanol obtenido con células vegetativas fue de 17.6% (p/p) de la glucosa consumida y el rendimiento de acetona fue del 3.9%.

Con esporas el rendimiento de butanol fue de 20.9% y el de acetona fue de 4%.

La productividad de butanol en ambos casos fue mayor a la obtenida en proceso estacionario tradicional.(221)

b) Producción de Etanol.

En las pasadas décadas, ante la creciente consternación por la crisis mundial de petroquímicos, se han planteado, investigadores e industriales, alternativas energé-

ticas con fundamento en el uso de fuentes renovables para la producción de energéticos.

Tal es la producción de etanol por medio de procesos biotecnológicos, con particular interés de ser usado como fuente combustible de vehículos.(145)

Existe gran cantidad de reportes de producción de etanol por medio de células inmovilizadas. Cabe mencionar que con el fin de maximizar la productividad de etanol para un sistema dado de biorreactor, se deben considerar los siguientes parámetros:(274)

- 1.- Minimizar los problemas de limitación de transferencia de masa para la glucosa, el etanol y el CO_2 dentro de las partículas, por formación estructural de esferas estables de pequeño diámetro.
- 2.- El uso de esferas pequeñas como soporte de inmovilización proveen también de áreas interfaciales -- entre sólido y líquido por unidad de volumen del biorreactor disponible para la transferencia de -- masa de sustratos y productos.
- 3.- Se debe maximizar la concentración celular dentro de las partículas de gel, sin sacrificar su estabilidad estructural por formación excesiva de CO_2

dentro de las partículas.

- 4.- Ya que se pretende aminorar la limitación de transferencia de masa, así como aumentar la cantidad de células inmovilizadas, resulta en la obtención de elevadas velocidades de consumo de glucosa y de producción de etanol.

Tomando estas consideraciones, se inmovilizaron células de Zymomonas mobilis en alginato de calcio. Una combinación de tamaño pequeño de partícula con una concentración elevada de células, 58 g de células secas por litro de esferas de alginato, dio elevadas productividades que fluctuaron entre 102 a 116 g etanol/l/h, en un reactor de nuevo diseño de lecho empacado. (220)

Se reportó la producción comparada de etanol utilizando células inmovilizadas de Sacchromyces bayorus contra un sistema inmovilizado de Zymomonas mobilis. La productividad de este último fue mayor que el sistema de levaduras inmovilizadas. Con una velocidad de flujo de 120 ml. h⁻¹ la bacteria produjo 9.96 g de etanol/h, mientras -- que la levadura sólo formó 4.8 g etanol/h. (195)

Las células de Zymomonas mobilis fueron atrapadas en capa-carragenina y tuvieron una capacidad de convertir

glucosa a etanol del 93% del rendimiento teórico. El sistema inmovilizado funcionó por varias semanas y se observó que el gel de carragenina aparentemente facilita la -- difusión de la glucosa y el etanol.

Se hizo una evaluación económica del proceso y se obtuvo que el sistema inmovilizado de células en forma continua, reduce el costo del etanol en 4 centavos de dólar por -- litro, en comparación con el sistema estacionario convencional. Las Tablas XXVI y XXVII presentan una comparación de la inversión de capital fijo y costo de producción de etanol en los dos sistemas. (79)

Otro reporte de etanol fue el llevado a cabo con células inmovilizadas de S. cerevisiae donde la fermentación se llevó a cabo con una alimentación bajo presión del sustrato al interior de las células. (275)

Se inmovilizó S. cerevisiae en diversas resinas de intercambio iónico, obteniéndose elevada productividad que varió de 53.1 a 62.0 g etanol/l.h.. (150)

Otros reportes son: la inmovilización de Z. mobilis por adsorción iónica (276); la producción de etanol por -- S. bayanus inmovilizada (277); la producción de etanol por S. cerevisiae inmovilizada en alginato (278); inmo-

TABLA XXVI
 COMPARACION ENTRE LA INVERSION DE CAPITAL FIJO DEL
 SISTEMA INMOVILIZADO Y EL SISTEMA ESTACIONARIO CONVENCIONAL

	Inversión de Capital Fijo (Dolares Americanos)	
	Sistema Inmovilizado	Sistema Estacionario
Esterilización	1,680,000	1,680,000
Destilación	2,322,400	2,322,400
Fermentación	1,556,000	18,316,800
Almacenamiento	1,781,000	1,781,000
Recobro biomasa*	No aplicable	960,000
T O T A L	7,339,400	25,060,200

Luong, J.H.T. et al. 1984 (79)

* Se requiere de 2 secadores (con velocidad de remoción de agua de 3,700 kg/L) para secar la biomasa. Asimismo, - se usa una centrifuga (de capacidad de 68,000 Kg/L) - para separar las células microbianas del medio de cultivo.

TABLA XXVII
 COSTO DE PRODUCCION DE ETANOL
 INMOVILIZADO CONTRA ESTACIONARIO

<u>Costo Producción (centavos dolar/litro)</u>		
	<u>Inmovilizado</u>	<u>Estacionario</u>
Esterilización	0.43	0.43
Destilación	1.59	1.59
Fermentación	0.29	3.73
Almacenamiento	0.35	0.35
Recobro biomasa	----	0.53
T O T A L	2.66	6.63

Luong, J.H.T. et al. 1984 (79)

vilización de Kluyveromyces marxianus en alginato de sodio y carragenina, teniendo como sustrato suero de leche para la fermentación alcohólica (279); células viables de Kluyveromyces fragilis atrapadas en alginato de calcio con un resultado del 90% de conversión de azúcares (lactosa) a etanol (222); y células de Saccharomyces uvarum inmovilizadas en una estructura porosa de alginato, lo cual elevó notablemente la -- productividad del proceso. (280)

G. Esteroides y Alcaloides.

a) Esteroides (281)

La disminución en el suplemento de materias primas para esteroides y un incremento en la demanda de agentes -- antiinflamatorios, contraceptivos y hormonas sexuales, ha traído como consecuencia el desarrollo de fuentes -- alternativas de esteroides, así como nuevos métodos de modificación de esteroides.

Estos métodos pueden ser divididos en síntesis química o modificación de los esteroides encontrados de forma natural.

La síntesis química tiene la desventaja que involucra gran número de pasos, así como la aparición de gran número de isómeros. El problema se vuelve mayor cuando se tiene que resolver las mezclas racémicas.

La transformación de esteroides, que se dan de forma natural, como la diosgenina; o esteroides de plantas, como el stigmasterol o colesterol, a productos farmacéuticos, puede ser llevada a cabo por métodos enzimáticos o microbiológicos, usando enzimas o células libres o enzimas o células inmovilizadas.

Dependiendo del tipo de transformación del esteroide, el proceso va a estar gobernado por una sola enzima o multiplicidad de enzimas. Estas enzimas pueden ser inducidas o constitutivas.

Algunas transformaciones de esteroides requieren de una enzima y un cofactor. En la conversión enzimática el cofactor debe ser añadido al sistema.

A continuación se mencionan las desventajas que presenta la transformación de esteroides por enzimas libres e inmovilizadas (281).

- 1.- El aislamiento y purificación generalmente acarrea una disminución en la actividad enzimática.
- 2.- La reacción no puede proceder si no se tiene un gran aceptor de electrones.
- 3.- Se requiere de un sistema especial para regenerar el cofactor.
- 4.- La enzima inmovilizada no tiene la suficiente actividad necesaria.

Los problemas encontrados en sistemas de células libres son:

- 1.- Baja solubilidad del sustrato.
- 2.- Toxicidad del solvente.
- 3.- Baja productividad por llevarse a cabo en sistema estacionario.

Por lo anterior, se propone el uso de células inmovilizadas en la producción y transformación de esteroides.

Las células de Arthrobacter simplex conteniendo actividad de -dehidrogenasa, fueron permeabilizadas con acetona e inmovilizadas en prepolímeros de uretano. Se observó que la actividad de las células inmovilizadas se mantuvo elevada aún con la presencia elevada de metanol (30%) en el sistema, en comparación con las células libres que fueron inhibidas drásticamente.

La vida media de las células libres en el sistema fue de 2.6 hrs. mientras que la de las células atrapadas - fue de 11 hrs. (282)

Se llevó a cabo la 11 -hidroxilación de progesterona con esporas de Rhizopus stolonifer inmovilizadas en - resinas de prepolímeros de foto entrecruzamiento. Se - obtuvo una excelente estabilidad de operación con res- pecto al micelio libre (182)

Así mismo, se hizo una comparación de las caracterís- ticas de la actividad 3 cetoesteroide- '- de hidroge- nasa de las células de Arthrobacter globiformis inmovi- lizado por diferentes métodos (283)

b) Alcaloides.

Al igual que los esteroides, la producción de alcaloides por métodos no convencionales ha tomado gran importancia.

Tal es el caso de los alcaloides de ergotina, producidos por diferentes especies de pirenomicetes de - - - Claviceps, que son metabolitos secundarios de excepcional interés farmacéutico. El 95% de la producción mundial, es obtenida por la extracción de la esclerotia de Claviceps purpurea, el cual es preparado a nivel del campo, mientras que la aplicación industrial de cultivos saprófitos en fermentadores está apenas empezando.

El micelio de Claviceps purpurea fue inmovilizado en alginato de calcio a 2%, 4% y 8%.

La producción de alcaloide, en células libres declinó a los 60 días, mientras que en las células inmovilizadas, se obtuvo una producción constante durante 200 días.

Los mejores rendimientos del ergopéptido de ergometrina fueron alcanzados cuando se uso 4% de gel para la inmovilización, mientras que el uso de 8% de gel para inmovilizar causa una inclinación hacia la biosíntesis de clavina. (284,229)

En la Fig. 2 aparece una relación biosintética de los alcaloides investigados producidos por Claviceps purpurea (285).

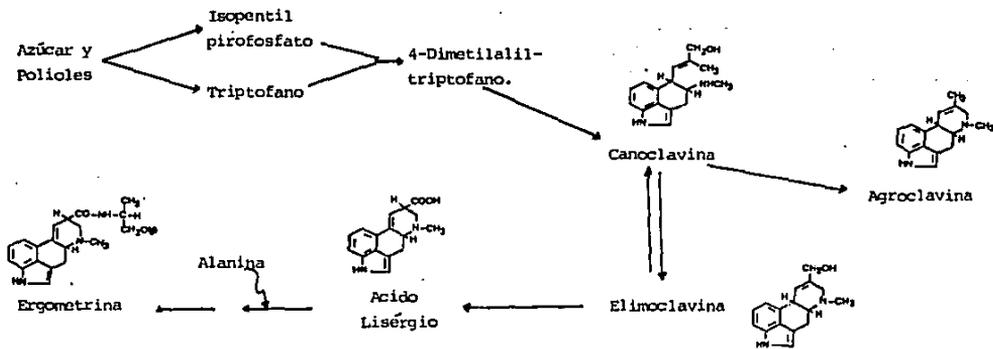


FIG. 2 RELACION BIOSINTETICA DE LOS ALCALOIDES PRODUCIDOS POR Claviceps purpurea CBS 164.59

Rehacek, Z. 1980 (285)

II. Productos de Células Vegetales

El uso de plantas para la producción de bioquímicos representa una nueva área en la exploración biotecnológica. - - Muchas especies de plantas producen compuestos o mezclas - de compuestos que son beneficios para el hombre. Las propiedades medicinales de ciertas plantas, principalmente de -- origen tropical y subtropical, ha sido reconocido desde -- miles de años. Los principios activos de estas especies de plantas, son alcaloides u otros compuestos con moléculas - muy complejas que son imposibles ó imprácticos de sintetizar.

Las plantas también son fuente de otros compuestos que no son fáciles de sintetizar, debido a su formulación compleja como son fragancias y sabores. Las plantas también producen agroquímicos como insecticidas y fungicidas así como químicos finos, incluyendo vitamina y enzimas (286) - - - (Tabla XXVIII)

La producción de compuestos de plantas superiores está - encausada al cultivo de planta, con la posterior extracción del material de interés. En general es un proceso - intensivo de trabajo que tiene diversas desventajas como son: el efecto de las restricciones geográficas así como

de las decisiones políticas en materia agrícola. La productividad de estas plantaciones, por otra parte, está sujeta a los factores ambientales así como al crecimiento de plantas parásitas.

Una alternativa atractiva ha sido el desarrollo de cultivo de células de planta aislada que pueden crecer en suspensión ó ser inmovilizadas a un soporte similar, para ser usadas en fermentadores asépticos ó en reactores bioquímicos para el cultivo de los mismos.

En la Tabla XXIX se presentan ejemplos de células vegetales inmovilizadas con su correspondiente producto.

I. Productos de Células Animales.

Las células animales también tienen, al igual que las células vegetales, gran importancia de ser cultivadas para la producción controlada de vacunas virales, proteínas, células y para tratamientos terapéuticos (291). La Fig. 3 representa, un esquema de las razones de cultivo de este tipo de células.

El cultivo de células libres representa algunos problemas que pueden ser solucionados ó reducidos por la inmovilización como son problemas de fragilidad, baja productividad

TABLA XXVIII

GRUPOS DE PRODUCTOS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL DE
PLANTAS SUPERIORES Y ALGUNOS EJEMPLOS ESPECIFICOS.

1.- Medicinas y Farmaceúticos

a) Alcaloides : atropina, cocaína, morfina, nicotina, reserpina, alcaloides, tibocuravina, alcaloides vinca.

b) Glicosteroides: digitoxina, digoxina

2.- Aceite y aromas esenciales

a) Terpenoides : alcanfor, limoneno, mentol, perfumes, vainilla, hierbabuena, especies, incienso.

b) Fenólicos

3.- Aceites vegetales, grasas, latex: aceite de lino, hule, chicla, aceite de jojoba.

4.- Químicos finos y especialidades : enzimas, fungicidas, insecticidas, peptidos, pigmentos, vitaminas.

5.- Biomasa: tabaco, textiles.

TABLE XXIX

CELULAS DE PLANTAS INMOVILIZADAS PARA PRODUCCION DE BIOQUIMICOS

ESPECIE INMOVILIZADA	METODO DE INMOVILIZACION ATRAPAMIENTO EN:	REACCION DE BIOTRANSFORMACION	PRODUCTO	REF.
<u>Digitalis lanata</u>	Alginato	12-B-hidroxilación	Digixina	290
<u>Digitalis lanata</u>	Alginato	12-B-hidroxilación	B-metil-digoxina	290
<u>Digitalis lanata</u>	Alginato	Glicosilación	Purpureaglicésida A	290
<u>Daucus carota</u>	Alginato	5-B-hidroxilación	5-B-hidroxydigitoxigenina	290
<u>Daucus carota</u>	Alginato	5-B-hidroxilación	5-B-hidroxygitoxigenina	290
<u>Catharanthus roseus</u>	Alginato	Reducción del enlace doble	Isómeros de Ajmalacina	290
<u>Merinda citrifolia</u>	Alginato	Reducción del enlace doble	Antraguinonas	286
<u>Glycine max</u>	Fibra hueca	Reducción del enlace doble	Fenólicos	286
<u>Solanum aviculare</u>	Adhesión	Reducción del enlace doble	Esteroides glicoalcaloides	286
<u>Catharanthus roseus</u>	Alginato y agarosa	Deshidrogenación	Isómeros de Ajmalacina	185
<u>Daucus carota</u>	Alginato y agarosa	Deshidrogenación	Isómeros de Ajmalacina	185
<u>Datura innoxia</u>	Alginato y agarosa	Deshidrogenación	Isómeros de Ajmalacina	185
<u>Daucus carota</u>	Alginato	5-B-hidroxilación de la digitoxigenina	Periplogenina	185

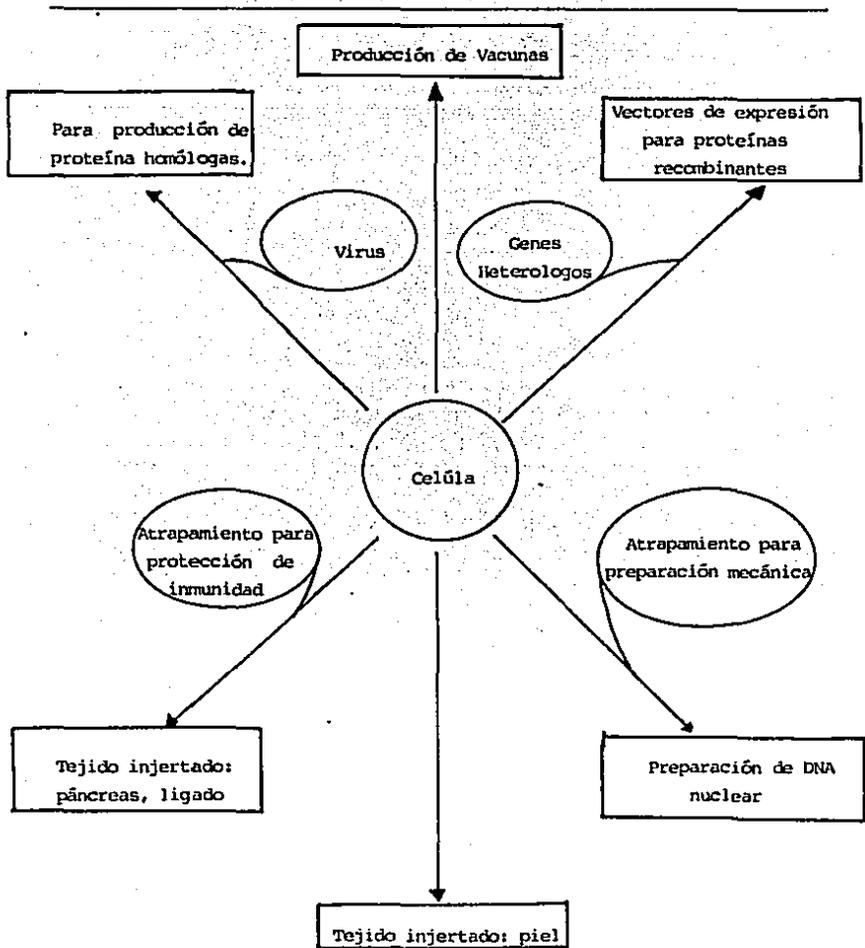


FIG. 3 Razones para Cultivar Células animales

Nilsson , K. 1987 (230)

TABLA XXX
PROBLEMAS EN CULTIVO DE CELULAS ANIMALES
QUE PUEDEN SER RESUELTOS O REDUCIDOS POR LA INMOVILIZACION

PROBLEMA	POSIBLE SOLUCION CON LA INMOVILIZACION
Células frágiles	Protección contra una elongación, dependiendo del método elegido de inmovilización.
Crecimiento lento	Fácil reutilización de las células inmovilizadas.
Productividad baja	Sistema de perfusión que incrementa las densidades celulares. Las células también utilizarán los componentes del medio en un sistema de perfusión.
Dependencia de "anchorage"	El uso de una matriz de inmovilización idónea, elimina las limitaciones en el rendimiento celular debido a un suplemento insuficiente de área superficial apta para el crecimiento celular.

Nilsson, K. 1987 (230)

El cultivo de células libres representa algunos problemas que pueden ser solucionados ó reducidos por la inmovilización como son problemas de fragilidad, baja productividad, etc. La Tabla XXX presenta un resumen de ellos.

Actualmente no hay ningún proceso a nivel industrial que esté utilizando células animales inmovilizadas. (230)

J. Electrodo

Dentro de los usos más destacados que se ha dado a las enzimas y células inmovilizadas es en la construcción de electrodos. (292-295)

a) Sensor de NO_2 (296)

La determinación de NO_2 es importante para el análisis de los procesos ambientales e industriales. El NO_2 se forma durante la combustión de todo tipo de combustibles fósiles. El NO_2 es el más reactivo de los óxidos gaseosos del nitrógeno y es el primer absorbedor de la luz solar en las reacciones atmosféricas fotoquímicas que producen el "smog" fotoquímico.

La determinación actual de NO_2 se lleva a cabo por métodos espectrofotométricos. Sin embargo, estos métodos

son afectados por la turbidez y calor de la muestra así como por la presencia de iones metálicos.

Estos métodos también requieren de largos tiempos de reacción así como de reactivos adicionales. Se construyó un biosensor consistente en una bacteria con actividad nitrato-oxidasa inmovilizada en carbonato de calcio y un electrodo de oxígeno. El tiempo de respuesta para la determinación de NO_2 fue de 3 minutos. Se observó una relación lineal entre el consumo de oxígeno y el decremento de NO_2 . Se calculó un error relativo de $\pm 4\%$.

b) Sensor de sulfito (297)

La determinación de sulfito y dióxido de sulfuro en aguas de desecho y en la atmósfera, es importante en cualquier análisis ambiental.

Debido a que los tejidos de animal y organelos también contienen muchas enzimas que no son producidas por los microorganismos, se constituyó un sensor amperométrico compuesto por partículas de microsomas inmovilizadas; por una membrana permeable de Teflón, permeable al gas; y un electrodo de oxígeno.

La respuesta del sensor se incrementó cuando se aumentó

la cantidad de organelo y se volvió constante cuando se puso 2.7 mg de proteína.

K. Varios

a) Producción de epóxidos

Unas nuevas cepas de bacterias fueron aisladas, encontrándose que llegan a oxidar algunos como eten o propeno ó 1-butino a los respectivos 1,2 epóxidos. Las células fueron inmovilizadas en alginato de calcio y capa-carragenina, después de la inmovilización, retuvieron una de actividad de 60 a 100% para la producción del epóxido. (298)

b) Producción de 2,3 Butanodiol

El 2,3 butanodiol, es fácilmente convertido a butanodieno que es materia prima para el hule sintético. La producción del 2,3 butanodiol por parte de Enterobacter aerogenes, inmovilizado en capa-carragenina, fue lineal en las primeras 30 hrs. de la fermentación, sin embargo, para evitar un decremento en la productividad se usó un sistema continuo (reactor de columna), donde se obtuvo una velocidad constante de producción de 3 mg/ml de 2,3 butanodiol. (299)

c) Recuperación de Uranio

El uranio es considerado por las políticas ecologistas - como un contaminante de ahí la importancia de recuperar lo así como su utilización como materia prima de procesos industriales.

Se inmovilizaron células de Streptomyces veridochromogenes y Chlorella regularis, en gel de poliacrilamida, las cuales presentaron mayor capacidad de absorción -- que las células libres, así como buenas propiedades -- mecánicas al ser aplicadas a un sistema de columna.

La recuperación de uranio en agua de mar por parte de las células de Chlorella fue de un 100% durante la -- primera pasada a través de la columna; en el caso de las células inmovilizadas de Streptomyces fue de un 80% después de cuatro pasadas a través de la columna (300)

d) Degradación de Fenol

Las células de Pseudomonas sp. fueron inmovilizadas en alginato y poliacrilamida. Las células inmovilizadas - tienen capacidad para degradar fenol a una concentración inicial de 2g-l medio, en menos de dos días mien-

tras que las células libres no crecen a estas concentra ciones. Por lo que se concluyó, que los materiales de inmovilización, actuaran como agentes protectores en contra del fenol. Se obtuvieron mejores resultados con poliacrilamida que con alginato (172)

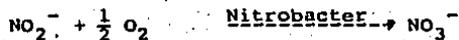
e) Remoción de compuestos nitrogenados de Aguas de Residuales

Las células de Nitrobacter agilis fueron inmovilizadas en alginato de calcio y la preparación resultante fue usada como catalizador para la oxidación de iones nitrito a nitrato.

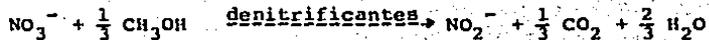
La influencia de pH, T, tamaño y capacidad de las particulas del biocatalizador fueron determinadas, así como la estabilidad operacional y de almacenaje. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para la inmovilización de Nitrosomonas europaea. Se concluyó, por las características encontradas, que estos dos microorganismos pueden ser integrados para su uso. (226) En la Fig. 4 se presenta el proceso de degradación de nitrógeno.

f) Producción de Hidrógeno y Amoníaco

Ante la crisis mundial de energéticos, se han acelerado los procesos de producción de hidrógeno y amonio, como



Bacterias



Bacterias

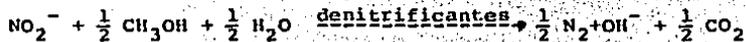


FIG. 4 Representación del Proceso de Degradación de Nitrógeno

Tramper, J. et al. 1986. (226)

posibles fuentes de energía del futuro (301)

La producción de hidrógeno ha sido llevada a cabo con células inmovilizadas de Clostridium butyricum en filtro de acetilcelulosa. Los resultados fueron mejores a los obtenidos por otros métodos de inmovilización. (302)

La producción de amoníaco ha sido obtenida, mediante el uso de células inmovilizadas de Anabaena ATCC 27893 en alginato de calcio (207), así como por células inmovilizadas de Anabaena cylindrica en alginato de calcio, donde se observó que la adición de nitrito incrementa la producción de amoníaco (303)

g) Producción de Glicerol

Se reportó la producción de glicerol, utilizando células inmovilizadas de Pichia farinosa en alginato de sodio y capa-carragenina. Se obtuvo una velocidad de producción de glicerol de 0.07 g/l /h y una concentración de 13.5 g/l (304)

Asimismo se inmovilizó el alga marina, Danatulla tertiolecta en alginato de calcio, obteniéndose una producción máxima de glicerol de 5 g/l (305)

h) Hidrólisis de d,L-mentilacetato.

Las células de Bacillus subtilis fueron inmovilizadas en espuma de poliuretano para hidrólisis del acetato . La actividad enzimática decreció, cuando se aumentó el número de células inmovilizadas por g de poliuretano . Se observó que la vida media aumentó 66 veces en relación a la de las bacterias libres (306)

i) Producción de Acrilamida.

Las células de Brevibacterium sp. fueron inmovilizadas en un reactor de fibra hueca, para la producción continua de acrilamida. La productividad volumétrica del reactor fue de 88 g/l/h. (307)

CAPITULO IX
POTENCIAL DE APLICACION DE BIOCATALIZADORES
EN MEXICO

10.1 Panorama Nacional de la Industria Enzimática.

Actualmente la industria nacional se encuentra a un nivel de subdesarrollo, como lo comprueba la gran cantidad de importaciones que se realizan cada año, siendo las principales enzimas importadas la pancreatina, la diastasa y la amilasa bacteriana (Ver Tabla XXXI). Las principales compañías importadoras se encuentran en la Tabla XXXII. Como se aprecia, estas compañías importadoras son, a su vez, las empresas productoras de ciertas enzimas, como ENMEX, que produce amilasas, proteasas y sustitutos de renina, lo cual implica que no existe un mercado nacional que satisfaga las necesidades de la industria. Además, cabe aclarar que muchas de estas empresas productoras cuentan con la participación de empresas extranjeras, lo que limita que la tecnología de producción no sea desarrollada a nivel nacional, sino únicamente aplicada.

El uso de las enzimas en México está limitado a la industria del almidón, detergentes y la quesera, cuando es aplicable a los procesos que ya se tienen funcionando, ya que por la situación económica que prevalece en el país, las industrias no quieren arriesgarse a cambiar un método químico por uno enzimático, el cual puede depender en último caso de la necesidad de la importancia del catalizador. (308)

Es, por tanto, necesario que se hagan estudios profundos de mercado para determinar la aplicación de enzimas a -- nivel industrial, que dé como resultado un proceso económicamente rentable para desarrollar las tecnologías adecuadas para México y en México.

Para desarrollar y aplicar estas tecnologías nacionales, se requiere de la vinculación de esfuerzos entre los institutos de investigación y apoyo científico nacionales, junto con la industria. De no ser así, los proyectos que darán sin dar fruto alguno. (309)

En cuanto al mercado exportador (Ver Tabla XXXIII), es -- mínimo, y la competitividad con respecto a los consorcios internacionales (Miles, Pfizer, etc) es mínima. Sin embargo, cabe la posibilidad de que si se desarrollan las tecnologías adecuadas a nivel nacional, dada la situación -- económica mundial, el mercado nacional será competitivo por tener un menor precio.

10.2. Potencial de Aplicación de la Actividad Enzimática en México.

La aplicación de la actividad enzimática a nivel nacional, dependerá de:

- 1.- Si se cuenta con la tecnología de producción de la enzima libre.
- 2.- Si se cuenta con la metodología adecuada de inmovilización, en la que se requiere que la enzima mantenga una elevada actividad, estabilidad mecánica, etc.
- 3.- Si existe un proceso industrial adaptado para usar esta tecnología.
- 4.- Comprobar que económicamente es rentable.

Es, por tanto, necesario, como ya se había mencionado, que exista una estrecha comunicación entre lo que necesita la industria y lo que necesitan desarrollar (tecnología, métodos, etc.) los institutos de investigación.

Por lo tanto, la aplicación de la actividad enzimática en México, depende de la consolidación de una tecnología enzimática desarrollada y aplicada a nivel nacional.

En cuanto al uso de enzimas o células inmovilizadas, se piensa que será a un mediano o largo plazo, ya que primero se tiene que consolidar la tecnología de enzimas libres aplicables a nivel industrial. (310)

TABLA XXXI
IMPORTACIONES POR PRODUCTO

PRODUCTO	1978 Kg	1979 Kg	1980-81 (Ene-Dic)	1981-82 (Ene-Dic)	1982-83 (Ene-Dic)	1983-84 (Ene-Mar)	TOTAL DE KG 1978-84
Hialuronidasa		15		623	624	2	1,264
Papaína		16,804	9,756	27,015	11,150		64,725
Amilasa no bacteriana		66	295	2,051	999		3,411
Pepsina		2,979	771	8,450	14,654	425	27,288
Tripsina		19	30	6,047	5,514	3	11,613
Cloruro de Lisozima		13	18,149	16	10	8	18,196
Quimotripsina		8	1	15	11	3	38
Pancreatina		987,069	7,739	35,794	27,825	5,476	1,063,903
Extracto de Cuajo		522	602	70		5	1,199
Diastasa de Asp. <u>orizae</u>		6,392	2,426	38,866	39,741	5,970	115,235
Celulasa		2,649	731	31,996	5,162	236	40,774
Amilasa Bacteriana	20,322	22,879	12,245	69,951	24,592	700	150,689
Mezclas crudas de:							
- Tripsina							2,902
- Quimotripsina		2,902					
Invertasa	3,061	1,786	1,510	7,067	4,433	630	18,487
Bromelina	1,099	2,114	994	2,436	3,332	665	10,640
Mezclas de:							
- Proteasas							46,721
- B-amilasas	2,536	377	40	22,168	21,600		
Serratio Peptidasa	53,012	2					53,014
Las Demás		23,589	3,579		10,406	8,302	45,876
Proteasas	3,336	6,403	110	5,460	5,700		21,009
Sin descripción			5	16,048	7,520		23,573
Preparación de:							
- Enzimas proteolíticas				1,090			1,090
Enzimas Pectolíticas				775	551	104	1,430
Peptidasas				119	330	1,312	1,761
Papaína grado farmacia				701	3,054		3,755
Fibrinucleasa				141	111		252

Fuente: Instituto Mexicano de Comercio Exterior

TABLA XXXII
PRINCIPALES IMPORTADORES

PANCREATINA:

- * Merck-México, S.A.
- * Lab. Kriya
- * Zon. Farmacéutica
- * Ciba-Geigy Mexicana, S.A. de C.V.
- * Representaciones Universales de Especialidades Farmacéuticas, S.A.
- * The Sydney Ross, Co. S.A.
- * Lab. Lepetit de México, S.A.
- * Organon Mexicana
- * Dronex, S.A.

DIASTASA DE Aspergillus orizae:

- * Enzimas y Productos Químicos, S.A.
- * ENMEX, S.A. de C.V.
- * Probst, S.A.

AMILASA BACTERIANA:

- * ENMEX, S.A. de C.V.
- * Industria Aristides Villalobos Ruiz

ENZIMAS PARA USO FARMACEUTICO:

- * Proquifim Dir. Opoterápicos
- * Cía. Medicinal La Campana, S.A. de C.V.

PROTEASAS:

- * Glucosa, S.A.
- * ENMEX
- * Lab. Takeda de México (Amilasas)

EXTRACTO ENZIMATICO DEL CUAJO:

- * Lab. Takeda de México, S.A. de C.V.
- * Mexicana de Alcaloides
- * ENMEX
- * Harmann y Reiner, S.A.
- * Farmacéuticos Lakeside, S.A.

ENZIMAS, excepto para uso FARMACEUTICO o ALIMENTICIO:

- * Farmacéuticos Lakeside, S.A.

LAS DEMAS o SIN DESCRIPCION:

- * Química Knoll
- * Glucosa, S.A.
- * ENMEX
- * Farmacéuticos Lakeside, S.A.
- * Lab. Takeda de México, S.A. de C.V.

Fuente: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial

TABLA XXXIII
EXPORTACIONES POR PRODUCTO

PRODUCTO	1978 Kg	1979 Kg	1980-81 (ENE-DIC)	1981-82 (ENE-DIC)	1982-83 (ENE-DIC)	1983-84 (ENE-DIC)	TOTAL 1978-84
Concentrados del Cuajo	46		6,847	892	9,257		17,042
Amilasas	21,632	4,610	3,297	33	28,503	46,584	104,659
Proteasas		181	33	4,778		982	5,974
Los demás	3,148	28,831	33,683	51,012	71,224	6,805	194,703

Fuente: Instituto Mexicano de Comercio Exterior

CAPITULO X
CONCLUSIONES

Por lo expuesto en el desarrollo del presente trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Las enzimas, como biocatalizadores, presentan un potencial de aplicación industrial muy grande -- por su elevada especificidad, capacidad-catabólica, mayores rendimientos, etc. en relación a los catalizadores inorgánicos.
- 2.- Actualmente el uso de enzimas microbianas se hace más viable por haber un mejor y más fácil control de la producción y obtención de las mismas, respecto a las enzimas de origen animal y vegetal.
- 3.- Hay una gran variedad de soportes, tanto orgánicos como inorgánicos, sin embargo los más usados a nivel industrial para la inmovilización de enzimas -- han sido las resinas de intercambio iónico; en el caso de células inmovilizadas los soportes usados han sido capa-carragenina y alginatos.
- 4.- La inmovilización de las enzimas solubles, como enzimas inmovilizadas y células inmovilizadas, si trae ventajas, como un mejor rendimiento en la -- producción, por haber mayor concentración de enzimas por volumen de reactor; una mayor estabilidad

de la actividad enzimática a cambios fisicoquímicos; la posibilidad de su reuso; que puede ser usada en procesos continuos y otras tantas mencionadas en los capítulos IV y VI de este trabajo.

Sin embargo, se deben aminorar las desventajas que presenta la inmovilización como son los efectos -- negativos en la transferencia de masa y oxígeno, -- que ocasionan baja en el rendimiento de producción ó una desviación en la ruta metabólica deseada.

- 5.- En sistemas donde sea posible el uso de la actividad enzimática inmovilizada, como enzima ó célula, es más ventajoso el uso de ésta última, como se -- mencionó en el Capítulo VII.

- 6.- El uso y aplicación de biocatalizadores inmovilizados está tomando gran impacto económico. En el campo de los alimentos: con la producción continua de jarabes de elevado contenido de fructosa; la reducción de un 40% en los costos de producción -- por el uso de la glucosa isomerasa inmovilizada con respecto al sistema convencional; la producción continua de L-aminoácidos. En el ramo de la medicina con la producción de esteroides y anti-bióticos; en el área química con la producción de

solventes y en el campo de análisis con el uso de electrodos bioquímicos. Esto denota que en un mediano plazo, el mercado mundial registre una profunda conversión de una industria química a una industria biotecnológica que utilice biocatalizadores inmovilizados.

APENDICE I
BIORREACTORES

A. Clasificación de los Biorreactores

Los biorreactores son los reactores utilizados para los procesos biológicos. Se deben diseñar en base a las características biológicas, los microorganismos ó de las enzimas como son: control óptimo de pH, temperatura, difusión de sustratos, etc. K. Venkatasubramanian (311) clasifica los biorreactores de acuerdo a su modo de operación y a sus características de flujo.

A continuación se describen las características de los principales tipos de biorreactores: (311,312)

a) Reactor Continuo de Tanque Agitado (R.C.T.A.)

Es el reactor más simple; está compuesto por un tanque y un agitador. Como agitador se usa una turbina de - - hélice y una propela. Estas características hacen que el contenido esté perfectamente mezclado.

Este tipo de reactor es muy usado para reacciones que presentan inhibición en su cinética, ya que la velocidad de reacción estará determinada por la composición del medio de salida.

La construcción abierta del RCTA permite el reemplazo rápido del biocatalizador inmovilizado. También facilita el control sencillo de la temperatura y el pH. - Este sistema puede ser sugerido cuando los costos del sustrato no sean elevados y donde se requiera de una productividad estable.

b) Reactor de Lecho Empacado (R.L.E.)

Son los reactores más usados para los sistemas inmovilizados de enzimas y células. En este caso es necesario considerar la caída de presión a través del lecho empacado, que va a depender de la forma y dimensiones de la columna, lo que afecta la velocidad de reacción.

Puede existir un movimiento estable del sustrato a través del biocatalizador inmovilizado en una dirección determinada.

Tiene la ventaja de una operación simple, elevadas velocidades de transferencia de masa y elevadas velocidades de reacción. Sin embargo, debido a que algunos sistemas de biocatalizadores inmovilizados requieren de presencia de elevadas concentraciones de O_2 y que el CO_2 sea removido; este sistema no es el ideal a nivel

industrial, ya que este problema es muy difícil de resolver.

c) Reactor de Lecho Fluidizado (R.L.F.)

En este tipo de reactor, las partículas individuales del biocatalizador inmovilizado son mantenidas en movimientos por un flujo continuo de sustrato. La presión de caída del flujo del fluido soporta esencialmente el peso del biocatalizador inmovilizado. El reactor, por lo tanto, provee a las partículas del biocatalizador inmovilizado de un movimiento libre a través de todo el lecho. La fluidización puede ser llevada a cabo ya sea por un líquido o por un gas.

Ofrece la ventaja de una buena mezcla entre el sólido y el fluido, así como una caída de presión mínima. La mezcla sustrato-fluido es importante en el caso de células inmovilizadas en crecimiento, porque puede ayudar a mantener una población celular estable.

Con el fin de mantener buenas características de fluidización, la diferencia entre la densidad de las partículas del biocatalizador inmovilizado y la densidad del sustrato debe ser elevada. Se presentan problemas

cuando los métodos de inmovilización están basados en atrapamiento o microencapsulación con geles coloidales hidratados, donde la diferencia de densidad entre sustratos y biocatalizadores inmovilizados es mínima.

En este sistema se debe tener mucho cuidado en evitar la destrucción y descomposición del biocatalizador -- inmovilizado. El tamaño de la partícula es importante para la formación de un lecho fluidizado estable.

d) Reactor de "Fibra Hueca" (R.F.H.)

El reactor empacado con fibra hueca semipermeable permite el paso únicamente del sustrato y del producto. -- Provee una área superficial de catálisis muy elevada -- en un volumen dado en el reactor. La selectividad del reactor está dada por el uso de fibras de diferentes características de permeabilidad. Las fibras en el -- reactor pueden ser arregladas en un sistema de reacción de diferentes formas.

Entre las mayores ventajas de este tipo de reactor se encuentra la simplicidad de la inmovilización, retención completa de las enzimas o células y un reemplazo fácil de las enzimas o células para mantener una -- actividad total o para la manufactura de diferentes

productos. Asimismo no se presentan los efectos negativos de la inmovilización.

La gran ventaja de este sistema estriba en un control apropiado de la cantidad de enzimas o células, con el fin de asegurar una distribución uniforme del biocatalizador, que es importante para la estabilidad del sistema. Una distribución no uniforme del flujo resulta también en una resistencia en la difusión del sustrato y del producto.

B. Selección del Tipo de Reactor

El tipo de reactor para un proceso en particular va a depender de las necesidades del proceso enzimático y de las condiciones del mismo. En la Tabla XXXIV se resumen los factores que influyen predominantemente en la elección del tipo de reactor.

TABLA XXXIV

FACTORES QUE AFECTAN LA ELECCION DEL TIPO DE REACTOR

- 1) Requisitos o necesidad de viabilidad de las enzimas o células
 - 2) Naturaleza del soporte y método de inmovilización
 - 3) Naturaleza del sustrato
 - 4) Cinética de la reacción
 - 5) Requisitos operacionales del proceso
 - 6) Facilidad de reemplazo o regeneración del biocatalizador
 - 7) Consideraciones hidráulicas
 - 8) Facilidad de diseño, fabricación y escalamiento
 - 9) Costo del reactor
-

Venkatasubramanian, K. 1983 (311)

BIBLIOGRAFIA

- 1) Tramper, J. 1985. Immobilizing biocatalysts for use in synthesis. Trends in Biotechnology. 3 (2): 45-50
- 2) Faith, W.T.; Neubeck, C.E.; Reese, E.T. 1971. Production and Applications of Enzymes. Adv. in Biochem. Eng. -- 1:45-48
- 3) Enzyme Nomenclature, American Elsevier, N.Y. 1973
- 4) Lehninger, A. 1981. Bioquímica. Ed. Omega, Barcelona pp: 191-192
- 5) Suckling, K.E. 1985. Mechanisms of Enzyme Catalysis. In Comprehensive Biotechnology 1:539-551
- 6) Ratkowsky, D.A., Olley, J.; Mc Meekin, T.A.; Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. Bacteriol. 149: 1-5
- 7) Mohr, P.W.; Krawiec, S. 1980. Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. J. Gen. Microbiol. 121: 311-317

- 8) Amelunxen, R.E., Murdock, A.h. 1978. Microbial life - of high temperatures: mechanisms and molecular aspects. In Microbial Life in extreme Environments, ed Kushner, D.J. A.P. 217-218
- 9) Forage, R.G. Harrison, D.E.F.; Pih, D.E. 1985. Effect of Environment en Microbial Activity. Biotechnology: Applications and Research p:251-280
- 10) Lehninger, A. 1981. Bioquímica. Ed. Omega, S.A. Barcelona p: 192-200
- 11) Hammes, G.G. 1983. Enzyme Catalysis and Regulation: Elementary Steps in Enzyme Catalysis. 99-109. A.P.
- 12) Hill, C.M.; Warght, R.D. Bardsley, W.G. 1977. Does any enzyme follow the Michaelis Menten equation Mol. Cellu. Biochem. 15:173-178
- 13) Wharton, W. Ch. 1983. Some recent advances in enzyme Kinetics. Enzyme Microb. Technol. 5:817-825
- 14) Cornish-Bowden, A. 1985. Enzyme Kinetics. Comprehensive Biotechnology 1:521-538

- 15) Kirsch, J. 1973. Mechanism of Enzyme Action. Ann. Rev. Biochem. 42:205-234
- 16) Stadtman, E.R. 1970. Mechanisms of Enzyme Regulation in Metabolism. The Enzymes. 1: 394-459
- 17) Priest, F. G. 1983. Enzyme Synthesis: Regulation and Process of Secretion by Microorganisms. In Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Science Pub. 319-366
- 18) Suckling, K.E. 1985. Mechanisms of Enzyme Catalysis. Comprehensive Biotechnology 1:539-551
- 19) Hammes, G.G. 1983 Enzyme Catalysis and Regulation. A.P. pp. 152-186
- 20) Cherman, J.; Cheremisinoff, O. 1983. Biotechnology in Industry: Unit Operations in Biotechnology pp. 99-110
- 21) Patet, P.R. 1985. Enzyme Isolation and Purification. Biotechnology: Applications and Research. pp. 534-564
- 22) Wimpeny, J.W. 7. 1967. Cell Disruption Methods Proc. Biochem. 9: 105-112

- 23) Scriban, R. 1984. Biotechnologie. Technique et Documentation Lavoisier. pp:275-288
- 24) Rose, A.H. 1981. The microbiological production of food and drink , Sci. Am. 245 (3): 126-139
- 25) Wood, B.J.B. 1982. Soy Sauce and Miso. In Fermented Foods. A.P. pp. 39-87
- 26) Yokotsuka, T. 1985. Traditional Fermented Soybean Foods Comprehensive Biotechnology. 3:396-427
- 27) Steinkraus, K.H. 1986. Fermented Food, Feeds and Beverages. Biotech. Adv. 4:219-243
- 28) Taylar, M.J. Richrdson, T. 1979. Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. Adv. Appl. Microbiol. 25: 7-35
- 29) Barfoed, H.C. 1981. Detergents. Industrial Enzymology. 284-293
- 30) Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes. Comprehensive Biotechnology 3:789-818

- 31) Whitaker, J.R. 1984. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb. Technol.* 6:337-384
- 32) Ryu, D.D.Y.; Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2:91-102
- 33) Adler-Nissen, J. 1987. Newer uses of microbial enzymes in food processing. *Trends in Biotechnology.* 5 (6): 170-174
- 34) Thomas, D.; Gellf, G. 1982. Enzyme Technology and Molecular Biology. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32:14-17
- 35) Wiseman, A. 1980. Biochemical Basis of Free and Immobilized Enzymes. Applications in Industry, Analysis, Synthesis & Therapy. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 30:521-529
- 36) Wiseman, A. 1975. *Handbook of Enzyme Biotechnology.* Ellis Horwood, Ltd. Chichester. p:111-124; 243-272
- 37) Zaborsky, O. 1973. *Immobilized Enzymes.* CRC-Press
- 38) Holcenberg, J.S. 1982. Enzyme therapy : Problems and Solutions. *Ann. Rev. Biochem.* 51-795-812

- 39) Chibata, I.; Tosa, T. 1981. Use of Immobilized Cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10:157-216
- 40) Van Beynum, G.M.A. 1980. Immobilized Biocatalysts Biotechnol. Letters 2(4): 185-190
- 41) Aiba, S. 1984. Biotechnology, new or old J. Chem. Tech. Biotechnol. 34b:229-231
- 42) Chibata, I.; Tosa, T. 1977. Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. Adv. Appl. Microbiol. 22: 1-27
- 43) Chibata, I.; Tosa, T. 1979. Industrial Applications of Immobilized Enzymes and Immobilized Microbial Cells. Appl. Biochem & Bioengineering 1:329-358
- 44) Murata, K.; Tani, K.; Koto, J.; Chibata, I. 1981. Glutathione production by immobilized Saccharomyces cerevisiae cells containing an ATP regeneration system. European J. Appl. Microb. Biotechnol. 11:72-77
- 45) Wang, H.Y.; Lee, S.S.; Takach, Y.; Cawthon, L. 1982. Maximizing microbial cell loading in immobilized cell systems. Biotechnol and Bioengineering Symp. 12:139-146.

- 46) Nakayama, K. 1985. Sources of Industrial Microorganisms In Biotechnology, Verlag Chemie 1:355-410
- 47) Dietz, A. 1985. Pure Culture Methods for Industrial Microorganisms. In Biotechnology, Verlag Chemie 1:411-434
- 48) Kockova-Kratochvilova, A. 1985. Characteristics of Industrial Microorganisms In Biotechnology, Verlag Chemie 1: 5-72
- 49) Cheetham, P.S.J. 1987. Screening for novel biocatalysts. Enzyme Microb. Technol. 9:194-213
- 50) Date, B. 1985. Características Fisicoquímicas y Económicas de los Desechos Agroindustriales. Primer Seminario de Avances en Biotecnología en la U.N.A.M. organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. México, D.F.
- 51) Collins, J.F., Richmend, M.H. 1962. Rate of growth of Bacillus cereus between divisions. J. Gen. Microbiol. 28:15-23.

- 52) Brocklehurst, K.; Baines, B.S.; Kiersten, M.P.J. 1981. Papain and other constituents of Carica papaya. In -- Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology (Wise man, Ed) 5:242-335
- 53) Leal, H. 1985. Evaluación Técnico-Económica de Desechos Lignocelulósicos Forestales y Agrícolas en la - Producción de Hongos Comestibles. I Seminario de -- Avances en Biotecnología de la U.N.A.M. México, D.F.
- 54) Fleischaker, Jr., R.; Sinskey, A. 1981. Oxygen Demand and Supply in Cell Culture. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12:193-197
- 55) Fiolitakis, E.; Grobbelaar, J.V.; Hegewald, E. Soeder, C.J., 1987. Deterministic Interpretation of the Temperature Response of Microbial Growth. Biotechnol & Bioeng. 30:541-547
- 56) Van't Riet, K. 1983. Mass transfer in fermentation. Trends in Biotechnology 1(4):113-115
- 57) Carrizales, V. 1983. Producción de enzimas extracelulares en cultivos semisólidos. Biotecnología de Enzimas, Ed. C. Huitrón U.N.A.M. 70-85

- 58) Tengerdy, R.P. 1985. Solid substrate fermentation. Trends in Biotechnology. 3(4):96-99
- 59) Oriol, E. 1985. Avances en la Producción de Amilasa por Fermentación Semisólida. Primer Seminario de -- Avances en Biotecnología en la U.N.A.M. organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., México, D.F.
- 60) Herbert, D. 1961. A Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems. Soc. Chem. Ind. 12:21-53
- 61) Evans, C.T.G., Herbert, D., Tempest, D.W. 1970. The continuous culture of microorganisms. 2. Construction of a chemostat. In Methods in Microbiology 2:277-327
- 62) Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. 1983. Genetic Improvement of Industrial Yeast. Ann. Rev. Microbiol. 37:121-142
- 63) Pasaraí, A.B., Korus, R.A., Williams, R.A., Heinsch, R. 1987. Catabolite Repression of Amylase Synthesis in Yeast. Biotechnol. & Bioeng. 30:363-367
- 64) Beppu, T. 1983. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. Trends in Biotechnology 1(3):85-89

- 65) Carrier, M.J., Nugent, M.E.; Tacon, W.C.A.; Primrose, S.B. 1983. High expression of cloned genes in E. coli and its consequences. Trends in Biotechnology. 1(4): 109-113
- 66) Yoneda, Y. 1980. Increased production of extracellular enzymes by the synergistic effect of gene introduced into Bacillus subtilis. by Stepwise transformation. Appl. Environ. Microbiol. 39:274-276
- 67) Young, F.E. 1980. Impact of cloning in Bacillus subtilis on fundamental and industrial microbiology. J. Gen. Microbiol. 119:1-15
- 68) Malek, I., Ricica, J. 1969. Continuous cultivation of microorganisms. Folia Microbiol. 14:254-278
- 69) Van Beynum, G.M.A. 1980. Immobilized Biocatalysts. Biotechnol. Letters. 2(4):185-190
- 70) Skinner, J.K. 1975. Enzymes Technology. C & en Washington, August 18.
- 71) Voroshilova, O.I., Kiseler, A.V., Nikitin, Yu. S., Khokhlova, T.D., Ananichev, A.V., Egoro V, A.M., Ulezlo, I.V. 1984. Immobilization of Glucose Isome-

rase form Actinomyces olivocinereus 154 on Macroporous Silica Carriers. Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya. 22 (4) 466-470

- 72) Simionescu, C., Popa, M., Dumitriu, S. 1987. Bioactive Polymers XXX. Immobilization of Invertase on the Diazonium Salt of 4-Aminobenzoylcellulase. Biotechnol & Bioengineering. 29: 361-365
- 73) Guisan, J.M. Melo, P.U., Ballesteros, A. 1981. Determination of Intrinsic Properties of immobilized enzymes. Appl. Biochem. & Biotechnology. 6:25-36.
- 74) Duggal, S.K.; Buchholz, K. 1982. Effects of Immobilization on Intrinsic Kinetics and Selectivity of Trypsin European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:81-87
- 75) Chibata, I., Tosa, T. 1981. Use of Immobilized Cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10:197-216
- 76) Chibata, I.; Tosa, T.; Fujimura, M. 1983. Immobilized living microbial cells. Ann. Rev. Ferment. Proc. 6:1-22

- 77) Chibata, I., Tetsuyo, T. 1983. Immobilized Cells: Historical Background. Appl. Biochem. & Bioengineering. 4: 1-9.
- 78) Wheatley, M., Phillips, C.R. 1983. Temperature Effects During Polymerization of Polyacrylamide Gels Used -- for Bacterial Cell Immobilization. Biotechnol. & Bioengineering 25:627-630.
- 79) Luong, J.H.T., Tseng, M.C. 1984. Process and Techno-economics of ethanol production by immobilized cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:207-216
- 80) Keller, E., Lingens, F. 1984. Synthesis of Chorismic acid by immobilized cells of Enterobacter aerogenes 62-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:3-5.
- 81) Fukui, S., Tanaka, A. 1982. Immobilized Microbial Cells. Ann. Rev. Microbiol. 36:145-172
- 82) Felix, H., Mosbach, K. 1982. Enhanced stability of enzymes in permeabilized and immobilized cells. Biotechnol. Letters. 4(8) 181-186

- 83) Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cowthon, L. 1982. Maximizing Microbial Cell Loading in Immobilized Cell Systems. *Biotechnol. & Bioengineering Symp.* 12:139-146.
- 84) Hahn-Haegerdal, B., Larsson, M., Mattiason, B. 1982. Shift in metabolism towards ethanol production in Saccharomyces cerevisiae using alterations of the physical-chemical environment. *Biotechnol. & Bioengineering Symp.* 12:199-202
- 85) Cheetham, P.S.J. 1987. Screening for novel biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 9:194-213
- 86) Brodelius, P., Nilsson, K. 1980. Entrapment of plant cells in different matrices. *FEBS Lett.* 122:312-316
- 87) Klein, J., Shara, P. 1980. Entrapment of living microbial cells in covalent polymeric networks: I. Preparation and properties of different networks. *J. Solid Phase Biochem.* 5:61-78
- 88) Klein, J., Kluge, M. 1981. Immobilization of microbial cell in polyurethane matrices. *Biotechnol. Lett.* 3:65-70

- 89) Klein, J.; Manecke, G. 1982. New developments in the preparation and characterization of polymer-bound - biocatalysts. *Enzyme Eng.* 6:181-189
- 90) Ananicher, A.V.; Verosilova, O.I.; Ulezlo, I.; Egorov, X.M. 1980. Comparative assesment of some methods of - immobilizing glucose isomerase on organic and inorganic carriers. 16 (5): 669-673
- 91) Toldra, I.; Jansen, N.B., Tsao, G.T. 1986. Use of porous glass fiber as a support for biocatalyst immobilization. *Biotechnol. Letters.* 8(11):785-790
- 92) Shimizu, K.; Ishihara, M. 1987. Immobilization of Cellulytic and Hemicellulolytic Enzymes on Inorganic Supports. *Biotechnol. & Bioengineering* 29:236-241
- 93) Morek, M.; Kas, J.; Valentova, O.; Demnenova, K.; Vodraska, Z. 1986. Immobilization of Cells via Activated Cells Walls. *Biotechnol Letters.* 8(10): 721-724
- 94) Srere, P.A. & Uyeda, K. 1976. Functional Groups on Enzyme Suitable for Binding to Matrices. In *Methods of Enzymology.* 44:11-19

- 95) Kolot, F.B. 1981. Microbial Carriers-Strategy For Selection. Proc. Biochem. 16(5):2-9
- 96) Cabral, J.M.S., Novais, J.M.; Kennedy, J.F. 1983. Immobilization of biocatalysts on new route transition metal-activated inorganic supports. Enzyme Microb. Technol. 5:30-32
- 97) López-Munguía, C.A. 1986. Las enzimas y los alimentos. Tecnología de Alimentos. 21(2):22-30
- 98) Navarro, R.A., Rubio, M.C.; Callieri, D.A.S. 1983. Production of Ethanol by Yeast Immobilized in Pectin. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:148-151
- 99) Kolot, F.B. 1981. Microbial Carriers Strategy for Selection. Part. II Proc. Biochem. 16(6):30-46
- 100) Messing, R.A. 1974. Carriers for Immobilized enzymes Proc. Biochem. 9(11):26-28
- 101) Klein, J.; Stoch, J.; Vorlop, K.D. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate beds. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:86-91

- 102) Hv, W.S., Wang, D.I.C. 1987. Selection of Microcarrier diameter for the cultivation of Mammalian Cells on -- microcarries. *Biotechnol & Bioeng.* 30:548-557
- 103) Vieth, W.R. 1974. Enzyme Engineering Part. II. *Chem Tech, January:* 47-55
- 104) Zaborsky, O. 1973. *Immobilized Enzymes.* CRC-Press, N.Y.
- 105) Mosbach, K. 1976. *Immobilized Enzymes. Methods in Enzymology Vol. 44.* Academic Press, N.Y.
- 106) Chibata, I. 1978. *Immobilized Enzymes.* John Wiley & Sons. N.Y.
- 107) Hartmeir, W. 1985. Immobilized biocatalysts from simple to complex systems. *Trends in Biotechnology.* 3(6): 149-153
- 108) Furusaki, Sh.; Asai, N. 1983. Enzyme Immobilization by the Coulomb Force. *Biotechnol & Bioengineering.* 25:2209-2219
- 109) Messing, R.A. 1975. Adsorption of proteins on glass surfaces and pertinent parameters for the immobilization of enzymes in the pores of inorganic carriers.

J. Non-Cryst. Solid 19:277-280

- 110) Baum, G.; Lynn Merrill, 1975. Inorganic Biomaterial Supports. Proc. Biochem. 10 (4): 12-16
- 111) Avinbasarova, A.; Artemova, A.; Kiselev, A.; Kosheenko, A.; Nikitin, Yu. S. 1982. Enzymatic Activity of Arthrobacter globiformis on Macroporous Ceramic Carriers Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 18 (3): 331-338.
- 112) Fukui, S.; Ikeda, S.; Fujimura, I.; Yammoda, H.M.; Kumagal, H. 1975. Comparative studies on the properties of tryptophanase and Tyrosine, phenol-lyase - - immobilized directly on Sepharose or by use of Sepharose-bound pyridoxal 5'-phosphate. European J. of Biochem. 51:155-164
- 113) Powell, L.W. 1984. Developments in Immobilized-Enzyme Technology. Biotechnol. & Genetic Engineering Reviews. 2:409-439.
- 114) Savidge, T.A.; Powell, L.W. 1977. Improved Enzyme Complexes and their Use. U.K. Patent. 1,492,937.

- 115) Simionescu, C.; Popa, M.; Dumitriu, S. 1987. Bioactive Polymers XXX. Immobilization of Invertase on the Diazonium Salt of 4. Aminobenzoyl cellulose. Biotechnol & Bioengineering. 29:361-365
- 116) Chim-anage, P.; Kashiwagi, Y.; Magae, Y.; Ohta, T. 1986. Properties of Cellulase Immobilized on Agarose Gel with Spacer. Biotechnol & Bioengineering. 28: 1876-1878
- 117) Synowiecki, J.; Sikorska, A.; Fath, A. 1987. Adsorption of Enzymes on Krill Chitin Modified with Carbon Disulfide. Biotechnol & Bioengineering. 29:352-354
- 118) Kohn, J.; Wilcheck, M. 1982. Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide. Enzyme & Microb. Technol. 4:161-163
- 119) Melo, J.S.; D'Souza, S.F.; Nadkarni, G.B. 1986 Ocimum Basilicum seeds as a Pellicular Support for Immobilizing Enzymes. Biotechnol Letters 8(12):885-888.
- 120) Chibata, I. 1978 Immobilized Enzymes. John Wiley & Sons. N.Y. pp:23-35

- 121) Dale, B.E.; White, D.H. 1983. Ionic strength: a neglected variable in enzyme technology *Enzyme & Microb. Technol.* 5:227-229
- 122) Messing, A. Carriers for Immobilized Biologically Active Systems. In *Advances in Biochemical Engineering* 10:51-75
- 123) Dinelli, D.; Marconi, W.; Merisi, F. 1976. Fiber Entrapped enzymes. In *Methods in Enzymology* (Ed. Mosbach) 44:227-243
- 124) Fujimura, T.; Kaetsu, I. 1987. Nature of Yeast Cells Immobilized by Radiation Polymerization. Activity - Dependence on the Water Content of Polymer Carriers. *Biotechnol & Bioengineering* 29:171-175
- 125) Imai, K.; Shiomi, T.; Uchida, K.; Miya, M. 1986. Immobilization of Enzyme into Poly (vinyl alcohol) Membrane. *Biotechnol & Bioengineering* 28:1721-1726
- 126) Kobayashi, Y.; Matsuo, R. Ohya, T.; Yokoi, N.; 1987. Enzyme Entrapping Behaviors in Alginate Fibers and their Papers. *Biotechnol & Bioengineering* 30:451-457

- 127) Liu, C.C.; Weaver, J.P.; Chen, A.K. 1981. Potentiometric measurement of glucose concentration using gel-immobilised glucose-dehydrogenase electrode - - Biochem & Bioenergetics 8:379-386
- 128) Kajiwara, S.; Maeda, H. 1986. Coimmobilization of Malate Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase in Polyethyleneglycol (#4000) diacrylate Gel by Droplet Gel-Entrapping Method. Biotechnol & Bioengineering. 28:1794-1800
- 129) Halwachs, W. 1979. The effect of pore diffusion on immobilized enzymes. Proc. Biochem. 14(6):25-27
- 130) Sadana, A.; Henkey, J.P. 1986. Influence of Chemical Modification on Enzyme Inactivation Kinetics and Stability. Biotech. Adv. 4:27-74
- 131) Weetall, H.H. 1985. Enzymes immobilized on inorganic supports. Trends in Biotechnology. 3(11):276-280
- 132) Mansfeld, J.; Schellenberger, A. 1987. Invertase Immobilized on Macroporous Polystyrene: Properties and Kinetic Characterization. Biotechnol & Bioengineering. 29:72-78

- 133) Nemtsora, N.N.; Birtsera, M.N.; Parr, G.S.; Bezyazychnaya, T.S.; Kendrat'eva, O.U.; Moskvicher, B.V. - - 1986. Immobilization of Dextranucrose of Leuconostoc mesenteroides on Silochromos with various structures. Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya. 22(4):466-470.
- 134) Takeuchi, T.; Makino, K. 1987. Cellulase Immobilized on Poly-L-Glutamic Acid. Biotechnol & Bioengineering. 29:160-164
- 135) Trevan, M.; 1987. Diffusion limitation: friend or foe. Trends in Biotechnology 5(1): 7-9
- 136) Abbot, B.J. 1977. Immobilized cells. Annu. Rep. Ferment. Processes 1:203-233
- 137) Chibata, I.; Tosa, T. 1981. Use of immobilized cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 10:197-216.
- 138) Chibata, I.; Tosa, T.; Fujimura, M. 1983. Immobilized living microbial cell. Annu. Rev. Ferment. Proc. 6:1-22

- 139) Fukui, S.; Tanaka, A. Immobilized microbial cells.
Annu. Rev. Microbiol. 36:145-172
- 140) Klein, J.; Wagner, F. 1983. Methods for the immobilization of microbial cells. Appl. Biochem. Bioeng. - -
4:11-51
- 141) Gerson, D.P., Zajic, J.E. 1979. The biophysics of cellular adhesion. ACS Symp. Ser. 106:29-57
- 142) Kolot, F.B. 1980. New Trends in Yeast Technology Immobilized Cells. Proc. Biochem. 15(7):2-8
- 143) Ash, D.G. 1979. Adhesion of microorganisms in fermentation processes. Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol
2:57-86
- 144) Mozes, N.; Marchal, F.; Herness, M.P.; Van Haecht, J.L. Reuliaux, L., Leonard, A.J.; Rouxhet, P.G. 1987. Immobilization of Microorganisms by Adhesion: Interplay of Electrostatic and Nonelectrostatic Interactions. Biotechnol & Bioengineering, 30:439-450.

- 145) Moo-Young, M.; Lampley, J.; Robinson, C.W. 1980. Immobilization of Yeast Cells on Various Supports for Ethanol production *Biotechnology Letters*. 2(12):541-548
- 146) Klein, J.; Verlop D.K. 1985. Immobilization Techniques-Cells. In *Biotechnology* 3:203-224.
- 147) Heinrich, M., Rhem, H.J. 1982. "Formation of Gluconic Acid at Low pH-Values by Free and Immobilized Aspergillus niger Cells during Citric Acid Fermentation". *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15:88-92
- 148) Heinrich, M., Rhem, H.J. 1981. "Growth of Fusarium moniliforme on n-Alkanes. Comparison of an Immobilization Method with Conventional Process. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11:139-145
- 149) Koshcheyenko, R.A., Tskrina, M.V., Skryakin, G.R. 1983. "immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformation" *Enzyme Microb. Technol.* 5:14-21
- 150) Daugullus, A.J., Brown, N.M., Cluett, W.R. 1981. "Production of Ethanol by Adsorbed Yeast Cells. *Biotechnol. Letters*. 3(11):651-656

- 151) Pines, G., Freeman, A. 1982. "immobilization and Characterization of Saccharomyces cerevisiae in Crosslinked Prepolymerized Polyacrylamide-Hydrazide. European J. - Appl. Microbiol Biotechnol. 16:75-80
- 152) Veelken, M., Pape, H. 1982. Production of Tylosin and Nikkomycin by Immobilized Streptomyces Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:206-210
- 153) Atrat, P. Hueller, E., Hoerhold, C. 1981. "Steroid Transformation with Immobilized Microorganism: V. Continuous Side Chain Cleavage of Cholesterol Derivate with Immobilization. European J. Appl. Microbio. Biotechnol. 12:157-160.
- 154) Siess, M.H., Davies, C. 1981. Behavior of Saccharomyces cerevisiae Cell Entrapped in a Polyacrylamide Gel and Performing Alcoholic Fermentation. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12:10-15
- 155) Koshcheenko, K.A., Sukhodolskaya, G.V., Tyurin, V.S. 1981. "Physiological Biochemical and Morphological Changes in Immobilized Cells during Repeated Periodical Hydrocortisone Transformations. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12:161-169

- 156) Murata, K., Tani, K., Kato, J., Chibata, I. 1981. Glutathione Production by Immobilized Saccharomyces cerevisiae Cells containing an ATP Regeneration System. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11:72-77.
- 157) Godbole, S.S., Souza, SP.D., Nadkarni, G.B. 1983. Regeneration of NAD(H) by alcohol dehydrogenase in gel-entrapped yeast cells. Enzyme Microb. Technol. 5:125-128
- 158) Chibata, I., Tosa, T. 1977. Transformations of Organic Compound by Immobilized Microbial Cells. Adv. Appl. Microbiol. 22:1-27
- 159) Murata, K., Tani, K., Kato, J., Chibata, I. 1980. Glutathione Production Coupled with an ATP Regeneration System. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10: 11-21.
- 160) Murata, K., Tani, K., Kato, J., Chibata, I. 1978. Continous Production of Glutathione by Immobilized Saccharomyces cerevisiae Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6:23-27.
- 161) Kumakura, M., Yoshida, M., Kaetsu, I. 1978. Immobilization of Streptomyces phaeochromogenes by Radiation-Induced Polymerization of Glass Forming Monomers.

- Biotechnol & Bioengineering. 21:679-688
- 162) Uchida, T., Watanabe, T., Kato, J., Chibata, I. 1978. Continuous Production of NADP by Immobilized Achromobacter oeris Cells. Biotechnol & Bioengineering. 20: 255-266.
- 163) Murata, K., Kato, J., Chibata, I. 1979. Continuous Production of NADP by Immobilized Brevibacterium ammoniagenes Cells. Biotechnol & Bioengineering. 21: 887-895
- 164) Samejima H., Kimura, K., Ado, Y., Suzuki, Y. 1978. Regeneration of ATP by Immobilized Microbial Cells and its utilization for the Synthesis of Nucleotides. Enzyme Eng. 4:237-244
- 165) Murata, K., Uchida, T., Tani, K., Kato, J., Chibata, I. 1979. Continuous Production of Glucose-6-phosphate by Immobilized Achromobacter butyri Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7:45-51
- 166) Morikawa, Y., Karube, I., Suzuki, S. 1980. Enhancement of Penicillin Acylase Activity by Cultivating Immobilized Kluyvera citrophila. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10:23-30

- 167) Marechal, P., Calderón-Seguin, R., Vandecasteele R. 1979. Synthesis of L-Tryptophan by Immobilized Escherichia coli Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7:33-44
- 168) Murata, K., Tani, K., Kato, J., Chibata, I. 1981. Glutathione Production by Immobilized Saccharomyces cerevisiae Cells: Containing an ATP Regeneration System. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11:72-77.
- 169) Morikawa, Y., Karube, I., Suzuki, S. 1979. Penicillin G Production by Immobilized Whole Cells of Penicillium Chrysogenum. Biotechnol. & Bioengineering. 21:261-270
- 170) Yang, H.S., Studebaker, J.F. 1978. Continuous Dehydrogenation of a Steroid with Immobilized Microbial Cells: Effect of an Exogenous Electron Acceptor. Biotechnol. & Bioengineering. 20:17-25
- 171) Morikawa, Y., Karube, I., Suzuki, S. 1980. Continuous Production of Bacitracin By Immobilized Living Whole Cells of Bacillus sp. Biotechnol. & Bioengineering. 22:1015-1023

- 172) Bettmann, H., Rehm, H.J. 1984. Degradation of Phenol by polymer entrapped microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:285-290
- 173) Cantarella, M., Miglianesi, C., Grazia, M., Alfani, F. 1984. Immobilization of yeast cells in hydroxyethyl-methacrylate gels. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 233-237.
- 174) Klein, J., Kluge, M. 1981. Immobilization of Microbial Cells in Polyurethane matrices. Biotechnol. Letters. 3 (2): 65-70
- 175) Takamatsu, S., Yamashida, K., Sumi, A. 1980. Kinetics of Production of L-Aspartic Acid by Aspartase of Immobilized Escherichia coli Cells. J. Ferm. Technol. 58 (2): 129-133
- 176) Bang, W., Behrendt, V., Lang, S. 1983. Continuous Production of L-Tryptophan from Indole and L-Serine by Immobilized Escherichia coli Cells. Biotechnol. & Bioengineering. 25: 1013-1025
- 177) Nilsson, K.S. Birnbau, S., Flygare, L.; Linse, L; Sehroder, V.; Jeppson, U.; Larsson, P.O.; Mosbach, K;

- Brodelius, P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:319-326
- 178) Vieth, W.R.; Wang, S.S.; Saini, R. 1973. Immobilization of whole cells in a membranous form. Biotechnol. Bioeng. 15:565-569
- 179) Mattiasson, B. 1983. Methods of Immobilization. In "immobilized Cells and Organelles" CRC Press.
- 180) Yamada, H., Yamada, K., Kumagai, H., Hino, T., Okomura, S. 1978. Immobilization of Betatrypsinase cells with collagen. Enzyme Eng. 3:57-62
- 181) Constantinides, A., Bhatia, D., Vieth, W.R. 1981. Immobilization of Brevibacterium flavuum Cells on Collagen for the Production of Glucanic Acid in a Recycled Reactor. Biotechnol. & Bioengineering. 23:899-916
- 182) Sonomoto, K., Nomura, K., Tanaka, A., Fukui, S. 1982. 11- α -hydroxylation of Progesterone by Gel-Entrapped Living Rhizopus stolonifer mycelia. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:57-62

- 183) Yangsmith, B., Sonamoto, K., Tanaka, A., Fukui, S. 1982. Production of Vitamin B₁₂ by Immobilized Cells of a Propionic Acid Bacterium. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:70-74
- 184) Sonomoto, K., Usui, N., Tanaka, A., Fukui, S. 1983. 9 alpha-hydroxylation of 4-Androstene 3,17-Dione by Gel Entrapped Corynebacterium sp Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:203-210
- 185) Brodelius, P., Nilsson, K. 1983. Permeabilization of Immobilized Plant cells, Resulting in Release of Intracellularly Stored Products with preserved Cell Viability. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:275-280
- 186) Amin, G., van den Eynde, E., Verachtert, H. 1983. By-Products formed during the Ethanollic Fermentation using batch and immobilized Cells Systems of Zymomonas mobilis and Saccharomyces bayanus. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:1-5.
- 187) Hallenbech, P.C. 1983. Immobilized microorganisms for nitrogen and ammonia production. Enzyme Microb. Technol. 5:171-180

- 188) Kayamo, H., Karube, I., Matsunaga, T., Nakayama, O. 1981. A Photochemical Fuel System Using Anabaena N-7363. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12:1-5
- 189) Maddox, I.S., Dunnill, P., Lilly, M.D. 1981. Use of Immobilized Cells of Rhizopus nigricans for the alfa-Hydroxylation of Progesterone. Biotechnol. & Bioengineering 23:345-354
- 190) Karube, I., Kuriyama, S., Matsunaga, T., Suzuki, S. 1980. Methane Production from Wastewaters by Immobilized Methanogenic Bacteria. Biotechnol. & Bioengineering. 22:847-857
- 191) Felix, H.R., Mosbach, K. 1982. Enhanced Stability of Enzymes in Permeabilized and Immobilized Cells. Biotechnology Letters. 4(3):181-186
- 192) Takata, I., Kayashima, K., Tosa, T., Chibata, I. 1982. Immobilization of Brevibacterium flavum using carrageenans modified with amines and stability of fumarase activity of the immobilized Cells. J. of Applied Biochemistry. 4:371-378

- 193) Zu-Hua, Y., Rhem, H.J. 1982. Formation of alfa-w-Dodecanoic and alfa, w-Tridecanoic acids from different Substrates by Immobilized Cells of a Mutant of Candida tropicalis. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:1-4
- 194) Takamatsu, S., Umemuro, I., Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T., Chibata, I. 1982. Production of L-Alanine from Ammonium fumarate using two Immobilized Microorganisms. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:147-152
- 195) Amin, G., Verachtert, H. 1982. Comparative Study of Ethanol Production by Immobilized cell Systems using Zymomonas mobilis or Saccharomyces bayanus. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:59-63
- 196) Bisping, B., Rhem, H.J. Glycerol Production by immobilized Cells of Saccharomyces cerevisiae. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:136-139
- 197) Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, I. 1980. Continuous Production of L-Alanine Using Pseudomonas dacunhae biotechnol. & Bioengineering. 22:2045-2054

- 198) Takata, I., Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, I. 1980. Immobilization of Brevibacterium flavum Cells in Capa-carrageenan. Enzyme Microb. Technol. 2:30-36
- 199) Jones, A., Berk, D., Lesser, B.H. 1983. Continuous pro-duction of patulin by immobilized cells of Penicillium urticae in a stirred tank reactor. Biotechnology Letters. 5 (12): 785-790
- 200) Sarkar, J.M., Mayaudan, J. 1983. Alanine synthesis by Immobilized Corynebacterium dismutans Cells. Biotech-nology Letters. 5(3): 201-206
- 201) Dhulster, P., Parascandola, P., Scardi, V. 1983. Impro-ved method for immobilizing invertase-Active whole cells of Saccharomyces cerevisiae in gelatin. Enzyme Microb. Technol. 5:65-69
- 202) Amin, G., Standaert, P. Verachtert, H. 1984. Effects of metabolic inhibitors on the Alcoholic fermentation by several yeast in batch or in immobilized cells systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:91-99
- 203) Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cawthon, L. 1982. Maximazing Microbial Cell Loading in Immobilized Cell Systems. Biotechnol. & Bioengineering Symp.12:139-146

- 198) Takata, I., Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, I. 1980. Immobilization of Brevibacterium flavum Cells in Caparrageenan. Enzyme Microb. Technol. 2:30-36
- 199) Jones, A., Berk, D., Lesser, B.H. 1983. Continuous production of patulin by immobilized cells of Penicillium urticae in a stirred tank reactor. Biotechnology Letters. 5 (12): 785-790
- 200) Sarkar, J.M., Mayaudan, J. 1983. Alanine synthesis by Immobilized Corynebacterium diphtheriae Cells. Biotechnology Letters. 5(3): 201-206
- 201) Dhulster, P., Parascandola, P., Scardi, V. 1983. Improved method for immobilizing invertase-Active whole cells of Saccharomyces cerevisiae in gelatin. Enzyme Microb. Technol. 5:65-69
- 202) Amin, G., Standaert, P. Verachtert, H. 1984. Effects of metabolic inhibitors on the Alcoholic fermentation by several yeast in batch or in immobilized cells systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:91-99
- 203) Wang, H.Y., Lee, S.S., Takechi, Y., Cawthon, L. 1982. Maximizing Microbial Cell Loading in Immobilized Cell Systems. Biotechnol. & Bioengineering Symp.12:139-146

- 204) Takata, I., Tosa, T., Chibata, I. 1984. Stability of lumerase activity of Brevibacterium flavum immobilized with capa-carrageenan and Chinese gallotanin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:85-90
- 205) Kuu, W. Y., Polack, J.A. 1983. Improving Immobilized Biocatalyst by Gel Phase Polymerization. Biotechnol. & Bioengineering. 25:1995-2006
- 206) Wang, H.Y., Hettwer, D.J. 1982. Cell Immobilization in capa-carrageenan with Tricalcium Phosphate. Biotechnol. & Bioengineering. 24:1827-1838
- 207) Musgrave, S.C., Kerby, N.W., Codd, G.A., Stewart, W.D.P. 1983. Structural Features of Calcium Alginate Entrapped Cyanobacterium Modified for Amonia Production. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:133-136
- 208) Tramper, J., Luyben, Ch. A.M., van den Tweel, W.J.J. 1983. Kinetic Aspects of Glucose Oxidation by Glucobacter oxydans Cells Immobilized in Calcium Alginate. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:13-18.

- 209) Foerberg, C., Enfors, S., Hoeggstrom, L. 1983. Control of Immobilized Non Growing Cells for Continuous Production of Metabolites. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:143-147
- 210) Hiemstra, H., Dijkhuizen, L., Harder, W. 1983. Diffusion of Oxygen in Alginate Gels Related to the Kinetics of Methanol Oxidation by Immobilized Hansenula polymorpha Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:189-196
- 211) Holst, O., Enfors, S.O., Mattiason, B. 1982. Oxygenation of Immobilized Cells Using Hydrogen-Peroxide; A Model Study of Gluconobacter oxydans converting glycerol to dihydroxyacetone. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:64-68
- 212) Hahn-Haergerdal, B., Mattiason, B. 1982. Azide Sterilization of Fermentation Media: Ethanol Production from Glucose Using Immobilized Saccharomyces cerevisiae. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:140-143
- 213) Jones, A., Veliky, I.A. 1981. Examination of Parameters Affecting the 5 beta-Hydroxylation of Digitoxigenin by Immobilized Cells of Daucus carota. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13:84-89

- 214) Nillson, J., Ohlson, S. 1982. Columnar Denitrification of Water by Immobilized Pseudomonas denitrificans - - Cells. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:86-90
- 215) Yamane, T., Nakatami, H., Sada, E., Tanaka, A., Fukui, S. 1978. Steroid Bioconversion in Water-Insoluble Organic Solvents: Dehydrogenation by Free Microbial Cells and by Entrapped in Hydrophilic or Lipophilic Gels. Biotechnol. & Bioengineering. 21:2133-2145
- 216) Kiersten, M., Bucke, C., 1977. The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate Gels. Biotechnol. & Bioengineering 19:387-397
- 217) Scherer, P., Kluge, M., Klein, J., Sahn, H. 1981. Immobilization of the Methenogenic Bacterium Methanosarcina barberi. Biotechnol. & Bioengineering. 23: 1057-1065
- 218) Krouwel, P.G., Groot, W.J., Kassen, N.W.F. 1983. Continuous isopropanol-butanol-ethanol fermentation by immobilized Clostridium beijerinckii cells in a packed bed fermenter. Enzyme Microb. Technol. 5:46-54

- 219) Szwajcer, E., Brodelius, P., Mosbach, K. 1982. Production of alfa-ketoacids: 2. Immobilized whole cells of Providencia sp. PCM 1298 containing L-aminoacid oxidase. Enzyme Microb. Technol. 4:409-413
- 220) Margaritis, A., Bajpai, P.K., BlairWallace, J. 1981. High Ethanol Productivities using small Ca-alginate beads of immobilized cells of Zymomonas mobilis. Biotechnol. Letters. 3(11):613-618
- 221) Haeggstroem, L. Molin, N. 1981. Calcium Alginate Immobilized cells of Clostridium acetobutylicum for solvent production. Biotechnol. Letters. 3(11): 632-636
- 222) Linko, Y.Y., Jalanka, H., Linko, P. 1981. Ethanol Production from whey with Immobilized living yeast. Bioetchnol. Letters. 3(6):263-268
- 223) Stenroos, S.L., Linko, Y.Y., Linko, P. 1982. Production of L-Lactic acid with Immobilized Lactobacillus delbrueckii. Biotechnol. Letters. 4(3):159-164
- 224) Yangsmith, B., Chutima, K. 1983. Production of Vitamin B₁₂ by Living Bacterial Cells Immobilized in Calcium Alginate Beads. J. Ferm. Technol. 61(6):593-598

- 225) Margaritis, A., Bajpai, P., Lachance, M.A. 1983. The use of Free and Immobilized Cells of Debaryomyces polymorphos to produce Ethanol from Jerusalem Artichoke Tubers. J. Ferm. Technol. 61(5):533-537
- 226) Tramper, J., de Man, A.W.A. 1986. Characterization of Nitrobacter agilis immobilized in calcium alginate. Enzyme Microb. Technol. 8:472-476
- 227) Cheettman, P.S.J. 1979. Physical studies on the mechanical stability of columns of Calcium alginate pellets containing entrapped microbial cells. Enzyme Microb. Technol. 1:183-188
- 228) Birnbaum, S., Pendleton, R., Mosbach, K. 1981. Covalent Stabilization of Alginate Gel for the entrapment of Living whole cells. Biotechnol. Letters. 3(8):393-400
- 229) Kopp, B., Rhem, H.J. 1983. Alkaloid Production by Immobilized Mycelia of Claviceps purpurea. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:257-263
- 230) Nilsson, K. 1987. Methods for immobilizing animal cells. Trends in Biotechnology. 5:73-78

- 231) Hou, T. Ch. 1984. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of Methylosinus sp. CRL 31 in a gas-solid bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:1-4
- 232) Storostina, N., Lusta, K.A, Fichte, B.A. 1983. Morphological and Physiological Changes in Bacterial Cells treated with Acrylamide. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:264-270
- 233) Kierstan, M., Reilly, J. 1982. Studies on the Characteristics of Alginate Gels in Relation to their use in Separation and Immobilization Applications. Biotechnol. & Bioengineering. 24:1507-1517
- 234) Gupta, A., Ramachandran, K.B. 1983. Difussional and Electrostatic Effects on the Kinetics of Immobilized Enzymes. J. Ferm. Technol. 61(3):323-328
- 235) Mattiason, B., Hahn-Haegerdal, B. 1982. Microenvironmental Effects on Metabolic Behaviour of Immobilized Cells: A Hypothesis. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:52-53.

- 236) Umemura, I., Takamatsu, S.; Tosa, T., Chibata, I. 1984
Improvement of production of L-aspartic acid using im-
mobilized microbial cells. Appl. Microbiol. Biotechnol.
20:291-295
- 237) Mosbach, K. 1982. Use of immobilized cells with special
emphasis on the formation of products formed by multis-
step enzymes systems and coenzymes. J. Chem. Tech. Bio-
tech. 32:179-188
- 238) Linko, P. & Linko, Y.Y. 1983. Applications of Immobi-
lized Microbial Cells. Appl. Biochem. & Bioengineering
4:54-136
- 239) Scriban, R. Biotechnologie. Technique et Documentation
Lavoisier
- 240) Klein, J. Vorlop, K.D., Wagner, P. 1984. The implica-
tion of reaction Kinetics and mass transfer on the
design of biocatalytic process with immobilized cells.
Enzyme. Eng. 7:437-449
- 241) Greenberg, N.A., Mahoney, R.R. 1981. Immobilization of
lactase (beta-galactosidase) for use in dairy processing:
a review. Process Biochem. 16():2-8

- 242) Moulin, G., Galzy, P. 1984. Whey a potential substrate for biotechnology. In *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1:347-374.
- 243) Brocklehurst, K., Baines, B.S., Kierstan, M.P.O. 1981. Papain and other constituents of Carica papaya. In *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. 5:242-335.
- 244) Kilara, A. 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. *Process Biochem.* 17:35-41.
- 245) Schindler, J., Schmid, R.D. 1982. Fragrance or aroma chemicals-microbial synthesis and enzymatic transformation-a review. *Process Biochem.* 17:2-8.
- 246) Sundaram, P.V. 1982. Analytical applications for routine use with immobilized enzyme nylon tube reactors. *Enzyme & Microbiol. Technology.* 4:290-298
- 247) Enfors, S.O., Nilson, H. 1979. Design and response characteristics of an enzyme electrode for measurement of penicillin in fermentation broth. *Enzyme & Microb. Technol.* 1:260-264

- 248) Szajani, B., Molnar, A., Klamar, G., Kalman, M. 1987. Preparation, Characterization and Potential Application of an Immobilized Glucose-Oxidase. Appl. Biochem. & Biotechnol. 14(1):37-47.
- 249) Szanji, B., Kiss, J., Ivony, J., Huber, I., Boros, L., Dorc, I. 1986. Immobilized Aminacylase Enzyme. US 4, 608,340 AUGUST 26
- 250) Mannens, G., Slegers, G., Lambrecgt, R. 1987. Immobilization of acetate kinase and phosphotransacetylase on derivatized glass beads. Enzyme Microbiol. Technol. 9(5):285-290
- 251) Hwang, J.S. 1987. Co-immobilized coupled enzyme systems on nylon mesh capable of gluconic and pyruvic acid production. Biotechnol. Letters. 9(4):253-258
- 252) Banerjee, M.; Chakravosty, S.; Majumdar, S.K. 1984. Characteristics of yeast B-galactosidase on calcium alginate beads. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:271-274.

- 253) Banerjee, M.; Chakrabarty, A.; Majumdar, S.K. 1982. Immobilization of Yeast Cells Containing B-galactosidase. *Biotechnol & Bioengineering*. 24:1839-1850
- 254) Daniel, M.J., 1985 "Low Cost Process for Lactose Hydrolysis with immobilized lactose" *Food Technology* October. 68-71
- 255) Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T. 1986. Continuous Production of L-Aspartic Acid. *Appl. Biochem & Biotechnology*. 13:231-240
- 256) Fujimura, M.; Kato, J.; Tosa, T.; Chibata, I. 1984 Continuous production of L-arginine using immobilized growing Serratia marcescens cells: Effectiveness of supply of oxygen gas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:79-84
- 257) Sarkar, J.M.; Mayauden, J. 1983. Alanine Synthesis by Immobilized Corynebacterium dismutans cells. *Biotechnology Letters*. 5(3):201-206

- 258) Bohr, M.; Kubicek, C.P.; Kominec, J. 1983. Gliconic Acid. Jn: Dellweg H (ed) Biotechnology, Verlag Chemie, Weinheim, 3:455-465
- 259) Stadlter-Stocke, A.; Nyeste, L. Hollo, J. 1980. Studies on the factors affecting gluconic acid and 5-Keto-gluconic acid fermentation by Autobacter. Acta Aliment. 9:155-172
- 260) Seiskari, P.; Linko, Y.Y.; Linko, P. 1985. Continuous production of gluconic acid by immobilized Gluconobacter oxydans cell bioreactor. Appl. Microbial. Biotechnol. 21:356-360
- 261) Horitsu, H.; Takahashi, Y.; Tsuda, J.; Kawai, K. Kawano, Y. 1983. Production of Itanoic Acid by Aspergillus terreus. Immobilized in Polyacrylamide Gels. European J. Appl. Microbial. Biotechnol. 18: 358-360
- 262) Takata, I.; Tosa, T.; Chibata, I. 1984. Stability of fumarase activity of Brevibacterium flavum immobilized with capa-carrageenan and chinese gallotannin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:85-90

- 263) Keller, E.; Lingens, F. 1984. Synthesis of chorismic acid by immobilized cells of Enterobacter aerogenes 62-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:3-5
- 264) Szwajcer, E.; Brodelius, P.; Mosbach, K. 1982. Production of α -ketoacids:2. Immobilized whole cells of Providencia sp. PCM 1298 containing L-aminoacid oxidase. Enzyme Microb. Technol. 4:409-413
- 265) Osuga, J., Mori, A., Kato, J. 1984. Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter aceti Cells Entrapped in a Capa-Carrageenan Gel. J. Ferm. Technol. 62(2):139-149
- 266) Ghommidh, C., Navarro, J.M. Durand, G. 1981. Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter Cells. Biotechnol. Letters. 3(2):93-98
- 267) Maddox, I.S.; Kingstom, P.J. 1983. Use of Immobilized Cells of the Yeast Saccharomyces lipolytica for the production of citric acid. Biotechnol. Letters. 5(12):795-798

- 268) Stanroos, S.L.; Linko, Y.Y.; Linko, P. 1982. Production of L-lactic acid with immobilized Lactobacillus delbrueckii. Biotechnol. Letters. 4(3):159-164
- 269) Mehaia, M.A.; Cheryan, M. 1987. Immobilization of Lactobacillus bulgaricus in a Hollow-Fiber Bioreactor for Production of Lactic Acid from Acid-Whey Permeate. Appl. Biochem & Biotechnol. 14(1):21-27
- 270) Veelken, M., Pape, H. 1984. Production of nikkomycin by immobilized Streptomyces cells. Physiological properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:146-152
- 271) Zurkova, E., Drobnik, J., Kalal, J. 1983. Immobilization of Escherichia coli cells with Penicillin-Aminohydrolase Activity on Solid Polymeric Carriers. Biotechnol. & Bioengineering. 25:2231-2242
- 272) Park, J.M., Han, M.H. 1984. The properties of Immobilized Whole Cells of Humicola sp. with rifamycin oxidase activity. Biotechnol. Letters. 6(3):143-148
- 272a) Chung, B.H., Chang, H.N., Kim, I.H. 1987. Rifamycin B Production by Nocardia mediterranei immobilized in a dual hollow fiber bioreactor. Enzyme Microb. Technol. 9 (6):345-349

- 273) Yangsmith, B., Sonomoto, K., Tanaka, A., Fukui, S. 1982. Production of Vitamin B₁₂ by Immobilized Cells of a Propionic Acid Bacterium. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:70-74
- 274) Margaritis, A., Bajpai, P.K., Blair Wallace, J. 1981. High Ethanol Productivities using small Ca-alginate beads of immobilized cells of Zymomonas mobilis. Biotechnol. Letters. 3(11):613-618
- 275) Mitani, Y., Nishizawa, Y., Nagai, Sh. 1984. Ethanol Production by Immobilized Cells with Forced Substrate Supply. J. Ferm. Technol. 62(3):249-253
- 276) Bar, R., Gainer, J.L., Kirwan, D.J. 1987. Ethanol Fermentation by Ionically Adsorbed Zymomonas mobilis. Environmental Effects on Cell Immobilization. Biotechnol. & Bioengineering. 29:1045-1050
- 277) Barras, M.R.A., Cabral, J.M.S., Novais, J.M. 1987. Production of Ethanol by Immobilized Saccharomyces bayanus in a Extractive Fermentation System. Biotechnol. & Bioengineering. 29: 1097-1104

- 278) Mandenius, C.F., Mattiason, B., Axeleson, J.P., Hagandar, P. 1987. Control of an Ethanol Fermentation Carried out with alginate entrapped Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. & Bioengineering. 29(8): 941-949
- 279) Markawa, S.S., Kennedy, J.F. 1984. Alcohol Production from Whey Permeate by Immobilized and Free Cells of Kluveromyces marxianus NCYC 179. Enzyme Microb. Technol. 6:18-23
- 280) Siva Raman, H., Seeterama, B., Pundle, A.V. 1982. Continuous ethanol production by yeast cells. Immobilized in open pore gelatin matrix. Biotechnology Letters 4(6):359-364
- 281) Kolot, F.B. 1982. Microbial Catalysts for Steroid Transformations. Part. I: Process Biochemistry. 17(6)12-18
- 282) Sonomoto, I.; Jin, A.; Tanaka, A.; Fukui, S. 1980. Application of Urethane Prepolymers to Immobilization of Biocatalysts. Agric. Biol. Chem. 44:1119-1126

- 283) Koshcheyenko , R.A., Tskrina, M.V., Skyakin, G.R. 1983. Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformation. Enzyme Microb. Technol. 5:14-21
- 284) Kolot, F.B., 1983. Microbial Catalysts for Steroid Transformations. Part II. Process Biochemistry. 18(1):19-21
- 285) Rehaeck, Z., 1980. Ergot alkaloids and their biosynthesis. Adv. Biochem. Eng. 14:33-60
- 286) Prenosil, E.J. 1983. Immobilized plant cell reactors. Enzyme Microb. Technol. 5:323-331
- 287) Stafford, A.; Morris, P., Fowler, M.W. 1986. Plant Cell Biotechnology: a perspective Enzyme Microb. Technol. 8(10):578-587
- 288) King, J. 1986. Plant Cells and the isolation of conditional lethal variants. Enzyme Microb. Technol. 8(9):514-522

- 289) Prenosil, J.E.; Hegglin, M.; Baumann, T.W.; Frischknecht, P.M.; Kappler, A.W.; Brodelius, P.; Haldimann, D. 1987. Purine alkaloid producing cell cultures: fundamental aspects and possible applications in biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 9(8):450-458
- 290) Mattiason, B. 1983. Immobilized Cells and Organelles. *CRC.* 1:1-35
- 291) Spier, R.E., Fowler, M.W. 1985. Animal and Plant Cell Cultures. In *Comprehensive Biotechnology* (Ed. Bull, A.) 1:302-328
- 292) Mascini, M., Guilbault, G.G. 1986. Clinical Uses of Enzyme Electrode Probes. *Biosensors* 2(3):147-172
- 293) Kulys, J.J. 1986. Enzyme Electrodes Based on Organic Metals. *Biosensors* 2(1):3-14

- 294) Davis, G. 1986. Advances in Biomedical Sensor Technology: a Review of the 1985 Patent Literature. Biosensors 2(2):101-124
- 295) Corcoran, C.A., Rechnitz, G.A. 1985. Cell-based biosensors. Trends in Biotechnology 3(4):6-92
- 296) Okada, T., Karube, I., Suzuki, Sh. 1983. NO₂ Sensor which uses Immobilized Nitrite Oxidizing Bacteria. Biotechnol. & Bioengineering. 25:1641-1651
- 297) Klein, J., Stock, J., Vorlop, K.D. 1983. Pore size and properties of Spherical Ca Alginate Biocatalysts. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:86-91
- 298) Habets-Guetzen, A.Q.H.; Brink, L.E.S.; van Ginkee, C. G.; Tramper, J. 1984. Production of epoxides from gaseous alkanes by resting cell suspensions and

- immobilized cells of alkene-utilizing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:245-250
- 299) Wei, Ch.J., Erarslan, A., Kinoshita, Sh., Taguchi, H. 1980. 2,3-Butanediol Production by Immobilized Enterobacter aerogenes IAM 1133 with capa-carrageenan. J. FERM. Technol. 58(2):123-127
- 300) Nakajima, A., Horikoshi, T., Sakaguchi, T. 1982. Recovery of Uranium by Immobilized Microorganisms. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:88-91
- 301) Hallenbech, P.C. 1983. Immobilized microorganismn for hidrogen and ammonia production. Enzyme Microb. Technol. 5:171-180.
- 302) Karube, I., Urano, N., Matsunaga, T., Suzuki, Sh. 1982. Hydrogen production from glucose by immobilized growing cells of Clostridium butyricum. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:5-9

- 303) Jeanfils, J., Loudeche, R. 1986. Photoproduction of ammonia by immobilized Heterocystic cyanobacteria. Effect of nitrite and anaerobiosis. Biotechnol. Letters. 8(4):265-271
- 304) Vijaikishore, P., Karanth, N.G. 1986. Glycerol production by immobilized cells of Pichia farinosa Biotechnol. Letters. 8(4):257-261
- 305) Grezeau, D., Navarro, J.M. 1986. Glycerol production by Dunatiella tertiolecta immobilized with Ca alginate beads. Biotechnol. Letters. 8(4):261-265
- 306) Brookes, I.K., Lilly, M.D., Drozd, J.M. 1987. Use of immobilized Bacillus subtilis for the stereospecific Hydrolysis of d,L-menthylacetate. Enzyme Microb. Technol. 9(4):217-220
- 307) Hwang, J.S., Chang, H.N. 1987. Continuous Production of Acrylamide by Brevibacterium sp. immobilized in a dual hollow fiber bioreactor. Biotechnol. Letters.

9(4):237-242

- 308) Huitrón, C. 1981. Biotecnología de Enzima: Problemas en la Producción, Aplicación y Comercialización de Enzimas. U.N.A.M. p. 395-400
- 309) López-Munguía Canales, A. 1985. "Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación industrial. En Prospectiva de la Biotecnología en México (ed. Quintero). CONACYT. pp. 285-304
- 310) Informe verbal del Dr. C. Huitrón. Catedrático de la U.N.A.M. Centro de Investigación sobre la Fijación de Nitrógeno. Cuernavaca, Mor.