

103
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE MONONUCLEOTIDOS
POTENCIADORES DEL SABOR CON
5' FOSFODIESTERASA Y 5' ADENILDEAMI-
NADA INMOVILIZADAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER OLMEDO AGUILAR

1 9 9 0



FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAG.
I INTRODUCCION	4
II GENERALIDADES	6
1. PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DE LOS NUCLEOTIDOS	6
2. QUIMICA DE LOS NUCLEOTIDOS	7
3. METODOS DE PRODUCCION	9
4. INMOVILIZACION DE ENZIMAS	17
III MATERIAL Y METODOS	23
1. SOLUCIONES ENZIMATICAS	23
2. CARACTERIZACION ENZIMATICA	24
3. MEDICION DE LOS NUCLEOTIDOS	25
4. INMOVILIZACION	29
IV RESULTADOS Y DISCUSION	31
1. CARACTERIZACION ENZIMATICA	31
a) fosfodiesterasa	31
b) adenildeaminasa	36
2. INMOVILIZACION	41
a) fosfodiesterasa	44
b) adenildeaminasa	48
3. CINETICA ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS	51
4. REACTOR EMPACADO CON LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS	53
5. SIMULACION	57
V CONCLUSIONES	62
VI BIBLIOGRAFIA	64

I INTRODUCCION

El sabor de un alimento es factor crítico de su aceptación por el consumidor. En muchas ocasiones el procesar un alimento hace que el sabor de este se modifique ó disminuya considerablemente. El descubrimiento de un grupo de sustancias "realzadoras del sabor" ha hecho posible compensar los efectos del procesado de alimentos dando la posibilidad de incrementar el sabor natural sin tener que adicionar sabores adicionales o artificiales. Así los potenciadores del sabor son sustancias que refuerzan o exaltan los sabores deseables o de frescura, o que reducen los sabores no deseables en un alimento. Puros, no tienen sabor propio y en sus niveles de empleo en alimentos, concentraciones tan bajas como partes por millón o partes por billón, actúan aumentando la sensibilidad de las células de los centros de percepción en la lengua, o incrementando la salivación facilitando una mayor percepción del sabor. (4)

Tres de los potenciadores del sabor más empleados en la actualidad en la industria alimentaria son: el glutamato monosódico y dos 5' mononucleótidos: 5'guanósín monofosfato disódico (5'GMP) y 5'inosín monofosfato disódico (5'IMP). Estos últimos fueron empleados inicialmente en mezclas con el primero disminuyendo los niveles de uso de glutamato hasta en un 75% con ahorro en costos de hasta un 25% (9). Actualmente los mononucleótidos son usados en mezclas sólo de nucleótidos y/o separados, con un efecto potenciador más fuerte que si se usara glutamato, o aún mayor que la suma de los efectos de cada uno de ellos por separado, a esto se llama efecto sinérgico. (48)

II. GENERALIDADES

1. PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DE LOS NUCLEOTIDOS

El sabor de los alimentos esta determinado por las sensaciones causadas por los componentes hidrosolubles de los alimentos, estos son: aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos, azúcares, bases orgánicas, iones inorgánicos y nucleótidos, cada uno de estos contribuyendo con un toque propio de los cuatro sabores básicos: dulce, salado, agrio y amargo y un "quinto" sabor "sabroso" que para muchos es una sensación (51). Así el sabor es una combinación compleja de estos. El desarrollo de una experimentación que comprobára estas afirmaciones da como conclusión que los principales contribuyentes al sabor en alimentos de origen animal o vegetal son los nucleótidos como el 5'IMP, el 5'GMP, el 5'AMP y el glutamato monosódico (GMS) (6,21,26,27) así se postula un "modelo del sabor" de los alimentos, que se muestra en la figura 1.

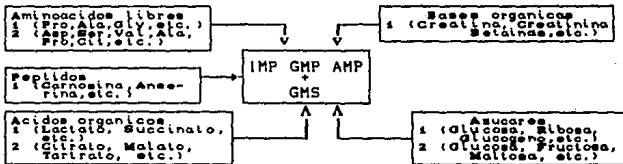


Figura 1 Modelo del sabor

Alimentos según su origen Animal (a) o Vegetal (v)

Así pues, el uso de los nucleótidos como aditivos de alimentos proporciona propiedades adicionales al alimento al que son adicionados como son: el realzar el sabor natural, además de reducir los sabores desagradables generados por su procesamiento; son muy solubles en agua (GMP) y en salsas (IMP),

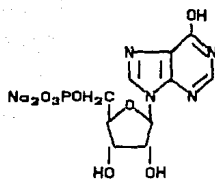
se conservan estables durante mucho tiempo; moderan sabores agrios en conservas, además de disminuir los niveles de uso de otros potenciadores conocidos (GMS) y de estar considerados como sustancias permitidas como aditivos en alimentos por la FDA. (1,52,53) En Estados Unidos se consumieron 3000 toneladas de Nucleótidos para salsas y aderezos en 1976 (57).

2. QUIMICA DE LOS NUCLEOTIDOS

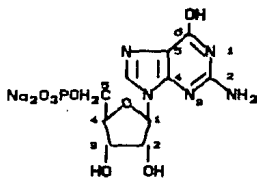
Los nucleotidos son sustancias cuya función más importante en los sistemas biológicos es la de constituir las unidades estructurales de los ácidos nucleicos. Así tenemos ribonucleótidos del ácido ribonucleico y desoxiribonucleótidos del ácido desoxiribonucleico. Dos ribonucleótidos se usan en la industria farmacéutica: 5'CMP y 5'UMP (50) y otros dos son los que en realidad tienen que ver con el sabor de un alimento: 5'IMP y 5'GMP. Se trata de sustancias de peso molecular promedio de 530 daltons y cuya estructura esta constituida por la unión de tres moléculas básicas:

- 1- Una sal de ácido fosfórico
- 2- Un azucar: ribosa
- 3- Una base nitrogenada: púrica { Guanosina
Inosina

Además la posición 6 de la base púrica esta hidroxilada y el fosfato esta en la posición 5 del azucar. Esta conformación espacial es la que le confiere las propiedades de potenciador (39). La estructura de los dos mononucleótidos se muestra en la figura 2.



5' Inosin monofosfato disódico



5' Guanosin monofosfato disódico

Figura 2 Mononucleótidos potenciadores del sabor

En esta figura los números pequeños (1,2,etc.) en la molécula del 5'guanósín monofosfato disódico muestran las posiciones claves para la actividad potenciadora.

Cabe señalar que también tienen actividad potenciadora los 6 tio-ribonucleótidos (32), los 2-metil o 2-etil y los 2-mercapto sustituidos (54) y otros 5'ribonucleótidos sustituidos que solo son hasta ahora curiosidades científicas pues no está autorizado su uso en alimentos.

La actividad potenciadora de los nucleótidos depende además de su estructura espacial de el tamaño de su molécula, los pirimidin ribonucleótidos (CMP,UMP) son más pequeños para ser "reconocidos" por los receptores de la lengua.

El tener el grupo fosfato en otra posición hace perder la conformación espacial, aunque los sustituidos con otros grupos sobre la base púrica en la posición 6 dan un carácter más electronegativo a la molécula provocando una reacción diferente de reconocimiento de intensidad más baja

que la de los sin sustituir. Los sustituidos en la posición 2 de la base púrica, interactúan estrechamente con el sitio activo del receptor intensificando la la actividad potenciadora por

superdeslocalización electrofílica del sustituyente (47).

3. METODOS DE PRODUCCION DE LOS 5' MONONUCLEOTIDOS

Como se mencionó con anterioridad los nucleótidos se producen industrialmente por tres distintos métodos con algunas variantes estos se muestran en la figura 3.

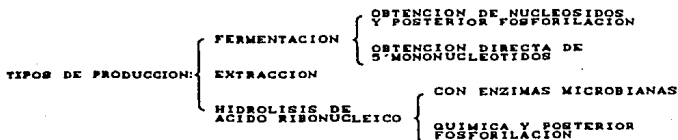


Figura 3 Métodos de producción de nucleótidos

Existen otras variantes en la producción pero estas solo son ensayos de laboratorio que han demostrado ser poco prácticas para su implementación industrial.

PRODUCCION POR FERMENTACION:

Es en Japón donde se desarrollaron las técnicas de producción fermentativa de nucleótidos, que están basadas en la obtención de cepas de microorganismos mutantes hiperproductoras de mononucleótidos y que carecen de enzimas que los degradan favoreciendo su acumulación. Por lo general son adenin-auxótrofos ó inosin-auxótrofos y algunos requieren la adición de ácido pantoténico o tiamina en el medio de cultivo para crecer. En la tabla 1 se presenta un resumen bibliográfico de los microorganismos reportados como productores.

Tabla 1 Microorganismos productores de 5'IMP o precursores

<u>microorganismo</u>	<u>requiere de:</u>	<u>conc. final</u>	<u>producto</u>
<i>Brevibacterium amoniagenes</i>	adenina	NR	inosina (18)
	inosina	NR	5'IMP (19)
	guanosina	30 g/l	inosina (20)
	adenina +	NR	5'IMP (23)
	ácido fosforico	NR	5'IMP (24)
<i>Bacillus subtilis</i>	adenina	NR	inosina (21)
	adenina	18 g/l	inosina (22)
<i>Corynebacterium glutamicus</i>	adenina	NR	5'IMP (25)
		NR	(28)

(NR = no reportada)

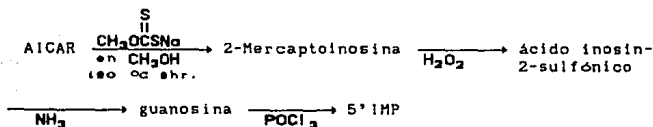
Se concentra el medio de cultivo al vacío en medio alcalino para aislar la inosina. Para su fosforilación se emplean industrialmente métodos químicos con un rendimiento de conversión del nucleósido al nucleótido de hasta el 90% (25,19). El proceso es el siguiente: se suspenden los nucleósidos en trimetilfosfato para hacerlos reaccionar con oxiclóruo de fósforo (POCl_3) en medio acuoso a 0°C por dos horas. Posteriormente se neutraliza con hidróxido de sodio y se obtiene $5'\text{IMP}\cdot\text{Na}_2\cdot 7.5\text{H}_2\text{O}$.

Para el 5'GMP se tiene un inconveniente adicional en la producción vía fermentativa ya que el mecanismo regulador de degradación y la fosforilación a di y trifosfatos dificulta su acumulación en la célula o en el medio de cultivo. Los métodos de producción industrial incluyen además de los anteriormente mencionados la producción de un precursor ó AICAR (5 amino, 4 imidazol carboxiamidin ribotido). En la figura 5 se presenta un resumen de microorganismos productores de 5'GMP o sus precursores.

Tabla 2 Microorganismos productores de 5'GMP o precursores

<u>microorganismo</u>	<u>requiere</u>	<u>producto</u>
<i>Bacillus megaterium</i>	adenina ó inosina	AICAR (27)
evitan que revierta a MUTACIÓN y controlan la ESPORULACION.	{ ácidos grasos eritromicina	
<i>Brevibacterium amoniagenes</i>	5'XMP	10 g/l 5'GMP (28)
<i>Bacillus subtilis</i>	adenina	guanosina (29) (30)

La transformación del AICAR en 5'GMP ocurre de la siguiente manera (31):



La transformación de guanosina en 5'GMP procede por la misma vía química que la fosforilación de inosina.

PRODUCCION POR EXTRACCION:

La producción de mononucleótidos por extracción se hace desde tiempos remotos en Japón, aunque a nivel de cocina ya que se usan fuentes ricas en nucleótidos como las hojuelas de pescado *Katsubushi* seco que contienen hasta un 1.5 % de IMP y un tipo de hongo seco *Shiitake* con un contenido de 0.3 % de GMP. Los extractos de estos productos ó los productos mismos són usados para sazonar los alimentos.

Dada la baja cantidad de nucleótidos y la poca disponibilidad de estas materias primas no es costeable su extracción industrial.

PRODUCCION POR HIDROLISIS DE ACIDO RIBONUCLEICO:

En el proceso de hidrólisis del ácido ribonucleico un aspecto fundamental es el hecho de contar con una fuente de ARN de bajo costo. De las fuentes naturales microbianas de alto contenido en ARN y bajo costo de producción es sin duda *Candida utilis*, de hecho la más empleada para este fin. Su contenido de ARN llega a ser hasta de un 15 % de su peso total. Se han ensayado su crecimiento en medios de bajo costo como lo són las melazas con buenos rendimientos de crecimiento y se concluyó que "se tendrá un buen retorno sobre la inversión si se considera el vender los nucleótidos como principal producto y la levadura libre de ARN como un subproducto" (46).

En México, se ha desarrollado un proceso de extracción del ARN de levadura (20) que utiliza un pretratamiento térmico (80 °C por 30 minutos), tensoactivos (laurato de sodio) en medio alcalino (pH 10-12) obteniendo rendimientos de extracción hasta de un 90 % . Para recuperar el ARN del medio de reacción se precipita con ácido ó etanol y posteriormente se seca al vacío hasta obtener el polvo de ARN crudo.

En la hidrólisis de ARN se emplean dos métodos: químico y enzimático.

Método químico:

Se trata de la descomposición del ARN hasta nucleósidos vía calentamiento por tres ó cuatro horas en medio alcalino ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrado) a 130 °C nucleósidos se emplea una resina de

intercambio iónico seguida de una concentración hasta cristalización. La adenosina se desamina con ácido nitroso para dar inosina. Los nucleótidos se forman por fosforilación de los nucleósidos con el método antes descrito.

Hidrólisis enzimática:

Para el óptimo desarrollo de un proceso enzimático, es necesario contar con enzimas altamente específicas que eviten la formación de subproductos indeseables. Se han desarrollado estudios para encontrar enzimas específicas de hidrólisis de ARN para obtención de mononucleótidos como producto principal. Hasta ahora se han encontrado que las enzimas hidrolíticas con esta propiedad son exoenzimas (es decir son enzimas que hidrolizan las cadenas de ARN desde los extremos y hacia adentro) y no endoenzimas (que hidrolizan al azar) pues estas últimas con frecuencia producen oligonucleótidos 5' ó 3' fosfato terminal y no 5' mononucleótidos (40). Además se sugiere que es fundamental que el sitio de ruptura de estas enzimas sea en un sitio específico: en el enlace 5' Fosfodiéster ($C_2'-D-\left\{ -P(O_2H)-O-C_3' \right\}$) y no en el 3' Fosfodiéster ($C_3'-O-PCO_2H-\left\{ -O-C_5' \right\}$) para obtener así los 5' mononucleótidos (33).

En la naturaleza existen diversas fuentes de enzimas nucleolíticas con las características antes mencionadas. En la figura 4 se enlistan una revisión de estas enzimas reportadas en la bibliografía.

Animales	{	Intestino o hígado de bovino	(11)
		Veneno de serpiente	(35)
Vegetales	{	<i>Catharanthus roseus</i>	(5)
		Maíz de cebada	(5)
		<i>Phaseolus aureus</i>	
Microbianas	{	<i>Aspergillus oryzae</i>	(3)
		<i>Aspergillus queriicinus</i>	(45)
		<i>Neurospora crassa</i>	(36)
		<i>Streptomyces aureus</i>	(41)
		<i>Penicillium citrinum</i>	(12)
		<i>Torula</i> y <i>Zygosaccharomyces</i>	(55)
		<i>Neurospora crassa</i>	(41)
		<i>Micrococcus sodonensis</i>	(7)
	<i>Phoma curcubitaceum</i>	(41)	

Figura 4 Fuentes de 5'fosfodiesterasas

Con el objeto de hacer más eficiente el proceso de obtención de nucleótidos potenciadores del sabor a partir de ARN, es necesario además de la hidrólisis del ARN, la desaminación del 5'AMP a 5'IMP. Así de todas las fuentes antes mencionadas solo se usan dos industrialmente para la producción de los 5'mononucleótidos:

Las enzimas de *Streptomyces aureus* y una combinación de enzimas de *Penicillium citrinum* y *Aspergillus oryzae*.

Se producen 5 enzimas de *Streptomyces aureus* durante la fermentación para la obtención de 5'Fosfodiesterasa (inoculación del mutante en medio líquido a 28 °C, agitado y aerado por 30 horas), estas son: Endonucleasa y Exonucleasa, que hacen la función de 5'Fosfodiesterasa; adenildeaminasa que desamina el 5'AMP a 5'IMP; Fosfatasa alcalina y 5' nucleotidasa que puede hidrolizar los 5'mononucleótidos. Es posible limitar la producción de 5' nucleotidasa por la adición de fosfatos en el medio de cultivo pero también disminuye la cantidad de Exo y Endo nucleasas.

Puede tambien inactivarse termicamente la 5' nucleotidasa al menos parcialmente. Asi el proceso enzimatico tiene que ajustarse a los parametros de operacion de las enzimas de interes para bloquear a las demas enzimas. El proceso empieza a un pH de 7 a 7.5 a temperaturas de 40 °C a 60 °C para que las nucleasas hidrolizen el ARN, cuya concentracion inicial no debe ser mayor al 1 % para evitar inhibir a las enzimas. Posteriormente se ajusta el pH a 5.5 y se baja la temperatura a 50 °C para la desaminacion del 5'AMP con la adenildeaminasa. El proceso dura aproximadamente 10 horas (41).

La combinacion de las enzimas de *Penicillium citrinum* (5'Fosfodiesterasa) y de *Aspergillus oryzae* (5'Adenildeaminasa), resulta más facil de usar que la anterior. Ademas de estar disponibles comercialmente por separado. Para la produccion de la 5'fosfodiesterasa se siembra un mutante de *Penicillium citrinum* (VI-10-14) en salvado de trigo humedo incubandose a 30 °C por 5 dias. Se extrae el micelio y el salvado con agua y se obtienen 2 enzimas: 5'fosfodiesterasa y una 5'nucleotidasa. Por purificacion mediante "salting out" con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diálisis y gel filtración se separa la fosfodiesterasa (13). Ensayos posteriores sobre esta enzima revelaron la existencia de actividad 2' y 3' nucleotidasa por lo que se creia que aún se tenia otra enzima mezclada como impureza pero quedo demostrado posteriormente (14) que se trata de la misma enzima que tiene dos actividades a diferentes temperaturas (70 °C para la fosfodiesterasa y 37 °C para la nucleotidasa). La 5'fosfodiesterasa tiene posibilidades de trabajar con concentraciones mayores de sustrato, que la de *Streptomyces aureus*, sin sufrir efectos de inhibicion y lo unico

que requiere es tener iones Zn^{++} en el medio de reacción, en concentraciones bajas (0.1 mM) para estabilizarla (15).

Como en las enzimas producidas por *Penicillium citrinum*, no existe ninguna que pueda desaminar el 5'AMP producido, es necesario usar una enzima adicional, la 5'adenildeaminasa de *Aspergillus oryzae*. Esta enzima puede ser usada en una etapa subsecuente a la acción de la fosfodiesterasa, en reacciones por separado ya que aunque su pH óptimo de trabajo es similar esta, su temperatura óptima se ubica 30 °C por debajo de la fosfodiesterasa.

En la figura 5 se muestra la reacción de desaminación.

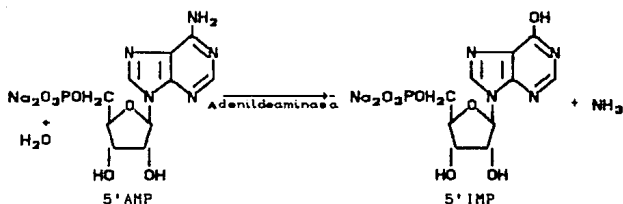


Figura 5 Reacción de Desaminación de 5'AMP

Uno de los usos actuales, recomendado por el fabricante de una preparación de esta enzima, es adicionarla directamente a un alimento precocido, que contenga 5'AMP como hongos, jitomate, espárragos, mariscos, moluscos y algunas frutas, y permitir su acción por 1 hora a 40 °C, después de lo cual se inactiva por calentamiento de toda la mezcla a 90 °C por 5 a 7 minutos, preferentemente se debe usar así en alimentos que se van a enlazar y a esterilizar en autoclave (2).

Esta enzima también se ha utilizado experimentalmente con la

combinación con 5'fosfodiesterasa para la obtención de los 5'Mononucleótidos potenciadores del sabor. (40)

Recuperación de los 5'mononucleótidos:

Los 5'mononucleótidos producidos por el proceso enzimático se encuentran contaminados con los 2' y 3'mononucleótidos, con 5'oligonucleótidos y con la enzima, que si no fué utilizada en forma inmovilizada, también es contaminante de la mezcla de hidrólisis. Para recuperar los 5'mononucleótidos se pasa la mezcla de hidrólisis por una resina de intercambio iónico ó por carbón activado del cual se eluyen por separado con una solución acuosa de metanol/amoniaco, para posteriormente precipitarlos con metanol en frío y secarlos (24)

4. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Al inmovilizar una enzima, en teoría se le confieren propiedades adicionales de estabilidad, resistencia a temperaturas altas, a pH, de operación, y lo más importante es posible el "reuso" de estas varias veces, con lo que los costos por concepto de enzimas para procesos industriales disminuye considerablemente. En los últimos 10 años ha habido un número extraordinario de métodos publicados para inmovilizar enzimas que utilizan gran variedad de soportes que por sus características físico-químicas "atrapan" a las enzimas, convirtiéndolas en catalizadores renovables de un sinnúmero de reacciones químicas.

En realidad pocos procesos han llegado a escala industrial, los más conocidos se muestran en la tabla 3 (8).

Tabla 3 Sistemas industriales que emplean enzimas inmovilizadas

ENZIMA	AREA DE APLICACION	MERCADO MUNDIAL. ANUAL (millones de USD).
<i>Glucosa isomerasa</i>	Industria de bebidas	20.00
<i>Glucosa oxidasa</i>	Industria de bebidas Tests de diagnostico	bajo
<i>Lactasa</i>	Industria lactea Procesamiento de suero	1.00
<i>Lipasas</i>	Industria de grasas Química de grasas	bajo
<i>Penicilino acilasa</i>	Produccion de GAPA	6.00
<i>Aminoácido Acilasas</i>	Produccion de mezclas racemicas	bajo

Los procesos de inmovilización de enzimas se clasifican según se muestra en la figura 6 (56).

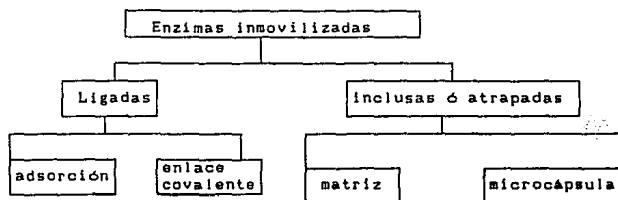


Figura 6 Métodos de inmovilización de enzimas

ENZIMAS LIGADAS.

Por adsorción:

En este tipo de inmovilización intervienen distintos tipos de enlaces como: los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, la transferencia de cargas, las interacciones hidrofóbicas, la quimisorción, etc. Es evidente que cada sistema enzima-soporte no está sujeto a un solo tipo de interacción, sino a combinaciones de estas. Los principales parámetros que

pueden influir en la adsorción de enzimas són:

1- Concentración de la enzima: Al aumentar la concentración de la enzima en solución se aumenta la masa adsorbida en el soporte hasta llegar a un máximo donde ya no se adsorbe más.

2- Tiempo de contacto: La velocidad de adsorción depende de las características fisicoquímicas del soporte y la enzima, aumentando al aumentar la temperatura.

3- pH: El efecto del pH esta orientado a la modificación de cargas naturales tanto en el soporte como en la enzima, observandose que la adsorción es máxima cerca del punto isoeléctrico de la enzima.

4- Composición del medio: Presencia de solventes orgánicos y de sales, que favorecen la adsorción a determinadas concentraciones.

5- Cantidad del soporte: Puede optimizarse la cantidad de este para lograr la adsorción de toda la enzima en solución.

6- Area específica del soporte: Los posibles fenomenos de impedimento estérico, los gradientes de concentración, etc. pueden disminuir la actividad enzimática observada.

Los soportes más usados son: DEAE celulosa, CM celulosa, Carbón activado, Resinas intercambiadoras, silicatos, alúmina, vidrio y cuarzo, colágena y polimeros fenólicos.

Las ventajas y desventajas de este método de inmovilización són:

a) El método es muy sencillo, basta con poner soporte y enzima en contacto en las condiciones ambientales adecuadas y posteriormente lavar el complejo para eliminar la enzima debilmente ligada.

b) La desorción es fácil al modificar las condiciones ambientales aunque no en todos los casos, no se recomienda para

sistemas en los que es esencial evitar la liberación de la enzima en el medio.

c) El soporte puede regenerarse pudiendo adsorber cualquier enzima.

d) La masa de enzimas adsorbidas depende del tamaño de partícula, ciertos soportes al empacarse se "tapan" .

e) La molécula de la enzima no se modifica por el proceso, pero la actividad del complejo, no es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida, se recomienda para enzimas de bajo costo.

f) Existe la posibilidad de usarse combinado con otros métodos.

Por enlace covalente:

Se efectúa una reacción química entre los grupos funcionales de la enzima y del soporte, estos últimos por lo general requieren de una previa activación. A pesar de que existen varios grupos funcionales en las enzimas que podrían reaccionar con soportes activados, actualmente solo 4 han sido explotados:

- a) Funciones Aminadas α y ϵ (Lis y aminoácidos terminales)
- b) Funciones ácidas carboxílicas α , β , γ (ácidos Asp y Glu)
- c) Funciones tiol (Cis)
- d) Anillos fenólicos (Tyr)

Algunos de los métodos más usados para la inmovilización de enzimas por enlace covalente se muestran en la figura 10. Se muestra además al grupo funcional de la enzima que interviene en la reacción con el grupo funcional del soporte y el método de activación de este.

Tabla 4 Inmovilización por enlace covalente

Grupo funcional Enzima	Grupo Funcional Soporte	Alternativa de Activación
-NH ₂ -COOH	-COOH -NH ₂	Reactivos de Woodward Citrbohidrimido Idi) Azoalacion Cloruro de acido Isotiocianato
-NH ₂	-OH	Halogenacion clorotriazina BrCN, ClCN Pitona Epiclorhidrina
-NH ₂	-NH ₂ NH ₂ -aromatico	Glutaraldehido Nitrilo de sodio
-NH ₂	ANHIDRIDO DE ACIDO	Reaccion directa

Existe una gran variedad de soportes sólidos que has sido propuestos para la inmovilización de enzimas. Destacan los siguientes:

Sustancias orgánicas: Celulosa, Dextranas, Pectina, Agarosa, etc.

Proteínas: Colágena, gnetina Polímeros: Polivinílicos,

Acrílicos, Amidas Sustancias minerales: Vidrio poroso, Aluminio

silicatos Soportes mixtos: Magnéticos y organo-minerales.

Las ventajas y desventajas de usar este método de inmovilización son:

- Condiciones de operación desnaturalizantes para muchas enzimas.
- Menor posibilidad de unir enzimas poco estables.
- Sólida unión enzima-soporte, ideal para enzimas caras.
- Mejor estabilidad de la enzima al manejo y al almacenaje.
- Posibles ataques microbianos a soportes orgánicos.
- Mejores propiedades mecánicas de la enzima.

ENZIMAS INCLUSAS O ATRAPADAS.

El principio de esta técnica es el de retener a la enzima ya sea en la matriz de un polímero o en una microcápsula, para lo cual se prepara una solución de monómero y enzima y se procede a efectuar la reacción de polimerización. Varios polímeros sintéticos han sido usados para atrapamiento de enzimas:

Geles de: Poli(acrilamida), almidón, dextranas, etc.

Fibras de acetato de celulosa.

a) *Atrapamiento en una microcapsula:* Consiste en atrapar a la enzima en una membrana semipermeable. Existen dos métodos generales de atrapamiento, basados en la separación de fases de soluciones de polímeros y la polimerización interfacial.

En ambos métodos, una solución acuosa de la enzima es emulsificada en un solvente orgánico en presencia de un agente surfactante. La membrana se forma alrededor de las gotas emulsificadas y las microcápsulas así formadas son lavadas y transferidas a un sistema acuoso con un agente surfactante.

Ventajas y desventajas de métodos de inmovilización por inclusión:

- a) La masa total de la enzima es inmovilizada.
- b) Las reacciones de polimerización son conocidas y controladas.
- c) La estructura espacial de la enzima no se modifica.
- d) Cualquier enzima puede inmovilizarse.
- e) Las reacciones de polimerización pueden desnaturalizar la enzima.
- f) La distribución y diámetro de poros es poco controlable.
- g) La localización de la enzima limita la transferencia de masa.
- h) Hasta ahora solo se usan confines analíticos.

III MATERIAL Y METODOS

MATERIALES:

Acido Ribonucleico de levadura tipo IV y 5' AMP, (Adenosin monofosfato disódico) de Sigma Chemical. Co., como sustratos en las reacciones con las enzimas 5'Fosfodiesterasa de *Penicillium citrinum* y 5'Adenildeaminasa de *Aspergillus oryzae*, ambas enzimas fueron amablemente proporcionadas por el Ing. Ariel Velazquez representante de Amano Enzyme Co en México. Los nucleótidos 5': AMP, CMP, UMP, GMP utilizados para la curva patrón de nucleótidos ó de AMP tambien són de Sigma Chemical Co. Todos los reactivos restantes són grado reactivo.

METODOS:

Preparación de las soluciones enzimáticas:

Solución 1 0.5 g. de 5'Fosfodiesterasa en 1000 ml. de un buffer de acetato de sodio .1M, pH 5.5; $ZnSO_4$ 0.1 mM. La enzima se disuelve con agitación moderada a temperatura ambiente y el residuo (vehículo) se filtra en papel Whatman # 1. La solución resultante es de color amarillo.

Solución 2 4 g. de 5'Fosfodiesterasa en 1000ml de un buffer 1M de acetato de sodio pH 5.5, con 0.1 mM de $ZnSO_4$. La enzima se disuelve con agitación moderada a temperatura ambiente y se filtra el residuo (vehículo) en papel Whatman # 1. La solución resultante es de color amarillo.

Solución 3 8 g. de 5' Adenildeaminasa en 1000 ml. de un buffer 0.1 M de acetato de sodio pH 5.5, con 0.1 mM de $ZnSO_4$. La enzima se disuelve con agitación moderada a temperatura ambiente y el residuo (vehículo) se filtró en papel Whatman # 1. La solución

resultante es de color café pálido.

Solución A 8 g. de 5' Adenilideaminasa en 1000 ml. de un buffer de acetato de sodio 1 M pH 5.5, con 0.1 mM de $ZnSO_4$. La enzima se disuelve con agitación a temperatura ambiente y el residuo (vehículo) se filtra en papel Whatman # 1. La solución resultante es de color café oscuro.

Caracterización de las enzimas de trabajo: Para los ensayos de ambas enzimas se utilizan las soluciones enzimáticas 1 y 3 a distintos pH de trabajo (de 3 a 9 en intervalos de 1), distintas temperaturas de operación (de 20 a 90 °C en intervalos de 10 °C) y distintas concentraciones de sustrato a fin de llegar a las condiciones óptimas de operación de las enzimas, manteniendo fijo el tiempo de reacción y la frecuencia de muestreo así como el método de medición de resultados que se describe posteriormente. También se hicieron ensayos de estabilidad de las enzimas: Estas se incuban a la temperatura óptima encontrada experimentalmente, durante un lapso de tiempo y monitoreando su actividad residual. Para la caracterización cinética se emplea la representación gráfica de Michaelis-Menten por Lineweaver Burk (37).

Hidrólisis de Acido Ribonucleico: El método de ensayo de la actividad de la 5' Fosfodiesterasa en solución es el siguiente: 1 ml. de la solución enzimática 1 se agrega a 9 ml. de una solución de ácido ribonucleico al 1.5% en buffer de acetatos 0.1 mM de $ZnSO_4$ pH 5.5 y se deja reaccionar por 30 minutos a 70 °C (en un baño de temperatura controlada New Brunswick Scientific) tomando muestras de 1 ml. cada 10 minutos, a las cuales se les precipita el ácido ribonucleico no hidrolizado agregandoles 2 ml. de reactivo de Mc. Fayden [acetato de uranio (Fluka) al 0.25% en

ácido perclórico al 2.5% (JT Baker)). Los productos solubles en este reactivo pueden ser considerados como mononucleótidos (54). Se enfrían en agua/hielo por 30 minutos para posteriormente centrifugar a 5000 rpm y 3 °C (Centrifuga Sorvall RC-5) por 20 minutos.

Finalmente se toma 0.1 ml del centrifugado y se afora a 10 ml. para medir el aumento de absorbancia a 260 nm (espectrofotometro LKB 4050). Para la enzima inmovilizada se procede en forma bastante similar solo que se agrega en este caso 1 ml. de buffer de acetatos en lugar de la solución enzimática además de agregar una cantidad conocida de la enzima inmovilizada y se agita durante el desarrollo de la reacción.

Se define la unidad de actividad como la cantidad de enzima que produce 1 mg. de nucleótidos en un minuto.

Medición de los nucleótidos: Se elabora una curva patrón de nucleótidos con una solución de concentración 0.001M equimolar de cada uno (5'AMP, 5'GMP, 5'UMP y 5'CMP) y se mide la absorbancia a 260 nm de distintas diluciones de esta solución. Los datos de absorbancia de la medición de actividad de fosfodiesterasa se interpolan en dicha curva y se obtiene así la concentración de nucleótidos producidos en la reacción. Esto implica la suposición de que en el ácido ribonucleico empleado, existen concentraciones iguales de cada nucleótido. La curva patrón se presenta en la figura 7.

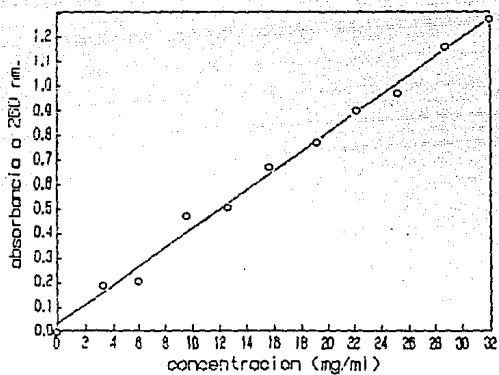


Figura 7 Curva Patron de Nucleotidos

Desaminación de 5'AMP: La medición de actividad para la adenildeaminasa es la siguiente:

1 ml. de la solución enzimática 3 se mezcla con 3 ml de una solución de 5'AMP 110.1 g/l en buffer de acetatos 0.1 M con 0.1 mM de $ZnSO_4$ y se deja reaccionar a 40 °C por 30 minutos (baño de temperatura controlada New Brunswick Scientific), tomando muestras de 0.5 ml. cada 10 minutos a las que se les agrega 3 ml. de ácido perclórico (JT Baker) al 2.5% para parar la reacción. Se toma una alícuota de 0.1 ml. de la mezcla anterior y se afora a 15 ml. para medir el decremento de la absorbancia a 265 nm (espectrofotómetro LKB 4050).

Para la medición de la actividad de la enzima ya inmovilizada se procede en forma bastante similar solo que en lugar de agregar 1 ml de la solución enzimática se agrega 1 ml. de buffer de acetatos, además de una cantidad conocida de la enzima inmovilizada y se agita durante el desarrollo de la reacción.

Se define la unidad de actividad como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de 5'IMP en 1 minuto.

Medición del 5'AMP desaminado / 5'IMP producido: Se elabora una curva patrón de 5'AMP con distintas diluciones de una solución de 180 μ moles/ml. Los datos de absorbancia de la medición de actividad se interpolan en dicha curva y así se obtiene la concentración de 5'AMP remanente con respecto al tiempo o su producto el 5'IMP vía la relación estequiométrica. La curva patrón elaborada se muestra en la figura 8.

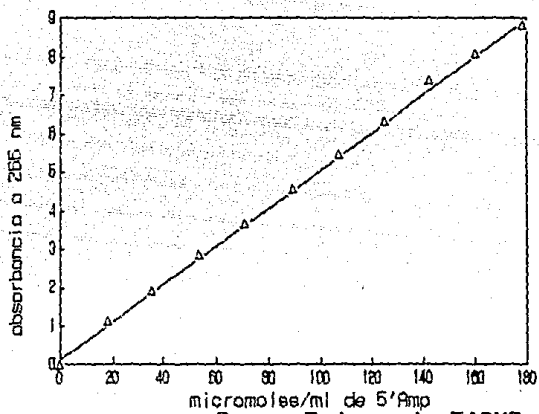


Figura 8 Curva Patron de 5'AMP

Inmovilización de las enzimas: Se utilizaron dos métodos básicos:

Inmovilización con glutaraldehído 100 mg. de un soporte comercial (sílice aminada Rhône Poulenc, Alumina aminada activada, ó grenetina comestible Royal) se les agrega una solución de 10 ml. de glutaraldehído en concentración conocida (de 2 a 20% en volumen) y se agita por 3 horas. Posteriormente se decanta la solución y se lava con 2 volúmenes de 10 ml. de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5 con 0.1 mM de $ZnZn_0$ para eliminar el glutaraldehído residual. Al soporte activado se le pone en contacto con un volumen conocido (8 a 10 ml) de solución enzimática de concentración variable (2 a 4 g/l) y se deja en reposo por un tiempo variable (de 12 a 72 horas) en refrigeración a 4 °C.

Terminado el tiempo de reacción se lava el soporte con la enzima inmovilizada con: 10 ml. de agua destilada, 10 ml. de NaCl 1 M durante 10 minutos, y 10 ml. de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5.

Inmovilización con soporte acrílico: A 100 mg. de soporte acrílico (Polímero modificado de acetato de vinilo/divinil etilénurea activado con epíclorhidrina, Merck) se les agrega 8 ml. de solución enzimática 2 ó 4 (según sea el caso) y se agita durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se decanta la solución y se lava el soporte con la enzima inmovilizada con: 10 ml. de agua destilada, 10 ml. de NaCl 1 M por 10 minutos y 10 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5, permaneciendo en 10 ml. de buffer a 4 °C hasta usarse.

Ensayo de estabilidad al reuso de las enzimas inmovilizadas: Se hacen mediciones de actividad sucesivas a las enzimas inmovilizadas (todas con el esquema ya mencionado) hasta completar una serie de 10 reusos o 5 horas de operación discontinuas entre

las cuales se lava el soporte con la enzima inmovilizada con 10 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5 despues de cada reuso y permanece en buffer a 4 °C hasta que se haga el siguiente reuso.

Caracterización cinética de las enzimas inmovilizadas :

Se usa, como para la enzima en solución, la representación gráfica de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk. Los procedimientos de medición de actividad y muestreo fueron descritos con anterioridad.

Ensayo de actividad de enzimas inmovilizadas en reactor empacado:

Con el soporte que contiene la enzima inmovilizada se empaca una columna (Bio Rad) de 1.5 ml. Esta columna se alimenta con un gasto promedio de .4 ml/min con una bomba peristáltica (Pharmacia Fine Chemicals) se mantiene toda la tubería del sistema y la columna en un baño a la temperatura óptima de la enzima. El efluente se muestrea cada hora para medición de actividad por los métodos ya descritos. El esquema de trabajo con este sistema se muestra en la figura 9.

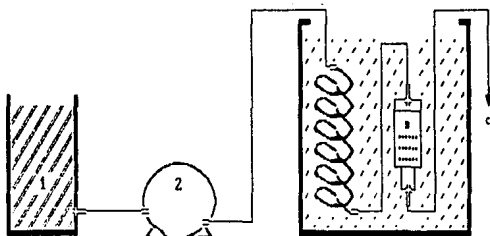


Figura 9 Esquema de trabajo con el reactor empacado

- 1 Sustrato: ARN O 5'AMP
- 2 Bomba peristáltica
- 3 Recipiente de temperatura controlada
- A SERPENTIN PARA CALENTAR EL SUSTRATO A LA TEMPERATURA DE TRABAJO
- B COLUMNA EMPACADA CON LA ENZIMA INMOVILIZADA
- C SALIDA DEL PRODUCTO DE REACCION

IV RESULTADOS Y DISCUSION

1 CARACTERIZACION ENZIMATICA

1.1 S'fosfodiesterasa

pH óptimo

Como puede observarse en la figura 10, el pH óptimo de la enzima se sitúa entre 5 y 6. Se fijó una temperatura de 70 °C para efectuar la optimización del pH. El rango es bastante restringido y la actividad decae rápidamente fuera de este. Para el trabajo experimental posterior se decidió trabajar la enzima a un pH de 5.5.

Temperatura óptima

En la figura 11 se presenta el efecto de la temperatura en la actividad enzimática. Aquí no existe un rango amplio para la operación de la enzima en óptimas condiciones, teniéndose una temperatura ideal de 70 °C, misma que se usó para todo el trabajo experimental posterior.

Estabilidad

Con el fin de conocer la estabilidad de la fosfodiesterasa se incubó la solución enzimática a 70 °C y se siguió la actividad en el tiempo. Después de 4 horas, a pesar de constatarse una caída de actividad se observó que no se alcanza el tiempo de vida media de la enzima como puede constatarse en la figura 12. Sin embargo la enzima es relativamente estable a la temperatura de reacción. En la figura 13 se demuestra, que la enzima no sigue un comportamiento lineal en la pérdida de actividad sino que parece

estabilizarse en un 60% de su actividad original. Por lo tanto no es posible calcular el tiempo de vida media de la enzima con la ecuación: $\ln \frac{A}{A_0} = e^{-kt}$ donde el tiempo de vida media = $\frac{\ln 2}{k}$ que corresponde a un modelo de desactivación de primer orden.

Actividad

La actividad de la solución enzimática 1 ([PE]= 2 g/l , pH 5.5 y 70°C) se calculó de la siguiente manera:

Se multiplica la pendiente de la recta (concentración de producto/tiempo) por la dilución de la solución enzimática y por la concentración de la enzima obteniendose:

$$\left[\frac{0.695 \text{ mg nuc.}}{\text{ml min}} \right] \cdot \left[\frac{10 \text{ ml reacc}}{1 \text{ ml PE}} \right] \cdot \left[\frac{1 \text{ ml}}{2 \text{ mg}} \right] = 3.475 \frac{\text{mg nuc}}{\text{mg E min}} \text{ y de}$$

acuerdo con la definición de unidad :

1 Unidad = Cantidad de producto enzimático que produce 1 mg de nucleótidos en un minuto.

tenemos que la actividad específica de la solución 1 es :
3.475 U/mg de producto enzimático.

Lo anterior difiere grandemente de lo reportado por el fabricante de la enzima (2), que anuncia el producto con más de 10,000 U/mg de producto enzimático, aunque los procedimientos de calculo que emplea son poco claros.

Caracterización cinética

Con el fin de determinar el comportamiento cinético de la enzima se efectuó un estudio de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato, con una concentración del producto

enzimático de 2 g/l, a la Temperatura y pH óptimos. Se encontró que el comportamiento de la enzima sigue el modelo de Michaelis-Menten. Sus constantes cinéticas se obtuvieron por medio de la representación gráfica del Modelo de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk como se muestra en la figura 14.

Las constantes són:

$$V_{max} = 0.697433 \text{ mg nuc. / ml. min.}$$

$$V_{max} = 3.487 \text{ mg nuc / mg PE. min}$$

$$K_m = 0.436819 \text{ mg/ml}$$

El valor de k_m es 30 veces más pequeño que la concentración de sustrato a la cual se midió la actividad del producto enzimático, por lo tanto se trabajó lejos de la saturación de la enzima.

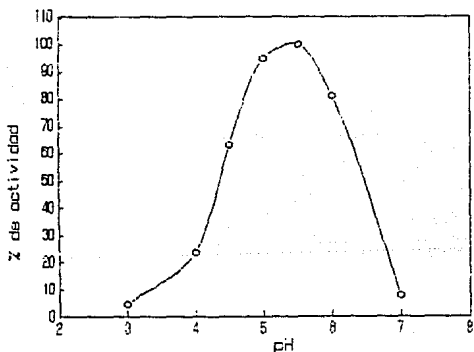


Figura 10 pH óptimo de la 5'fosfodiesterasa

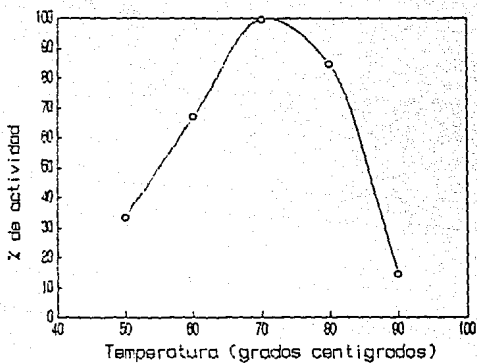


Figura 11 Temperatura optima de la 5'fosfodiesterasa

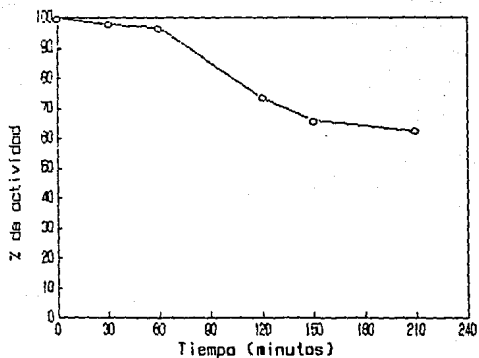


Figura 12 Estabilidad Térmica 5'Fosfodiesterasa

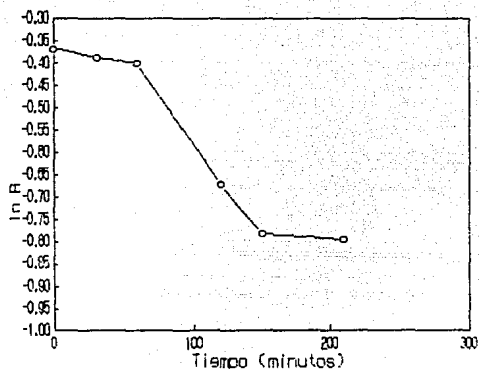


Figura 13 $\ln R$ Vs. Tiempo 5'fosfodiesterasa

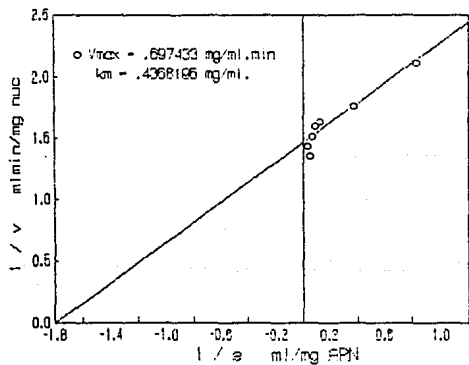


Figura 14 Cinetica de la 5'fosfodiesterasa

1.2 5'Adenildeaminasa

pH óptimo

Como puede observarse en la figura 15, el rango de actividad es más amplio que para la fosfodiesterasa abarcando de 5 a 8 con hasta un 80 % de actividad en los extremos. Para el trabajo experimental posterior se decidió trabajar a un pH de 5.5. Esta selección se basa no solo en el hecho de que a este valor la actividad es máxima sino que además es también el pH óptimo para la fosfodiesterasa dando la posibilidad de usar las dos enzimas juntas en la reacción.

Temperatura óptima

Como se muestra en la figura 16 el rango de temperatura óptima de la enzima es de 38 a 44 °C. Definitivamente se trata de una enzima de menor termoestabilidad que la fosfodiesterasa lo que elimina la posibilidad de usar las dos enzimas juntas en solución o inmovilizadas pues la diferencia de temperaturas de operación es demasiado grande. Para el trabajo experimental posterior se decidió trabajar a 40 °C.

Estabilidad

Con el fin de conocer la estabilidad de la adenildeaminasa se incubó un volumen de esta a 40 °C y se siguió la actividad en el tiempo. Después de una hora de incubación se observó una caída del 20% en la actividad inicial de la enzima puede constatarse en la figura 17.

En la figura 18 se muestra que la enzima sigue un comportamiento

lineal en la pérdida de actividad, al graficarse en forma logratimica, por lo que posible aplicarle un modelo de desactivación de primer orden:

$$\ln \frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad \text{en el tiempo de vida media} \quad \ln \frac{1}{2} = e^{-kt_1}$$

De la figura 18 se puede entonces determinar la pendiente que resulta ser igual a la constante de desactivación de 1^{er} orden a 40 °C : $K = 3.5398 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$

y el tiempo de vida media:

$$T = \ln \frac{2}{k} = 192.63 \text{ min}$$

Actividad

La actividad de la solución enzimática 3 ([PE]= 8 g/l , pH 5.5 y 40 °C) se calculó de la siguiente manera:

Se multiplica la pendiente de la recta (concentración de producto/tiempo) por la dilución de la solución enzimática y por la concentración de la enzima obteniéndose:

$$\left[1.08 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right] \cdot \left[\frac{4 \text{ ml. reac}}{1 \text{ ml. E}} \right] \cdot \left[\frac{1 \text{ ml. enzima}}{8 \text{ mg. enzima}} \right] = 0.54 \frac{\mu\text{mol.}}{\text{mg. E} \cdot \text{min}}$$

y de acuerdo con la definición de unidad :

1 Unidad = Cantidad de producto enzimático que produce μmol de de 5'IMP en un minuto.

tenemos que la actividad especifica de la solución 3 es :
0.54 U/mg de producto enzimático.

Lo anterior difiere grandemente de lo reportado por el fabricante de la enzima (2), que anuncia el producto con más de 50U/mg de producto enzimático, aunque los procedimientos de calculo que

emplea són poco claros.

Caracterización cinética

Con el fin de determinar el comportamiento cinético de la enzima se efectuó un estudio de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato, con una concentración del producto enzimático de 8 g/l, a la Temperatura y pH óptimos. Se encontró que el comportamiento de la enzima sigue el modelo de Michaelis-Menten. Sus constantes cinéticas se obtuvieron por medio de la representación gráfica del Modelo de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk como se muestra en la figura 19.

Las constantes són:

$$V_{max} = 1.66 \mu\text{mol } 5' \text{IMP/ ml. min.}$$

$$V_{max} = 0.86 \mu\text{mol } 5' \text{IMP/ mg PE min}$$

$$K_m = 62.34 \mu\text{mol/l}$$

El valor de k_m es 4000 veces más pequeño que la concentración de sustrato a la cual se midió la actividad del producto enzimático, por lo tanto se trabajó lejos de la saturación de la enzima.

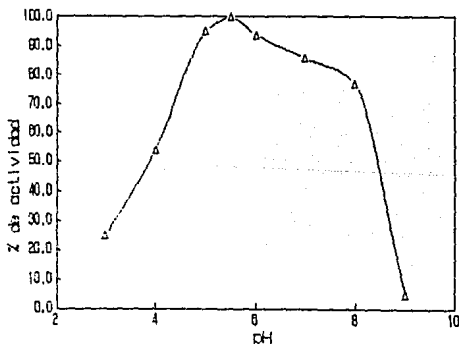


Figura 15 pH óptimo de la 5'Adeniladeaminasa

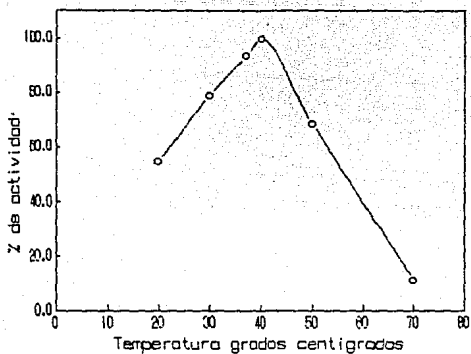


Figura 16 Temperatura optima 5'Adenildeaminasa

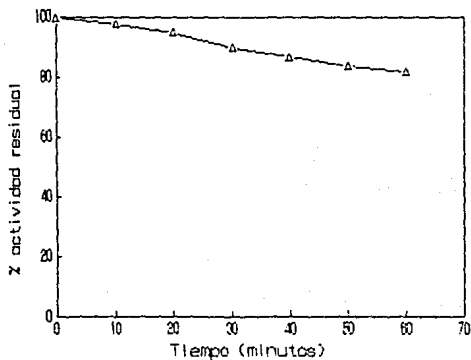


Figura 17 Estabilidad termica 5'Adenildeaminasa

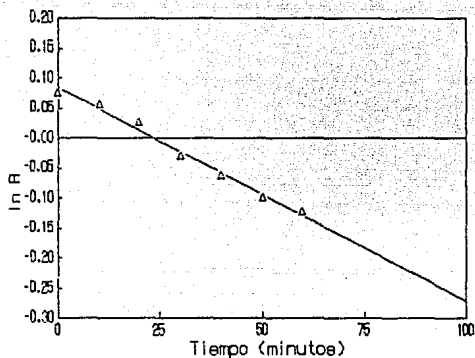


Figura 18 ln A Adenildeaminasa Vs. Tiempo

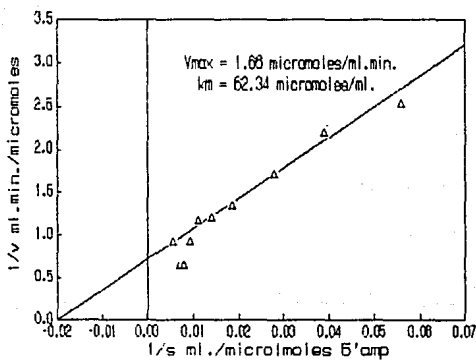
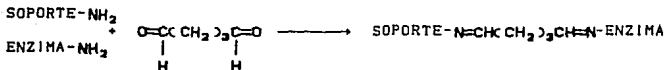


Figura 19 Cinetica de la 5'Adenildeaminasa

2 INMOVILIZACION

REACCION BASICA DE INMOVILIZACION VIA ENLACE COVALENTE UTILIZANDO UN REACTIVO BIFUNCIONAL: GLUTARALDEHIDO



Los tres métodos siguientes tienen como base la reacción anterior. El glutaraldehido se emplea comunmente como reactivo "enlace" entre soportes aminados y enzimas. La inmovilización se lleva a cabo por la formación de bases de Schiff entre los grupos amino de soporte y enzima y las funciones aldehido del glutaraldehido. (10)

* GRENETINA COMESTIBLE:

Se hicieron ensayos con 5'Fosfodiesterasa según el método descrito, logrando inmovilizar la enzima en este soporte. Se forman pequeñas esferas de grenetina al parecer resistentes a la temperatura y pH del ensayo. Se enfrentaron 55.6 U en la reacción de inmovilización sobre el soporte activado, de las cuales se inmovilizaron 2 U lo que corresponde a un rendimiento del 3.59 % . Sin embargo se observa pérdida de actividad hasta llegar a un 30% de actividad residual despues de 5 reusos del soporte activo, en un periodo de 172 horas de "edad" del soporte, como se presenta en la figura 20.

Entre reusos se conserva al soporte en refrigeración a 4 °C en el buffer de trabajo y previo lavado con el mismo. En este caso la temperatura termina por disolver las partículas del soporte con la enzima inmovil. Por esta razón se concluye que a pesar de ser el método más simple, con materias primas de menor costo y alta disponibilidad, esta alternativa no era viable para el proceso que se pretende desarrollar. Cabe señalar que no se

intentó otro método de inmovilización en grenetina (atrapamiento) pues dadas las características estructurales del sustrato, sería un método en el que la enzima aunque estable y bien inmovilizada, estaría prácticamente inaccesible al sustrato.

* SILICE AMINADA:

Una vez más se ensaya con 5'fosfodiesterasa según el mismo método descrito, sobre sílice Rhône Poulenc con area de contacto de $6m^2/g$, el cual fue activado por el Dr. Agustín López Munguía y fue usado con éxito para inmovilizar dextran sacarasa (38). En este caso se logra inmovilizar 1.68 U de las 55.8 U enfrentadas, sobre las partículas del soporte, correspondientes a un rendimiento del 3.02 % .

En esta ocasión el derivado obtenido pierde la actividad después de 4 reusos en un periodo de 144 horas de "edad", hasta llegar a un 4.41% de actividad residual como se muestra en la figura 21. Entre reusos se conserva al soporte en refrigeración a 4 C en el buffer de trabajo y previo lavado con este.

Una vez más el soporte empleado y/o el método de inmovilización no representan alternativa útil para el proceso que se pretende desarrollar, por la baja eficiencia de inmovilización y la pobre estabilidad del derivado.

* ALUMINA ACTIVADA:

Se prueba de nuevo con 5' fosfodiesterasa y el mismo método. En este caso el soporte también se activó con silanos por el Dr. Agustín López. Este soporte se usa comúnmente en los mofles catalíticos. El soporte no resiste ni la temperatura ni el pH de ensayo, pues se deshace. Cualquier medición de actividad fue considerada poco representativa, ya que la turbidez debida al polvillo del soporte hizo imposible tener una medición confiable.

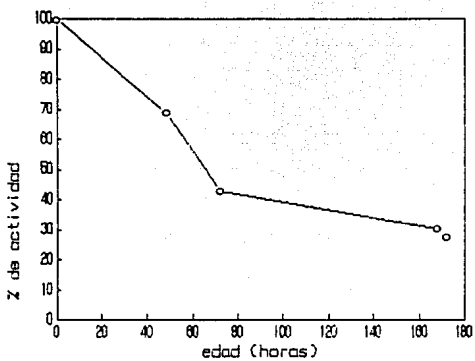


Figura 20 Estabilidad 5'Fdsa inmovilizada en grenatina

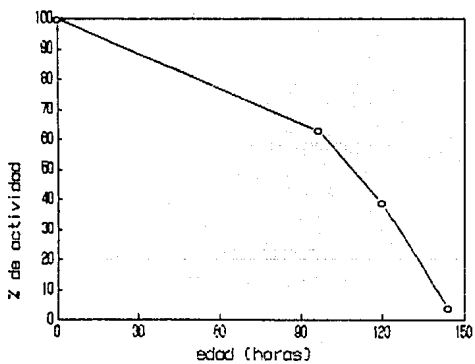


Figura 21 Estabilidad 5'Fdsa inmovilizada en silice

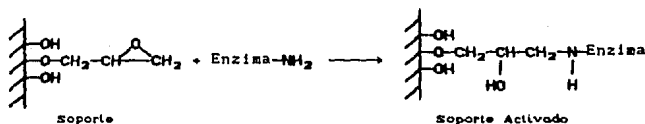
2.2 SOPORTE ACRILICO

Se usó 5'fosfodiesterasa sobre un soporte comercial Acrílico con las siguientes características que se enlistan en la tabla 1.

Tabla I Principales características del soporte acrílico empleado en la inmovilización de fosfodiesterasa.

Tipo de soporte	Copolimero mixto (acetato de vinilo/divinil-etileno) modificado con grupos oxirano
Diametro de partícula	100-200 μ metros
Equivalentes de grupo activo	800 μ mol/g
Area especifica de contacto	183 m^2/g

REACCION DE INMOVILIZACION



Primeramente se observó que con esta metodología de inmovilización, el derivado con la enzima inmovilizada conserva la actividad a lo largo de 10 reusos en un periodo de 480 horas, con una pérdida de tan solo 6% aproximadamente de la actividad original según puede apreciarse en la figura 22.

Considerando estos resultados como altamente positivos se procedió a un estudio más profundo del proceso de inmovilización sobre este soporte.

Se hicieron pruebas con distintas concentraciones de enzima en la solución de reacción frente a una cantidad constante de soporte, con el fin de analizar los efectos de la concentración de enzima en la reacción de inmovilización. Los resultados se aprecian en la tabla II y en la figura 23. Se presenta la evolución de la medición de actividad durante la primera media hora

Tabla II Efecto de la concentración de enzima 5'Fosfodiesterasa en la reacción de inmovilización con 100 mg de soporte acrílico.

Enzima Disponible	Unidades enfrentadas	Unidades inmovilizadas	%	Rendimiento U/g de soporte
4 mg.	13.8	0.0	0.0	0.0
8 mg.	27.8	0.025	0.089	0.25
12 mg.	41.7	0.15	0.359	1.5
16 mg.	55.6	0.4	0.719	4.0
32 mg.	111.2	0.75	0.674	7.0

Las Unidades inmovilizadas fueron medidas de acuerdo a la actividad encontrada en los soportes con la enzima inmovil.

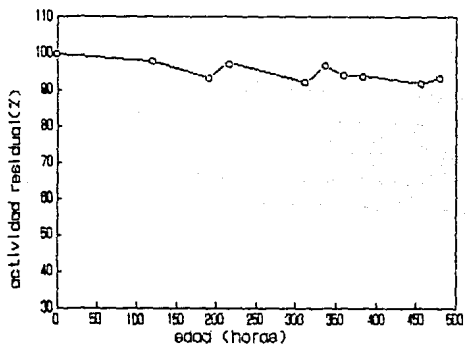


Figura 22 Estabilidad 5'Fds inmovilizada en acrílico

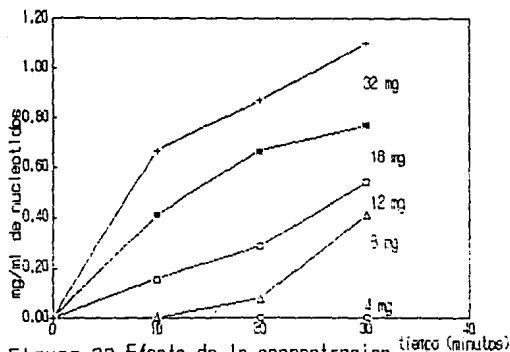


Figura 23 Efecto de la concentración de 5'Fds en inmovilización

Es evidente que al aumentar la cantidad de enzima que reacciona con una cantidad constante de soporte no se observa mas que un debil incremento en la actividad presentada. Se observa que el mayor rendimiento de inmovilización de enzima por gramo de soporte corresponde no a cuando se adicionó la mayor cantidad de enzima en solución sino a la mitad de este valor, 16 mg. o 55.6 unidades enfrentadas. El efecto de la saturación del soporte por el exceso de enzima puede observarse en la figura 24. Este resultado así como los bajos rendimientos obtenidos llevaron al planteamiento de nuevos experimentos.

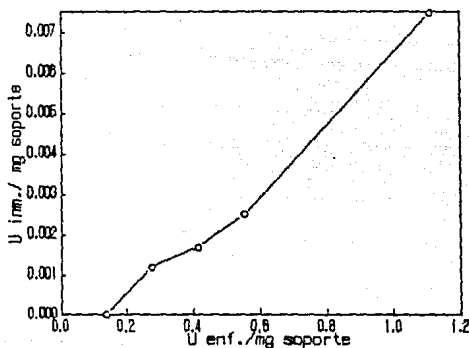


Figura 24 Enzima enfrentada Vs. Enzima inmovilizada

Para tratar de mejorar los rendimientos de inmovilización de la 5' fosfodiesterasa se planteo un experimento distinto, en el cual se varia ahora la cantidad de soporte y no la cantidad de enzima en la solución de reacción. Los resultados se presentan en la Tabla 3 y la evolución de las reacciones de medición de actividad inicial se presentan en la figura 25.

Tabla III Efecto de la cantidad de soporte presente en la reacción de inmovilización con 5'Fosfodiesterasa 4 mg/ml

Soporte Disponible	Unidades enfrentadas	Unidades inmovilizadas	Rendimiento %	U/g de soporte
100 mg.	111.2	0.915	0.822	9.15
250 mg.	111.2	3.140	2.820	12.56
500 mg.	111.2	7.32	6.580	14.64
750 mg.	111.2	8.9	8.000	11.86
1000 mg.	111.2	10.39	9.340	10.39

Las Unidades inmovilizadas fueron medidas de acuerdo a la actividad encontrada en los soportes con la enzima inmovil.

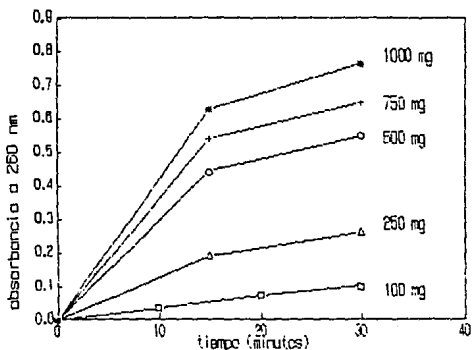


Figura 25 Efecto de la cantidad de soporte en reacción

Como puede observarse, los rendimientos de inmovilización para la 5' fosfodiesterasa se incrementaron considerablemente al aumentar la cantidad de soporte disponible para la inmovilización, evitando que se saturaran las partículas de soporte. La cantidad óptima de soporte a utilizarse en la reacción de inmovilización es 500 mg ya que en este caso se inmovilizaron mas unidades/gramo de soporte. Al referir la cantidad de enzima inmovilizada solamente se tomó en cuenta la enzima activa, es decir pudo haberse inmovilizado mucha más enzima que la activa. Esto es debido a que la reacción se efectúa entre el soporte y cualquier grupo amino disponible en la enzima, por lo que solo aquella enzima que pudo inmovilizarse sin dañar la estructura espacial de su sitio activo u ocultarla por bloqueo, resulta activa.

Posteriormente se probó el mismo soporte acrílico para inmovilizar 5'Adenildeaminasa. Verificandose primeramente la estabilidad del derivado. Se observó que el soporte con la enzima inmovilizada conserva su actividad a lo largo de 10 reusos en un periodo de 480 horas, con pérdida del 15 % de actividad original, según se puede observar en la figura 26. Es evidente que esta enzima es menos estable que la fosfodiesterasa inmovilizada sobre el mismo soporte, pero los resultados permiten suponer que el soporte acrílico constituye igualmente una alternativa viable para la inmovilización de 5'adenildeaminasa.

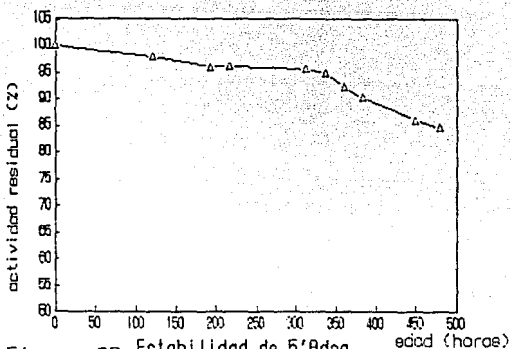


Figura 26 Estabilidad de 5'Adenil deaminasa inmovilizado en acrílico

Posteriormente con el fin de optimizar la reacción de inmovilización se hizo una prueba con distintas concentraciones de enzima en la solución de reacción frente a una cantidad constante de soporte acrílico. Los resultados se aprecian en la tabla 4 y en la figura 27.

Tabla IV Efecto de la concentración de enzima 5'adenil deaminasa en la reacción de inmovilización con 100 mg de soporte acrílico.

Enzima Disponible	Unidades enfrentadas	Unidades inmovilizadas	Rendimiento %	U/g de soporte
10 mg.	5.40	0.0	0.0	0.0
20 mg.	10.80	0.848	7.850	8.48
30 mg.	16.20	1.022	6.300	10.22
40 mg.	21.60	1.342	6.210	13.42
80 mg.	43.20	1.4408	3.333	14.44

Las Unidades inmovilizadas fueron medidas de acuerdo a la actividad encontrada en los soportes con la enzima inmovil.

La eficiencia de la reacción puede apreciarse igualmente en la figura 28 donde se muestra claramente el efecto de la relación enzima-soporte en la preparación del derivado acrílico con la 5'adenil deaminasa inmovilizada.

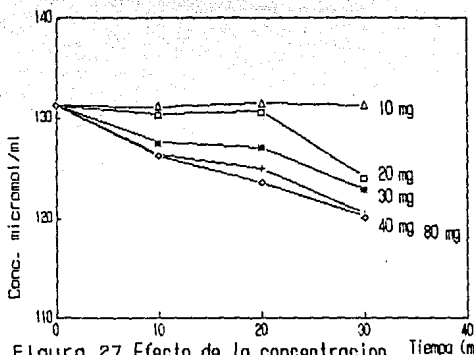


Figura 27 Efecto de la concentración de 5'adea en inmovilización

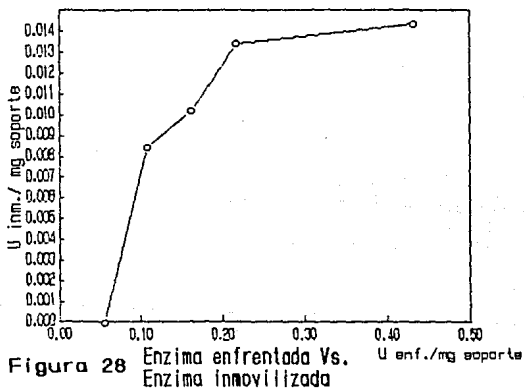


Figura 28 Enzima enfrentada Vs. Enzima inmovilizada

Comparando las dos enzimas inmovilizadas, la 5'adenildeaminasa es menos estable que la 5'fosfodiesterasa, pero la primera es más afin a inmovilizarse sobre el soporte en mayor cantidad activa, alcanzandose rendimientos 10 veces mayores que la segunda.

3.0 CINETICA ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

Debido al exito obtenido en la inmovilización y conservación de la fosfodiesterasa y la adenildeaminasa en el soporte acrílico, se procedió a la caracterización cinética de los nuevos productos, siguiendo la misma metodología que para la enzima libre. Los resultados se presentan en las figuras 29 y 30 y en las tabla V.

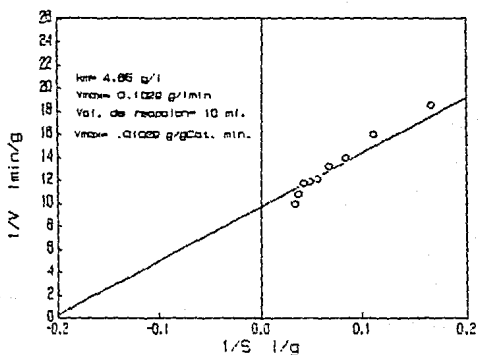


Figura 29 Cinetica Enzimatica 5'Fdca inmovilizada

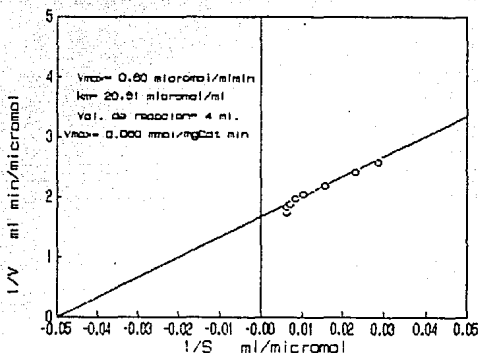


Figura 30 Cinética Enzimática 5'adea inmovilizada

Tabla V Comparación de las constantes cinéticas de las enzimas inmovilizadas y solubles.

5' Fosfodiesterasa (5'fdsa)	
INMOVILIZADA	SOLUBLE
Vmax= 0.1029 mg nuc/ml min	Vmax= 0.6974 mg nuc/ml min
Km= 4.85 mg/ml	Km= 0.4367 mg/ml
Vmax= 0.01029mg nuc/mg Cat min	Vmax= 3.487 mg nuc/mg PE min
5' Adenildeaminasa (5'adea)	
INMOVILIZADA	SOLUBLE
Vmax= 0.60 μ moles/ml min	Vmax= 1.66 μ moles/ml min
Km= 20.81 μ moles/ml	Km= 62.34 μ moles/ml
Vmax= 0.060 μ moles/mg Cat min	Vmax= 0.83 μ moles/mg PE min

Como puede observarse existe un aumento de 10 veces en el valor del k_m para la 5'fdsa inmovilizada comparada con la soluble, mientras que en el caso de la 5'adea, el valor es del mismo orden de magnitud aunque menor. Esta situación se debe con seguridad a los fenómenos de difusión del ARN en la partícula del soporte activado, ya que como el sustrato es de alto peso molecular su difusión a través de los poros es lenta. Las condiciones del ensayo por otro lado, hacen difícil pensar en un control difusional

externo. Por otro lado no existe una explicación cinética a la disminución en el km de la deaminasa y el hecho de que se mantenga en el orden de magnitud que tiene para la enzima libre hace evidente la ausencia de problemas difusionales en el catalizador y el sistema de reacción.

4.0 Reactor empacado con las enzimas inmovilizadas

Una vez que las enzimas fueron caracterizadas cinéticamente, se procedió a efectuar un estudio de su utilización en reactor empacado con el fin de explorar la factibilidad de implementar un proceso continuo. Se diseñaron dos reactores a nivel laboratorio de acuerdo con el esquema descrito en la figura 9 de Material y Método. Las enzimas se inmovilizaron de acuerdo al método descrito con anterioridad solo que en esta ocasión se enfrentó un gramo de soporte en reacción con la solución enzimática 2 o 4 según la enzima. Transcurrido el tiempo de inmovilización se midió la actividad de los soportes activados y después de lavarlos con el buffer de trabajo se suspendió el soporte en 15 ml de buffer y se tomó una alícuota de este para empacar con los reactores. La medición de actividad de los reactores se realizó según el método descrito con anterioridad.

Las condiciones de operación de los reactores empacados se muestran en las tablas VI y VII, el desempeño de ambos reactores se observa en las figuras 31 y 32.

Tabla VI Condiciones de operación para la columna empacada con 5'fosfodiesterasa.

Concentración del sustrato:	15 g ARN/l.
Peso del soporte:	0.278 g
Volumen del sistema:	4.5 ml
Flujo:	0.00880 l/min
pH y temperatura:	7.0 C y 5.5
Actividad del soporte:	10.80 U/g
Fraccción vacía:	0.0430

La fracción vacía se calcula dividiendo el volumen del soporte entre el volumen de la columna.

Tabla VII Condiciones de operación para la columna empacada con 5'adenildeaminasa.

Concentración del sustrato:	8100.0	$\mu\text{MolAMP/l.}$
Peso del soporte:	0.5284	g
Volumen del sistema:	4	l
Flujo:	0.00333	l/min
pH y temperatura:	40 C	y 3.5
Actividad del soporte:	25.000	U/g
Fraccción vacía:	0.688	

La fracción vacía se calcula dividiendo el volumen del soporte entre el volumen de la columna.

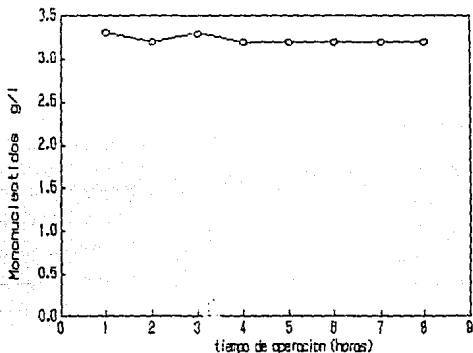


Figura 31 Columna empacada con 5'fdaa inmovilizada

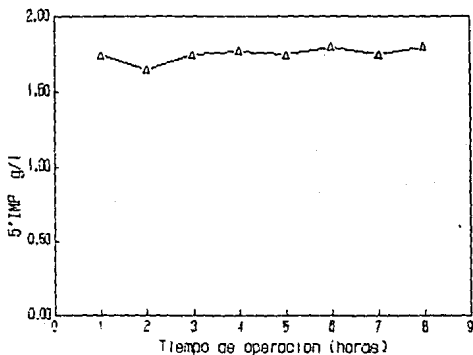


Figura 32 Columna empacada con 5'adaa inmovilizada

La selección de 15 g/l de ARN como concentración de alimentación se definió por ser la concentración a la que se trabajó con la enzima libre aunque puede fácilmente disolverse el doble de ARN y alimentarse así el reactor, ya que en el estudio cinético se observó que no existe inhibición por exceso de sustrato. Para selección de la concentración del AMP, se definió considerando una cantidad un poco menor a la que sería producida como consecuencia de la hidrólisis. El estudio se hizo por separado debido, por un lado a la dificultad analítica que hubiese implicado que se alimentase el efluente del primer reactor al segundo, pues los mononucleótidos (5'GMP, 5'CMP, 5'UMP) interfieren en la medición del 5'IMP, y por otro lado porque el primer reactor no estaba diseñado para alta conversión sino, en ambos casos, para un estudio de estabilidad de los catalizadores.

Suponiendo un reactor cinético, ambos reactores estarían descritos por la ecuación del reactor de flujo pistón con cinética de Michaelis-Menten:

$$V_{max} \theta = S_0 X - k_m \ln(1-X) \quad (1)$$

Donde θ es el tiempo de residencia en minutos y V_{max} la actividad enzimática en el reactor, siendo x la conversión del reactor.

$$\theta = \frac{V \text{ (volumen real cm}^3\text{)}}{Q \text{ (gasto cm}^3\text{/min)}} \quad (2)$$

$$V = V_{reactor} \cdot \epsilon \text{ (fracción vacía)} \quad (3)$$

$$V_{max} = \frac{\text{(Actividad/g soporte)} \cdot (W \text{ soporte})}{V_r} \quad (4)$$

entonces la ecuación del reactor de flujo pistón con cinética de Michaelis-Menten queda así:

$$\frac{\epsilon \cdot \text{Actividad} \cdot W \text{ soporte}}{Q \text{ (flujo)}} = S_0 X - k_m \ln(1-x) \quad (5)$$

Sustituyendo los valores en la ecuación encontramos por análisis dimensional que es necesario establecer la relación estequiométrica para que las unidades sean congruentes, así:

1 g de ARN al hidrolizarse produce 1.047 g Nucleótidos, suponiendo un peso molecular promedio para el ARN de 200,000 y para los nucleótidos de 400.

1 g de 5'AMP al desaminarse produce 1.002 g de 5'IMP.

Por lo que los valores para sustituir en la ecuación 5 quedan así:

Tabla 8 Valores a sustituir en la ecuación de Michaelis-Menten

Para la reacción de hidrólisis		Para la reacción de desaminación	
S_0	= 15.700 g nuc/l	S_0	= 8100.0 μ mol AMP/l
K_m	= 0.077 g nuc/l	K_m	= 20810 μ mol AMP/l
E	= 0.043 g nuc/l	E	= 0.0384 g soporte
A	= 0.0108 g soporte	A	= 25.000 μ mol AMP/min g
V	= 0.2278 g soporte /min	V	= 0.8084 g soporte /min
Q	= 0.000890 l/min	Q	= 0.000890 l/min

Resolviendo la ecuación por el método de Newton-Raphson (22) tenemos que el valor de x o sea la conversión para las condiciones dadas con el reactor de hidrólisis es de 0.2604 mientras que la obtenida experimentalmente fue de 0.2133; y para el reactor de desaminación es de 0.51244 y la obtenida experimentalmente fue de 0.6539.

Comparando la conversión calculada con la obtenida experimentalmente tenemos que existen pequeñas variaciones entre estas aunque se mantienen dentro de el mismo orden de magnitud, por lo que puede suponerse un control cinético para los reactores con un grado de exactitud bueno.

5.0 Simulación de reactores batch y en continuo

Una vez comprobado que el comportamiento de los reactores es similar al cinético de Michaelis-Menten, es posible simular el comportamiento de reactores batch y continuos empacados con las enzimas inmovilizadas. Así para un reactor batch tenemos la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_{max} \cdot \text{Tiempo} = S_0 \cdot X - K_m \cdot \ln (1-X) \quad (6)$$

suponiendo un mezclado homogéneo y el tiempo de reacción en minutos.

Al resolver la ecuación para el reactor de hidrólisis se tomó en cuenta la máxima cantidad que era posible disolver de ARN en el buffer de trabajo, así $S_0 = 30$ g/l. Para el reactor de desaminación se tomó en cuenta la concentración de 5'AMP que se produciría si el reactor de hidrólisis tuviera una conversión igual a 1, así $S_0 = 7.85$ g/l.

La V_{max} de ambos reactores varía en función de la cantidad de soporte activado que se agregó. (ver tabla V)

Los resultados de la resolución de la ecuación 6 para ambos reactores pueden observarse en las figuras 33 y 34. En ellas se muestra la relación conversión/tiempo de reacción para distintas cantidades de enzimas inmovilizadas en el reactor.

Aquí es posible observar como al aumentar la cantidad de la enzima inmovilizada en el reactor, el tiempo de reacción necesario para una conversión del 95 % del sustrato es cada vez menor hasta que al llegar a un máximo de 5 gramos la diferencia con el inmediato inferior es cada vez menor por lo que aumentar más allá de este punto la cantidad de catalizador no produce un efecto apreciable en la relación conversión/tiempo.

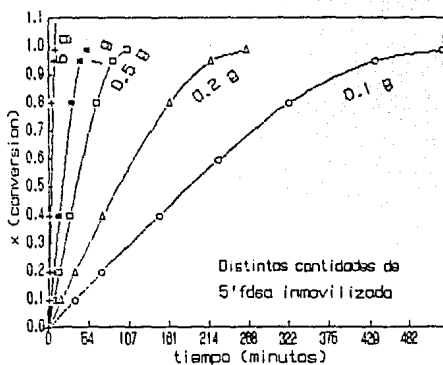


Figura 33 Conversion Vs. Tiempo Hidrolisis de ARN

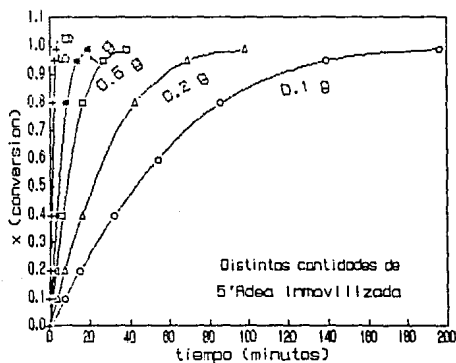


Figura 34 Conversion Vs. Tiempo Desaminacion de 5'amp

Para la simulación de un reactor en continuo se utiliza con la ecuación 5 transformada:

$$\frac{W \text{ soporte}}{Q \text{ (flujo)}} = \frac{S_0 X - k_m \cdot \ln(1-X)}{E \cdot A} \quad (7)$$

de manera que en esta ocasión tenemos que variando la cantidad de soporte activado así como el flujo con que se alimenta el reactor se obtendrá un valor de x.

Las constantes para cada reactor se muestran en la tabla VIII con la excepción de la S_0 que para el reactor de hidrólisis fue de 7.5, 15 y 30 g/l y para el reactor de desaminación las concentraciones esperadas si la conversión del primer reactor fuera del 100 %, esto es 5560, 11300, 22600 $\mu\text{moles/l}$ respectivamente. Lo anterior facilita el simular el tener un sistema con la salida del reactor de hidrólisis conectada a la entrada del reactor de desaminación y hacer un solo proceso en la producción de mononucleótidos.

Los resultados de resolver la ecuación 7 para ambos reactores en las condiciones dadas se muestran en las figuras 35 y 36.

Como puede observarse, para el reactor de hidrólisis al aumentar la concentración de sustrato alimentado es necesario que el valor de W/Q aumente considerablemente para tener una una conversión del 99 %; mientras que para el reactor de desaminación este aumento no es tan significativo debido a que las concentraciones de sustrato alimentadas no son tan grandes como en el caso anterior ya que la mayor concentración alimentada al reactor de desaminación apenas se acerca a la concentración menor alimentada al reactor de hidrólisis.

A continuación se observa la aplicación práctica de la simulación.

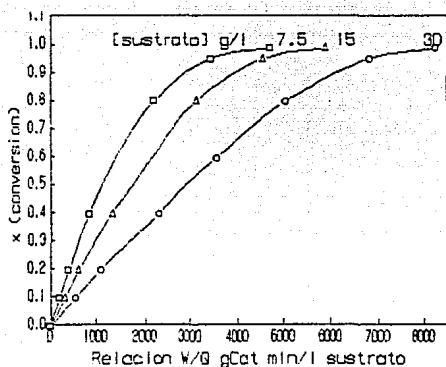


Figura 35 Conversion Vs. W/G Hidrolisis de ARN

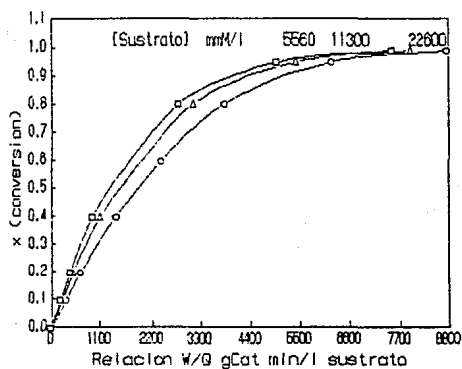


Figura 36 Conversion Vs. W/G Descarboxinacion de 5'AMP

EJERCICIO DE SIMULACION

Supongamos que se desea saber el volumen que tendra los reactores tanto de hidrólisis como de desaminación para que al alimentar una concentración de 30 g de ARN/l con un gasto de 1.0 l/min se obtenga un 90% de conversión:

Con el dato del 90% de conversión e interpolando en la figura 35 tenemos que para un $S_0 = 30$ g/l se requiere un valor de W/Q de 6250 g Cat min/l. Así :

$$\frac{W}{1.0 \text{ l/min}} = 6250 \quad \therefore \quad W = 6250.0 \text{ g ó } 6.2 \text{ kg. de soporte activado con}$$

5'fosfodiesterasa, y como la densidad del soporte es de 0.2846 g/cm³ entonces el reactor de hidrólisis tendrá un volumen de 22 l.

Interpolando en la figura 36 la concentración de 5'AMP tenemos que para el reactor de desaminación se requerirá de un de un valor de W/Q de 4950 g Cat min/l Así:

$$\frac{W}{1.0 \text{ l/min}} = 4950 \quad \therefore \quad W = 4950.0 \text{ g ó } 4.9 \text{ kg. de soporte activado con}$$

5'adenildeaminasa, y como la densidad del soporte es de 0.2846 g/cm³ entonces el reactor de desaminación tendrá un volumen de 17.4 l.

El conocer el volumen óptimo calculado por la simulación facilita el diseño posterior de los reactores a utilizar en el escalamiento a nivel piloto del proceso aquí desarrollado. Un tratamiento similar puede hacerse para los reactores Batch utilizando las figuras 33 y 34 además de las constantes cinéticas obtenidas

V CONCLUSIONES

Al desarrollarse un proceso para la hidrólisis enzimática de ácido ribonucleico de levadura *Candida utilis* se cumplió con los objetivos de este trabajo experimental, lograndose un proceso que utiliza enzimas comerciales sin problemas de disponibilidad, ligadas por enlace covalente a un soporte acrílico.

El catalizador desarrollado observa características de alta estabilidad a la temperatura y pH del ensayo así como a largos periodos de almacenamiento por lo que se hace posible el uso industrial de la enzima inmovilizada.

La temperatura y pH óptimos se ubican en rangos de riesgo de contaminación microbiana limitada si bien se sugeriría un control estricto en la higiene y limpieza de equipo así como una filtración del sustrato inicial en membrana, para eliminar al máximo el riesgo de contaminación microbiana.

El estudio cinético de las enzimas libres e inmovilizadas ayuda a un conocimiento global de las reacciones efectuadas, encontrandose que para la reacción de hidrólisis utilizando la enzima inmovilizada existen problemas de tipo difusional para su desarrollo sin que esto haga suponer que el empleo de el soporte activado con esta enzima se haga poco atractivo. Para la enzima de desaminación inmovilizada no se aprecian diferencias significativas entre los comportamientos cinéticos de enzima libre e inmovilizada.

Se diseñaron dos reactores para emplearlos empacados con las enzimas inmovilizadas en continuo por 10 horas lograndose que estos no perdieran actividad en todo este lapso de tiempo. El diseño de estos reactores no contemplaba la operación en continuo de ambos reactores a la vez ya que se presentan dificultades analíticas para medir sus respuestas, además de que no se trataba de que fueran reactores de alta conversión sino de que aportaran datos sobre el comportamiento de una cantidad de catalizador en una reacción en continuo.

Los datos aportados por estos reactores de laboratorio dieron pie a que utilizando el modelo de Michaelis-Menten para reacción batch y para un reactor de flujo pistón se desarrollaran simulaciones para conocer el comportamiento del catalizador en diferentes condiciones de trabajo. Considerandose adecuado para efectuar posteriores escalamiento a nivel planta piloto de los dos tipos de reactores simulados según convenga a la disponibilidad de un sustrato adecuado para la reacción o reacciones enzimáticas a efectuarse.

Finalmente el desarrollo de un ejercicio de simulación ejemplifica la forma en que el diseño de los reactores en continuo debiera hacerse, al menos en el tratamiento básico del diseño, que representa la utilidad práctica del trabajo desarrollado, cuya implementación industrial es atractiva dado el valor agregado que tienen estos productos partiendo de la base que la materia prima es un subproducto de la producción de proteína unicelular.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adding The Final Touch. Boletín publicitario de Ajinomoto Co.
- 2.- Amano Enzyme Co. Technical Bulletin (5'Adenilideaminasa)
Boletín publicitario de Amano Enzyme Co.
- 3.- Arce P., Desarrollo de un proceso enzimático para
la obtención de potenciadores del sabor Tesis en desarrollo
Universidad Iberoamericana
- 4.- Badui Dergal Salvador Diccionario de tecnología de alimentos
Editorial Alambra Mexicana S.A., Primera Edición, 1988
- 5.- Benaiges M., Lopez-Santín V., Sola C. Poster en
Biotechnology International Symposium, Paris, Francia, 1988
- 6.- Bender A., Wood T., J. Sci. Food Ar. 9, 812, 1958
- 7.- Berry & Campbell Biochim. Biophys. Acta 132, 78-83, 1967
- 8.- Burg K., Mauz O., Noetzel S. & Sauber K. New Synthetic
Carriers for enzyme coupling. Die Angewandte Makromolekulare
Chemie 147, 105-121, 1988
- 9.- Cheil Sugar Co. Technical Bulletin on Nucleotides
Boletín Publicitario de Cheil Sugar Co.
- 10.- Chibata I. Immobilized enzymes, John Wiley & Sons, 1978
- 11.- Cohn & Volkin Nature 167, 483-484, 1951
- 12.- Fujimoto M. Agric. Biol. Chem. V.33 # 10, 1517-1518, 1968
- 13.- Fujimoto M. Agric. Biol. Chem. 38(4), 777-783, 1974
- 14.- Fujimoto M. Agric. Biol. Chem. 38(4). 785-790, 1974
- 15.- Fujimoto M. Agric. Biol. Chem. 39(10), 1991-1997, 1975
- 16.- Furuya A. Biotech. Bioeng. Vol XV, 795-803, 1973
- 17.- Furuya A. Agric. Biol. Chem. 34, 210-221, 1970
- 18.- Furuya A. App. Microb. 20, 263-270, 1970
- 19.- Furuya A., Abe S. Biotech. Bioeng. 8, 229-240, 1971
- 20.- Gomez J. Rev. Soc. Quim. Mex. 21 (3), 239-241, 1977
- 21.- Hashimoto H., FAO Symposium of significance of fundamental
Research in utilization of fish, Japan, 1964

- 22.- Iriarte R., Borrás H., Apuntes de Métodos Numéricos, Editado por el Departamento de Matemáticas Aplicadas de la Facultad de Ingeniería de la UNAM. 1984.
- 23.- Ishi & Shilo Agric. Biol. Chem. 36, 1511-1522, 1972
- 24.- Keller R. Methods in Enzymology V 136, 517-523, 1987
- 25.- Kinoshita S. Biotech. Bioeng. 9, 329-334, 1967
- 26.- Komata Y. Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries 28, 633, 1962
- 27.- Komata Y., Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries 30, 749, 1964
- 28.- Komatsu J. Gen. Appl. Microbiol. 19, 263-271, 1973
- 29.- Komatsu J. Gen. Appl. Microbiol. 18, 19-27, 1972
- 30.- Kotani Y. Abs. Fr. Ann. Meet. Agric. Chem. Soc. Jpn., 1977
- 31.- Kumashiro F. Biotech. Bioeng. 10, 303-320, 1968
- 32.- Kunninaka A. Agric. Biol. Chem. 44 (6), 1437-1439, 1980
- 33.- Kunninaka A. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn. 23 (3), 239-243, 1959
- 34.- Kunninaka A. J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 55, 1957
- 35.- Landt M. Biochem. 17, 4130-4135, 1978
- 36.- Linn & Lehman J. Biol. Chem. 240, 1287-1293, 1965
- 37.- López Munguía Canales Agustín en Tecnología Enzimática, Compiladores Agustín López y Rodolfo Quintero, editado por UNAM. Primera Edición, 1987.
- 38.- López Munguía Canales Agustín. Production, Purification et Immobilisation de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc Mesenteroides*. These Diplome de Docteur Ingenieur. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France. Diciembre, 1979.
- 39.- Margalith Z. Pinhas. Flavor Microbiology, Charles C. Thomas Publishers, 1982
- 40.- Nakao Y. Microbial Technology I (editores Pappler H. Perlman D.) Academic Press, New York, 1979
- 41.- Nakao Y. Microbial Production of Nucleic Acid Related Substances, Halsted Press, New York, 1976
- 42.- Nakayama K. J. Gen. Appl. Microbiol. 10, 133-142, 1964
- 43.- Nakayama K. Agric. Biol. Chem. 29, 234-238, 1965

- 44.- Nara T. Agric. Biol. Chem. V. 31 # 11, 1351-1356, 1967
- 45.- Otha & Ueda App Microbiol 16 1293-1299, 1968
- 46.- Peschard E., Viniegra G. Análisis de costos de la producción de proteína y ácido ribonucleico de levadura por fermentación aeróbica de la melaza de caña. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, 1976
- 47.- Relative Flavoring Effects of Savory Nucleotides, Flavoring, Ingredients, Packaging & Processing, May 1981 pp 11
- 48.- Sanchez Granados Miguel. Potenciadores del sabor en la industria alimentaria. Trabajo Monográfico de Actualización. Facultad de Química, UNAM. 1987
- 49.- Shilo & Ishi J. Biochem. (Tokyo) 69, 337-347, 1971
- 50.- Sinsky A., Organic Chemicals From Biomass, (Wise D.L. Editor) The Benjamin Cumming Publ. Co. Inc., Menlo Park, California 1983
- 51.- Technical Bulletin on Ajinomoto Nucleotides Part 1. Boletín publicitario de Ajinomoto Co.
- 52.- Technical Bulletin on Ajinomoto Nucleotides Part 2. Boletín publicitario de Ajinomoto Co.
- 53.- Technical Bulletin on Ajinomoto Nucleotides Part 3. Boletín publicitario de Ajinomoto Co.
- 54.- Teranishi Roy, Flavor Research (Recent advances), Marcel Dekker, Inc. 305-355, 1981
- 55.- Velazquez Corona J. Producción de Mononucleótidos de levadura por degradación específica de RNA, TESIS Facultad Química, UNAM. 1978
- 56.- Wingard L. Enzyme Engineering, Interscience Pub. Co. 1972
- 57.- Yamada, Hakko To Kogyo 34, 668-694, 1976