

03072

2

2 ej

**"DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE UN SISTEMA DE HIDROLISIS DE
LACTOSA MEDIANTE LA UTILIZACION DE CELULAS DE LEVADURA
KFRAGILIS INMOVILIZADAS EN UN SOPORTE DE GELATINA"**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A

EDMUNDO CASTILLO ROSALES

**Centro de Investigación sobre
Ingeniería Genética y Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México**

Cuernavaca, Mor., Agosto de 1990.

**TESIS CON
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 GENERAL

	PAGINA
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES	7
1.-Enzimas en procesos industriales	
1.1 Importancia y Desarrollo	7
1.2 Aplicación en tecnología de alimentos	8
1.3 Aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas	12
2.- β -galactosidasa	
2.1 Fuentes de la enzima	18
2.2 Cinética	23
2.3 Aplicación y procesos comerciales	29
2.3.1. enzima soluble	30
2.3.2. enzima inmovilizada	30
2.3.3. células inmovilizadas	33
RESULTADOS	
1.1 Permeabilización celular	37
1.2 Desarrollo del Biocatalizador	43
1.3 Caracterización cinética del biocatalizador	55
1.4 Determinación de las características difusio- nales del biocatalizador	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	75
APENDICE I	A1-A17
APENDICE II	B1-B27

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PAG		PAGINA
TABLA 1	11	FIGURA 1	9
TABLA 2	16	FIGURA 2	13
TABLA 3	17	FIGURA 3	25
TABLA 4	19	FIGURA 4	25
TABLA 5	20	FIGURA 5	28
TABLA 6	22	FIGURA 6	54
TABLA 7	27	FIGURA 7	57
TABLA 8	31	FIGURA 8	61
TABLA 9	34	FIGURA 9	61
TABLA 10	41	FIGURA 10	62
TABLA 11	45	FIGURA 11	62
TABLA 12	47	FIGURA 12	66
TABLA 13	48		
TABLA 14	50		
TABLA 15	51		
TABLA 15B	53		
TABLA 16	56		
TABLA 17	59		
TABLA 18	63		
TABLA19	64		

PRESENTACION

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México.

Consta de 3 etapas principales:

1. Desarrollo y optimización del método de permeabilización para células de levadura *Kluyveromyces fragilis*
2. Desarrollo y caracterización cinética de un Biocatalizador de células inmovilizadas de levadura *Kluyveromyces fragilis* con actividad β -galactosidasa.
3. Caracterización difusional del biocatalizador.

La forma de presentación es a través de una introducción y antecedentes, que tienen como objetivo, ubicar el trabajo dentro del contexto de los avances que sobre el tema se han publicado.

Posteriormente, los resultados se reportan para la etapa de desarrollo del método de permeabilización y caracterización difusional en forma de 2 artículos de los cuales uno fue aceptado para su publicación y el otro ya fue publicado. La etapa 2 se reporta en la forma tradicional de una tesis.

La sección de materiales y métodos, se encuentra englobada totalmente en los apartados correspondientes de los artículos. Es ahí donde son referidos oportunamente dentro del texto.

Finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones, las cuales son ubicadas en la última sección del trabajo.

RESUMEN

Muchas investigaciones se han llevado a cabo sobre la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa, además varios artículos de revisión se han publicado sobre el tema. Sin embargo el problema no se encuentra aún del todo resuelto, pues los procesos con enzima soluble resultan bastante caros y aún no se encuentra un biocatalizador con las características deseadas para abaratar el proceso. En este trabajo se desarrolló un sistema de inmovilización de células de levadura *Kluyveromyces fragilis* con actividad de β -galactosidasa el cual por las características de pH de trabajo de la enzima las células utilizadas (6-7) se puede aplicar a la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche; además por utilizar células completas abarata el costo del proceso. Dicho catalizador se caracterizó cinética y difusionalmente, presentándose las recomendaciones para su utilización, así como para su mejora y optimización. Además el trabajo presenta el desarrollo de una metodología de permeabilización celular aplicada a las células de levadura para la expresión de su actividad de β -galactosidasa la cual se encuentra dentro de las células; esta metodología podría ser utilizada en células en las que exista interés por actividades enzimáticas intracelulares.

INTRODUCCION

La utilización de la β -galactosidasa o lactasa (E.C. 3.2.1.23) en la hidrólisis de la lactosa presente en la leche y sus subproductos ha sido objeto de un gran número de investigaciones durante los últimos años. En gran parte, estas investigaciones han estado asociadas al gran desarrollo que tuvieron las técnicas de inmovilización, y a las perspectivas que éstas han generado en la utilización más racional de muchos de los componentes de alimentos y sus subproductos de industrialización, tales como el suero de leche.

La posibilidad de hacer accesible la leche y sus subproductos a personas que presentan intolerancia a la lactosa, el mejor aprovechamiento del suero de leche que tradicionalmente ha sido subutilizado, y la solución de los problemas de cristalización o baja solubilidad de la lactosa en la industria de lácteos, son problemas que han hecho necesaria la investigación para la utilización de la β -galactosidasa en la hidrólisis de lactosa.

La relevancia de estos problemas reside específicamente en que:

a) Los problemas nutricionales que se resolverían al hacer accesible la leche a personas con intolerancia (80 % de la población total en México padece o ha padecido estos problemas (1)), tratándose principalmente de infantes cuya principal fuente de nutrimentos es la leche.

b) Además, se considera que en el país los más de 10,000 litros diarios de suero que son tirados diariamente al drenaje(2), podrían ser utilizados para la producción de alimentos para animales y humanos; tal es el caso de la producción de jarabes deslactosados o sustitutos de leche para ganado bovino a partir de suero hidrolizado, lo cual desarrolla una potencial fuente de ingresos extra para la industria quesera.

c) Y finalmente, al ser el suero un producto con una alta D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxígeno) dado su alto contenido de

nutrientes, lo convierten en un importante contaminante de aguas residuales

Debido a lo anterior, es que compañías tan importantes en el área de la Tecnología Enzimática, como son : SnamProghetti, Valio, Corning, Rohm GmbH y Novo, han dirigido buena parte sus líneas de investigación y desarrollo, a la solución de dichos problemas mediante la utilización de la enzima β -galactosidasa para el procesamiento de leche y suero de leche . Es así que procesos, que involucran a la enzima libre o inmovilizada, han sido llevados mas allá de la escala de laboratorio, ya sea a nivel piloto o a escala industrial (3).

Sin embargo, la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa en forma soluble es un proceso que aún actualmente ha resultado costoso, debido principalmente al alto costo que implica la producción y purificación de la enzima (4). Es por esta razón que la utilización de la enzima en forma inmovilizada se presentó como una alternativa para desarrollar procesos que en la actualidad operan comercialmente (5,6,7,8).

Desafortunadamente, los procesos con β -galactosidasa inmovilizada tienen un alto valor y son poco accesibles, principalmente para países del tercer mundo incluyendo a México. Esto se debe principalmente a que dichas compañías no sólo comercializan a los biocatalizadores, sino que venden todo un paquete tecnológico y productos asociados a este (reactor enzimático, sanitizantes, biocatalizador, controladores).

Además, exceptuando el proceso desarrollado por la compañía Snam-Proghetti, todos los procesos se han desarrollado utilizando enzima de origen fungal (del género *Aspergillus* principalmente), por lo cual su aplicación óptima es en el procesamiento de sueros ácidos. Los sueros que mayoritariamente se producen en México son sueros dulces, pues los quesos que aquí se consumen, principalmente son quesos frescos y no madurados. La opción mas viable resulta entonces la utilización de enzima de levadura, cuyo pH óptimo de operación se encuentra cercano a la neutralidad

(6.5-7), y cuya enzima esta aceptada para su uso en alimentos. Entre las levaduras que producen a la enzima β -galactosidasa, se encuentra la levadura *Kluyveromyces fragilis* la cual se utiliza para llevar a cabo este estudio.

Dadas las consideraciones anteriores, el objetivo de este trabajo se dirige al desarrollo de un biocatalizador que se pueda aplicar en la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche principalmente.

OBJETIVOS

Objetivo general.- Desarrollar un biocatalizador para la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche, mediante la utilización de células de levadura *Kluyveromyces fragilis* inmovilizadas en una matriz polimérica.

Objetivos específicos.-

- Desarrollar el método de permeabilización celular adecuado para células de levadura *K. fragilis* mediante el análisis y la evaluación de diferentes métodos reportados en la literatura.
- Establecer, desarrollar y optimizar la técnica de inmovilización adecuada para las células permeabilizadas de levadura *Kluyveromyces fragilis*.
- Caracterizar y analizar el biocatalizador desarrollado, en terminos cinéticos, de conversión y difusionales, a través del uso de modelos teóricos reportados y/o del desarrollo de modelos que describan de la mejor manera su comportamiento.
- Evaluar las perspectivas de aplicación del proceso, planteando las conclusiones y recomendaciones pertinentes.

Dichos planteamientos se llevaron a cabo bajo el siguiente diagrama: (sig. pagina)

**EVALUACION DE DIFERENTES METODOS DE PERMEABILIZACION
CELULAR PARA LA ELECCION DEL MENOS AGRESIVO**



**ADAPTAR Y OPTIMIZAR EL METODO DE PERMEABILIZACION
PARA CELULAS DE LEVADURA**



**DESARROLLAR UN METODO DE INMOVILIZACION CELULAR QUE
SE ADAPTE AL METODO DE PERMEABILIZACION DESARROLLADO**



**REALIZAR LA CARACTERIZACION CINETICA DEL BIOCATA-
LIZADOR Y ESTABLECER SU ECUACION CINETICA**



**EVALUAR LA CAPACIDAD DE CONVERSION DEL CATALIZADOR
UTILIZANDO COMO SUSTRATO SOLUCIONES DE LACTOSA Y
SUERO DE LECHE**



**CARACTERIZAR DIFUSIONALMENTE EL CATALIZADOR EN FORMA
EXPERIMENTAL Y A TRAVES DEL USO DE MODELOS TEORICOS**



**ESTABLECER LA ECUACION DE REACTOR ADECUADA AL COM-
PORTAMIENTO CINETICO-DIFUSIONAL DEL BIOCATALIZADOR**



**EVALUAR LAS PERSPECTIVAS DE APLICACION DEL PROCESO
Y PLANTEAR LAS CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
PERTINENTES**

ANTECEDENTES

1.- ENZIMAS EN PROCESOS INDUSTRIALES

1.1 Importancia y desarrollo de las enzimas

Las enzimas son producidas por células vivas y constituyen el principal medio a través del cual se llevan a cabo las funciones celulares. Dado que las enzimas poseen naturaleza proteínica y que su estructura espacial y conformación de ciertos aminoácidos alrededor del llamado sitio activo les permite catalizar reacciones químicas, se les conoce como biocatalizadores, pues tienen la capacidad de acelerar millones de veces la velocidad de reacción en una misma dirección.

Desde siglos atrás, el hombre ha desarrollado procesos en los cuales las enzimas juegan un papel determinante, aun cuando no siempre estuvo consciente de su utilización. Se puede decir que para su estudio y aplicación industrial se requirió el desarrollo previo de disciplinas como son la Bioquímica, la Microbiología etc. (9).

Son diversos los acontecimientos que se mencionan como los orígenes de la Tecnología Enzimática. Entre ellos destacan la definición de estos agentes activos como enzimas (= en la levadura) por Khúneen 1878; la demostración de la actividad glucolítica fuera de la levadura por Buchner en 1897; y la cristalización de la ureasa en 1926 por Summer, lo cual sugirió la naturaleza química de las enzimas. A partir de estos hallazgos y hasta la actualidad se han descubierto alrededor de 3000 enzimas, quedando muchísimas más por descubrirse.

La importancia de las enzimas radica en su alta capacidad catalítica y el alto grado de especificidad por el sustrato, además del impacto que han tenido en áreas tan diversas como son la Medicina y el sector alimentario y farmacéutico entre otros. Dados estos preceptos se genera todo un campo de investigación conocido como "Tecnología enzimática".

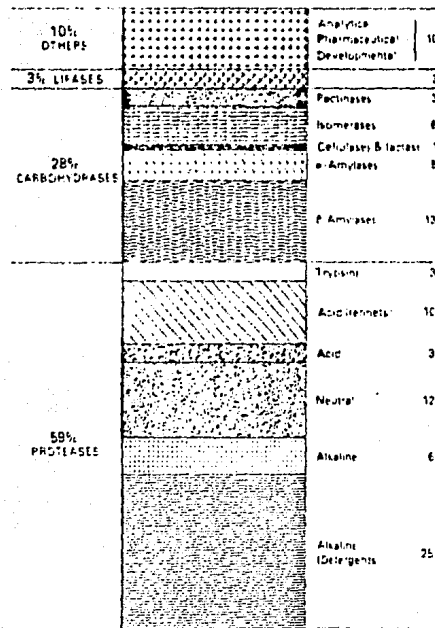
En síntesis podríamos decir entonces que la Tecnología enzimática es un área de la Biotecnología que abarca la producción, extracción, inmovilización y utilización de las enzimas en sectores tales como el alimentario, farmacéutico, médico y el químico. También está orientado hacia el control de la contaminación con diversas aplicaciones en el área analítica y de control de calidad. Dentro del sector alimentario específicamente, el desarrollo y aplicación de procesos enzimáticos para la obtención o mejoramiento de fuentes alimenticias tiene gran impacto, sobre todo en países en desarrollo como México.

Existe en general una gran diversidad de aplicaciones para las enzimas, por ejemplo: en la industria peletera, en donde las proteasas juegan un papel muy importante, o en la industria de los detergentes en donde las lipasas tienen un gran potencial de aplicación. Se sabe que más del 80% de las enzimas que se utilizan en la industria son enzimas hidrolíticas, las cuales se utilizan generalmente para despolimerizar sustancias naturales. De este porcentaje el 60 % son enzimas proteolíticas y el resto son las llamadas carbohidrasas (10). La figura 1 nos muestra la distribución industrial de las enzimas.

1.2 Aplicación en tecnología de alimentos

Al referirnos a enzimas relacionadas con alimentos, es necesario hacer una distinción entre las enzimas que se encuentran en forma natural en los alimentos, y aquellas que son añadidas a ellos para provocar una modificación. Ambas juegan un papel importante en las propiedades de los alimentos; sin embargo haremos énfasis en aquellas que son añadidas al alimento para transformarlo o modificarlo.

Actualmente se conocen un gran número de enzimas que tienen importancia en la industria alimentaria, López-Munguía Canales et al(11) tratan más ampliamente el tema, discutiendo las principales aplicaciones y potenciales de las enzimas en alimentos. De la gran variedad de enzimas que existen sólo algunas de ellas son



Godfrey et al (10)

Fig. 1 Distribución del uso de las enzimas en la industria

utilizadas a nivel industrial, algunas de las más importantes se enlistan en la tabla 1 (12).

Fundamentalmente estos procesos se llevan a cabo utilizando enzimas en solución y resultan, en algunos casos, Tecnologías costosas debido a la etapa de producción y purificación de las enzimas. Sin embargo el uso de enzimas inmovilizadas no ha resultado siempre una buena alternativa para llevar a cabo estos procesos dada la baja estabilidad de algunos catalizadores y la dificultad de su implementación.

De los adelantos mas importantes en el área de la Tecnología enzimática, y que han tenido gran impacto en la industria alimentaria, cabe mencionar al desarrollo de las reninas de origen microbiano (13), la producción de nuevos productos mediante el uso de las enzimas en la industria de los sabores, la utilización de enzimas clarificadoras de mostos en la industria cervecera(10, 14) y la utilización de pululanases para la desramificación en la industria del almidón, de la cual se dice abarca casi 1/3 del mercado total de las enzimas(15).

Actualmente gran variedad de enzimas se estudian con el objeto de encontrarles una aplicación práctica y hacer posible su comercialización. Ejemplo de éstas son la inulinasa, que degrada a la inulina, polimero natural de la fructosa, y las oxido-reductasas, que son potenciales controladores del potencial REDOX de los alimentos en el almacenamiento(16), además de las glucosil transferasas, utilizadas en la síntesis de nuevos polisacáridos (17).

Con los ejemplos anteriores hemos podido constatar el gran impacto y el potencial de aplicación que tiene la tecnología enzimática en el área de la tecnología de alimentos. Además se observa que el uso de las enzimas inmovilizadas no es tan frecuente como se podría pensar, pese a las ventajas que éstas tienen y a la gran cantidad de reportes que sobre las mismas existen, esto se ha debido principalmente a los altos costos que aun implica la implementación de los procesos y de que todavía

Tabla 1.- PRINCIPALES APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS ENZIMAS EN EL SECTOR ALIMENTARIO

ENZIMAS	APLICACION
<p>α-amilasa fúngica proteasa fúngica Lipoxidasa</p>	<p>PANIFICACION Mejoramiento general del pan Ablandamiento de masa Blanqueado de pan</p>
<p>α-amilasa bacteriana Proteasa bacteriana Amiloglucosidasa fúngica Papaína β-Glucanasa</p>	<p>CERVECERIA Malteado de cebada y otros cereales . Elimina dextranas y endulza la cerveza. Clarificación Disminuye la viscosidad.</p>
<p>α-amilasa bacteriana Amiloglucosidasa fúngica Invertasa Glucosa isomerasa</p>	<p>IND. AZUCARERA Solubilización de almidón a alta temperatura. Conversión total de almidón a glucosa Inversión de sacarosa Isomerización de glucosa</p>
<p>Renina o sustituto Penicilinas Nicinasa Lactasa Catalasa</p>	<p>LACTEOS Cuajado de leche por precipitación Eliminación de estos antibióticos en leche. Producción de leche y suero deslactosado . Eliminación de peróxido de hidrógeno.</p>
<p>Lactasa</p>	<p>HELADOS Eliminación de lactosa que puede cristalizar.</p>
<p>Pectinasas</p>	<p>FRUTAS Varias mejoras en el procesamiento (clarificación, filtrado, etc.)</p>
<p>Celulasas</p>	<p>VEGETALES Ablandamiento y mejora del sabor.</p>
<p>Glucosa oxidasa y Lipasas</p>	<p>HUEVO Eliminación de glucosa antes del secado. Propiedades espumantes de la clara de huevo.</p>
<p>Papaína</p>	<p>CARNES Ablandamiento de carne.</p>

las industrias se muestran escépticas en su utilización(11).

1.3 Aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas

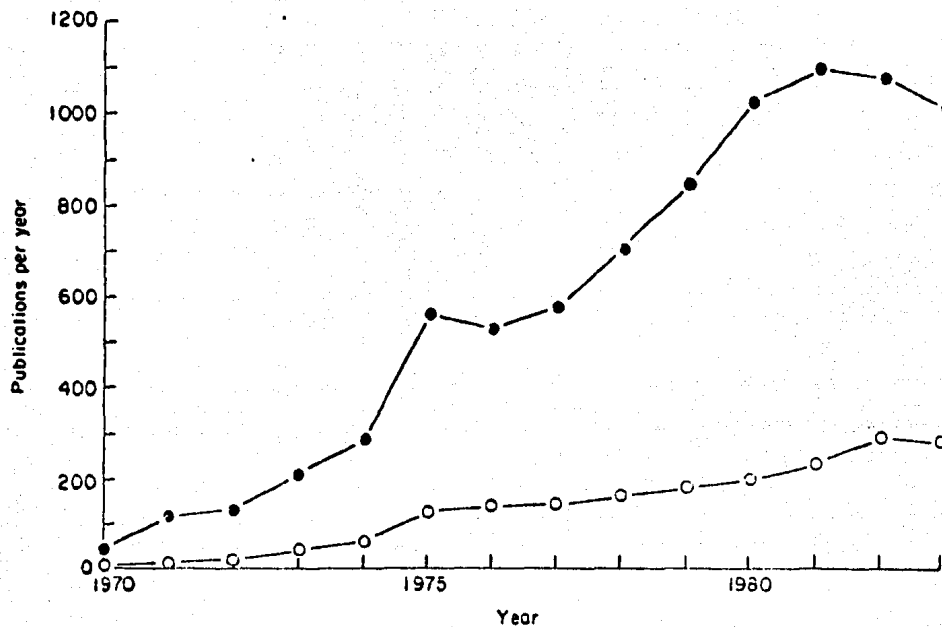
La inmovilización de enzimas o células con actividad catalítica fué una de las áreas de la Biotecnología que tuvo un desarrollo explosivo durante la década pasada. A lo largo de esta década el área de la tecnología enzimática y de las enzimas inmovilizadas ha ido madurando hasta convertirse en una de las áreas clave dentro de los procesos biotecnológicos; no obstante, aun existe mucho trabajo por realizar en este campo.

Un gran número de publicaciones en revistas internacionales sobre inmovilización de enzimas ha sido generado durante las dos últimas décadas (18) (fig 2). Sin embargo esta cantidad de publicaciones no refleja los avances que en el área se han tenido, ya que aun son pocos los sistemas con enzimas inmovilizadas que se utilizan industrialmente. En la actualidad el desarrollo de los biocatalizadores ha llegado a grandes sofisticaciones y existen trabajos que presentan biocatalizadores con sistemas multienzimáticos muy complejos, o aun mas los que utilizan vías metabólicas completas (19) . Es así que en la literatura nos encontramos con una gran variedad de soportes y técnicas de inmovilización (20) .

Para los propósitos de este trabajo, nos referiremos a enzimas o células inmovilizadas como aquéllas que se encuentran confinadas en una matriz, lo cual hace posible su reutilización repetidamente.

Dentro de los procesos industriales que utilizan enzimas inmovilizadas se mencionan algunos de los mas importantes desde el punto de vista de implementación del proceso y que han tenido más éxito comercial:

La utilización de la glucosa isomerasa en forma inmovilizada para la isomerización de glucosa a fructosa, es uno de los primeros procesos industriales en los que se utilizaron las enzimas



Rosevear et al (18)

Fig. 2. Publicaciones generadas sobre enzimas inmovilizadas (patentadas -o-o-, sin patentar -●-●-)

inmovilizadas, aunque en realidad la enzima que se utiliza es la xilosa isomerasa que como actividad secundaria presenta la actividad de glucosa isomerasa. Por tratarse de una enzima intracelular su purificación y utilización en un proceso con enzima libre resulta muy costoso, lo cual hace recomendable su inmovilización para reutilizaciones sucesivas(21) es así que todas las presentaciones comerciales de la glucosa isomerasa siempre son en forma inmovilizada(10). Entre las empresas que han comercializado a la glucosa isomerasa inmovilizada esta la empresa Miles Kali-Chemie, cuya presentación se conoce en el mercado con el nombre de Optisweet[®], la empresa japonesa Takasaki, la empresa Novo Nordisk que inmoviliza células de *Bacillus coagulans*, y la compañía Gist Brocades que inmoviliza *Actinoplasiens misourtienses*.

Otra área industrial en la que las enzimas inmovilizadas juegan un papel importante es la industria peletera, en donde las proteasas son las más utilizadas. Existe un reporte de la compañía Rhone-Progil en la que se utiliza una proteasa inmovilizada para el depilado de las pieles, el nombre comercial de la enzima es Rapidepilase[®] la cual se dice que puede reducir el costo del depilado de las pieles en 1.8 veces comparando con el proceso al utilizar enzima libre (10).

Dentro de las aplicaciones más recientes de las enzimas inmovilizadas se puede mencionar su uso en análisis, tal es el de los electrodos enzimáticos para la detección de azúcares(10).

La compañía japonesa Tanabe Seiyaku desarrolló un método de inmovilización de células en una matriz polimérica de poliacrilamida, la cual en la actualidad cuenta con una gran variedad de aplicaciones, entre las cuales podemos encontrar: la producción de ácidos orgánicos (9), la producción de ácido 6-aminopenicilámico. Para la manufactura de estos soportes utilizan células inmovilizadas de diferentes microorganismos.

Se puede decir que actualmente los procesos que involucran enzimas inmovilizadas a nivel industrial o piloto tienen poco

tiempo de estar en operación, por lo cual existen aún problemas que resolver para optimizar su aplicación. Dentro de los procesos que se reportan utilizando enzimas inmovilizadas los más importantes se resumen en la tabla 2 (9) .

La experiencia industrial de Tanabe Seiyaku en la utilización de enzimas inmovilizadas a nivel industrial, recomienda tener en consideración los siguientes factores para la selección de biocatalizadores:

- costo del soporte o reactivos en la inmovilización
- rendimiento de actividad enzimática del biocatalizador con respecto a la enzima libre
- estabilidad del biocatalizador durante su operación
- regeneración de la actividad enzimática del biocatalizador después de un largo período de utilización

y para la aplicación a nivel industrial de los biocatalizadores, las consideraciones son resumidas por Chibata et al (22).

Sin embargo la gran mayoría de los problemas se presentan de manera diferente para cada enzima, los cuales aún no se han resuelto satisfactoriamente para muchas de ellas, tal es el caso de la β -galactosidasa, de la cual se hablará en detalle en próximos apartados.

En la tabla 3 (23) se ilustran los ejemplos más importantes de la aplicación de las enzimas inmovilizadas en el área de alimentos . Las aplicaciones de las enzimas inmovilizadas son variadas, así como también los soportes en los que se inmovilizan. Generalmente el tipo de soporte que se elige para la inmovilización de enzimas o células debe de cumplir con ciertas características, entre las que se encuentran:

- que sea inerte
- que no interfiera en el transporte de los reactantes
- que tenga buena resistencia mecánica
- que sea de bajo costo y de fácil adquisición

Tabla 2.- ALGUNOS PROCESOS INDUSTRIALES QUE EMPLEAN ENZIMAS INMOVILIZADAS.

ENZIMA	APLICACION
Aminocilasa	Resolución de mezclas racémicas
Aminoácido liasas	Producción de aminoácidos
Glucosa isomerasa	Producción de jarabes fructosados
Glucoamilasa	Producción de glucosa
α -galactosidasa	Hidrólisis de rafinosa
Invertasa	Producción de azúcar invertido
Glucosa oxidasa	Varios
Lactasa	Leches deslactosadas/ industrialización del suero de leche
Proteasas	Clarificación de cerveza
Naranginasa	Tratamiento de jugo de toronja
Penicilin amidasa	Hidrólisis de penicilina

Tabla 3.-APLICACION DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS EN EL AREA DE ALIMENTOS

ENZIMA	SOPORTE	PROCESO
AMINO ACILASA	DEAE-Sephadex	resolución de mezclas de A.A.
ASPARTASA	Gel de poliacrilamida	Producción de ácido aspártico
TRIPTOFANASA	Gel de poliacrilamida	Producción de triptofano
GLUCOSA ISOMERASA	Gran variedad	Producción de jarabes fructosados
*GLUCOAMILASA	Vidrio poroso	Producción de jarabes glucosados
INVERTASA	Celulosa	Inversión de sacarosa
PROTEASAS (papaina)	Complejo papaina-glutaraldeído	Clarificación de cerveza
α -AMILASA	Gel de poli-acrilamida	Jarabes Glucosados
α -GALACTOSIDASA	Gel de poliacrilamida	Hidrólisis de rafinosa
*PECTINASAS	Silica porosa	Modificación de pectinas
NARANGINASA	α -aminohexil-celulosa	Degradación de ramnósidos en cítricos
β -GALACTOSIDASA	Varios	Leches deslactosadas

*PROCESOS QUE SON ECONOMICAMENTE POCO FACTIBLES

Las perspectivas de aplicación de las enzimas inmovilizadas continúa en aumento, debido al gran número de enzimas y aplicaciones tan variadas que se les ha encontrado. Esto podrá incrementarse mientras exista el interés en la investigación y desarrollo en el área de la Tecnología enzimática.

En el apartado siguiente se detallarán los antecedentes que sobre el desarrollo de un biocatalizador de β -galactosidasa se encuentran en la literatura, antes de presentar los resultados que sobre el desarrollo del biocatalizador se obtuvieron.

2. - β -GALACTOSIDASA

2.1 Fuentes de la enzima

Lactasa es el nombre genérico para la enzima β -galactosidasa (E.C.3.2.1.23) o, más formalmente, β -D-galactohidrolasa. Esta enzima se encarga de catalizar la reacción de hidrólisis de la lactosa y convertirla en una mezcla equimolecular de glucosa y galactosa. En la práctica, dependiendo de las condiciones de reacción, no siempre se logra una mezcla equimolecular, dado que en algunos casos la galactosa polimeriza o se une a la misma lactosa para formar oligosacáridos (24,25).

En la naturaleza la enzima se encuentra ampliamente distribuida, es así que la podemos localizar en plantas, animales, bacterias, levaduras (intracelular), hongos (extracelular). Algunas de estas fuentes son utilizadas para producir preparaciones de enzima comercial (26 a 37). En las tablas 4 y 5 se muestran las fuentes de la enzima así como las preparaciones comerciales existentes.

De la gran variedad de fuentes de la enzima, no todas son aprobadas por las leyes sanitarias para su uso en alimentos (35), y son las preparaciones de β -galactosidasa de *A. niger*, *A. oryzae*, *Sacharomyces sp.* las que se consideran como las más seguras desde el punto de vista toxicológico debido a que históricamente han sido utilizadas en forma segura en alimentos y además han sido sometidas a gran cantidad de pruebas de patogenicidad (36).

Tabla 4.- POSIBLES FUENTES DE β -GALACTOSIDASA

ORGANISMOS	FUENTE
Plantas	durazno chabacano almendras espinas de rosas semilla de alfalfa fruto del café
Organos animales	intestino tejido de cerebro y piel
Levaduras	<i>Kluyveromyces</i> (<i>Saccharomyces</i> <i>lactis</i>) <i>Kluyveromyces</i> (<i>Saccharomyces</i>) <i>fragilis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Wingea roberstii</i>
Bacterias	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Thermus aquaticus</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Lactobacillus sporogenes</i>
Hongos	<i>Neurospora crassa</i> <i>Aspergillus factidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Mucor puicillus</i> <i>Mucor michel</i> <i>Scopuloriopsis</i> <i>Alternaria palma</i> <i>Curvularia inaegualis</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Alternaria alternara</i>

Tabla 5.- PREPARACIONES COMERCIALES DE LACTASA (soluble)

MICROORGANISMO	COMPAÑIA
<i>Aspergillus niger</i>	Baxter Laboratories. Chicago Il. USA. Dairyland Food Labs. Waukesha Wi. USA Kyowa Hakko Kogyo Co. Japan Societe Rapidase. Seelin France. Wallerstein Co. Morton Grove Il. USA. GB Fermentation Industries Inc. Il USA.
<i>Kluyveromyces or Saccharomyces lactis</i>	Gist-Brocades. Holland (Maxilact) Nutritional Biochemicals Co. Ltd. Cleveland, USA. Tokyo Tanabe Co. Ltd. Japan
<i>Kluyveromyces or Saccharomyces fragilis</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co. Japan. Sigma Chemicals Co. St. Louis USA Novo A/S Denmark (lactozyme)
<i>Escherichia coli</i>	CF Boeringer GmbH. Mannheim Federal Republic of Germany Worthington Biochemical Corp. Freehold, USA
Preparaciones de levadura son suministradas por:	British Drug House Ltd. London England. DEBI. Cassina de Pecchi. Milan Italy Sturge Enzymes Ltd. England (Hydrolact) Miles Laboratoies. USA (Godo) Fungal preparations Miles Laboratories (USA) (Takamine)

Entre las β -galactosidasas, la de *Candida pseudotropicalis* también ha sido aceptada para su uso en alimentos (38) y una de las que ha sido más estudiada es la de *E. coli*. Sin embargo ésta no es aceptada para su uso en alimentos dada la alta patogenicidad del microorganismo (38).

En función de la fuente de la enzima la β -galactosidasa presenta diferentes propiedades, es así que la β -galactosidasa de *E. coli* se reporta como la más grande, ya que presenta pesos moleculares hasta de 850 000 daltones, mientras las enzimas de *Kluyveromyces fragilis* y *A. oryzae* poseen pesos moleculares de 201 000 y 90 000 respectivamente. Otras propiedades en las que difieren las β -galactosidasas son la temperatura y el pH óptimo; en algunas ocasiones estas variaciones se presentan aun cuando la enzima es de la misma fuente, para preparados o extractos de diferentes compañías, variaciones se hacen más frecuentes cuando se trata de enzimas inmovilizadas, esto es debido al grado de pureza de los extractos pues generalmente arrastran otro tipo de proteínas que interfieren en las propiedades de las enzimas; o como en el caso de las enzimas inmovilizadas, que se debe principalmente a los cambios conformacionales y en el microambiente que sufren las enzimas (39).

En general las β -galactosidasas de hongos presentan valores de pH óptimos en el rango ácido, entre 2.5 y 4.5, mientras que las de las levaduras y las bacterias tienen rangos de pH más cercanos a la neutralidad, de 6 a 7 (35).

Otras de las propiedades importantes de las β -galactosidasas es la susceptibilidad a la inhibición por producto, es decir por galactosa. Las enzimas de hongos generalmente son las que presentan más acentuado este fenómeno (40).

Las β -galactosidasas de organismos termofílicos presentan alta termoestabilidad, lo cual resulta muy interesante desde el punto de vista de su aplicación, ya que son capaces de resistir temperaturas de operación hasta de 60°C. Esto les confiere un

menor riesgo de contaminación microbiana en procesos continuos(37, 41).

Las principales propiedades de algunas de las β -galactosidasas se resumen en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6 .- PRINCIPALES PROPIEDADES DE ALGUNAS β -GALACTOSIDASAS

Fuentes	pH óptimo	Peso molecular (kD)	Temperatura óptima (°C)
<i>A. niger</i>	3.0-4.0	124	55-60
<i>A. oryzae</i>	5.0	90	50-55
<i>K. fragilis</i>	6.6	201	37
<i>K. lactis</i>	6.9-7.3	135	35
<i>E. coli</i>	7.2	540	40
<i>L. thermophilus</i>	6.2-7.1	530	55-57
<i>C. Inaequalis</i>	3.4-4.3		30-55
<i>B. circulans</i>	6.0		60-65
<i>Bacillus sp</i>	6.8		65
<i>Fusarium - moniliforme</i>	3.8-5.0		50-60
<i>L. bulgaricus</i>	7.0		42-45
<i>Leuconostoc- citrovorum</i>	6.5		60
<i>Scopulariopsis</i>	3.6-5		50-65
<i>Bacillus- stearothermophilus</i>	6.0-6.4	215	65
<i>Streptococcus- thermophilus</i>	6.5-7.5	500-600	55
<i>Mucor pucillus</i>	4.5-6		60
<i>Alternaria- alternara</i>	4.5-5.5		50-70
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5-5.5	570	80

2.2 Cinética de la β -galactosidasa

El estudio del mecanismo de reacción de la β -galactosidasa así como la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima ha ido paralelo al estudio e investigación que sobre la misma se ha realizado. Reviste gran importancia en un proceso catalítico el conocimiento de su mecanismo de reacción puesto que proporcionará un mejor conocimiento de las propiedades y el manejo del sistema. En el caso de las enzimas nos permitirá definir en un momento dado el proceso de inmovilización adecuado, de tal forma que no se afecten los sitios activos de la enzima, además de permitirnos el conocimiento de su ecuación de velocidad, lo cual resulta de gran importancia en el diseño y operación de reactores enzimáticos.

En lo que se refiere a los mecanismos de reacción propuestos para la β -galactosidasa, así como sus propiedades cinéticas existen numerosos reportes en la literatura. En este trabajo se hará énfasis especial en los que se refieren a la enzima de *Kluyveromyces fragilis* dado que se trata del microorganismo que se utilizará en la parte experimental. El uso de la células de *Kluyveromyces fragilis* en este proyecto se ha justificado en la introducción del trabajo.

En la actualidad el mecanismo de reacción más aceptado para la β -galactosidasa es el propuesto por K. Wallenfels (42) y Shukla (43) el cual podría ilustrarse de la siguiente manera: (figuras 3 y 4). En estas figuras se observa que, los grupos imidazol y sulfhidrilo de los aminoácidos del sitio activo de la enzima son parte esencial en el mecanismo de reacción y pertenecen a los aminoácidos histidina y cisteína respectivamente (42).

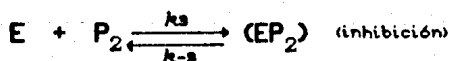
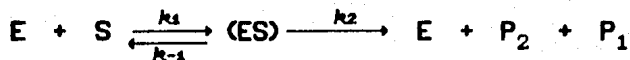
Además se sabe que, los valores de pH a los que trabajan las β -galactosidasas de diferentes fuentes están determinados por la secuencia de aminoácidos ionizables más cercanos al sitio activo, y por el número de subunidades que forman la estructura cuaternaria de la enzima. Para la enzima de *E. coli* se han detectado cuatro subunidades y para la de *Kluyveromyces fragilis*

se tienen hasta nueve o diez subunidades (44).

En cuanto a la cinética de la β -galactosidasa, el establecimiento de una ecuación adecuada para cada enzima de las diversas fuentes, cobra especial relevancia cuando el sistema se aplica en reactores enzimáticos, ya sea que se trate de enzima libre o inmovilizada. Es decir que el modelo cinético que se elija será aquel que mejor describa los datos experimentales, tomando en cuenta siempre que este dependerá de la fuente específica de la enzima, ya sea hongos, levaduras, bacterias, etc.. A continuación se presentan los modelos que se reportan en la literatura.

Existen varios reportes referentes al mecanismo cinético de la β -galactosidasa de la levadura *Kluyveromyces fragilis* (45, 46, 47). Weetall (45) concluye que la inhibición más importante en esta enzima es la que produce la galactosa, siendo del tipo competitivo. Esto se puede observar en las figuras 3 y 4, dado que la galactosa de la molécula de lactosa es la que se asocia en el centro activo de la enzima por el cual compite la molécula de galactosa.

El mecanismo propuesto para esta reacción es el siguiente:



donde :

E =ENZIMA

P₁ =GLUCOSA

P₂ =GALACTOSA

S =LACTOSA

k₁₋₃=CONSTANTES DE LAS REACCIONES INDIVIDUALES

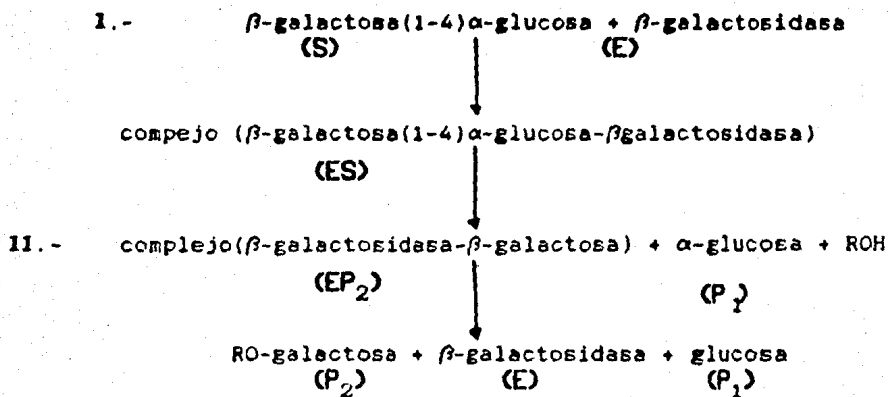


Figura 3.- Mecanismo de reacción de la β -galactosidasa

el cual estructuralmente es el siguiente:

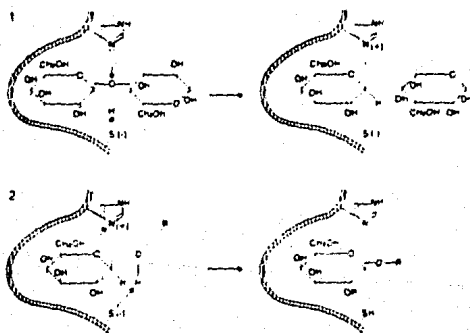


Figura 4.- Mecanismo de reacción estructural de la β -galactosidasa.

así entonces la ecuación de velocidad de acuerdo a Wallenfels será (45):

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{S + K_m(1 + P_2/K_i)}$$

donde: v = velocidad de reacción

$$V_{max} = k_2 E_t$$

E_t = Concentración de enzima total en el ensayo

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$K_i = k_{-3} / k_3$ (constante de inhibición)

Esta ecuación es la más utilizada en la literatura para la integración de ecuaciones de velocidad, cuando se trabaja con β -galactosidasa libre.

Los valores de las constantes cinéticas que se encuentran más frecuentemente en la literatura son presentadas en la tabla 7.

Estos valores son reportados para enzima libre e inmovilizada de varias fuentes enzimáticas(48).

Otro modelo reciente, Kuo Chen Chen et al (49), muestra un modelo cinético para la inhibición competitiva por galactosa y una no competitiva por glucosa, siendo estas inhibiciones mutuamente excluyentes en la reacción. El estudio resulta en una ecuación cinética más compleja que las anteriormente reportadas, pero que ajusta mejor los datos experimentales con mejores correlaciones que con el modelo de Weetall (45). El modelo cinético y la ecuación propuestos son los siguientes (49): Fig 5.

La ecuación cinética será entonces:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_s \left(1 + \frac{G}{K_g} + \frac{A}{K_a} \right) + S \left(1 + \frac{G}{\alpha K_g} \right)}$$

donde:

v = velocidad de reacción

K_a, K_g, K_p = constantes de disociación del esquema (fig. 5)

Aún más recientemente Bakken et al (50) proponen tres modelos cinéticos diferentes para la hidrólisis de lactosa los cuales

Tabla 7.- CONSTANTES CINÉTICAS DE DIFERENTES β -GALACTOSIDASAS^a

	Soluble	Inmovilizada
Enzima de levadura(M)	.112	0.714
Km (app) M	.666	3.270
Ki (app). mM Gal	10.5	11.30
Enzima de hongos(M)	.04	.05
Km (app) M	1.25	3.22
Ki (app) mM Gal	No det.	6.54;6.2,4.7
<i>Escherichia coli</i> (M)	.625 (25 C)	.12 (25°C)
Km (app) M	No det.	no det.
Ki (app) mM	17.5	16.3

^aRichmond, M. et al. (48).

engloban al modelo de Weetall (45) y de Kuo Chen Chen (49), con pequeños ajustes en los parámetros cinéticos.

2.3 Aplicación de la β -galactosidasa y Procesos comerciales

Las principales aplicaciones que se tienen para la β -galactosidasa son las siguientes (10) :

- a) **Leche fluida.** La hidrólisis de lactosa en leche fluida mejora la digestibilidad para intolerantes a la lactosa, además de incrementar el poder edulcorante y acentuar el sabor de ésta.
- b) **Leche en polvo.** Las leches en polvo con lactosa hidrolizada se utilizan en la preparación de fórmulas dietéticas, generalmente en personas con deficiencia temporal de β -galactosidasa.
- c) **Leches fermentadas.** La utilización de leches hidrolizadas en la elaboración de quesos o leches fermentadas, incrementa la velocidad de producción de ácidos, de tal forma que los tiempos de proceso se ven disminuidos considerablemente.
- d) **Leches concentradas.** Utilizada principalmente para prevenir los efectos de la cristalización de la lactosa.
- e) **Alimentos para animales.** Generalmente se utilizan sueros hidrolizados en la preparación de concentrados alimenticios para cerdos y ganado vacuno.
- f) **Suero.** El suero hidrolizado se concentra para producir jarabe deslactosado con alto poder edulcorante. Este jarabe puede ser utilizado como fuente proteica de alta calidad, o como sustituto parcial o total de la leche en algunos procesos de la industria de alimentos.
- g) **Suero desproteínizado.** Después de la desmineralización el suero es hidrolizado y concentrado a 60-65% de sólidos, con lo que se puede obtener un jarabe con propiedades similares a un jarabe de dextrosa, el cual en algunos casos es utilizado como saborizante-edulcorante en la industria de alimentos.

Los sistemas de reacción de hidrólisis de la lactosa que más se utilizan son en lote

2.3.1 Enzima soluble

Aunque un gran número de sistemas para la hidrólisis de lactosa han sido reportados, sólo algunos de ellos se han escalados con éxito a nivel industrial o semindustrial. La tabla 8 muestra algunos de los procesos utilizando enzima libre que se encuentran disponibles comercialmente (51).

El problema principal que se tiene con el uso de la enzima libre a nivel industrial, es el alto costo que implica en el proceso. Así, aunque las preparaciones comerciales de la enzima son bastante eficientes, por la alta actividad específica de la mayoría, los procesos resultan costosos.

Los procesos con enzima libre generalmente se llevan a cabo en tanques agitados con operación en lote, las temperaturas óptimas de operación se encuentran entre los 35-40°C.

Generalmente, las mismas compañías que comercializan la enzima libre, son las que han hecho los esfuerzos más grandes por desarrollar un proceso con enzima inmovilizada, de tal forma que los costos de proceso sean abatidos.

2.3.2 Enzima inmovilizada

En 1975 Vasilis Giekas et. al. (51) publica una revisión bibliográfica muy completa sobre β -galactosidasa, en la cual se mencionan los intentos más importantes por desarrollar un proceso con β -galactosidasa inmovilizada. De esa fecha hasta ahora se sabe que algunos de estos procesos ya son disponibles comercialmente (4,5,6,7,52,). Los principales antecedentes al desarrollo de estos procesos son mencionados a continuación.

La compañía francesa "Union Laitiere Normande " en 1978 inició con pruebas a nivel semiindustrial utilizando un catalizador desarrollado por Corning Glass Co. en el cual se inmovilizó enzima fungal (*Aspergillus niger*) (53). Simultáneamente, con la misma enzima la compañía inglesa "Milk Marketing Board" evaluó la estabilidad operacional del sistema. La

Tabla 8.- PRESENTACIONES COMERCIALES DE LA β -GALACTOSIDASA EN FORMA SOLUBLE Y NIVEL DE APLICACION.

COMPANIA	ENZIMA(SUSTRATO)	NIVEL
Valio Laboratory	lactasa de <i>K. Lactis</i> (UHF-leche)	Planta piloto (Finlandia)
Novo A.S.	lactasa de <i>K. fragilis</i> (Procesamiento de suero)	Planta piloto (Dinamarca)
Tetra Pak	lactasa de <i>K. fragilis</i> (UHF-leche)	Industrial (Suecia)

operación se llevó a cabo en forma continua durante 5 días/semana, en los cuales se procesaron alrededor de 30,000 litros de suero dulce, que se convirtieron en 1.7 toneladas de jarabe de suero (1200 kg de sólidos). La hidrólisis se llevó a cabo hasta un 80 % de conversión. La planta operó de 16 a 20 horas al día. El principal problema detectado fué la contaminación microbiana, facilitada por las temperaturas de operación (35-40°C) y el tipo de sustrato tan nutritivo que se utilizó.

El primer intento por utilizar β -galactosidasa inmovilizada a nivel industrial fue hecho con el catalizador desarrollado por la compañía italiana Snam-Progetti Laboratories (54). Este catalizador se preparó mediante el atrapamiento de la β -galactosidasa de la levadura *Kluyveromyces lactis* en fibras de triacetato de celulosa (55). La compañía "Centrale du Latte" fué la encargada de implementar el proceso, teniendo una capacidad de operación de 10,000 kg de leche/día. El proceso se realizó con leche estéril, a temperaturas de 5-8°C en tanques agitados y con operación por lote. El principal problema que presentó el proceso fué también la alta contaminación microbiana, debido a las mismas razones anteriores. El trabajar a bajas temperaturas se convierte en el común denominador de futuros procesos, sobre todo en aquellos que utilizan a la leche como sustrato.

La empresa finlandesa Valio (52) desarrolló un proceso de inmovilización en resinas fenolformaldehídicas, utilizando β -galactosidasa de *Aspergillus niger*, trabajando con suero ácido desproteínizado. El reactor en lote operó a temperaturas de 10°C, encontrando una caída muy drástica de actividad enzimática a medida que se incrementaba la temperatura de operación (56). Este proceso se encuentra disponible comercialmente desde 1981, aunque actualmente se utiliza *A. oryzae* porque ofrece mejores resultados en el proceso, el rango de pH óptimo que reportan es de 4.5-6.9 y un tiempo de vida media de 1.5 años con conversiones de por lo menos 80% (52).

Actualmente existen otros procesos comerciales, cada uno con diferentes características de proceso y operación, tal es el caso de los catalizadores de las compañías Gist Brocades, Sumitomo, Röhm, British Charcoals & Mc Donald's (4, 5, 6, 7, 52), sin embargo se sabe que se encargan de comercializar el paquete tecnológico que incluye reactor y enzima inmovilizada, pero no se encuentran reportes que muestren el éxito del proceso a nivel industrial (Tabla 9).

Se sabe que las principales causas del poco éxito que han tenido estos catalizadores son las siguientes (21) :

→No se cuenta con un sistema que utilice a los sustratos completos, debiendo desproteinarlos antes del tratamiento, los procesos que trabajan con el sustrato entero presentan pérdidas de actividad enzimática muy drástica debido a la contaminación.

→Dado los problemas de contaminación, se hace necesaria la operación a bajas temperaturas, lo que hace al proceso largo y costoso.

→Dados los problemas anteriores, los procesos de deslactosado de la leche y sus subproductos se complican para su industrialización.

2.3.3 Células inmovilizadas

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de una tecnología que pueda minimizar los problemas que se mencionaron en el inciso anterior, y que sea accesible en todos sentidos a los países en vías de desarrollo, como es el caso de México se sigue haciendo necesaria, por lo que resulta importante la suma de esfuerzos para lograrlo.

Particularmente en el grupo de trabajo del laboratorio de Tecnología enzimática del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, se han hecho intentos por desarrollar esta tecnología, basándose en un sistema de células inmovilizadas. La factibilidad económica del proceso se basa en la inmovilización de células enteras de levadura el cual evita la extracción y purificación de la enzima. Dichas etapas del proceso

Tabla 9.- SISTEMAS DE β -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA DISPONIBLES COMERCIALMENTE

COMPANIA	PROCESO	NIVEL (compañía)
Snamprogetti	Fibras de triacetato de celulosa, enzima de levadura atrapada, reduce el contenido de lactosa en leche, proceso Batch.	Industrial Centrale Lateria Milano (Italy)
Corning Glass	Lactasa de <i>A. niger</i> enlazada a silica, hidrólisis de UF suero ácido, reactor de lecho fijo	Semindustrial (UIN Condi) (France) (Dairy Crest UK)
Connecticut Lehigh Universities	Lactasa de <i>A. niger</i> enlazada a alumina porosa, reactor de lecho fluidizado con UF suero.	Planta piloto (USA)
Valio Laboratory	Lactasa de <i>A. niger</i> adsorbida en resina Duolite ES-762, procesa UF suero	Industrial Keymenlaakso Dairy (Finland)
Gist Brocades	Inmovilización de enzima Maxilact, procesamiento de leche	Planta piloto (Holanda)
Rohm GmbH	lactasa de <i>A. oryzae</i> enlace covalente a Flexazym LA-F, proceso de UF suero ácido y	Planta piloto (W. Germany)
Sumitomo	Lactasa de <i>A. oryzae</i> covalentemente enlazada a resinas de intercambio iónico procesamiento de suero y leche.	Planta piloto (Japón)
Amerace Corp	Lactasa de <i>A. oryzae</i> enlace covalente a PVC-silica microporosa en láminas, procesamiento UF suero.	Planta piloto (USA)

* Vasilis Gekas et al ref. (51).

son las que implican mayor incremento en el costo del producto final. Además se pretende proteger a la enzima contra el proceso de inmovilización y su consecuente desnaturalización al mantenerla dentro de la célula, por lo que se hace necesario también un método de permeabilización celular que nos permita expresar el máximo de actividad lactásica intracelular de las células de la levadura sin una liberación de ésta. Cabe mencionar que se elige trabajar con levaduras, dado que el pH óptimo de trabajo de la β -galactosidasa de estos microorganismos(6-7) permiten su aplicación en leche y sueros dulces. Como antecedentes a este trabajo se tienen los siguientes resultados (57):

SISTEMA DE INMOVILIZACION: Fibras de acetato de celulosa

ACTIVIDAD ENZIMATICA: 25 UONPG/g de catalizador

METODO DE INMOVILIZACION: Atrapamiento-entrecruzamiento

AGENTES ENTRECRUZANTES UTILIZADOS: carbodimidas y glutaraldehído

EFICIENCIA DE LA INMOVILIZACION: 5-10%

FUENTE ENZIMATICA: Células de levadura *Kluyveromyces fragilis*

PROBLEMAS PRESENTADOS:

- Pérdida de enzima durante la operación del catalizador, debida a una permeabilización no controlada de las células.
- Baja eficiencia de la inmovilización provocada por un enfrentamiento directo de los agentes entrecruzantes y la enzima (sitios activos, soportes estructurales, etc).
- Actividad enzimática poco competitiva con catalizadores comerciales
- Costos elevados del catalizador que presentó la máxima actividad (25 UONPG/g catalizador), dado que para su preparación se utilizó carbodimida de precio elevado por ser la que presentó mejores resultados (1-etil-3,3-dimetilaminopropilcarbodimida).

De dichos resultados se observa que:

- La enzima es muy sensible a tratamientos con agentes entrecruzantes como es el glutaraldehído o la carbodimida.

→El tratamiento de permeabilización es bastante exhaustivo, de tal forma que se llega a una lisis casi total de las células provocando la liberación de la enzima, así entonces la enzima queda directamente expuesta a los agentes entrecruzantes.

→El catalizador tiene una actividad específica muy baja, comparada con el mínimo requerido para un éxito comercial(3) y que es el que en promedio presentan los catalizadores comerciales de β -galactosidasa (250 U/g de catalizador, medidas en ONPG=UONPG/gcat). El catalizador presenta una actividad de 25 UONPG/gcat.

→El catalizador que mejores resultados ofreció fué el preparado con carbodimida como agente entrecruzante; el precio de este reactivo es bastante elevado, por lo que resulta un proceso casi incosteable para ser escalado.

En función de estos antecedentes es que se determinaron las estrategias de trabajo, y se llevó a cabo el trabajo experimental, el cual se detallará en los siguientes apartados.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.1 PERMEABILIZACION CELULAR.

Como se presenta en los antecedentes, los catalizadores de β -galactosidasa desarrollados a la fecha han sido principalmente elaborados con enzima que proviene de hongos, las cuales tienen su pH óptimo de trabajo en el rango ácido. Esto los hace aplicables a sueros ácidos principalmente (pH=4-5). Al intentar procesar leche o suero dulce de leche, se hace necesaria una enzima cuyo pH óptimo se encuentre cercano a la neutralidad. Como otras β -galactosidasas de levaduras la de *Kluyveromyces fragilis* tiene estas características (44), por lo que se eligió como fuente enzimática. Además dentro del grupo de trabajo se han optimizado las metodologías de producción de la enzima utilizando este microorganismo, el cual cabe mencionar, fue obtenido de la colección de la "Northern Regional Research Laboratories" en Estados Unidos, con clave *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109.

Por otro lado, de acuerdo a los antecedentes que se tienen sobre la inestabilidad de esta enzima, se decide trabajar con las células completas de la levadura, con el fin de brindar la posibilidad de aumentar la estabilidad de la enzima, tanto durante el proceso de inmovilización como durante la operación del catalizador.

Al elegir un biocatalizador de β -galactosidasa con células inmovilizadas de *Kluyveromyces fragilis*, se presenta un primer obstáculo: la ubicación de esta enzima en las células es intracelular, de tal forma que para que esta actividad enzimática pueda ser aprovechada se necesita de un tratamiento previo de permeabilización. Este tratamiento debe ser controlado de tal forma que no permita la salida de la enzima de las células, sino que sólo permita la salida de productos y entrada de sustrato, de no ser así se tendría mucha pérdida de enzima en la operación y uso del biocatalizador.

La primera etapa del trabajo consistió entonces en efectuar una evaluación de diferentes métodos de permeabilización celular reportados en la literatura, de tal forma que se eligiera aquél que permitiese expresar un máximo de la actividad enzimática sin que esta se saliera de las células. Para un balance de la actividad enzimática que pudiese ser medida con estos métodos la actividad expresada se comparó con la que presentaron las células de la levadura *Kluyveromyces fragilis* al ser permeabilizadas con disolventes (alcohol isoamílico), ya que éste método se utiliza en forma rutinaria para la medición de actividad enzimática.

Se evaluaron métodos tales como el tratamiento con proteasas, microbianas para degradar las proteínas de la membrana celular, o el de la congelación-descongelación, el cual ocasiona una ruptura mecánica de la célula; se probaron también diferentes disolventes y mezclas de éstos, así como el tratamiento con diferentes sales de fosfato para "perforar" parcialmente la membrana por efecto de la presión osmótica.

Se eligió el método que presentó las mejores características en función de nuestros objetivos, siendo éste la permeabilización con sales de fosfato. A dicho método se le sometió a una optimización estadística, a través de la utilización de los métodos de Plackett-Burman y de Box-Wilson. El método de Plackett-Burman se utilizó para determinar aquellas variables que afectan en forma importante en el proceso de permeabilización. Contando con dichas variables se procedió a la determinación del nivel más apropiado de utilización con el uso del diseño experimental de Box-Wilson. Finalmente, en esta etapa se evaluaron las células en forma libre en la hidrólisis de lactosa.

El artículo denominado "*Permeabilization treatment to control the enzyme leakage for Kluyveromyces fragilis yeast cells*" presenta los resultados de la etapa de permeabilización de las células. Este artículo fue publicado en el libro "Physiology of immobilized cells" (editores :J.A.M. de Bont, J. Visser, B.Mattiasson, y J.Tramper en editorial Elsevier Science

Publishers, Amsterdam 1990), además de ser expuesto en el "Symposium of Physiology of immobilized cells" celebrado en diciembre de 1989 en Wagenigen, Holanda.

Como puede observarse en el artículo, con los métodos evaluados no se pudo lograr un control de la permeabilización, ya que se detectó actividad enzimática en los sobrenadantes (fuera de las células) a tiempos posteriores a la permeabilización. Los métodos en los que se utilizaron disolventes, mostraron buenos resultados en una etapa inicial; sin embargo, al paso del tiempo el efecto de la permeabilización continuó ya que el disolvente residual no se pudo eliminar totalmente, por lo cual el proceso continuó hasta llegar a una lisis de la célula. El método de proteasas presentó el principal inconveniente de que los productos de la hidrólisis liberan aminoácidos azufrados, los cuales confieren a las células un aroma bastante desagradable, que al ser aplicado a productos con alto contenido de proteínas como son el suero y la leche, provocarían cambios indeseables en el aroma y sabor del producto final.

El método en el que se utilizan sales como agentes permeabilizantes, en donde según reportes de la literatura (58) se trata de un efecto parecido al "salting out", fue el que se eligió para su optimización dado que se trató de un método que es fácil de controlar y además puede resultar bastante económico. En la tabla 1 del artículo (Apéndice I pg A10) puede observarse que fue el método que presentó la mayor retención de la actividad enzimática intracelular, es así que se eligió este método para su optimización.

La primera etapa consistió en observar el efecto del tiempo de permeabilización en las células, tomando como referencia la actividad que presentan las células al ser permeabilizadas con alcohol isoamílico. Este efecto se observa en la tabla 2 del artículo (Apéndice I pg A11), el cual muestra que el método es posible de ser mejorado, ya que la expresión de la actividad enzimática esta afectada directamente por el tiempo de permeabilización, esto se observa mejor en la tabla 10, en la cual se presenta la influencia del tiempo de permeabilización sobre la relación entre la enzima intracelular (AEI) que puede ser medida y

Tabla 10.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PERMEABILIZACION EN EL CONTROL DEL PROCESO.

TIEMPO (min)	AEI/AEE.
30	5.6
75	2.6
90	2.3
105	2.5
120	2.2
135	2.1
180	1.9

la extracelular(AEE), expresada como: AEI/AEE , tomando como base los resultados de la tabla 2 del artículo(Apéndice I pg A11).

Se puede observar en la tabla 10 que el tiempo de permeabilización influye directamente en el proceso, ya que a tiempos largos de permeabilización con sales la relación AEI/AEE disminuye progresivamente, siendo que en 180 minutos se tiene un valor de 1.9, el cual es el mismo que se tiene con el alcohol isoamílico, siendo éste un método en el que se tiene una lisis total de las células.

Sin embargo no sólo el tiempo de permeabilización es determinante en el proceso, sino que diversos factores influyen en él. Para determinar la influencia de otros factores en el proceso, y qué tan determinantes son, se realizó un estudio estadístico siguiendo los modelos de Plackett-Burman y Box-Wilson.

Los resultados de dicho estudio se presentan en las tablas 3,4,5 del artículo(Apéndice I pg A12-14), presentando los resultados y las condiciones finales en la tabla 6 del artículo(Apéndice I pg A15). En estas condiciones se logró retener a la enzima dentro de las células, las cuales fueron evaluadas en reacciones completas de hidrólisis en repetidas ocasiones. La evaluación se llevó a cabo en lotes de hidrólisis de lactosa(soln. al 5% p/v) a 37° y un pH de 6.6, recuperando las células después de cada hidrólisis, logrando reutilizarla hasta seis veces sin que estas perdieran más del 50% de su actividad inicial.

Estos experimentos confirman aun más la posibilidad de poder expresar la actividad enzimática, manteniendo a la enzima dentro de la célula, de tal forma que al enfrentarla en el proceso de inmovilización esta quede protegida.

Con estos resultados se procedió al desarrollo y evaluación de un biocatalizador de lactasa con células de *Kluyveromyces fragilis* inmovilizadas, las cuales fueron permeabilizadas de manera controlada de acuerdo a las condiciones de la tabla 6 de este artículo (Apéndice I pg A15).

1.2 DESARROLLO DEL BIOCATALIZADOR CON CELULAS DE LEVADURA INMOVILIZADAS.

a) Evaluación del método de inmovilización celular en fibras de acetato de celulosa para las células con permeabilización controlada.

Debido a que el nivel de permeabilización celular es un factor determinante en la eficiencia de la inmovilización, en la etapa anterior del proyecto se estudio el proceso de permeabilización de las células de levadura *K. fragilis* con el objeto de retener la enzima β -galactosidas dentro de la célula. Al no controlar la permeabilización de las células la enzima difunde hacia la mezcla de reacción sin que pueda ser retenida en el soporte.

De acuerdo al artículo presentado en el inciso anterior se llegó a la conclusión de que el proceso de permeabilización era eficiente (Apéndice I), entonces se pensó que las células permeabilizadas por éste método podían ser reutilizadas sin la necesidad de inmovilizarlas, puesto que al estar reteniendo las células a la enzima estas mismas podían funcionar como soporte. Sin embargo al tratar de utilizar las células permeabilizadas como un catalizador, perdieron una considerable actividad enzimática, como para poder realizar diferentes lotes de hidrólisis de lactasa. Debido a esto se optó por continuar con el objetivo inicial que fue el de inmovilizar células completas de *Kluyveromyces fragilis* con actividad de β -galactosidas. El soporte que se utilizó para la inmovilización de las células fue el de acetato de celulosa, pues es en este soporte en el que se tenían antecedentes en cuanto al manejo de la metodología (57). Las células utilizadas para la inmovilización fueron aquellas que se obtuvieron después del tratamiento de permeabilización con sales. Esto permitió observar el efecto tiene el control de la permeabilización en la eficiencia de la inmovilización en fibras de acetato de celulosa y si el método de inmovilización era el adecuado.

La forma en que se efectuó la evaluación fue la siguiente:

Se inmovilizaron células, permeabilizadas con sales, en fibras de acetato de celulosa de acuerdo a la metodología planteada por Castillo (57), la cual se basa en el atrapamiento de las células de levadura en un soporte de acetato de celulosa. Las células son suspendidas en un buffer de fosfatos (pH=6.6) y se emulsionan con el acetato de celulosa disuelto en acetona, posteriormente son extruídas y precipitadas en tolueno para obtener un biocatalizador en forma de fibras.

Posteriormente se evaluó la eficiencia de la inmovilización por medio de la detección de la existencia de enzima en las mezclas de reacción; esto es midiendo la actividad enzimática a las fibras preparadas mediante la utilización de el cromóforo ONPG, como sustrato sintético para la enzima (Materiales y Métodos del artículo Apéndice I pg A4). Las fibras presentan actividad enzimática, sin embargo al evaluar el lugar donde esta estaba presente se encontró que casi toda ella estaba fuera del biocatalizador (tabla 11).

En la tabla 11 se observa que, pese a haber inmovilizado células con una permeabilización controlada por el sistema fosfatos-células-temperatura, la enzima siguió presente en los sobrenadantes. Las lecturas de absorbancia en los tubos de la reacción en los cuales no se desnaturaliza la enzima por temperatura ("sin detener"), muestran valores excesivamente altos pese a ya no estar presentes las fibras, de lo cual se deduce que la reacción continúa con la enzima que se está liberando de las fibras, resultando así en un método poco eficiente de inmovilización.

No sólo con un control del proceso de permeabilización es posible retener a la enzima dentro del soporte, ya que el proceso de inmovilización contribuye de manera significativa a la permeabilización de las células y por lo tanto a la difusión de la enzima al exterior del soporte. Esto se debe a que los disolventes

TABLA 11. LECTURAS DE ABSORBANCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CELULAS PERMEABILIZADAS EN FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA.

Tiempo (Min)	Absorbancia (410nm) (Deteniendo la reacción)	Absorbancia (410nm)* (Sin detener la reacción)
0	0.000	1.637
4	0.158	>2.000
8	0.319	>2.000
12	0.495	>2.000

*Absorbancia medida a los tubos de la cinetica sin detener la reaccion.

utilizados en el proceso de inmovilización, como son la acetona y el tolueno, atacan directamente a las células permeabilizadas con sales, llegando a una lisis casi total de éstas. Por estas razón se decidió evaluar el efecto de los disolventes utilizados en la inmovilización.

El procedimiento consistió en inmovilizar células sin permeabilizar para observar el efecto que ejercían los disolventes (acetona principalmente) sobre éstas. Los resultados se muestran en la tabla 12, anotando las lecturas de absorbancia de las muestras sin detener la reacción y aquellas en las que se detiene la reacción. El hecho de detener la reacción por temperatura, nos da una medida de comparación entre la actividad que se encuentra dentro del biocatalizador y aquella que esta fuera de él, pues una lectura mayor de absorbancia de las muestras donde no se detiene la reacción indica que la actividad enzimática continua en los sobrenadantes. Las lecturas de absorbancia registradas muestran salida de la enzima al sobrenadante, lo que indica que las células sin permeabilizar previamente son capaces de llevar a cabo la reacción. Los estudios demuestran entonces que los disolventes utilizados en la inmovilización (acetona y tolueno) provocan la permeabilización no controlada de las células, lo cual redundo en la ineficiencia del método de inmovilización.

Para tratar de disminuir la salida de enzima del soporte de fibras de acetato de celulosa se intentó disminuir el tamaño del poro de las fibras, aumentando la concentración de acetato de celulosa, y utilizando células sin permeabilizar. Los resultados se muestran en la tabla 13. A medida que se incrementó la concentración de acetato de celulosa se observa que la salida de la enzima a la mezcla de reacción disminuye. Sin embargo no fué posible evitar la salida de enzima ni aún con la máxima concentración manejable de acetato de celulosa utilizado (tabla 13).

Dado el efecto de los disolventes sobre la ineficiencia del método de inmovilización en fibras de acetato de celulosa, se

TABLA 12. - EFECTO DE LOS DISOLVENTES USADOS EN LA INMOVLIZACION DE CELULAS EN FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA

Tiempo (Min)	Absorbancia (410nm) (Deteniendo la reacción)	Absorbancia (410nm)* (Sin detener la reacción)
0	0.000	1.326
4	0.760	>2.000
8	1.410	>2.000
12	2.000	>2.000

*Absorbancia medida a los tubos de la cinética después de 15 minutos de haber sido leídas las muestras de actividad enzimática.

TABLA 13. - INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACETATO DE CELULOSA EN LA EFICIENCIA DE LA INMOVILIZACION

Concentración de Acetato de Celulosa (mg/5ml)	Salida de Actividad Enzimática (Δ de salida)*
500	0.970
550	0.843
650	0.620
750	0.519
850	0.430

*Evaluado como la diferencia que hubo entre las lecturas de absorbancia sin detener la reacción y las lecturas de absorbancia cuando se detiene la reacción.

planteó el uso de un soporte en el cual se evitara el empleo de disolventes y que pudiese reforzarse la inmovilización mediante el uso de agentes entrecruzantes.

El soporte elegido fue el de gelatina con el uso de glutaraldehído como agente entrecruzante. Este método es una combinación de atrapamiento y entrecruzamiento. Se eligió como agente entrecruzante el glutaraldehído puesto que se cuenta con un número considerable de grupos amino en la gelatina, por su naturaleza protéica y porque además se trata de un mecanismo de reacción bastante estudiado (59). Los grupos aldehído del glutaraldehído reaccionan con los grupos amino de la gelatina y por lo tanto atacan en menor grado a los grupos amino de las células permeabilizadas con sales y con las enzimas. La reacción característica del glutaraldehído con la gelatina produce una base Schiff con su característico color amarillo. La metodología final de inmovilización se detalla en la sección de resultados 1.4, correspondiente a la sección de materiales y métodos del artículo presentado (Apéndice II pg 88).

Se realizó un barrido de concentración celular para definir la máxima capacidad de atrapamiento de la matriz de gelatina (Tabla 14). Los resultados muestran que la máxima concentración de células fue de 3.2-4.8 g (peso seco) siendo en este rango de pesos de células en los que el biocatalizador presentó la mayor actividad enzimática.

Es importante notar que al no utilizar disolventes en el proceso de inmovilización se elimina el problema de salida de enzima hacia la mezcla de reacción (Tabla 15), pues no se detectó aumento en las lecturas de absorbancia en las muestras donde no se detuvo la reacción, indicando que toda la enzima está dentro del biocatalizador. Se eligió la condición de inmovilización de 4.8 g de célula porque presentó la mayor actividad enzimática.

Después de la optimización de la carga celular contenida en las fibras de gelatina, se procedió a la determinación del tiempo

TABLA 14.- EVALUACION ACTIVIDAD ENZIMATICA DE FIBRAS DE GELATINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CELULAS PERMEABILIZADAS CON SALES.

Concentración* de células (g)	Actividad Enzimática (u/g soporte)	Salida de enzima hacia la mezcla de reacción.
0.4	12.54	No
0.8	24.35	No
1.2	54.56	No
1.6	82.61	No
3.2	90.84	No
4.8	121.14	No
6.4	No manejable	--

* por cada 0.6 g de gelatina en cada ensayo.

TABLA 15. - LECTURAS DE ABSORBANCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN SOPORTE DE FIBRAS DE GELATINA.

Tiempo (Min)	Absorbancia (410nm) (Deteniendo la reacción)	Absorbancia (410nm)* (Sin detener la reacción)
0	0.000	0.000
4	0.433	0.431
8	0.985	0.983
12	2.089	2.100

de entrecruzamiento con glutaraldehído, realizándose entrecruzamientos a las fibras preparadas variando el tiempo de la reacción. Los tiempos evaluados fueron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. Dadas las características de las fibras obtenidas después de este tratamiento, solo se midió actividad enzimática a las que se curtieron por un período mayor de 30 minutos, puesto que las otras presentaron poca consistencia en su estructura. En la tabla 15B se presentan los resultados de esta evaluación, anotando en cada caso aquellas condiciones en las que el tratamiento fue insuficiente por presentar salida de enzima. La concentración de glutaraldehído se mantuvo constante a 1.25% .

Los tiempos obtenidos fueron bastante aceptables si se considera que el proceso se piensa escalar, puesto que son suficientes para poder manipular volúmenes más grandes de biocatalizador . Por otro lado la actividad enzimática que se obtuvo es competitiva con la de biocatalizadores comerciales que se reportan en la literatura los cuales fueron mencionados en la sección de antecedentes, y los cuales se encuentran en un rango de 200 a 500 U/g de biocatalizador. Estas consideraciones hacen al proceso bastante atractivo para ser caracterizado bajo las condiciones de preparación que hasta aquí han sido descritas.

Cabe hacer mención que se trata de un proceso económico, puesto que al utilizar células completas y reactivos poco costosos el precio del biocatalizador se reduce considerablemente; siendo el glutaraldehído el reactivo más costoso, este es usado a concentraciones muy bajas (1.25%).

Posteriormente se realizó una evaluación de la potencialidad de reutilización del soporte, probándolo en la hidrólisis de soluciones de lactosa y de suero de leche. La evaluación se realizó en lotes de hidrólisis durante 8 días, cada lote consistió de 1000ml de soluciones de suero dulce de leche y de lactosa con una concentración del 5% a 30° muestreando cada 24 h. (figura 6) para saber la conversión, se lavó el

TABLA 15B. - OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE CURTIDO DEL BIOCATALIZADOR

Tiempo de curtido	Actividad enzimática(U/g)	Salida
30	725	SI
40	522	NO
50	506	NO
60	411	NO

ESTABILIDAD DEL CATALIZADOR

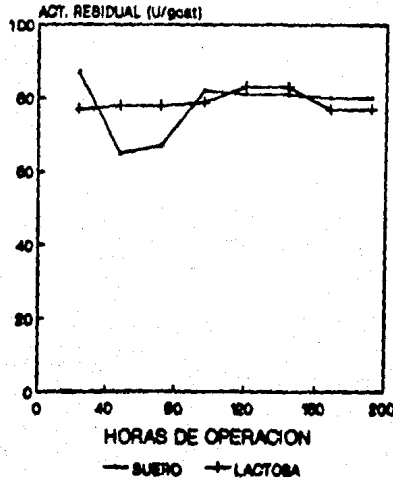


Fig. 6. Actividad enzimática del biocatalizador después de varios lotes de hidrólisis (8 lotes) utilizando como sustrato suero de leche y soluciones en lactosa

biocatalizador con solución Buffer y se corrió el siguiente lote. La actividad enzimática se mantuvo constante durante todo el experimento, además de lograrse conversiones de 63% para suero dulce y de 72% para lactosa en promedio. El interés principal de este experimento fue probar la potencialidad operacional del soporte, por lo cual no se tomaron en cuenta factores tales como las constantes cinéticas del soporte, relación enzima-sustrato, etc.

1.3 CARACTERIZACION CINETICA DEL BIOCATALIZADOR

La caracterización cinética del biocatalizador se realizó en 3 etapas.

1. Establecimiento de las condiciones de medición de las velocidades de reacción, para fijar la concentración de enzima a utilizar en los ensayos cinéticos, utilizando ONPG y lactosa como sustratos.

2. Evaluación de los parámetros cinéticos, mediante la medición de velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato.

3. Procesamiento de los datos experimentales y ajuste a los modelos reportado en la literatura.

1. Establecimiento de la concentración de enzima a utilizar en el estudio cinético.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas en la medición de velocidades se varió la cantidad de biocatalizador en diferentes mediciones de actividad enzimática y se mantuvo fija la concentración de ONPG (0.00227 M). La reacción se efectúa en un volumen de 42 ml. Las cantidades de biocatalizador y los resultados se muestran en la Tabla 16 y la figura 7.

Los resultados de actividad total que se presentan en la Tabla 16, muestran que cuando se utilizan de 0.035 g a 0.5 g de catalizador, existe un aumento de esta actividad y que es proporcional a la cantidad de enzima utilizada. En valores por arriba de 0.5 g de biocatalizador, el aumento de la actividad total (at) deja de ser lineal.

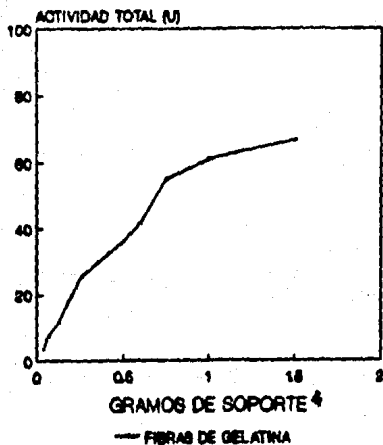
TABLA 16. VELOCIDADES DE REACCION (ACTIVIDAD ENZIMATICA) PARA DIFERENTES CANTIDADES DE BIOCATALIZADOR UTILIZADAS EN LA REACCION ONPG.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso *	0.035	0.065	0.125	0.250	0.500	0.600	0.750	1.00	1.00
at=	0.37	0.74	1.16	2.54	3.63	4.17	5.48	6.09	6.66

at= actividad total (UONPG en el volumen total de reacción)

* Peso del biocatalizador en gramos

RELACION ENZIMA-SUSTRATO para fibras de gelatina



* Actividad específica de 50u/g, medidas en la zona lineal

Fig. 7. Evaluación de la concentración de enzima a utilizar en la determinación de actividad enzimática, utilizando fibras de gelatina como biocatalizador

De la figura 7 se determina que la cantidad de biocatalizador que se debe de utilizar para llevar a cabo la medición de actividad enzimática, debe ser tal que la concentración de enzima en la mezcla de reacción sea menor a 0.05 Unidades/ml, que es cuando se utilizan 0.05g de biocatalizador con una actividad enzimática de 60 U/g. Esto permite trabajar en la zona lineal de la curva, en donde la reacción se lleva a cabo con la enzima en saturación, es decir en velocidad máxima.

Con el dato establecido para ONPG, de 0.05 U/ml de enzima en la reacción y una concentración 2.27 mM de ONPG se eligió el sistema para lactosa:

El método de medición de la actividad enzimática utilizando lactosa como sustrato se basa en la detección de la glucosa generada por la hidrólisis, mediante el kit de medición de glucosa Glucotest®. Se consideró que la concentración mínima a utilizar de lactosa (mínima para ser detectada por Glucotest®) es de 8 mM, por lo que para 8 mM de lactosa se necesitan 0.18 U/ml de enzima en la reacción.

El tiempo de reacción se varió de 0 min a 20 minutos; las lecturas detectadas se presentan en la Tabla 17.

Se eligió entonces 0.35 g como la cantidad de biocatalizador a utilizar en la caracterización cinética que corresponden a las 0.18 U/ml de reacción necesarias para la reacción.

2.- Para la evaluación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se fijó una cantidad conocida de biocatalizador (0.35 g peso húmedo, 80% humedad) y se utilizó un intervalo de concentraciones de lactosa que va desde de 5 mM a 20mM (se hace notar que de aquí en adelante todas las mediciones se realizaron utilizando a lactosa como sustrato por ser el sustrato natural de la enzima, por lo cual se deben medir los parámetros cinéticos). Se evaluaron las diferentes velocidades de reacción en los experimentos, como actividad específica del biocatalizador (unidades/gramos de biocatalizador).

TABLA 17. ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIDA EN LACTOSA COMO SUSTRATO

Tiempo	glucosa mg/dl parando reacción	glucosa mg/dl sin parar reacción
0	7	7
5	13	14
10	24	24
15	31	33
20	44	42

Los datos experimentales presentados en la tabla 18 se procesaron con el fin de obtener los parámetros cinéticos a través de la linearización de los datos, y así encontrar aquel en el que se tuviera la mejor correlación con los datos cinéticos experimentales. Se graficó de acuerdo a los siguientes modelos: LineWeaver-Burk, Hanes-Wolf, Wolf-Agustinsson-Hofstee y Eddie-Scatchard.

Con los datos de la tabla 18 se construyen las figuras 8, 9, 10 y 11 cuyas ecuaciones son las siguientes:

Modelo de	Ecuación	Figura #
Lineweaver-Burk	$1/v = (K_m/V_{max})(1/S) + (1/V_{max})$	8
Hanes-Wolf	$S/v = (1/V_{max})(S) + (K_m/V_{max})$	9
Wolf-Agustinsson-Hofstee	$v = (-K_m)(v/S) + (V_{max})$	10
Eddie-Scatchard	$v/S = (1/K_m)(v) + (V_{max}/K_m)$	11

En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos de la linearización en las gráficas anteriores para los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , así como la correlación que presentan estas gráficas. Como se puede observar en dicha tabla el método de linearización que presenta mejor ajuste con los resultados obtenidos es el método de Lineweaver-Burk. Por lo que los valores obtenidos para V_{max} y K_m son: 525 μ moles de glucosa/minuto y 87 mM respectivamente.

El hecho de la utilización de los diferentes modelos de ajuste y linearización de los datos cinéticos, se realizó para encontrar cual de ellos ajustaba mejor con nuestros datos y con nuestras condiciones experimentales, ya que algunos de ellos son recomendados para concentraciones altas de sustrato o cuando se obtienen velocidades de reacción muy bajas (60).

GRAFICA DE LINE WEAVER-BURK

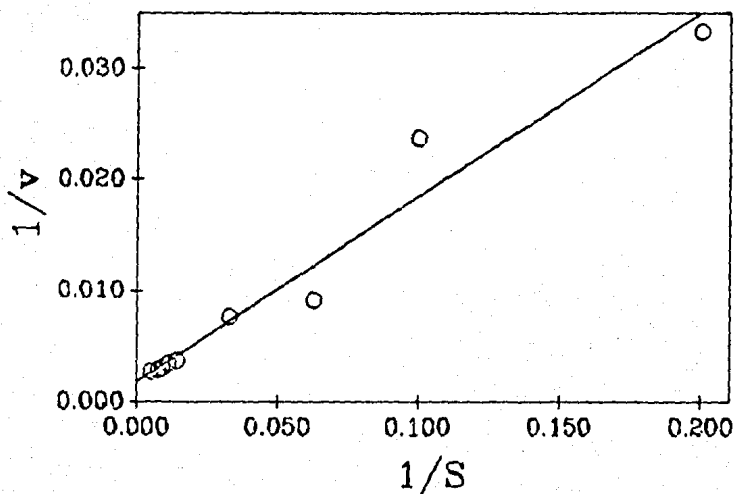


Fig. 8. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Lineveaver-Burk

GRAFICA DE HANES WOLF

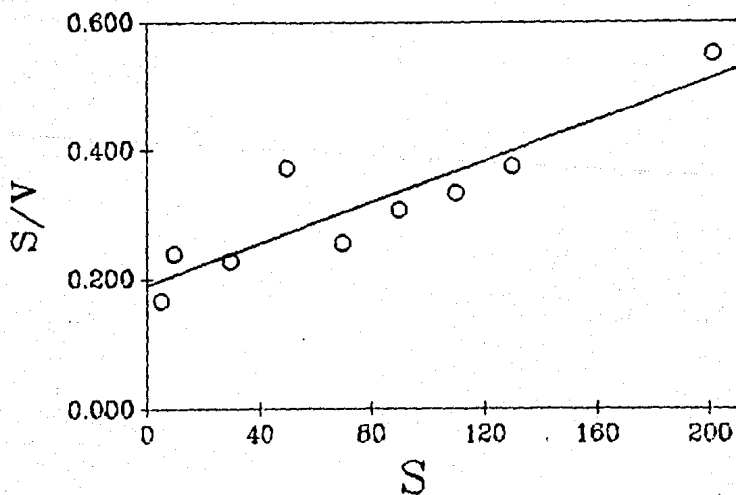


Fig. 9. Linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Hanes-Wolf

GRAFICA DE WOLF-AGUSTINSSON-HOFSTEE

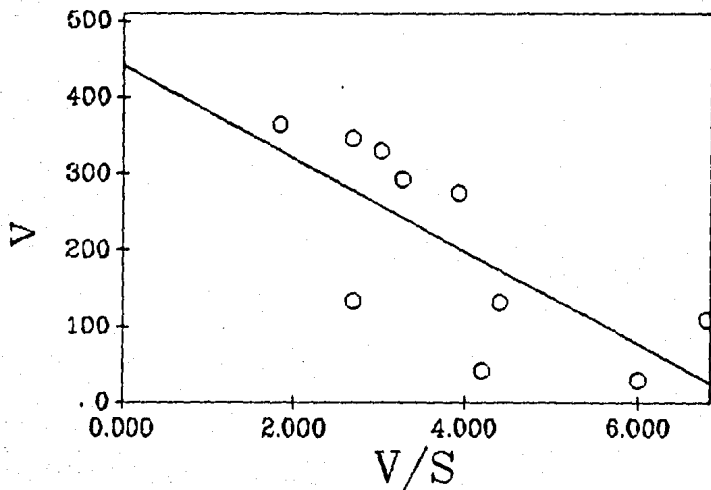


Fig. 10. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Wolf-Agustinsson Hofstee

GRAFICA DE EADIE-SCATCHARD

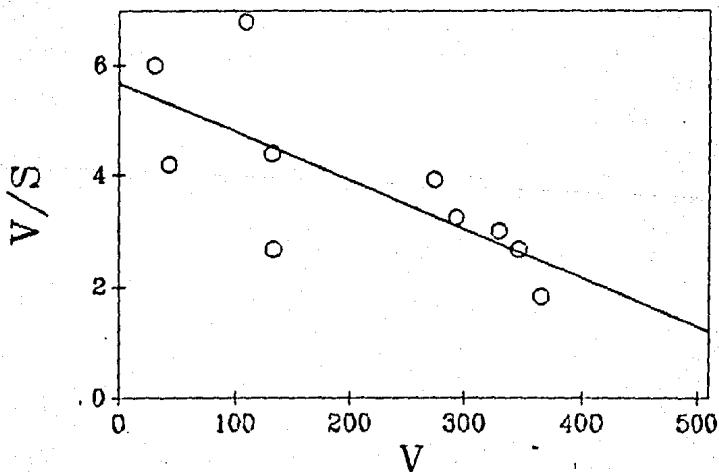


Fig. 11. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten, según el modelo de Eadie-Scatchard.

TABLA 18. DATOS EXPERIMENTALES MODIFICADOS PARA CARACTERIZACION CINETICA.

S (mm)	V (U/gcat)	1/S	1/V	S/V	V/S
5	30	.200	.0333	.1666	6
10	42	.100	.02381	.2380	4.2
16	109	.003	.00917	.1467	6.81
30	132	.033	.00758	.2272	4.4
50	134	.020	.00741	.3731	2.68
70	274	.0143	.00365	.2554	3.92
90	293	.0112	.00341	.3071	3.25
110	330	.00909	.00303	.3333	3.0
130	347	.00769	.00288	.3746	2.67
144	510	.00694	.00196	.2823	3.5
201	365	.00498	.00274	.5506	1.82

TABLA 19. RESULTADOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES REPORTADOS PARA LINEARIZACION DE DATOS CINETICOS.

Parámetro	Coefficiente de correlación	K _m *	V _{max} **
Lineweaver-Burk	0.97	87	525
Hanes-Wolf	0.83	120	671
Wolf-Agustinsson-			
Hofstee	0.62	65	482
Eadie-Scatchard	0.62	166	870

* μ moles de glucosa/min g de biocatalizador

** mM

Sin embargo, de los resultados anteriores se puede observar que en ninguno de los casos resulta un ajuste aceptable para la cinética del biocatalizador, puesto que las regresiones lineales resultaron muy bajas. En base a que la enzima de *Kluyveromyces fragilis* presenta inhibición por galactosa(49,50), se pensó que probablemente se estaba presentando un efecto secundario a la cinética, el cual debería ser un efecto inhibitorio por galactosa. Al evaluar este efecto se encontró que trabajando en condiciones de velocidad máxima, y variando desde cero hasta 200mM la concentración del inhibidor (concentración que es al 100% de conversión en suero) ,la inhibición no se presentó. Presumiblemente esto se debió a las condiciones del experimento, ya que el inhibidor se adicionó en el exterior del catalizador, por lo que se supone entonces que presenta problemas de difusión, ya que estas concentraciones de inhibidor no se difunden tan rápido que puedan tener un efecto de inhibición. El hecho de suponer que se tienen problemas difusionales se debe a que se está trabajando una inmovilización en un gel, y estos sistemas generalmente presentan estos problemas (21).

De los anteriores experimentos se puede deducir entonces que se tiene un efecto de resistencia a la difusión en el catalizador, y que por lo tanto al medir la inhibición por la galactosa ésta no tiene tiempo de difundir al interior del catalizador y afectar a la enzima. Por otro lado la galactosa que se está produciendo por la reacción, tampoco está afectando, dado que las mediciones se llevaron a cabo en velocidades iniciales lo cual asegura que la concentración de inhibidor es baja (60). Cuando se realizó la gráfica de velocidad contra concentración de sustrato, no se encontró un comportamiento de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten(Figura 12).

Así entonces se procedió a medir el factor de efectividad del biocatalizador, por medio de la relación de la actividad enzimática que presentó en forma entera y la actividad que

GRAFICA DE MICHAELIS-MENTEN

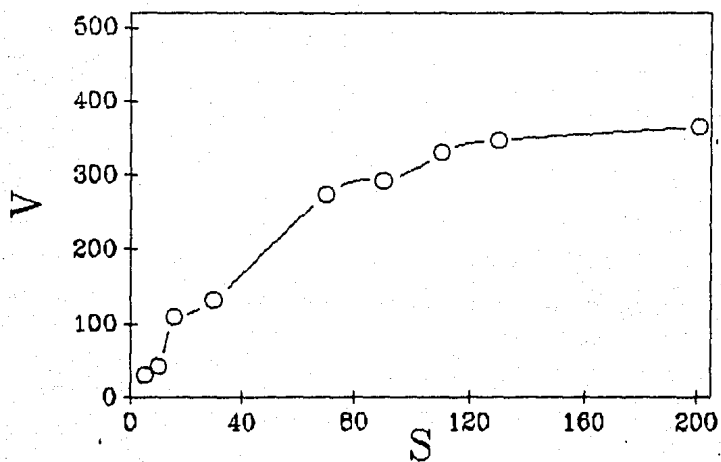


Fig. 12. Gráfica de la cinética del biocatalizador según el modelo propuesto por Michaelis-Menten

presentó al eliminar las barreras difusionales moliendo el catalizador.

Se encontró un factor de efectividad de 0.5 lo cual indica que sólo se está utilizando el 50% de la enzima que se encuentra inmovilizada y el otro no se está utilizando.

1.4 DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS DIFUSIONALES DEL BIOCATALIZADOR.

En el inciso anterior se encontraron los parámetros cinéticos aparentes del biocatalizador (tabla 19), sin embargo su exactitud y validez se cuestionó, dados los problemas difusionales encontrados, es así que se procedió en este apartado a determinar el comportamiento del biocatalizador de acuerdo a estas resistencias difusionales. Los resultados se engloban en el artículo "*Design of two immobilized cell catalysis by entrapment on gelatin: internal diffusion aspects*" el cual fue sometido para su publicación en la revista "Enzyme Microbial Technology" en febrero de 1990 y aceptado para su publicación en abril del mismo año el cual se encuentra en el apéndice II.

Lo resultados del artículo muestran aportaciones importantes a los métodos tradicionales de tratamiento de los datos difusionales de las enzimas inmovilizadas los cuales podemos resumir como:

-Se determinó la influencia que tiene la variación de la concentración de sustrato en el factor de efectividad, variación que se presenta a lo largo de la reacción.

-A esta relación concentración de sustrato-factor de efectividad se ajustó un polinomio de tercer orden, el cual describió el comportamiento del factor de efectividad a lo largo de la reacción.

-La forma tradicional de tratamiento de las ecuaciones de reactores enzimáticos se modificó, pues generalmente se han integrado considerando constante el factor de efectividad de los biocatalizadores. En el artículo se muestran los resultados del modelamiento de un reactor de Tanque agitado en operación por lote, considerando una cinética de Michaelis Menten, una cinética de Michaelis Menten con factor de efectividad constante a lo largo de la reacción y además considerandolo variable. Pudimos observar que los datos experimentales se ajustan mejor al modelo en el que se considera variable el factor de efectividad.

-Por otro lado también se ejemplificó una forma indirecta de obtener el coeficiente de difusión a través de resolver la ecuación que describe el balance de masa en una partícula de biocatalizador.

Podemos agregar que el biocatalizador de lactasa desarrollado presenta buenas perspectivas de aplicación dadas las características difusionales encontradas ($\eta = .99$); además que la forma de tratamiento de los resultados se presenta como una alternativa en el diseño de reactores enzimáticos, es decir la utilización del factor de efectividad cuando es influenciado por la variación en la concentración de sustrato a lo largo de la reacción y la determinación indirecta del factor de efectividad.

Este modelo de tratamiento de los datos

cinetico-difusionales, se puede considerar como una aportación muy interesante en el análisis de biocatalizadores que presenten problemas difusionales.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. -

Las conclusiones de este trabajo, son presentadas en el orden en que se presentaron los objetivos, además se complementan con algunas recomendaciones para futuros trabajos sobre el tema.

El objetivo general del trabajo, fué la obtención de un biocatalizador que pudiese aplicarse en la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche. Esto se logró al inmovilizar células permeabilizadas de *Kuyveromyces fragilis*, cuyo pH óptimo de actividad de β -galactosidasa es cercano a la neutralidad (6.6-6.8). El haber elegido la utilización de células de levadura como fuente enzimática, obedeció a que se sabe que las enzimas poseen una mayor estabilidad al trabajar dentro de su medio natural que es la célula. Además de que el uso de células en biocatalizadores favorece la disminución de sus costos de producción ya que evita la etapa de purificación de la enzima.

La primera etapa del trabajo consistió en desarrollar un método efectivo de permeabilización celular para la levadura *Kluyveromyces fragilis*, con actividad de β -galactosidasa en forma intracelular. El método elegido fue el de permeabilización con sales puesto que resultó ser controlable, es decir que al término del proceso el efecto de éste no continuó y por lo tanto permitió expresar la actividad enzimática de las células sin que ésta saliera de las mismas.

Como se vió en los resultados este método de permeabilización dió la alternativa de la utilización de las células en forma libre, tal como si fuera un biocatalizador, sin embargo no se lograron mas allá de seis reutilizaciones. Estos resultados dieron la pauta para comprobar que el método de permeabilización permite expresar la actividad enzimática intracelular. Cabe hacer mención que este método de permeabilización es posible de ser modificado, en función del rendimiento de actividad enzimática (se obtuvo un 25% de rendimiento), pudiendo también modificarlo hasta tener un método de extracción. Por otro lado, es importante hacer

notar que simultáneamente y también posteriormente a la publicación de este artículo, se han venido publicando en la literatura una serie de artículos en los que se hacen esfuerzos por el desarrollo de una metodología que tenga las características de la que se presentó, lo cual da mayor relevancia al trabajo realizado(60, 61, 62).

Otro objetivo fué el de desarrollar un método de inmovilización eficiente en la retención de la actividad enzimática dentro del soporte, esto es, que no dañara las células permeabilizadas y por lo tanto no permitiera la salida de la enzima. El método elegido fué el de atrapamiento en gelatina, y un posterior curtido con glutaraldehído.

Este método resultó efectivo, puesto que al no utilizar disolventes en su elaboración como en el caso del acetato de celulosa, no se afectó a las células permeabilizadas y se obtuvieron así

rendimientos de hasta un 90% en la retención de actividad enzimática enfrentada. También se probó el potencial de reutilización del biocatalizador, obteniéndose una estabilidad mínima de operación de 200 horas, lo que resulta bastante atractivo para su posterior optimización y escalamiento. Puede concluirse entonces que se tiene un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa, con características adecuadas para ser utilizado en la hidrólisis de lactosa en leche y suero, que presenta una actividad enzimática en algunos casos superior a la de catalizadores que se utilizan industrialmente.

Una vez desarrollado el biocatalizador con las características arriba mencionadas, se llevó a cabo su caracterización cinética y difusional, llegando a las siguientes conclusiones:

+La conversión observada es aceptable, pues en todos los casos que se evaluó fué superior al 80%, lo cual resulta práctico si el proceso se piensa escalar. Dicho esto de otra manera con un ejemplo específico, los niveles de hidrólisis requeridos para que

el proceso de producción de jarabes deslactosados sea costeable se recomienda sean por arriba del 75% (4), pues concentraciones mayores provocan la formación de trisacaridos disminuyendo la concentración de glucosa en el medio. Concentraciones menores al 75% no satisfacen los requerimientos de glucosa para formar jarabes.

→Pese a que las células de la levadura *Kluyveromyces fragilis* presentan cinética de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten el biocatalizador no se ajusta a este modelo. Esto se debe a que presenta resistencias difusionales, las cuales son las que están limitando el proceso, es así que la velocidad de conversión del sustrato a producto estará regida por la velocidad con la cual este se difunde al interior del soporte, y no por la velocidad con la cual la enzima es capaz de transformarlo, puesto que esta esta siendo subutilizada al estar limitada de sustrato.

→Se midió el factor de efectividad del biocatalizador preparado en forma de fibras, el cual tuvo un valor de 0.5, lo que significa que sólo se está utilizando alrededor del 50% de la enzima inmovilizada. Generalmente existen dos formas de hacer que este proceso se haga mas eficiente, y es reduciendo el tamaño de partícula del biocatalizador ó haciendo que el proceso sea limitado por la cinética al disminuir la enzima que se inmoviliza. Esto no se pudo realizar con el biocatalizador, puesto que una disminución de partícula resultaba impráctico dadas las características geométricas del catalizador, pues al ser de forma cilíndrica, la disminución de tamaño no reportó ninguna mejoría; al fraccionar las fibras no se disminuía el diámetro sino sólo la longitud. Por otro lado al disminuir la cantidad de células que se estaban inmovilizando si se aumento la efectividad, sin embargo también se disminuyó la actividad específica del biocatalizador; así entonces se tuvo que para efectividades cercanas a 0.9 se tenían valores casi diez veces inferiores de actividad enzimática específica. Por lo tanto fué entonces necesario un estudio

difusional más completo que describiera de forma confiable el comportamiento cinético-difusional del biocatalizador, el cual se resumió en el segundo artículo presentado.

Como se presentó en los resultados, se desarrolló una ecuación que describe de buena manera el comportamiento que presenta el biocatalizador en la transformación de la lactosa a lo largo de un lote de hidrólisis, el cual se ve influenciado de forma directa por la variación de la concentración de sustrato a través del proceso, que a su vez afecta al factor de efectividad. Fue entonces que se estableció un mecanismo para describir el comportamiento del biocatalizador en función de la disminución del factor de efectividad al disminuir el sustrato durante la reacción, ajustando un polinomio a los datos experimentales que lo describe. Posteriormente se integra la ecuación del reactor a utilizar con la ecuación cinética de la enzima, pero considerando esta variación en el factor de efectividad, a diferencia de como se realiza tradicionalmente en donde se considera al factor de efectividad como constante a lo largo de la reacción. Se hace notar la relevancia de esta metodología puesto que fue evaluada no solo para el biocatalizador desarrollado en fibras de gelatina con un factor de efectividad de 0.5, sino que también para una geometría diferente de biocatalizador en forma de esferas, el cual tuvo un factor de efectividad de 0.99 y que sin embargo también presentó esta dependencia y además para un biocatalizador con diferente actividad enzimática. Es por esto que se considera esto como uno de los aportes más importantes de este trabajo, ya que ofrece una alternativa bastante confiable del tratamiento de los datos de los biocatalizadores en general.

Como conclusión general se puede afirmar que se cumplieron los objetivos originales del proyecto, efectuando al mismo tiempo aportes al estudio y caracterización de biocatalizadores. Se abrieron perspectivas alentadoras en el uso del biocatalizador desarrollado para la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce, quedando por establecer las políticas de operación y mantenimiento

del catalizador, así como el diseño de el reactor que se elija para trabajar de acuerdo a las observaciones realizadas en el artículo.

BIBLIOGRAFIA

1. Rosado J.L., Pineda O., y Solomons N.W., (1985) Rev. Tecnol. Alim. 20 :5-10.
2. Reporte Técnico(1989) (Compañía KEM-FUDS.) MEXICO .
3. Barrett. J.L. (1987) Large Scale and application of immobilized lactase, en Methods in Enzymology. Vol. 136 411-423
4. Varela C. G. (1987) Tesis Profesional Universidad Autonoma de Puebla
5. Reporte Técnico. Rohm Gmbit MO-1-03-E 270287.
6. Reporte Técnico MAXILACT Mil/81.07. Sp. 03.
7. Reporte Técnico NOVO ENZYMES. LACTOZYM
8. Reporte Técnico British Charcoals and Mc.Donalds. BRIMAC (1988)
9. López Mungía C.A.(1985) Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación industrial" en. Proespectiva de la Biotecnología en México. eds. Rodolfo Quintero. ed. CONACyT. Fundación Javier Barros Sierra. MEXICO
10. Godfrey, T. y Reichelt, J.(1983) Industrial Enzimology. The Application of Enzymes en Industry New York: The Nature Press.
11. Bárzana E. y López Munguía C.A. Tecnología Enzimática en Biotecnología Alimentaria. eds. López-Munguía C.A., García G.M. Quintero R.R. Editorial PUAL/UNAM en prensa.
12. Monsan Pierre. Enzimas en alimentos (1988) en Tecnología Enzimática eds. López-Munguía C.A. y Quintero RR. ed. UNAM MEXICO
13. Jens-Alder-Niessen (1987). TIBTECH. Vol. 5, No. 6, 170-174.
14. Godffredsen, S.E. Rasmussen, A.M., Otlesen, M. Rafn, P. and Petersen, N. (1984) Applied Microbiol. Biotechnol. 20,23-28.
15. Jensen, B.F. and Norman B.E. (1984). Process Biochem. 19, 129-134.
16. Frost, G.M. and Meers D.J.L. (1982). Food flavoring ingredientes. Processing Packaging 4(11) 10,14,45,56.
17. Paul F., Oriol E., Auriol D. & Monson P. (1986) Carbohydr. Res. 149, 433-441.
18. Rosevear, A. y Lambe, C.A. (1986) in Secondary Metabolism en Plant Cell Cultures eds. Morris, P. ed. Cambridge University Press Cambridge.

19. Brodelius, P. and Mosbach, K. (1982). J. Chem. Tech. Biotechnol. 32,-330.
20. Hartmier, W. (1985) Trends in Biotechnology Vol. 3, 6.
21. Poulsen, P.B. (1984) in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Vol. 1,2, 121-139.
22. Chibata, I. Tosa, T., Sato, T., Mori, T. (1978) Immobilized enzymes. ed. Halsted press book New York, N.Y. USA.
23. Garcia G.M., and López-Munguía C.A. (1984). Ciencia y Desarrollo, 58, 0, 39,48.
24. Aunstrup, K. (1983). Annual Rep. Ferment. Processes, 6, 189 (NOVO INDUSTRIES).
25. Shukla, T. (1975) C.R.C. Critical Reviews in Food Technology (1) 325.
26. Agrawal, S., Sonowat, H.M. and Dutta, S.M. (1982) J. Dairy Sci. 65, 866.
27. Charles, M. Coughlin, R. Paruchuri, E. Allen, B. and Hasseleberg F.(1975) Biotechnol. Bioeng. 17, 203.
27. Kim. Y.M., Lee, J.C., Chung. P.K., Choi Y.N., and Yang H.C., (1983) Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng, 11(1) 59.
29. Lutzen N.W. and Norman B.E. in: Food Process Engineering E.D. Linko P. and Larinhari J. (1979) Abstracts No. 4.2.1.
30. Macris, B.J., Markakis, P. (1981) Applied Environmental. Microbiol. . 41 (4) 956.
31. Makaniski, K., Matsuno R., Kazauaki, T. Yamamoto K., and Kamikubo T. (1983) Enzyme Microb. Technol 5, (3), 115.
32. Park Y. and Pastore G.M., J. Fermentation Technol. (1981), 59, (2), 165.
33. Sandhu, D.K. and Waraich, M.K.(1983) Biotechnol. Bioeng. , 25, 797.
34. Shukla, T. (1975) C.R.C. Critical Reviews in Food Technology (1) 325-356.
35. Coughlin R.W. Charles, M. In: immobilized Enzymes for food Processing Ed. Pitcher W. 1980 CRC editorial Florida, USA.
36. Parizia M.W. and Foster F.M. (1983) J. Food Protection 46 (5), 453.

37. Wasserman B., (1984) Food Technol (2), 78
38. Greenbery N.A. and Mahoney R.R. (1981) Process. Biochem , 16,(2)2.
39. White C. and Kennedy (1980) Enzyme Microbiol Technol. , 2, 82.
40. Sprossler, Band and Plainer H.(1983) Food Technol. 101, 93.
41. Thomas, G.V. Karla, M.S. and Singh, A.(1980) Indian J. Experimental Biol. , 18, 1020.
42. Wallenfels and Malhotra O.P. (1960). in: The Enzyme Inded. Eds Boyer P..D. Lardy H. and Myrback K. Academic press. New York. 4, 409-30.
43. Shukla T.D. (1975). C.R.C. Critical review of Food Technology 5:325-356.
44. Mahoney R., Whitaker J. J. (1977) Food Biochem.1 , 327-350.
45. Weetall H.H., Havewalla N.B., Pitcher W.H., Detar C.C., Van W.P. and Yaverbaum S. (1974) Biotechnol. Bioengn. 16, 295.
47. Wondoloski M.V., and Woychik J.H. (1974) Biotechnol. Bioengn. 16: 1633.
48. Pitcher W.H., Ford J.R. and Weetall H.A. (1976) Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes Mosbach K. Ed. Academic Press New York .
49. Chen K., Houg J.Y., Ling A.C., (1985) Enzyme Microb. Technol. 7,10,510-514.
50. Bakken A.P., Hill Ch. G., Amundson C.H., (1989)Biotechnol. Bioengng. 33, 1249-1257.
51. Gekas, V., and Lopez-Leiva M., (1985)Process Biochem. 20, 2-12.
52. Valio Industries Laboratory. Reporte técnico (1987).
53. Weetall H.H., Havewalla N.B., (1972) Biotechnol. Bioeng. Symp. 3, 241.
- 54 Marconi W., Marisi F., Mosti, R., (1975) Agric. Biol. Chem. 39(6) 1323.
55. Pastore M., Morisi F., and Viglia A. (1974) J Dairy Sci 57, 269.
56. Harju M., Heikonen M., Krevla M., Linko M., In: Linko P., and

Lavinkari J.,(1979) Food Process Engineering London Appl. Sci Publishers.

57. Castillo R.E. (1986) Tesis Profesional Universidad Nacional Autonoma de México

58. Brodski, J.A. and GrootWassink, J.W.D. (1987) J. Food Sci. 51,4, 897-903.

59. Goldstein L. (1976) in Methods in Enzymology ed. Mosbach, K. Academic Press, New York, San Francisco, London Vol. 44, 397-443.

60. Segel H.I. (1975) Enzyme Kinetics Wiley Interscience Publishers New York N.Y.

61. Knorr D. Pandya Y. Beaumont M.D., and Ulrich S. (1990) in "Engineering and Food" ed. E.L. Spiess and H. Schubert Elsevier Applied Science.

62. Joshi M.S., Gowda L.R. and Bhat S.G. (1987) Biotechnol. Lett. 9,8,549-554.

63. Beaumont M.D., Pandya Y. and Knorr D. (1989) Food Biotechnology 3,71.

PERMEABILIZATION TREATMENT TO CONTROL THE ENZYME LEAKAGE
FOR *KLUYVEROMYCES FRAGILIS* YEAST CELLS

Edmundo Castillo and Lidia T. Casas*

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y
Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; A.P.
510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, México.

* To whom all correspondence should be addressed

ABSTRACT

A methodology to obtain "really permeabilized" *Kluyveromyces fragilis* yeast cells was developed. After the permeabilization treatment, lactase activity was not detected outside the cells, so the reutilization of permeabilized yeast cells was evaluated on lactose hydrolysis. Lactose conversion by permeabilized cells was measured in a batch reactor. Eight run hydrolises were carried out and conversions up to 60% were reached. The statistical methods Placket-Burmann (PBM) and Box-Wilson (BWM), were used in order to determine the most influenciating parameters in the permeabilization, and to optimize the process, in this way 676 lactose units per gram of cells were obtained and all activity remained inside the cells. Parameters such as temperature, permeabilization were evaluated individually and additively, in the permeabilization process. After the use of the statistical methods, the optimal conditions obtained were: 50°C, KH₂PO₄ 45mM, 75min, pH=7.0, and 90 g/l cell concentration for the permeabilization treatment.

Keys: Permeabilization, *Kluyveromyces fragilis*, β -galactosidase, lactose hydrolysis.

INTRODUCTION

In recent years the use of β -galactosidase (E.C.2.3.1.23) in the dairy industry has increased, e.g. low lactose milk production or whey utilization to produce sweet syrup (1). However, the high cost of the process and the technological associated problems have generated many studies (2,3). The need for a biocatalyst that offers good inexpensive operational stability orients it toward cells utilization with β -galactosidase activity instead of purified enzyme (4,5,6,7). Several methods have been reported for yeast cells permeabilization such as *Kluyveromyces fragilis* sp with intracellular β -galactosidase. The most common permeabilization methods is the treatment with solvents (1). such as ethanol, acetone, toluene, isoamyl alcohol, etc. (8). However, not all of them are accepted for food applications. Furthermore, they cause enzyme leakage from the cell so the procedure is transformed in an extraction method, associated with a total cell wall rupture. J. A. Asenjo et al. (9), proposed the utilization of lytic enzyme systems, for the release of cell membrane bound proteins or recovery of cell-associated product. Some papers report a freeze-thawing procedure for permeabilization, but cell wall rupture occurs.

Because there does not exist a specific definition for permeabilization in literature, it was established as "the procedure to allow the expression of intracellular enzymatic activity but, without enzyme leakage out of the cell"

M.S. Joshi et al. (10) showed the expression of enzymatic activity by means of anionic detergent (Cethylthrymethylammonium bromide) in cells of *Kluyveromyces fragilis* for enzymatic hydrolysis of milk lactose. However, they do not present the degree of cell lysis nor the possibility of catalyst reutilization. In 1986, Brodsky and GrootWassink (11), reported a cell permeabilization treatment through the use of phosphate salts. They obtained good expression of enzymatic activity, but after a few hours a total lysis of the yeast *K. fragilis* took place, so they recommended the method for the industrial recovery of soluble lactase.

MATERIALS AND METHODS

Organism

The yeast *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y1109 was obtained from USA Northern Regional Research Laboratories. The organism was maintained by monthly transfers on slants of agar medium (5% lactose, 0.75% yeast extract, 0.84% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.05% MgSO_4 , 0.45% K_2HPO_4 and 2% agar) (12).

Chemicals

Lactose sugar and the chemical kit to determine glucose were purchased from SIGMA Chem., Co. (USA). The rest of the chemicals were products from J.T. Baker, Co. (USA). Agar was obtained from DIFCO Laboratories (USA).

Cultivation

The yeast was transferred from the slants to a 2800 ml Fernbach flask containing 1000 ml of the medium previously described but which did not contain agar (12). The flask cultures were propagated at 29°C on a rotatory shaker (New Brunswick Scientific Co), at 200 rpm. After 20 hrs cells were harvested by centrifugation and washed three times with deionized water to prepare them for the permeabilization step.

Permeabilization treatment

The washed cells contained in a centrifuge flask were resuspended with deionized water in a Erlenmeyer flask to obtain a 75 g/L cell concentration. The pH was adjusted to 7.1 either with KOH or HCl and monobasic potassium phosphate was added to obtain 250 mM salt concentration. The cell suspension was incubated in a shaker water bath held at 50°C for 75 minutes, then, the cells were harvested from permeabilization suspension at 7500 rpm for 15 min and washed three times with deionized water. To monitor the permeabilization, progress samples were periodically withdrawn.

β -galactosidase activity determination

For routine determination of β -galactosidase activity in the control cells, a modified method reported in literature was used (12). A volume of culture containing 12-13 mg cell biomass was mixed with 5 ml of isoamyl alcohol in a 25 ml volumetric flask

and taken up to volume with 0.1 M, pH 6.6, phosphate buffer containing $MgSO_4$ 1mM and $MnSO_4$ 0.1 mM. This mixture was shaken for 1h at room temperature ($24^\circ C$). After 0.1 ml of this solution was mixed with 2.7 ml phosphate buffer, 0.1 ml, 3.36 mM 2-mercaptoethanol and with 0.1 ml 0.068 M solution of o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). This mixture was pre-equilibrated at $40^\circ C$ and kept at this temperature in a cell of a spectrophotometer (Beckman 35). The absorbance at 410 nm was recorded continuously for 4 min to record the ONP generation. To measure the activity of salt permeabilized cells the same methodology was used, eliminating the isoamlic alcohol permeabilization step. To evaluate and distinguish the intracellular ("inside") and extracellular ("outside") activities, permeabilized cells and their supernatant were separated by centrifugation, and the activity was measured in both fractions.

Specific activity was established as the β -galactosidase units per gram of cell biomass. One β -galactosidase unit is defined as the amount of enzyme needed to hydrolyze one μ mole of ONPG to ONP per minute.

RESULTS

Different permeabilization methods were evaluated: freeze-thawing, solvents (8), proteases, and a procedure used by Brodsky and GrootWassink based on salting out (11). All of them were evaluated under the same conditions reported in literature, with exception of the Isoamlic alcohol method, that was used for references purposes (12). The evaluation was based on the retention of enzymatic activity inside the cells.

Generally, every method showed particular advantages (Table 1). Enzymatic activity was detected outside the cells in all the evaluated methods. The freeze-thawing method presented high enzymatic activity, but all outside the cell. The permeabilization with proteases apparently is a good method. It only affects membrane proteins and does not affect polysaccharides, but the protease tested (HT Proteolytic and papaine) produced some peptides and amino acids, and resulted in a disagreeable smell and taste of the product.

The use of solvents has been reported most frequently. The solvents evaluated in this study are listed in table 1. It was observed that the solvent permeabilization method (spm) is a method for maximum expression of activity, however, the cells are completely broken. In this evaluation, the solvent-cell contact time was changed, and the enzyme, in almost every condition, was detected outside the yeast. But, in some cases the enzyme at evaluation time was detected inside the cell. However, the residual solvent in the cell, was enough to carry out the lysis of cell wall. This residual solvent resulted very hard to eliminate without damaging the enzymatic activity, turning it in an inefficient permeabilization method.

In the matter of this work, the method reported by Brodsky and GrootWassink (11), was evaluated and modified, at first, for permeabilization time. It was found that after a short permeabilization time very little enzymatic activity occurred outside the cell (Table 2). And we observed, that the level of expression of enzymatic activity was increasing as the permeabilization was taking place. The total enzymatic activity found (inside and outside the cell) was around 4000 U/g cells, even higher than in the isoamlic alcohol reference (2970 μ g cells). In the reference test, the enzyme loss by effect of the isoamlic alcohol, was more important than the enzyme loss in permeabilization with salts because the remnant alcohol was not eliminated, and so the enzymatic activity measured directly (after alcohol treatment) was higher than the addition of the cells the enzymatic activities inside and outside which were measured two hours after.

Furthermore, the method was easy to control, because the soluble phosphates were eliminated by simple centrifugation and water washing. This method was selected and optimized further.

Optimization

Parameter optimization was achieved the aid of the statistical methods Plackett-Burman and Box-Wilson (13-14). The initial permeabilization conditions were the same as those reported by Brodsky and GrootWassink (11), and were taken as the experimental

center. The evaluated superior and inferior limits and the experimental center are shown in Table 3. The number of combinations for the Plackett-Burmann method was fixed for eight variable. The combinations of the tested variables are presented in table 4. The superior and inferior limits of the variable used are indicated with the symbols (+) and (-) respectively. The intracellular and extracellular enzymatic activities were measured accordingly to the materials and methods section.

Enzymatic activity was not detected in the supernatants solutions (table 5). The combined effects of the tested variables in experiments 7 and 8, were not enough to permeabilize the cells (Table 5). In these experiments the cells presented enzymatic activity only after a treatment with isoamyl alcohol (1800 u/g cells). With the mathematical treatment (13), it was found that the most important variables in the permeabilization process are: salt concentration, temperature, time, and cellular concentration. From these conditions the BWM was carried out taking in account the combined effects of these variables. The results of this optimization showed how the evaluated variables should be increased or decreased. The results of the optimization step after the increasing and decreasing of the variables values, are shown in table 6. The highest level of enzymatic activity, reached after the optimization step was 676 u/g cell. Not all of activity was expressed, only around 23% of total (2970 u/g cell as reference), but the permeabilization level reached was enough to re use the same cells several times, and to obtain lactose conversions up to 60% (1). That condition was chosen like the optimal, because, no extracellular enzymatic activity was detected.

It is supposed, that the crucial factors, responsible for the retention, of all the enzyme by the permeabilized cells, are the combined effects of the evaluated parameters evaluated which were determined by the combinations used in both, the Plackett-Burman and the Box-Wilson methods. After comparing each one of the parameters tested with the parameters reported by Brodski and GrootWassink, a general tendency is not observed in the values of the parameters C.

The cells were evaluated like a biocatalyst on lactose solutions (5 g/l in a batch reactor. The pH was adjusted with HCl to 6.6 the reaction was carried out at 25°C and the cells were recovered by centrifugation after each hydrolysis. The remaining activity was measured after each hydrolysis cycle in a small cells sample, the results, after eight hydrolyses are shown in Fig. 1. It was observed that the enzymatic activity remained the same for the first six hydrolyses cycles and it decayed over 50% in the last two hydrolyses. May be it was due to the lysis of cell continued, by effect of PO₄ ions, present in Lactose-Buffer solution (0.1 M), and then a small quantity of enzyme were lost in each run, after centrifugation and harvesting of remainent cells.

LITERATURE CITED

1. Vasilis, G. and M. Lopes-Leiva. *Process. Biochem.* 2, 2-13 (1985).
2. Wendorff, W.L. and C.H.J. Amudson. *Milk Food Technol.*, 34, 300-306, (1971).
3. Sprossler, B. and H. Plainer. *Food Technol.* 37, 93-97 (1983).
4. Weetall, H.H. and H. Pitcher Jr. *Biotechnol. Bioeng.* 16, 295-313 (1974).
5. Guy, E.J. and E.W.J. Bingham, *J. of Dairy Sci.* 61, 147-151 (1978)
6. Cheng Cheng, K. and A.C. Ling. *Enzyme Microb. Technol.* T. 510-514 (1985).
7. Castillo R.E. Desarrollo de un sistema de inmovilización de células completas de levadura con actividad de β -galactosidasa. BSc Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1986).
8. Declaire, M. de Cat, W., and N. Van Huynh. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 300-301 (1987).
9. Asenjo, J.A., Andrews, B.A., Hunter, J.B. and S. Lecorre. *Process Biochem.* 20, 158-164 (1985).
10. Joshi, M.S., Gouda, L.R. and S.G. Bath. *Biotechnology Letters.* 9, 549-554 (1987).
11. Brodsky, J.A. and J.W.D., GrootWassink. *J. of Food Sci.*, 51, 597-903 (1986).
12. García Garibay, M., Torres J., López-Munguía, A., and T.L. Casas. *Biotechnology Letter.* 9, 417-420 (1987).

13. Plackett, R.L. and J.P., Burmann. *Biometrika*, 1946, 33, 105.
14. Box, G.E.P. and K.B. Wilson. *J. Royal Statistical Society*, 13, 1-45- (1951).

Table 1. Evaluation of permeabilization methods.

METHOD	ENZYMATIC INTRACELLULAR	ACTIVITY* EXTRACELLULAR
FREEZE-THAW SOLVENTS	196	1460
a) Ethanol	101	111
b) ETOH-acetone	98	134
c) Toluene	NAD	2104
d) Acetone	NAD	293
PROTEASES	735	980
SALTING-OUT	2060	700
ISOAMILIC ALCOHOL (as reference)	NAD	2970

* U/g cells

NAD = no activity detected

Table 2. Enzymatic activity of permeabilized cells at different permeabilization times by salting out.

TIME min	ISOAMILIC ALCOHOL	Enzymatic Activity*		TOTAL
		INSIDE	OUTSIDE	TOTAL
30	---	420	75	495
60	** 2970	1074	556	1640
75	---	1626	604	2230
90	---	1978	846	2820
105	---	2406	955	3350
120	---	2721	1186	3900
135	---	2654	1231	3880
180	---	2824	1431	4250

* U/g cells

**reference method

Table 3. Parameters evaluated in PBM. Superior and inferior limits.

PARAMETER	SUPERIOR	INFERIOR	EXPERIMENTAL CENTER
pH	7.2	6.0	6.6
Temp (°C)	53	43	48
KHzPO ₄ (M)	0.15	0.05	0.10
Time (min)	189	60	120
Cells (g/l)	175	100	140
MnCl ₂ (mM)	0.2	0.05	0.125
MgCl ₂ (M)	0.02	0.005	0.012
KCl	0.15	0.05	0.100

PBM=Plackett-Burmann Method

TABLE 4. Plackett-Burman, like experimental design

	A	B	C	D	E	F	G	Enzymatic Activity (ONPG)
1	+	-	-	+	-	+	-	A= pH
2	+	+	-	-	+	-	-	B= Temp °C
3	+	+	+	-	-	+	+	C= KH ₂ PO ₄ (M)
4	-	+	+	+	-	-	-	D= Time (min)
5	+	-	+	+	+	-	+	E= Cells (g/l)
6	-	+	-	+	+	+	-	F= MnCl ₂ (mM)
7	-	-	+	-	+	+	-	G= MgCl ₂ (M)
8	-	-	-	-	-	-	-	H= KCl

TABLE 5. Results of Plackett-Burmann method evaluated on permeabilization treatment

EXPERIMENT	E N Z Y M A T I C A C T I V I T Y*	
	INSIDE	OUTSIDE
1	102.00	NAD
2	733.00	NAD
3	584.00	NAD
4	694.00	NAD
5	107.00	NAD
6	255.00	NAD
7	NAD	NAD
8	NAD	NAD

* U/g cells

NAD = no activity detected

TABLE 6. Optimal conditions for permeabilization treatment after BWM

PARAMETER	VALUE
TEMPERATURE (°C)	51
PHOSPHATES CONC. (M)	0.045
TIME (min)	75
CELLULAR CONC. (g/l)	90
MgCl (mM)	0.02

*Enzyme activity = 676 U/g inside of cell

BWM=Box-Wilson Method

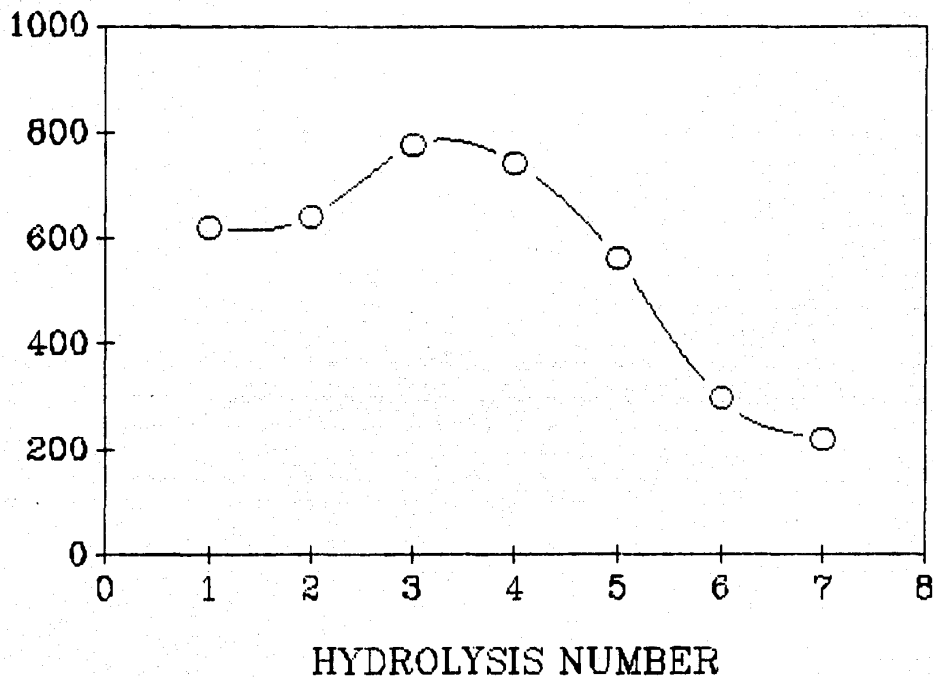
ABBREVIATED TITLE:

Castillo and Casas: Permeabilized yeast cells reutilization.

Figure 1. Lactase content of cells remaining after repeated lactose hydrolysis by permeabilized whole cells of *Kluyveromyces fragilis*. Lactose hydrolysis was carried out with 5% lactose solutions at 37°C in a one liter batch reactor (—○—○—○—).

LACTOSE HYDROLYSIS WITH PERMEABILIZED *K. fragilis* CELLS

SPECIFIC ACTIVITY OF THE BIOCATALYST (U/g)



Design of two immobilized cell catalysts

DESIGN OF TWO IMMOBILIZED CELL CATALYSTS BY ENTRAPMENT ON GELATIN: INTERNAL DIFFUSION ASPECTS

Castillo R.E., Rodríguez A.M., Casas T.L., Quintero R.R. & López-Munguía C.A. (*)

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos. 62271, MEXICO.

ABSTRACT

Experimental results obtained during the design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin are presented. Strong diffusional limitations are found and explained with the usual parameters and models, introducing an empirical correlation between substrate concentration and effectiveness factor. The effect of particle size, enzyme load and specific activity in the system is discussed in terms of cooperation between bioengineers and geneticists.

Keywords: immobilized cells, mass transfer effects, lactase, penicillin acylase.

(*) To whom all correspondence should be addressed

Design of two immobilized cell catalysts

INTRODUCTION

In the broadest sense, cell immobilization can be defined as the physical confinement or localization of microorganisms in a fixed support that permits their continuous reuse⁽¹⁾. Immobilized cells include dead cells with a desired enzymatic activity, or growing and viable cells for a complex biochemical process, in which coenzymes, cofactors, etc., are also involved.

Immobilization of microorganisms, for the application of a single enzymatic activity is an alternative to enzyme immobilization, that has been the subject of several technological developments in recent years. One of the main advantages of this type of process is that extraction and purification of the intracellular enzyme is avoided, resulting in a reduced catalyst production cost^(2,3,4,5). In general, the use of immobilized cells, overcome some of the disadvantages shown by immobilized enzymes, such as high manufacturing costs, complicated manufacturing, lower operational stability etc.. The choice between the use of immobilized enzymes or immobilized cells is similar in many respects to the more familiar choice between the use of purified or crude soluble enzyme as biocatalysts⁽⁶⁾.

At the end of 70's and early 80's, a great number of immobilized cells methods were developed, such as gel entrapment, cellular aggregates, chemical attachment to a polymeric matrix, etc.^(7,8). One of the first publications dealing with immobilization of whole cells for the use of a single enzyme is due to Leuschner in 1964⁽⁹⁾. Currently a wide variety of immobilization methods of microbial cells have reached the industrial scale as shown in

Design of two immobilized cell catalysts

table 1.

In this table the catalysts are produced by different methods: there are products based in ionic bindings, such as the immobilization of fungal spores, methods based on cell aggregates where the group of Vojtisek has contributed with industrial applications in socialist countries⁽³⁾ and methods based on gel entrapment. This last category is the most frequent due to the simplicity of the catalyst preparation: such is the case of the processes developed by Tanabe Seiyaku Co.⁽¹⁰⁾, based on cell entrapped on carrageenan for malic acid, aspartic acid, alanin, and phenylalanin production and by Genex Corporation for L-phenylalanine, aspartic acid, L-serine and L-tryptophan with cells immobilized on vermiculite⁽¹¹⁾.

Once an immobilized cell system has been selected for a given enzymatic process, two factors are of particular importance. These two factors represent and demonstrate the interrelation between Genetic Engineering and Biochemical Engineering: in one hand, what is the highest specific activity that can be obtained from a given cell host by genetic improvement? , and on the other hand, how much of this specific activity is really expressed if the catalyst design is mass transfer limited?. This particular limitation is the most common in immobilized cells systems, when the cell entrapment method is used.

For a given cell immobilization method, mass transfer limitations define the maximum specific activity, beyond which any strain genetic improvement will render the process less efficient, considering that it will increase the rate of a non limiting step. This information is important when designing biocatalysts and provides a clear demonstration on why both geneticists and biochemical engineers should be involved in this and other activities

Design of two immobilized cell catalysts

of biotechnology. The objective of this paper is to provide examples of the already mentioned situation found in the design of two catalysts prepared by cell entrapment on gelatin: β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* and penicillin acylase from *Escherichia coli*.

Mass Transfer Effects

In a recent review⁽¹⁾ mass transfer effects in immobilized cell systems are discussed. In this and many other articles external and internal diffusion resistances are treated in terms of effectiveness factors^(2,13,14). Although not always verified, external mass transfer in immobilized cells and enzymes is often considered negligible, due to the possibility to handle hydrodynamic conditions and reactor design to minimize its effects.

However, internal diffusional limitations are difficult to eliminate in immobilized cell systems, especially when the catalyst production process has already been defined. This factor is with no doubt a major limitation in developing new catalysts with immobilized cell for enzymatic reactions by the common gel entrapment techniques. Two alternatives are always proposed in the literature to avoid them: decrease particle size and/or decrease enzyme load. Nowadays a rule of thumb in immobilized cell or enzyme catalysts is the selection of the smallest particle size as a compromise between internal diffusion limitations and reasonable pressure drops in packed bed reactors.

The easiest alternative, from the design point of view is to decrease artificially the reaction rate, so that it becomes the controlling step. This is done by reducing the enzyme or cell load during the catalyst preparation. This of course, results in a rational use of the enzyme, but may result in a catalyst with low specific

Design of two immobilized cell catalysts

activity. Catalysts design is thus of particular importance, since due to the new technologies, geneticists are developing higher specific activity strains, while bioengineers recommend the reduction of the enzyme load to avoid diffusional limitations. It is important to mention that a high specific activity is often the final criteria to select between an enzyme or a cell catalyst.

In order to account for internal diffusion the effectiveness factor is always the first parameter to be defined:

$$\eta = \frac{v_{obs}}{v} \quad (1)$$

which measures the relation between the observed reaction rate (v_{obs}) in the presence of diffusional resistances and the kinetic rate (v), that would be observed if all diffusional limitations were eliminated.

To predict this parameter, the mass balance equation inside the particle is obtained. For any type of geometry:

$$-\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{n}{r} \cdot \frac{dS}{dr} - \frac{kE_t S}{K_m + S} \cdot \frac{1}{De} = 0 \quad (2)$$

where

- $n = 0$ for a slab
- $n = 1$ for a cylinder
- $n = 2$ for a sphere

This equation which describes the substrate concentration profile (S) as a function of the particle radius (r), has been solved numerically by many authors using different kinetic models. With the concentration profile the

Design of two immobilized cell catalysts

predicted observed velocity can be easily obtained by integration of the local rates. For Michaelis Menten kinetics the solution is presented as a plot of the effectiveness factor vs the Thiele modulus (ϕ), a dimensionless number which involves the kinetic parameters of the enzyme (kE_0 and K_m), the particle radius (R) and the effective diffusivity of the substrate (D_e). Equation 2 can be rewritten for spherical beads as follows :

$$\frac{d^2 \theta}{dz^2} = - \frac{\phi^2 \theta}{1-\beta} - \frac{2}{z} \frac{d\theta}{dz} \quad (3)$$

where:

$$\phi = \frac{R}{2} \sqrt{\frac{kE_0}{D_e K_m}}$$

$$\beta = S/K_m$$

$$z = r/R$$

In this plot, the effectiveness factor is also a function of the surface concentration (S_0) as the initial dimensionless boundary condition is: $\theta_0 = S_0/K_m$ at $z=1$. The surface concentration is assumed equal to the bulk concentration when no film resistance is present.

Once the effectiveness factor has been defined, the design equation for a batch reactor for instance would be:

$$V_{r,z} = - \frac{dS}{dt} = \eta \frac{kE_0 S}{K_m + S} \quad (4)$$

The relationship between the effectiveness factor

Design of two immobilized cell catalysts

and the substrate concentration has been the subject of theoretical treatment but it is seldom considered in experimental results and equation 4 is integrated with the effectiveness factor as a constant. In theoretical studies equations 3 and 4 are sometimes solved simultaneously but very few publications deal with this dependence experimentally. Radovich⁽¹¹⁾, points out that if internal mass transfer limitations occur, the actual rate expression is multiplied by an experimentally determined or predicted effectiveness factor and included in the reactor equation. Experimental determinations often involve the reduction of the catalyst particle size up to a point where reaction rate per unit mass no longer increases^(15,16,17): It is often ignored that these measurements are carried out in saturated conditions, when substrate concentration is high and therefore far from Michaelis Menten or first order kinetics.

Lee and Tsao⁽¹⁸⁾ proposed the estimation of the effectiveness factor at the logarithm of the mean substrate concentration. More recently, Manjon et al.⁽¹⁹⁾, developed a single equation for the packed bed reactor for reversible Michaelis Menten kinetics in which substrate conversion and the effectiveness factor are a function of a dimensionless length. Since the explicit dependence between the effectiveness factor and the reactor length is unknown, the equation is solved numerically.

In figure 1, equation 3 is solved numerically and the concentration profile integrated to illustrate the effect of decreasing substrate concentration on the effectiveness factor. The evolution of a batch reaction is shown in the figure for a Thiele modulus of 18 starting at $\beta_0=10$ (bold arrow), being clear that as the reaction proceeds, serious diffusional limitation occur. It follows that the relationship between effectiveness factor and substrate concentration is important for the design of

Design of two immobilized cell catalysts

immobilized cell reactors. It has been stated that if the Thiele modulus is higher than 0.3-3 significant diffusional limitations can be expected⁽¹⁾, however, it is difficult to find in the literature a calculated value for enzyme catalysts prepared with immobilized cells: the largest source of error comes from the effective diffusivity which is difficult to measure or estimate. The relationship given by Satterfield⁽²⁾ is commonly used with arbitrary values for the porosity (ϵ) and tortuosity factor (τ): $De = D \epsilon / \tau$ where D is the molecular diffusivity.

In this article the effective diffusivity is estimated from experimental data obtained with a catalyst with diffusional limitations. An empirical correlation between the effectiveness factor and the substrate concentration is obtained in order to allow a simple numerical integration of the batch and plug flow reactor equations and a direct design equation for the CSTR. Some aspects of the catalyst design are also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Cells of *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109 with β -galactosidase activity were grown and permeabilized as has already been described⁽²³⁾. Cells of *E. coli* with penicillin acylase activity were kindly provided by the mexican company GENIN S.A. de C.V.

Both microorganisms were immobilized by entrapment in gelatin. In both cases the maximum amount of cells that could be added to a 3 % (w/v) gelatin solutions, without modifications of the particle properties, was used (20 g/l). After homogenization of the mixture, beads of different size were produced in a pneumatic system⁽²²⁾. From the same mixture, fibers were produced instead of beads by direct

Design of two immobilized cell catalysts

extrusion in cold water. In both cases the catalyst is treated with 1.25% glutaraldehyde solution during 45 min. After several washes the catalyst is stored in refrigeration (4°C) in phosphate buffer 0.1 M, pH=6.6 for *K.fragilis* and pH=7.8 for *E.coli*. Approximately 25% of the initial activity is lost during the process.

Lactase activity was measured following the release of glucose from a 5% lactose solution in phosphate buffer 0.1 M, with the glucose test reagent according as has been described⁽²³⁾. One unit is defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of lactose in one minute. The produced cells contain 1666 U/gcell and followed M. Menten kinetics with a $K_m=5.33g/l$, galactose being a competitive inhibitor⁽²⁴⁾.

Penicillin acylase activity was measured with 2% potassium penicillin-G (PGK) solution in phosphate buffer 0.1M, pH=7.8 at 37 °C. The 6-aminopenicillanic acid (6-APA) produced is measured by the p-dimethylaminobenzaldehyde method⁽²⁵⁾. One unit is defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of 6-APA per minute. The cells with approximately 50% protein content presented an enzymatic activity of 200 U/gcell.

Reactions to measure initial rates in biocatalysts were carried out in 20 ml with 400 mg of immobilized cells with samples taken during the first 10 minutes. For batch reactions the volume was increased to 50 or 100 ml.

In both catalysts the activity is reported in terms of a unit weight of dry cells (U/gcell), protein in the cells (U/gprot) or dry catalyst (U/gcat).

The effectiveness factor was experimentally determined by comparing the activity of a given gelatin catalyst with the activity of the same catalyst after

mechanical disintegration.

All equations were solved numerically with the aid of simulation language ISIM[®] developed by Salford University Industrial Center, LTD, Salford, England. This language utilize four different integration methods to solve differential equations.

RESULTS AND DISCUSSION

Effective diffusivity

The biocatalyst prepared with the *K. fragilis* cells in the form of fibers gave a beta-galactosidase activity of 510 U/gcat while the disintegrated catalyst resulted in an increased activity of 1050 U/gcat, both measurements carried out at 50 g/l of lactose. This gives a clear evidence of diffusional limitations with an effectiveness factor of 0.486. Since the cells had already been characterized, all the parameters needed to solve eq. 3 were available with the exemption of the Thiele modulus. The equation was solved in order to find the value of the modulus that would decrease the initial rate of the ground catalyst 0.486 times. This value turned out to be 18, so from the Thiele modulus, all other parameters being known, the effective diffusivity could be indirectly evaluated. In table 2, this value is compared to other experimental results reported in the literature for lactose in various media. It can be observed that the value here obtained ($4.21 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg}$) is very similar to the one obtained in carrageenan, giving indirect evidence of a similar diffusional process. However, the effective diffusivity is 2 orders of magnitude smaller when compared to the reported value in the same system without cells, a stronger effect than the one reported by Furui & Yamashita⁽²⁶⁾ for *E. coli* cells on carrageenan and Brito et al. for *E. coli* on carrageenan and locust bean

Design of two immobilized cell catalysts

gum⁽²⁷⁾. The value reported by Friedman & Kraemer⁽²⁸⁾ for lactose diffusivity on gelatin is very similar to the molecular diffusivity of lactose in water, but this measurement was made on a gelatin solution and not in a gelatin gel.

As a conclusion, in this case it is not possible to obtain the effective diffusivity applying the usual correction factors to the molecular diffusivity: even with a void fraction value as low as 0.1 and a tortuosity factor as high as 10. When cells are not entrapped the behaviour seems to be different. Boersma et al.⁽²⁹⁾ following a similar procedure for reversible Michaelis Menten kinetics of flocculated *Arthrobacter* cells with intracellular glucose isomerase found a difference of only 7.3 between the effective and the molecular diffusivity. In any case, this indirect but simple experimental measurements of initial rates and effectiveness factors could be useful to obtain approximations of the effective diffusivities.

Effect of substrate concentration

Another important consideration, often neglected in the design of enzymatic reactors is the effect of substrate concentration on the effectiveness factor during the reaction. This was shown by the vertical arrow in figure 1 for a given Thiele modulus equal to 18 in a reaction with 50 g/l of lactose.

In figure 2, the experimental effectiveness factors determined at different initial substrate concentrations are reported for the lactase catalyst. This figure is a non logarithmic modification of figure 1, presenting the profiles as a function of β for selected values of the Thiele modulus, including the value of 18 calculated for the *K. fragilis* catalyst. However since it is not possible to obtain a direct function between this two parameters, an empirical polynomial correlation was obtained:

$$\eta = a + bS + cS^2 + dS^3 \quad (5)$$

where:

$$\begin{aligned} a &= 0.1552 \\ b &= 1.4327 \times 10^{-2} \\ c &= -2.5951 \times 10^{-4} \\ d &= 2.25 \times 10^{-6} \end{aligned}$$

With this correlation, equation 4 can be simplified for the design of a batch reactor to give:

$$kE_s(t) = K_m \int \frac{dS}{a + bS^2 + cS^3 + dS^4} + \int \frac{dS}{a + bS + cS^2 + dS^3} \quad (6)$$

In the particular case of the continuous stirred tank reactor, the design equation is:

$$\theta = \frac{(K_m + S) \cdot (S_0 - S)}{a + bS + cS^2 + dS^3} \quad (7)$$

Since the reaction in the CSTR proceeds at the exit substrate concentration (S), the effectiveness factor is the lowest (figure 2), this type of reactor is not recommended for immobilized cell catalyst with internal diffusional limitations.

In figure 3 the experimental results obtained in a batch reactor are presented and compared to the predicted values for three cases: the catalyst with no diffusional limitations present, integrated equation 4 with a constant effectiveness factor (0.489) and equation 6 taking into account the decrease in the effectiveness factor as substrate is consumed. It is clear that the best results were obtained in the last case. It is interesting to point out that in initial rate experiments with free cells, galactose behaved as a competitive inhibitor with $K_i=30$ mM. When this experiment

Design of two immobilized cell catalysts

was performed with the catalyst in kinetic control conditions, the inhibition constant increased to 200 mM. However, the competitive inhibition model could not adequately describe the experimental results shown in figure 3, for any of the three cases.

Optimization in the design of the catalysts

Considering the limitations observed with the catalyst prepared in the form of fibers, the effect of a different type and shape was studied. With an experimental system based on the design of Su et al.⁽²²⁾, we were able to produce 0.35 to 3 mm diameter gelatin beads. This was only possible when in the original design, water was substituted by cold corn oil to receive the extruded beads. In figure 4 the effect of particle size obtained for *E.coli* and *K.fragilis* cell catalysts is presented, when the effectiveness factors are evaluated at 50 g/l of lactose and 20 g/l of penicillin respectively. This figure directly illustrates the often mentioned effect of particle size on internal diffusion limitations.

Once a given size is selected, the already discussed effect of substrate concentration should be considered. For the two immobilized cell catalysts, we selected two particle sizes, inside and outside the diffusional limited region, and later we determined the effect of substrate concentration on the effectiveness factor. These results are presented in figure 5 where it becomes evident that the limitations can occur later in the reaction (batch reactor) or near the exit of a plug flow reactor: in both cases when the substrate concentration decreases to limit where there is a switch from kinetic to diffusional control. In the literature, it is often found that during the design of an enzyme or cell catalyst, the process is declared free from internal diffusional limitations after finding a particle size where the initial rate no longer increases or the activation

Design of two immobilized cell catalysts

energy of the enzyme in the catalyst becomes equal to the one of the free enzyme. In both cases the effect of substrate concentration is systematically ignored and as shown in figure 5, this could be a source of error.

Finally during the development of a process for the production of an immobilized cell catalyst, a classical or genetical strain improvement project is included, in order to obtain the maximum specific activity. If the catalyst is controlled by internal diffusion, the increase in the specific activity of the strain will only turn the catalyst more inefficient, as a higher percent of the enzymatic activity inside the catalyst will be useless. This is shown in table 3, for the *K.fragilis* cells with an actual activity of 1666 U/g cells. A five fold increase in specific activity of the cells would cause a decrease in the effectiveness factor from 0.5 to 0.257, as measured at 50 g/l. The specific activity of the catalyst would however increase from 550 to 1485 U/g cat so the enzyme production cost will be an important criterion to define the catalyst production process.

Acknowledgements. Authors wish to express their gratitude to Alfredo Martinez and Mario Caro for pilot plant support.

Design of two immobilized cell catalysts

REFERENCES

1. RADOVICH J.M., 1985. Mass Transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 2-10.
2. CHAMPLUVIER E., MARCHAL F. & ROUXHET P.G. , 1989. Immobilization of Lactase in yeast cells retained in a glass wool matrix. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 422-430.
3. VOJTISEK V. & JIRKU V., 1983. Immobilized cells. *Folia Microbiol.* **28**, 309-340.
4. KOLOT F.B., 1980. New trends in yeast technology-Immobilized Cells. *Process Biochemistry* 10/11, 2-8.
5. DURAND G. & NAVARRO J.M. , 1978. Immobilized microbial cells. *Process Biochemistry*, **9**, 14-23.
6. CHEETHAM P.S.J., 1980. Developments in the immobilization of microbial cells and their applications. In: *Topics in enzyme and Fermentation Biotechnology*. Vol. 4. Ed. Alan Wiseman, Ellis Harwood Limited, England. 189-238.
7. VOJTISEK V. & VANEK Z., 1986. Selection and enrichment of active strains of microorganisms and their use for production of immobilized cells biocatalysts. In: *Overproduction of microbial metabolites: Strain improvement and process control strategies*. Eds. Z.Vanek & Z. Hostalek. Butterworths Publ. Co., Boston Mass. 183-212.
8. CHIBATA I., TOGA T. & TAKATA I., 1983. Continuous production of L-malic acid by immobilized cells. *Trends in Biotechnology*, **1**, 1, 9-11.
9. KOLARIK M.J., CHEN B.J., EMERY A.H. & LIM. H.C.,

Design of two immobilized cell catalysts

1974. Glucose isomerase entrapped in cellulose acetates. In: Immobilized enzymes in Food and Microbial Process. Ed. A.C.Olson & C.L.Cooney. Plenum press 1st ed. New York USA 71-83.
10. TOSA T., 1986. Design of Bioreactors. Abstract & Proceedings of the Bio Fair Tokyo, 94-99.
 11. HAMILTON B.K., HSIAO H.Y., SWANN W.E., ANDERSON D.M. & DELENTE J.J., 1985. Manufacture of L-aminoacids with bioreactors. Trends in Biotechnology 3, 3, 64-68.
 12. HALWACHS W., 1979. The effect of pore diffusion on Immobilized enzymes. Process Biochemistry. 6, 25-27.
 13. ENGASSER J.M. & HORVATH C., 1976. Diffusion and Kinetics with Immobilized Enzymes. In: Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol. 1. Eds. L.Wingard, E.Katchalski & L.Goldstein. Academic Press. 127-220.
 14. WEBSTER I.A. & SHULER M.L., 1979. Whole-cell Hollow-Fiber reactor: Effectiveness factors. Biotechnol. Bioeng. Vol 21, 1725-1748.
 15. LEE Y.Y., FRATZKE A.R., WUN K. & TSAO G.T., 1976. Glucose isomerase immobilized on porous glass. Biotechnol. Bioeng., 18, 389-413.
 16. ROVITO E.J. & KITTEL J.R., 1973. Film and pore diffusion studies with immobilized glucose oxidase. Biotechnol. Bioeng. 15, 143-161.
 17. LOPEZ-MUNGUIA C.A., 1981. Determinación de los efectos de la transferencia de masa en la cinética observada de enzimas inmovilizadas. Rev. Soc. Quim. Mex., 25, 5, 522-528.

Design of two immobilized cell catalysts

18. LEE Y.Y. & TSAO G.T., 1974. Mass transfer characteristics of immobilized enzymes. *J. Food Sci.*, **39**, 667-672.
19. MANJON A., IBORRA J.L., GOMEZ J.L., GOMEZ E., BASTIDA J. & BODALO A., 1987. Evaluation of the effectiveness factor along immobilized enzyme fixed bed reactors: Design of a reactor with naringinase immobilized into glycophase-coated porous glass. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 491-497.
20. SATTERFIELD C.N. & SHERWOOD T.K., 1963. The role of diffusion in catalysis. Addison-Wesley, Reading, MA., 20-26.
21. CASTILLO R.E. & CASAS T.L. 1990 Reutilization of free and immobilized *Kluyveromyces fragilis* yeast cells with a controlled permeabilization treatment. On the Proceedings of "Physiology of immobilized cells, an international symposium" Elsevier Science Publishers B.V. The Netherlands. In press.
22. SU H., BAJPAI R. & PRECKSHOT W., 1989 Characterization of alginate beads formed by a two fluid annular atomizer. *Applied Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 561-569.
23. WENDORF W.L. 1969 Studies on the β -galactosidase activity of *Sacharomyces fragilis* and effect of substrate preparation. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin.
24. CASAS T.L., 1989. Research report. Regional Program of Biotechnology for Latinamerica and the Caribbean. PNUD/ONUUDI December.
25. CASAS T.L., 1981. Produccion del acido 6-APA por hidrolisis enzimatica de penicilina G. Master in Science Thesis. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico.

Design of two immobilized cell catalysts

26. FURUI M. & YAMASHITA K., 1985. Diffusion coefficients of solutes in immobilized cell catalysts. J. Ferment. Technol. **63**, 2, 167-173.
27. BRITO E., DONJUAN J., DOMINGUEZ F. & CASAS T.L.. 1990. Diffusion coefficients of carbohydrates in modified K-carrageenan gels with and without *E. coli* immobilized cells Vol. **69**, No. 2. In press.
28. FRIEDMAN L. & KRAEMER E., 1930. The structure of gelatin gels from studies of diffusion. J. Am. Chem. Soc., **52**, 4, 205.
29. BOERSMA J.G., VELLENGA K., DE WILT H.G.J. & JOOSTEN G.E.H. 1979 Mass transfer effects on the rate of isomerization of D-glucose into D-fructose, catalyzed by whole-cell immobilized glucose isomerase. Biotechnol. Bioeng., **21**, 1711-1724.
30. PERRY R.H. & CHILTON C.H., 1973. Chemical Engineers' Handbook. 5th edition. McGraw Hill Kogakusha Ltd. Tokyo.

Design of two immobilized cell catalysts

TABLE 1- Examples of industrial enzymatic processes with immobilized whole cells.

Microorganisms	Enzyme	Product	Company
<i>E. coli</i>	Aspartase	L-aspartic acid	Tanabe Seiyaku Genex Corp.
<i>E. coli</i>	Penicillin acylase	6-aminopenicilanic acid	Tanabe Seiyaku Novo Industri Toyo Yozo
<i>Actinoplanis missourienses</i>	Glucose Isomerase	Fructose syrups	Gist Brocades.
<i>Bacillus coagulans</i>	Glucose Isomerase	Fructose syrups	Novo Industri
<i>E. coli</i>	Tryptophanase	Tryptophan	Genex Corp.
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Fumarase	Malic acid	Tanabe Seiyaku
<i>Erwinia rhapontici</i>	Isomaltulose synthase	Isomaltulose	Miles Lab.
<i>Serratia plymuthica</i>	Isomaltulose synthase	Isomaltulose	South German Sugar.
<i>Mortierella vinacea</i>	β -galactosidase hydrolysis	Raffinose	Hokkaido Sugar
<i>Pseudomonas dacunhae</i>	Aspartate decarboxylase	Alanine	Tanabe Seiyaku
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Serine hydroxymethyl transferase	Serine	Genex Corp.
<i>Rhodotorula rubra</i>	Phenylalanine ammonia-lyase	Phenylalanine.	Genex Corp.
<i>Rhodococcus sp</i>	Nitrilase	acrylamide	Nitto Chem.Ind.

Design of two immobilized cell catalysts

TABLE 2. Lactose diffusivities in various systems.

System	Diffusivity (cm ² /seg)	ref.
<i>K. fragilis</i> in gelatin (5%, 37°C)	4.21×10^{-8}	this work
gelatin (5%, 5°C)	1.44×10^{-6}	(28)
<i>E. coli</i> in carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	3.53×10^{-8}	(27)
carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	1.285×10^{-8}	(27)
water (25°C)	4.9×10^{-6}	(30)

Design of two immobilized cell catalysts

TABLE 3. Effect of strain genetic improvement on the effectiveness factor in a immobilized cell catalyst limited by internal diffusion.

	Effectiveness factor		
	So= 50 g/l	So= 10 g/l	So= 1 g/l
1/2 Vmax	0.620	0.370	0.230
Actual activity (Vmax)*	0.500	0.278	0.170
2 Vmax	0.390	0.205	0.122
3 Vmax	0.328	0.172	0.100
5 Vmax	0.257	0.134	0.080
10 Vmax	0.197	0.093	0.055

* actual value is 1666 U/gcell

LIST OF FIGURES

FIGURE 1. Effectiveness factor as a function of the Thiele modulus, for Michaelis Menten kinetics in a spherical catalyst. (the bold arrow illustrates a reaction with $\phi = 18$, and $S_0 = 50$ g/l: point a)

FIGURE 2. Experimental effectiveness factors obtained at different initial substrate concentrations for the immobilized *K.fragilis* catalyst, a modified presentation of figure 1.

FIGURE 3. Evolution of a batch reaction limited by internal diffusion with an immobilized cell β -galactosidase catalyst as described by different models.

FIGURE 4. Effectiveness factor as a function of particle size for a penicillin acylase (-○-) and β -galactosidase (-□-) immobilized cell catalysts.

FIGURE 5. Effect of substrate concentration on effectiveness factor for two particle sizes of immobilized cell catalysts. (*E.coli*: -○- 0.35 mm, -△- 1.44 mm; *K.fragilis*: -●- 0.35 mm, -▲- 1.44 mm).

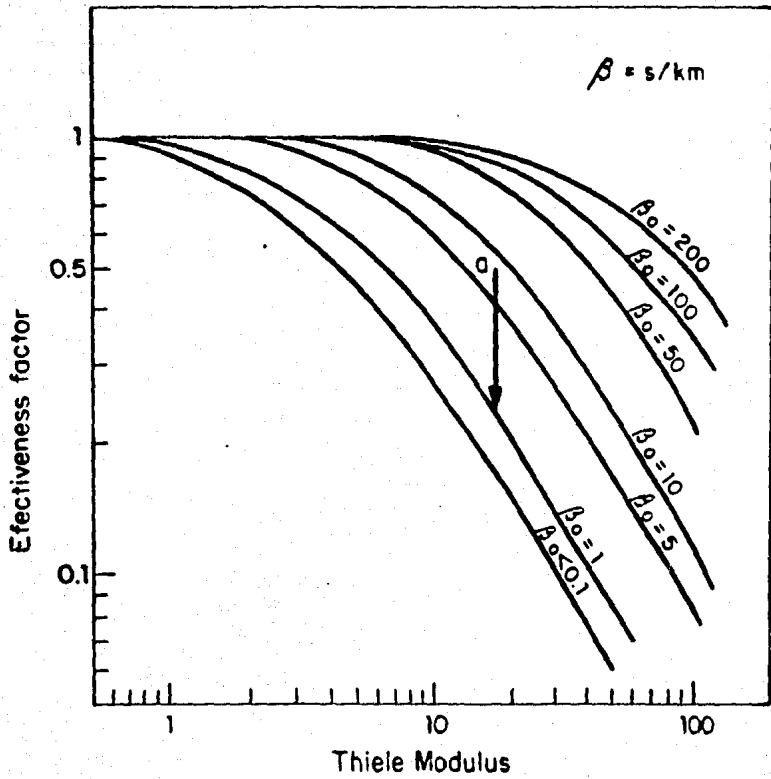


Fig. 1

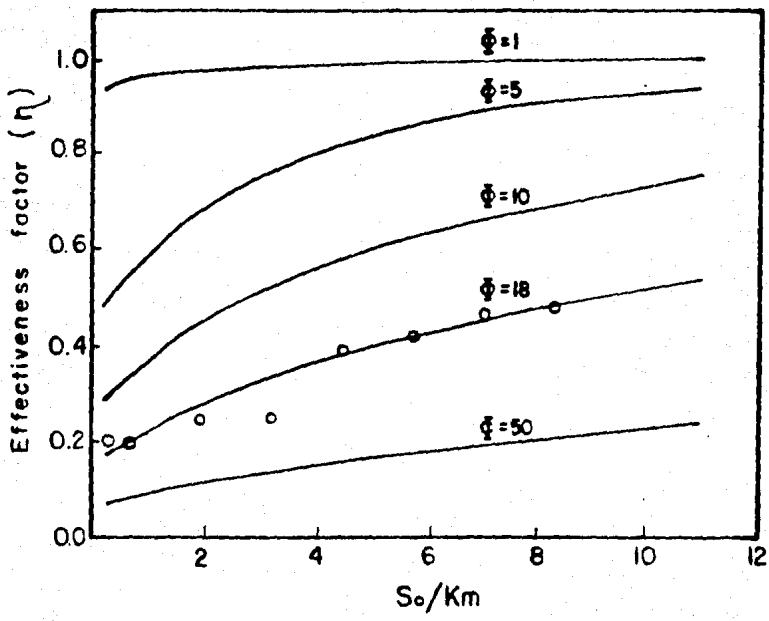


Fig. 2

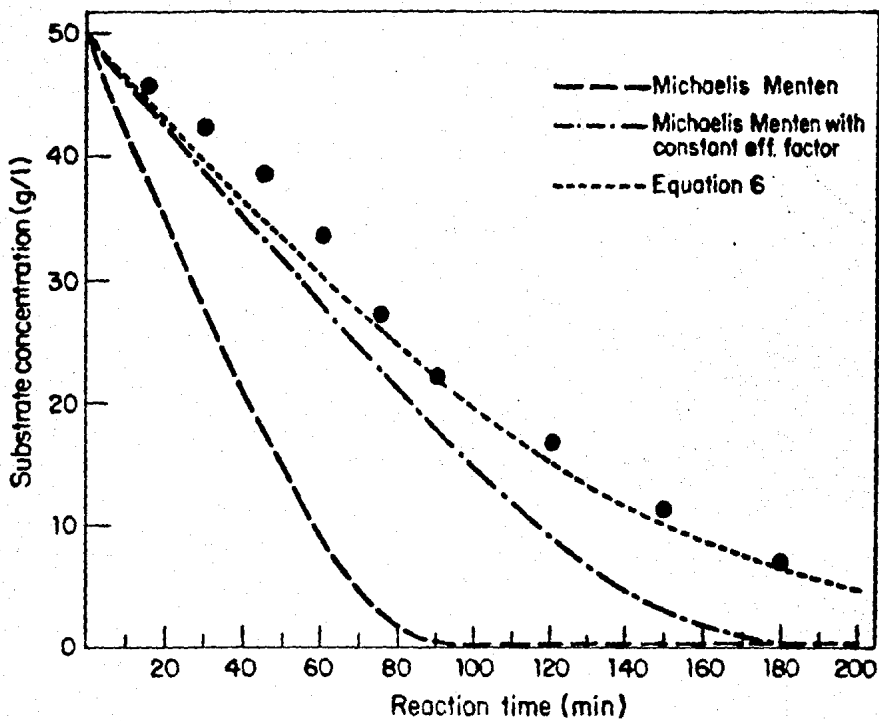


Fig. 3

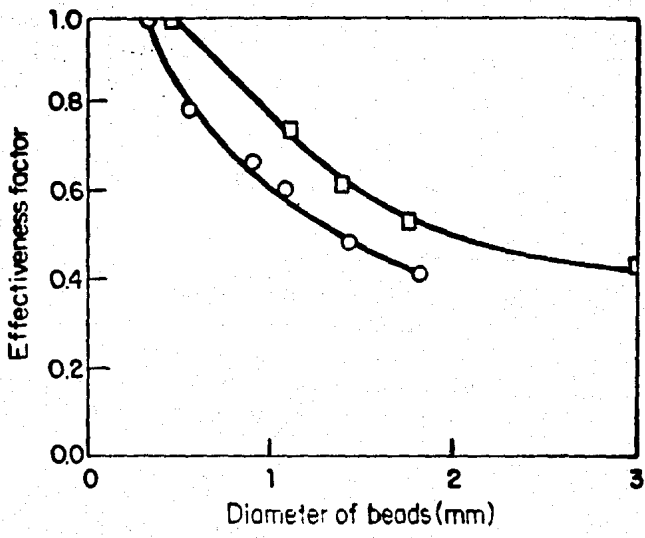


Fig. 4

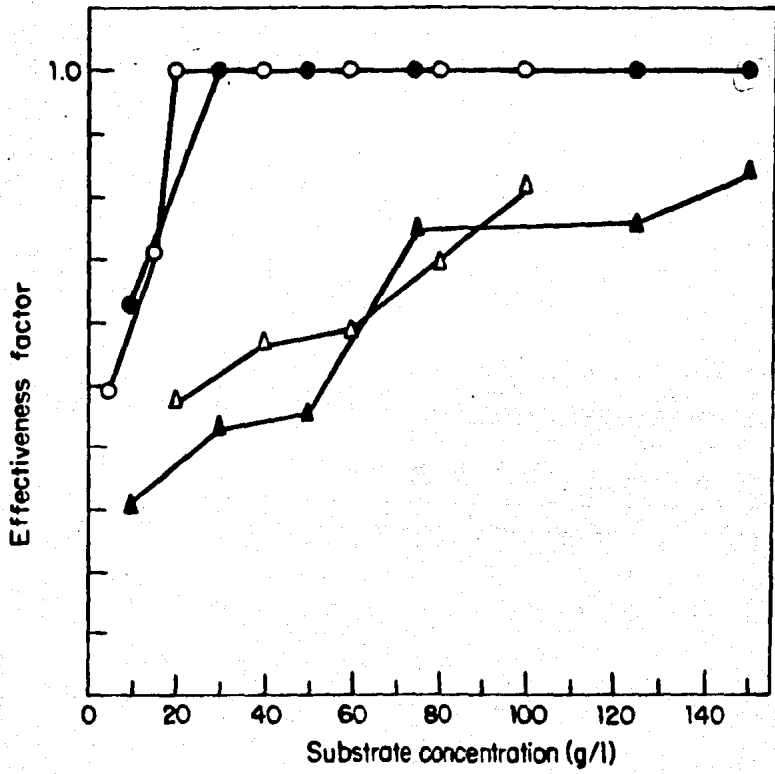


Fig. 5