



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UACPyP CCH
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CONTRIBUCION AL DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA
OBTENCION DE UN BIOCATALIZADOR CON ACTIVIDAD DE
B-GALACTOSIDAD QUE PUEDA SER APLICADO LECHE Y SUERO
DULCE DE LECHE.

Trabajo que presenta la M. en C.
Lidia T. Casas

Para obtener el grado de doctor en Biotecnología, en el
Proyecto Académico de Especialización, Maestría y
Doctorado en Biotecnología

Asesor del Tema
Dr. Agustín López Munguía

Cuernavaca, Mor. México,

marzo de 1992.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

I.- Presentación de la tesis.....	1
II.- Resumen.....	4
III.- Introducción	6
IV.- Objetivos.....	23
V.- Producción de la β -galactosidasa en células de <i>K. fragilis</i>	24
● Antecedentes y presentación de los trabajos.....	24
● Conclusiones y aportaciones en los trabajos realizados con respecto a la producción de la β -galactosidasa en células de <i>K. fragilis</i>	31
VI.- Diseño y obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa que pueda ser aplicado en la hidrólisis de la lactosa en suero dulce de leche completo.....	34
● Antecedentes y presentación de los trabajos.....	34
● Conclusión y aportaciones en los trabajos realizados en el diseño de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa, para la hidrólisis de la lactosa en suero dulce completo de leche.....	40
VII. Discusión final.....	42
VIII. Bibliografía General.....	53

Anexo 1.....	59
● Relación entre la velocidad específica de consumo de azúcar y la actividad específica de β -galactosidasa en células de <i>K.fragilis</i>	60
● Escalamiento del proceso de producción de lactasa en células de <i>K.fragilis</i>	75
● Inmovilización de células de <i>K. fragilis</i> en gelatina-entrecruzando con glutaraldehído.....	91
 Anexo 2.....	 106
● Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from <i>Kluyveromyces marxianus</i>	107
● Influence of spray drying on the permeability of <i>K fragilis</i> measured by β - galactosidase activity.....	111
● Reutilization of free and immobilized <i>Kluyveromyces fragilis</i> yeast cells with controlled permeabilization treatment.....	130
● Design of two immobilized cell catalyst by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects.....	137
 Anexo 3.....	 144
● Procedimiento para obtener un biocatalizador con células con una permeabilidad controlada para la hidrólisis de la lactosa.....	145
● Perfil financiero, hidrólisis enzimática de suero de leche	154

I. Presentación de la tesis

Los estudios aquí presentados fueron desarrollados durante el periodo de 1986-1990, en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la U.N.A.M laborando como Investigador Asociado en el Departamento de Bioingeniería a cargo de un grupo de investigación, estudiando aspectos en el área denominada tecnología enzimática y desarrollo tecnológico, específicamente con enzimas intracelulares y células completas, en donde el modelo de estudio fué la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

En la elaboración y discusión del documento participó el Dr. Agustín López Munguía, quién fungió como tutor principal de los estudios de doctorado. En este también aparecen otros autores, ya que colaboraron como estudiantes de maestría (E. Castillo y C. Peña) o como técnicos académicos (M. García-Garibary y J. López) en el grupo de investigación.

Como lo ilustra el título del trabajo, éste contribuye al desarrollo de un proceso para la obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa que pueda ser aplicado en leche y suero dulce de leche, abordando dos aspectos importantes que son: La producción de la enzima en células de *K. fragilis* y la obtención del biocatalizador con actividad de β -galactosidasa a base de células inmovilizadas.

El documento está constituido por artículos publicados, y otros escritos que han sido presentados en informes técnicos o solo complementan el trabajo; por esta razón es que tratando de uniformizar el documento todos éstos se presentan a través de un formato común en donde la paginación de la parte superior corresponde al trabajo global y la de la parte inferior a cada uno de los trabajos o secciones. La paginación presentada en el índice corresponde al trabajo global.

El trabajo está integrado por ocho capítulos y tres anexos:

En el capítulo I corresponde a la presentación de la tesis, en donde se relata el tema del trabajo, los participantes, lugar en el que se realizó así como su estructuración.

En el capítulo II se presenta un resumen de los estudios realizados, y presentados en el documento.

En el capítulo III, además de introducir el tema objeto del trabajo se presentan los antecedentes que lo justifican.

En el capítulo IV, se presenta el objetivo general y los particulares establecidos para el desarrollo y conclusión del trabajo.

En el capítulo V, se muestran y discuten los trabajos realizados con respecto a la producción de la β -galactosidasa en células de *K. fragilis*. Para tal efecto en el capítulo se contempla una sección de antecedentes y presentación de los trabajos en donde además de analizar los antecedentes que justifican los estudios realizados, éstos se describen en forma muy breve; posteriormente se presentan la sección titulada como conclusiones y aportaciones en los trabajos realizados en la producción de la β -galactosidasa en células de *K. fragilis* se concluye y puntualizan las aportaciones en esta área del conocimiento.

En el capítulo VI, se muestran y discuten los trabajos realizados con respecto al diseño y obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa en suero dulce completo de leche. Para cumplir dicho propósito el capítulo está estructurado de la misma forma que el capítulo V.

En el capítulo VII denominado discusión final, se recopilan y discuten los dos temas centrales (producción de la enzima y obtención del biocatalizador) para mostrar las aportaciones relevantes del trabajo.

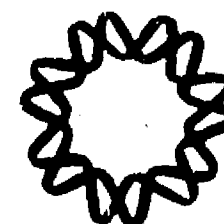
En el capítulo VIII denominado bibliografía general, se listan las referencias citadas en los textos correspondientes a las secciones de introducción, presentación, conclusión y aportaciones en los trabajos realizados en la producción de la enzima y obtención del biocatalizador y en la discusión final.

En el documento se contempla 3 anexos: En el anexo 1, se agrupan los trabajos que fueron elaborados específicamente para la presentación de la tesis, son resultados correspondientes a los estudios de producción de la lactasa y obtención del biocatalizador y se pretende que sirvan de base para publicaciones posteriores. En el anexo 2 también se presentan resultados de ambos estudios, solo que los documentos son artículos ya publicados. Y el anexo 3, contiene una patente y una evaluación de costos para la obtención de un jarabe a base de suero hidrolizado, ambos apoyan la discusión de los resultados.

Una parte importante de éstos estudios fueron apoyados económicamente por donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a través del Programa Regional de Biotecnología para América Latina y el Caribe de las Naciones Unidas.



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



II. Summary.

The aim of the present studies was to obtain a biocatalyst to hydrolyze the lactose in sweet whey and milk. The β -galactosidase production from *K fragilis* cells and the biocatalyst manufacture from this cells were studied.

Two aspects were studied concerning the enzyme production :the role of oxygen and the scale up of production process. The results suggested that enzyme production is determined by the specific lactose consumption rate by the cells. In a batch process, oxygen has a strong influence on the specific sugar consumption rate. The specific β -galactosidase activity (U/g) tends to increase when the specific sugar consumption rate is low (1 g lactose/g cell h) On the other hand, when the specific sugar consumption rate is higher than 2 (g lactose/g cell h) the specific activity tends to decrease. The enzyme production process was established for 130 l and 500 l volume. The scale up criterion used was k_{la} constant.

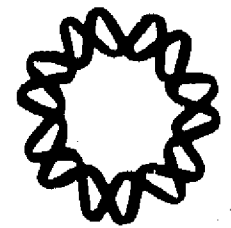
Two other topics were studied concerning the manufacture of the biocatalyst manufacture: the permeabilization treatment of cells and the production and characterization of the biocatalyst. In the context of this work it is important to clarify the term "permeabilization". It refers to intra cellular detection of β -galactosidase activity, avoiding its diffusion into the surrounding medium. The two permeabilization treatment methods studied were: a) cell treatment with salts and b) cell treatment by spray drying. By both methods whole cells with enzymatic activity confined in the intracellular space were obtained. Different levels of cell permeabilization were found depending of drying temperature and it was postulated that the permeabilization mechanism is independent of the drying mechanism.

TELS.: (52) (73) 172799, 172999, 175687, 175676 TELEX: 173425 CIFNME FAX: (52) (73) 172388

APDO. POSTAL 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62271, MEXICO.



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



For the biocatalyst manufacture, the cells were agglomerated in beads by entrapment with gelatin and cross linking with glutaraldehyde. Schiff base between the amino groups of gelatin and aldehyde groups of glutaraldehyde was formed. The kinetics and diffusional aspects of the biocatalyst were studied. An empirical correlation between the effectiveness factor and the substrate concentration was obtained. Numerical integration of the batch and plug flow reactor equations and a direct design equation for the continuous stirred tank reactor (CSTR), was developed.

The biocatalyst operational stability studies show, that in lactose and sweet whey at 37°C the biocatalyst maintain the 100% of initial activity during 180 hours.

Vo. Bo.

Dr. Agustín López Munguía
Asesor del Trabajo

TELS.: (52) (73) 172799, 172999, 175687, 175676 TELEX: 173425 CIFNME FAX: (52) (73) 172308

APDO. POSTAL 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62271, MEXICO.

II. Resumen

El objetivo del presente trabajo es el de obtener un biocatalizador con actividad de lactasa que tenga perspectivas para poder ser aplicado en la hidrólisis de la lactosa de suero dulce completo de leche y de leche a nivel industrial. Para cumplir la meta establecida se abordaron dos aspectos importantes; la producción de la enzima en células de *K. fragilis* y la obtención del biocatalizador con actividad de β -galactosidasa a base de células inmovilizadas.

Con respecto a la producción de la enzima los estudios se centraron en aclarar el papel del oxígeno en la producción de la enzima y el escalamiento del proceso. Los estudios muestran que la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo influye en la velocidad de consumo de la lactosa, azúcar inductor del sistema de regulación de la enzima. Así la actividad específica de β -galactosidasa (U/g) está determinada por la velocidad de consumo de la lactosa por la célula; por lo que a velocidades específicas de consumo de azúcar cercanos a 1 (g galactosa/g cel h) la actividad específica tiende a aumentar a través del proceso (en lote o alimentado), mientras que a velocidades de consumo de azúcar mayores a 2 ésta tiende a disminuir. El proceso de producción de la enzima en lote fue escalado de 14 l a 500 l y el criterio de escalamiento fue k_{la} constante.

Con respecto a la obtención del biocatalizador los estudios se enfocaron primeramente a tratar de obtener células permeables, definiéndose el término de permeabilidad como: "El procedimiento para obtener la mayor actividad enzimática en el interior de la célula, sin que ésta difunda a la mezcla de reacción". Los dos métodos explorados fueron: a) permeabilización con sales y temperatura y b) a través del secado por aspersión. Se lograron permeabilizar células de *K. fragilis* por ambos métodos. En el tratamiento de las células por secado se observan varios niveles de permeabilización dependiendo de la temperatura de secado, y se sugiere que el mecanismo de permeabilización es independiente del de secado.

Una vez permeabilizadas las células se formaron agregados celulares atrapando en gelatina y curtiendo con glutaraldehído, entrecruzando a través de la formación de bases de Schiff entre los grupos amino de la gelatina y los grupos aldehído del glutaraldehído. El biocatalizador resultante fue caracterizado en términos cinéticos y difusionales. Se obtiene una correlación empírica entre el factor de efectividad y la concentración de sustrato, que se puede integrar directamente a las ecuaciones de diseño de un reactor del tipo tanque agitado o flujo pistón. Los resultados experimentales muestran, que la conversión se predice mejor por la ecuación de diseño con la correlación integrada, que con aquella en la que se considera el factor de efectividad constante. Los estudios de estabilidad operacional del biocatalizador en lactosa y suero muestran que éste conserva el 100% de la actividad inicial durante 180 horas de operación a 37°C en suero dulce completo.

II. Summary.

The aim of the present studies was to obtain a biocatalyst to hydrolyze the lactose in sweet whey and milk. The β -galactosidase production from *K fragilis* cells and the biocatalyst manufacture from this cells were studied.

Two aspects were studied concerning enzyme production : the role of oxygen and the scale up of production process. The results suggested, that the enzyme production is determined by the specific lactose consumption rate by the cells. In a batch process the oxygen affect the specific sugar consumption rate. The specific β -galactosidase activity (U/g) tends to increase when the specific sugar consumption rate is low (1 g lactose/g cell h) On the other hand, when the specific sugar consumption rate is higher than 2 (g lactose/g cell h) the specific activity tends to decrease. The enzyme production process was established for 130 l and 500 l volumes, the scale up criterion used was k_{la} constant.

Concerning biocatalyst manufacture two other topics were studied : the permeabilization treatment of cells and the production and characterization of the biocatalyst. In the context of this work it is important to clarify the term "permeabilization" it refers to intra cellular detection of β -galactosidase activity , avoiding its diffusion into the surrounding medium. The two permeabilization treatment methods studied were: a) cells treatment with salts and b) cells treatment by spray drying. By the both methods whole cells with enzymatic activity confined in the intra cellular space were obtained. Different levels of cell permeabilization were found depending of drying temperature and it was postulated that the permeabilization mechanism is independent of the dried mechanism.

For the biocatalyst manufacture pellets cells were formed, trapping with gelatin and cross linking with glutaraldehyde through Schiff bases between the amino groups of gelatin and aldehyde groups of glutaraldehyde. The kinetics and diffusional aspects of the biocatalyst were studied. An empirical correlation between the effectiveness factor and the substrate concentration was obtained in order to allow a simple numerical integration of the batch and plug flow reactor equations and a direct design equation for the continuous stirrer tank reactor (CSTR).

The biocatalyst operational stability studies, shown, that in lactose and sweet whey at 37°C the biocatalyst maintain the 100% of initial activity during 180 hours.

III. Introducción

La β -galactosidasa o lactasa y la tecnología enzimática.

La biotecnología, multidisciplina científica de creciente importancia ha sido definida como : la aplicación de los seres vivos para la obtención de bienes y servicios. Para algunos autores la biotecnología se inicia con la modificación genética y por ende metabólica de células eucariotes y procaríotes, para la obtención de nuevos compuestos o el incremento en la producción de los ya sintetizados.

Para otros, la biotecnología aparece con las diversas metodologías de transformación biológica que han usado las civilizaciones desde los inicios de la historia hasta nuestros días; ejemplo de esto es la obtención de bebidas fermentadas.

Independientemente del enfoque del que se parta, el objetivo de la biotecnología es el mismo; lograr beneficios a partir de la actividad celular sobre la materia orgánica e inorgánica y la biotecnología moderna es la convergencia de la biología celular y molecular, la bioquímica y la ingeniería.

Dentro de esta multidisciplina en donde las transformaciones biológicas son el principal objetivo, la obtención y aplicación de las enzimas, enmarcadas en la denominada tecnología enzimática, resulta de gran importancia.

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza protéica con un alto grado de especificidad y eficiencia, logrando acelerar los procesos químicos en una magnitud de hasta 10^{15} veces (Segel, I.H, 1975) debido a la acción concertada de más de un grupo químico de la proteína en la catálisis, disminuyendo la energía libre de activación. Así su aplicación se lleva a cabo en condiciones medias de pH y temperatura, las reacciones enzimáticas se llevan a cabo a temperaturas de 25 a 60°C y valores de pH de 5 a 8.

Las enzimas pueden ser aplicadas en forma soluble (libres) o ser inmovilizadas en un soporte o matriz, a su vez la inmovilización de las enzimas puede realizarse utilizando éstas purificadas o en el interior de la célula. Se define como enzimas o células inmovilizadas aquellas que se encuentran confinadas en un espacio, lo cual hace

factible su reutilización, y en consecuencia la disminución en el costo del proceso de aplicación de la enzima. Otras ventajas son que es posible establecer procesos continuos y la estabilidad de la enzima puede ser mejorada.

Las enzimas inmovilizadas han tenido impacto en la industria química, farmacéutica y de alimentos principalmente. Dentro de los procesos más importantes que utilizan enzimas inmovilizadas mencionaremos: La utilización de la glucosa isomerasa para la isomerización de la glucosa en fructosa en la producción de jarabes fructosados como uno de los primeros procesos que se implantó utilizando enzimas inmovilizadas y que ha venido a revolucionar el mercado de los edulcorantes.

Otra área importante de las enzimas inmovilizadas es su aplicación en análisis a través de los denominados estuches de reactivos o "kits" y de los electrodos enzimáticos (Casas, 1985).

La compañía Japonesa Tanabe Seiyaku ha desarrollado diferentes biocatalizadores con células microbianas inmovilizadas utilizando, como soportes acrilamida y carragenina implementando gran variedad de procesos entre los cuales estan: la producción de ácidos orgánicos como aspártico, málico y la producción del ácido 6 aminopenicilánico (Casas, 1985).

En la actualidad, la aplicación de biocatalizadores con enzimas o células inmovilizadas a nivel industrial se ve apoyada por otras áreas; la ingeniería genética, la ingeniería de proteínas y avances en el diseño de reactores, apoyan no solo incrementando su concentración celular sino también su estabilidad y espectro de tal forma que en el presente el diseño de una enzima "ad hoc" para una determinada bioconversión es una realidad. Quizá el primer ejemplo, es el desarrollado por Genencor con la subtilisina mejorada por técnicas de ingeniería genética y biología molecular, alterando la relación en su actividad de transesterificación versus hidrólisis. Como ejemplo de avance en el diseño de reactores tenemos el mejoramiento de reactores enzimáticos de membrana para el uso de enzimas que requieren de cofactores. Este consiste, en la unión de cofactores a polímeros solubles unidos al sistema de membranas, permitiendo la producción de compuestos como α -amino o hidroxil ácidos.

Así, por su aplicación en las más diversas áreas, las enzimas (solubles o inmovilizadas) son sustancias con una gran importancia económica. En 1988, el mercado mundial estimado de las enzimas era de 550 millones de dólares, en donde el 5% (20 a 25 millones) corresponde a biocatalizadores o enzimas inmovilizadas (Polastro, 1989.). En la tabla 1, se muestra la distribución de ventas de enzimas solubles a nivel mundial para 1990 y en la tabla 2 el mercado para las enzimas inmovilizadas.

**Tabla 1 DISTRIBUCION DE VENTAS DE ENZIMAS SOLUBLES
EN EL MUNDO (1990)
(Quintero, 1990)**

Enzima	Distribución (%)
Proteasa alcalina(detergentes)	26
Proteasa alcalina	6
Proteasa neutra	12
Proteasa ácida	13
Alfa amilasa	6
Glucoamilasa	13
Lactasa	4
Industria farmaceutica	10
Otros	8

**Tabla 2. MERCADO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS
(Quintero 1990)**

Enzima	Aplicación	Mercado (toneladas)
Glucosa isomerasa	Edulcorantes	20
Penicilino amidasa	6-APA	6
Glucosa oxidasa	Bebidas y diagnóstico	bajo
Lactasa	Leche y suero	1
Lipasas	Alimentos, fragancias grasas	bajo
Aminoacilasas	diversos	bajo

*bajo = menor a una tonelada

La industria alimentaria es quizá la que mayor tradición ha tenido en el uso de enzimas. Las proteasas se utilizan en el ablandamiento de masa, en la manufactura de pan y en la clarificación de cerveza.

Como se puede observar en ambas tablas, una de las enzimas de más interés en la industria alimentaria es la lactasa. La lactasa (β -galactosidasa, E. C. 3,2,1,23) hidroliza a la lactosa en sus monosacáridos glucosa y galactosa. Esta enzima se utiliza desde hace algunos años en la preparación de productos deslactosados a base de leche o suero (Vassilis y López Leyva 1985). Los productos con lactosa hidrolizada presentan ventajas nutricionales, ya que favorecen el consumo de lácteos por personas con intolerancia al disacárido (Nijpels 1981). Por otro lado, la hidrólisis de lactosa ofrece ventajas tecnológicas debido a que la glucosa y galactosa son más dulces y solubles que la lactosa, aunado a que ambos azúcares son más fácilmente fermentados. (Brotsky y Grootwassink 1986).

Al hidrolizar la lactosa se evitan problemas de cristalización en helados, leches condensadas y otros productos elaborados con leche y suero dulce de leche. Asimismo, dado el mayor poder edulcorante que presentan la glucosa y la galactosa con respecto a la lactosa, se puede disminuir la cantidad de sacarosa a utilizar en productos lácteos que se emplean cuando la leche ha sido deslactosada. Es importante señalar que este aumento del poder edulcorante no va asociado a un aumento del poder calorífico del producto, lo cual es importante para productos como el yogurt natural, debido a que son consumidos frecuentemente por personas con problemas de sobrepeso. El pretratamiento de la leche con la enzima conduce a una acidificación más rápida y segura, reduciéndose el tiempo de coagulación. En el caso del queso de cuajada, ésta es más firme pudiéndose aumentar el rendimiento hasta en un 10% aproximadamente.

Características bioquímicas de la β -galactosidasa

La lactasa o β -galactosidasa es una enzima producida por una gran variedad de seres vivos: bacterias, hongos, levaduras, animales y plantas. En alimentos, solo se utilizan las lactasas de hongos como *Aspergillus niger*, *A. orizae* y las de levadura como *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis* y *Candida pseudotropicalis* debido a que estos microorganismos tienen la categoría de GRAS (Generally Recognized as Safe) de la FDA (Food and Drug Administration de los E.U.A.) (tabla 3).

Tabla 3 FUENTES DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA
(Vassilis y López-Leyva 1985).

Organismos Superiores		
Plantas	Animales	
Durazno	Intestino	
Almendra	Tejido cerebral	
Albaricoque		
Microorganismos		
Bacterias	Levaduras	Hongos
<i>E. coli</i>	<i>K. lactis</i>	<i>N. crasa</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>K. fragilis</i>	<i>A. niger</i>
<i>S. lactis</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>A. orizae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>W. roberstsi</i>	<i>M. pucillus</i>
<i>L. sporogenes</i>		

* Microorganismos utilizados para la preparación comercial de la enzima

Debido a que el pH óptimo de actividad de la enzima de levadura oscila entre 6.6 y 7.3 (tabla 4) ésta ha sido la utilizada en la hidrólisis de la lactosa en leche.

Tabla 4 PROPIEDADES DE LA ENZIMA B-GALACTOSIDASA DE DIVERSOS MICROORGANISMOS (Canales 1985).

Fuente de la enzima	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Peso molecular (KD)
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	55-60	124
<i>Aspergillus orizae</i>	5	50-55	90
<i>Kluyveromyces lactis</i>	7-7.3	37	135
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6.6	37	201
<i>Candida pseudotropicalis</i>	7.5	30	215
<i>Escherichia coli</i>	7.2	40	465
<i>Bacillus sp.</i>	6.8	65	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7	42-45	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6-7	55	500-600

La lactasa además de hidrolizar a la lactosa en sus monosacáridos, cataliza la producción de pequeñas cantidades de disacárido y trisacáridos como un resultado de reacciones de transgalactosidación, particularmente en concentraciones altas de sustrato sin embargo estos subproductos son eventualmente hidrolizados.

La hidrólisis de la lactosa involucra la transferencia de un residuo galactosa a un aceptor (agua, otro azúcar o alcohol). Se postula que los grupos activos durante la hidrólisis corresponden a un grupo imidazol de la histidina y a un grupo sulfihidril de la cisteína (Wallenfels y Molhotra 1960).

Los estudios de purificación y caracterización de la β -galactosidasa de *K. fragilis* realizados por Mahoney y Whitaker (1978) muestran que el peso molecular determinado por ultracentrifugación y filtración en gel fué de 201 000 d. Esta enzima es considerablemente más grande que

la β -galactosidasa de *K. lactis* (Dickson y Markin 1979) y de la lactasa de *A. orizae* y *A. niger* (Vassilis y López-Leyva 1985) y más pequeña que la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (Zabin y Fowler 1978) (Tabla 4).

El examen de la proteína por microscopía electrónica, sugiere que está constituida por 9 o 10 subunidades en un arreglo de tipo pentagonal el cual confiere un número mayor de contactos por subunidad haciéndola muy estable. La reacción con paracloromercuribenzoato (PCMB), indica que la enzima puede poseer 5 sitios activos por molécula, lo cual debería ser compatible con un modelo de 10 subunidades. Por otro lado, el análisis electroforético sugiere que la molécula presenta dos subunidades grandes diferentes de 90,000 y 120,000 daltones. El punto isoeléctrico de la mayor isoenzima es de 5.1, comparado con el de 4.61 reportado para la enzima de *E. coli* (Craven y col. 1965). El coeficiente de extinción molar de la β -galactosidasa de *K. fragilis* determinado a 280 nm es de 1.58 cm^2 por mg de proteína y la relación de A_{280}/A_{260} es 1.60.

La lactasa de *K. fragilis* carece de carbohidratos y presenta el 30% de aminoácidos hidrofóbicos en su composición (Mahoney y Whitaker 1978). Al igual que muchas enzimas, la actividad de la β -galactosidasa se ve influenciada por la presencia de iones en solución (tabla 5). Uwajima et al (1972) reportan que los iones de potasio en concentraciones de 0.1 M incrementan la actividad lactasa de *K. fragilis*. Por otro lado, el magnesio y el manganeso en concentraciones 0.001 M y 0.0001 M respectivamente, incrementan la velocidad de hidrólisis de lactosa en amortiguador de fosfato de potasio a pH 7. Sin embargo, los iones potasio no pueden ser reemplazados por sodio, magnesio o manganeso. Los metales pesados como el zinc (5×10^{-3} M), y el cobre (5×10^{-3} M), ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Mahoney y Whitaker 1977).

Además la adición de iones manganeso confiere a la lactasa de levadura una mayor estabilidad a las condiciones extremas de temperatura 45-60°C (Wendorff y Amudson 1971).

Tabla 5 EFECTO DE DIVERSOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces fragilis* (Wendorff y Amudson 1971; Mahoney y Whitaker 1977)

CONCENTRACION DEL ION (M)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
Sin adición de iones	100
K^{2+} 1×10^{-1}	120
Mn^{2+} 1×10^{-7}	103
1×10^{-6}	176
1×10^{-5}	287
1×10^{-4} - 1×10^{-2}	300
Mg^{2+} 1×10^{-4} - 1×10^{-2}	150
Zn^{2+} 1×10^{-3}	0
Ca^{2+} 1×10^{-1}	30
Na^{+} 1×10^{-3}	42
Ag^{+} 1×10^{-6}	0
Hg^{2+} 1×10^{-6}	0

Actividad relativa a la medida utilizando amortiguador de fosfatos de potasio 0.05M pH 7.

Las constantes cinéticas calculadas por el método de Lineweaver-Burk (tabla 6), se encuentran en un rango de 2.5 a 3.0 mM para K_m y de 0.66 a 3 μ moles de producto liberado por minuto para V_{max} cuando se utiliza ONPG como sustrato. Cuando se hidroliza lactosa los valores reportados para K_m son de 14-24 mM y de V_{max} de 1.0 a 10 μ moles de glucosa producida por minuto (Wendorff y Amudson 1971; Uwajima y col. 1972; Mahoney y Whitaker 1977).

Tanto la galactosa como la glucosa producidas por hidrólisis de lactosa inhiben la actividad de la β -galactosidasa. La galactosa se comporta como un inhibidor competitivo mientras que la glucosa como un inhibidor no competitivo. (Wendorff y Amudson 1971).

La constante de inhibición (K_i) reportada para galactosa es de 27.7 mM; 10 veces mayor que el valor de K_m medido con ONPG y casi dos veces más alto que la K_m calculada para lactosa como sustrato; con respecto a la inhibición con glucosa se ha encontrado que no es muy considerable ya que para la lactasa de *K. lactis* ésta es de 340 mM y para la lactasa de *fragilis* no se encuentra inhibición (Mahoney y Whitaker, 1977). Además de los productos de hidrólisis los

tiogalactosidos inhiben competitivamente la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (Mahoney y Whitaker 1977).

Tabla 6 CONSTANTES CINÉTICAS PARA LACTASAS DE LEVADURA

FUENTE DE LA ENZIMA	Km (mM)	V _{max} μ moles prod min x mg prot.	Ki (mM)
<i>K. lactis</i> ^a			
ONPG	1.6	143	46
Lactosa	12-17		(Galactosa) 340 (Glucosa)
<i>K. fragilis</i> ^b			
ONPG	2.72	960	27.7
Lactosa	13.90		(Galactosa)
<i>K. bulgaricus</i> ^c			
ONPG	30-59		
<i>C. pseudotropicalis</i> ^c			
ONPG	3.06	63	

a) Dickson y Markin (1979)

b) Mahoney y Whitaker (1977)

c) Takatoshi et al (1982)

Impacto de la β -galactosidasa de levadura en México.

En México, la lactasa es una enzima cara, con un costo de 90 dólares el kg (5×10^6 unidades) y de importación, lo cual ha sido uno de los obstáculos para su aplicación a gran escala. En la tabla 7 se muestran las lactasas libres e inmovilizadas, disponibles a nivel mundial. Como se puede observar la enzima de levadura solo se encuentra disponible en forma libre y en el país se ha llegado a aplicar en la hidrólisis de la lactosa en leche ya que por su costo, su aplicación en suero dulce de leche no es rentable. Por otro lado, la enzima inmovilizada disponible es de origen fúngico y su aplicación principal es la hidrólisis de la lactosa en suero ácido permeado.

En el país, la producción de leche deslactosada resulta de gran importancia, ya que además de las ventajas técnicas obtenidas en la manufactura de los productos lácteos existe un alto porcentaje de

población intolerante a la lactosa; Los estudios de intolerancia al azúcar se han realizado tanto en zonas rurales como urbanas y muestran que un 75% de la población rural (Lisker, 1975-1980) y un 50% de la población urbana (Rosado, 1989) son intolerantes a la lactosa de la leche. Los estudios mencionados se realizaron en pacientes adultos y de edad avanzada, poco se conoce sobre la deficiencia de lactasa en niños mexicanos, especialmente desde el período de destete a la edad preescolar, este período corresponde a la edad en que el individuo es más vulnerable a enfermedades infecciosas o deficiencias dietéticas causas importantes en la intolerancia secundaria de la lactosa, sin embargo un indicador indirecto de esta situación son los casos de diarrea reportados por la Secretaría de Salud. Como dato tenemos que esta Secretaría reportó que en 1981 hubo en México 9,500,000 casos de diarrea cuya intensidad y gravedad requirieron de atención médica, el grupo más afectado son los niños entre 0 y 4 años en quienes en promedio ocurre de 0.8 a 1.8 episodios de diarrea por año.

En resumen en el país se cuentan niños en edad escolar, preescolares, niños nacidos prematuramente, mujeres embarazadas y ancianos intolerantes a la lactosa, para los cuales la leche es un alimento de primera necesidad.

Por otro lado, es importante la utilización de la considerable cantidad de suero que se produce y desperdicia en el país. El suero es un subproducto de la industria láctea, es la porción acuosa de la leche y usualmente se obtiene coagulando la leche por medio de cuajo o renina, por acidificación o por calentamiento. El suero de queso es rico nutricionalmente, contiene en % P/V : 3.3-6 de lactosa, 0.32-0.7 de proteína, 0.15-1 de grasa y trazas de sales. La proteína consiste de β -lactoglobulina (50%), α -lactoalbumina (25%) y otras proteínas (25%) incluyendo inmunoglobulinas. Por esta razón en México, al igual que el resto de los países del mundo, en donde se obtiene suero, la producción representa un problema de contaminación, debido a la alta demanda bioquímica de oxígeno (39000-48000 ppm) al ser vertido al drenaje.

Tabla 7 ALGUNAS LACTASAS DISPONIBLES EN EL MUNDO
(Vassilis y López Leiva, 1985)

Compañía distribuidora	Tipo de Enzima	Sustrato en el que se aplica
Novo A/S	<i>K. fragilis</i> (soluble)	Suero en general
Gist Brocades	<i>K. lactis</i> (soluble)	Leche y suero
Miles Laboratories	<i>A. niger</i> (soluble)	Suero y leche
Pfizer	<i>A. oryzae</i> (soluble)	Suero y leche
Lactaid Inc.	<i>K. lactis</i> (soluble)	Leche y suero en pacientes
Valio Laboratory	<i>K. lactis</i> (soluble)	Leche y suero
	<i>A. oryzae</i> (inmovilizada)	Suero permeado
Sumitomo	<i>A. oryzae</i> (inmovilizada)	Suero permeado
*Rohm GhÖm	<i>K. fragilis</i> (libre)	Suero y leche
	<i>A. oryzae</i> (inmovilizada)	Suero permeado y leche
British Mc. Donaldsa	<i>A. oryzae</i> (inmovilizada)	Suero permeado

* Información otorgada por la propia compañía.

Este problema es creciente ya que la producción de queso en el mundo se incrementa año con año, en 1983 la Federación Internacional de Lacteos reportó que en 1981 se produjeron alrededor de 10 millones de toneladas de queso y por consiguiente 90 millones de toneladas de suero, estimando que esta producción se duplicaría en diez años (Marwaha, S.S y Kennedy J. F. 1988).

En algunos países, especialmente los integrantes de la Comunidad Económica Europea han abordado el problema de la contaminación por suero de leche, enfocándose a cuatro aspectos: producción, recolección, legislación y criterios de calidad (D, Allum, 1980). En la legislación se han considerado tanto medidas de producción y almacenamiento del suero para no ser vertido al drenaje, así como de calidad para incrementar su incorporación a alimentos de consumo humano y poder ser sustituido como sólidos de leche.

En estos países el suero se fracciona en sus diferentes componentes para ser utilizado en las industrias farmacéutica y de alimentos, enriqueciendo alimentos para bebés con las proteínas recuperadas, como saborizante lácteo, sustituto de sólidos de leche en alimento para becerros y como jarabe edulcorante al ser hidrolizada la lactosa, etc.

En la Comunidad, como en los Estados Unidos de Norte América, la recolección del suero se encuentra integrada a los procesos de obtención de leche y producción del queso. En Europa el suero obtenido se llega a utilizar como fertilizante por su alto contenido de nitrógeno (S.S Marwaha y J.F.Kennedy, 1988).

Sin embargo, debido a que estos países generalmente son altos productores de leche y carne, así como exigentes consumidores de queso, y a que los procesos para el aprovechamiento del suero son costosos, la mayor parte del suero es secado y vendido en forma muy económica, ya que además el costo de este tratamiento es indexado al precio del queso. Los compradores de este suero, son generalmente países importadores de leche y carne, ubicados en el denominado tercer mundo.

En México, en donde los requisitos protéicos de la mayor parte de población no han sido cubiertos, se vierten alrededor de un millón de toneladas de suero dulce al drenaje, por año (Varela, 1987). Verter un millón de toneladas de suero, significa el desperdicio de 48 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína de excelente calidad, lo que representa el requerimiento protéico de 156,000 adultos y el requerimiento calórico de 190,000 durante un año, además del deterioro ecológico, al contaminar orgánicamente los mantos acuíferos.

En el país la industrialización del suero presenta problemas técnicos, económicos y sociales. La recolección y disposición del suero no se encuentra legislada, por lo que a los productores de queso les resulta cómodo vertirlo al drenaje. El precio de venta del queso es controlado, por lo que no es posible indexar a éste el costo de procesamiento del suero. Adicionalmente, el procesamiento del suero es ineficiente y por lo tanto costoso, ya que las lecherías y queserías no siempre se encuentran integradas y presentan un bajo nivel de automatización.

El proceso de obtención del suero que se comercializa es el siguiente: El suero que se obtiene de la cuajada se clarifica, posteriormente es descremado, se pasteuriza y evapora hasta un 50% de sólidos; el suero concentrado se seca en rodillos (roller) o en secadores (spray) automáticos. Actualmente el 10% del suero que se produce en México es del tipo spray, este se usa en dulces, en la elaboración de sabor a queso, a chocolate, en helados y en la formulación de alimento para aves, becerros y puercos, en estos últimos también se utiliza el suero tipo roller.

Así, aproximadamente solo el 33% del suero que se produce es industrializado, y la demanda estimada, para 1986 fué de 36.6 millones de litros (Varela, J. 1987); parte de esta demanda es satisfecha con el suero que se importa de la Unión Americana, debido a que éste muchas veces es más barato que el suero que se produce en México. En el período de 1987-89 el precio del suero mexicano pudo competir con el precio del suero norteamericano, sin embargo esta situación es cada vez más difícil de mantener, debido a la tendencia en la apertura comercial entre los dos países.

Para que el suero seco (suero spray) mexicano compita con el suero que se importa, se necesita que éste ofrezca al menos ventajas técnicas, que le permitan usos diferentes a la fecha ensayados, además de un aumento en el rendimiento en la obtención de los productos a los que se incorpora.

Para lograr este propósito, se sugiere la obtención de un producto a base de suero completo con la lactosa hirolizada, las ventajas que este producto tendría sobre el denominado suero spray, que es el que principalmente se comercializa para consumo humano serían:

La disminución del toque salino con respecto al suero sin hidrolizar, debido al enmascaramiento de éste por el poder edulcorante que presentan la glucosa y la galactosa, esta característica permitiría que el suero se integrara a los productos en que se utiliza en una mayor proporción. Para lograr este efecto es importante que el suero dulce se hidrolice a pH de 6.6.

Al disminuir el contenido de la lactosa, se eliminan los problemas de cristalización en las operaciones unitarias utilizadas en el tratamiento del suero para su industrialización, tales como la evaporación y secado, por lo que los rendimientos en la obtención de los productos en los que se incorpora es mayor, su vida de anaquel se incrementa y su textura es mejor que la de los productos producidos con el suero sin hidrolizar.

Los productos a base de suero hidrolizado pueden ser promocionados como aptos para personas intolerantes y con sobrepeso además de un alto contenido nutricional.

Por último para que este producto sea económicamente competitivo es importante que el costo de hidrólisis no resulte alto, lo que hace necesario trabajar con una enzima inmovilizada, que permita su reutilización.

Con el objeto de tener una idea de las características que debería de tener un biocatalizador para que la obtención del jarabe (suero hidrolizado y evaporado al 70% de sólidos) fuera rentable, se realizó una estimación de la actividad y estabilidad que necesitaría presentar un biocatalizador para que el costo de obtención del jarabe fuese menor o similar al costo de obtención del suero seco (Primer Informe Técnico de Avance, Proyecto Hidrólisis de Suero de Leche para la Obtención de Jarabes Dulces, U.N.A.M., Kem Fuds, CONACYT, 1988). En el estudio se consideró que el costo del biocatalizador era de 500 dls el Kg con una actividad de 180 U/gr (unidades obtenidas utilizando lactosa como sustrato) 1 kg de biocatalizador hidrolizan 50 lts de suero por hora. Se tomaron estos valores ya que son las características que presenta el biocatalizador de Rhóm disponibles en

el país (manufacturado a base de enzima de hongo y su pH óptimo de actividad es de 5), idóneo para la hidrólisis de suero ácido permeado).

Las estimaciones mostraron que un biocatalizador con estas características debería de retener el 100% de su actividad inicial durante 2.3 meses; considerando un proceso continuo con periodos de saneamiento de 30 minutos cada 20 hrs.

El poder contar en México con una enzima lactasa que hidrolice a la lactosa de la leche y suero dulce, redundaría en beneficios económicos, nutricios y ambientales.

Como se mostró en la tabla 7, para la hidrólisis de la lactosa de la leche, es posible disponer de las lactasas solubles producidas por RhOm, Gist Brocades y Novo, sin embargo para la hidrólisis del azúcar en suero dulce completo no hay disponibilidad de una enzima inmovilizada de levadura en el mercado. Una de las razones por la que no se encuentra un biocatalizador con la enzima inmovilizada es la baja estabilidad de ésta y la dificultad para inmovilizarla por enlace covalente.

En la tabla 8 se describen algunos de los resultados reportados en la literatura. Estos aparecen en una revisión publicada por Vassilis y López-Leyva en 1985, y es importante señalar que en el trabajo se revisan 45 estudios de los cuales solo 9 corresponden a la inmovilización de la lactasa de levaduras, 4 a la de *E. coli* y los 30 restantes a la lactasa de hongos. En la tabla también se observa que la mejor actividad se obtiene cuando se inmovilizan células en colágena, aunque con una baja conversión en suero. Cuando la enzima se atrapa en fibras de acetato de celulosa, también se obtiene una alta actividad específica, los autores reportan que tratan 1, 788 kg de lactosa por kg de fibras, y que los mayores problemas se presentan cuando las fibras se aplican en el tratamiento de suero.

En México en el Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, se ha inmovilizado la lactasa de *K. lactis* en partículas de nylon, el biocatalizador presenta una actividad específica de 400 u/g utilizando lactosa como sustrato, también ha sido probado en leche y debido a las altas caídas de presión que se observa en las columnas por el tamaño de partícula tan pequeña, se propone su aplicación en reactores de canasta (comunicación personal Dr. Ignacio Magaña).

Tabla 8. Biocatalizadores con Lactasa de Levadura Inmovilizada.
(Vassilis y López-Leyva 1985).

Fuente	Método de Inmovilización	Sustrato	Actividad
<i>K. lactis</i> (enzima)	Adsorción, formación de uniones hidrofóbicas	ONPG permeado de suero	70 U/g 67% de eficiencia en la unión
<i>K. fragilis</i> (enzima)	Unión covalente por el método de diazotización	ONPG	3 U/g
<i>K. fragilis</i> (enzima)	Unión covalente por el método de diazotización	leche	no viable
<i>K. fragilis</i> <i>K. lactis</i> (enzima)	Unión covalente a través de grupos oxiranos activos	ONPG	11-23% la eficiencia de unión. Resultados pobres.
<i>K. fragilis</i> (enzima)	Unión covalente con glutaraldehído	ONPG	25.5 U/g
<i>K. lactis</i> (enzima Gist Brocades)	Atrapamiento en fibras	Leche esteril a 25°C.	22 U/g 71-81% de conversión en 20 hrs.
<i>K. fragilis</i> (células)	Atrapamiento en colágena	Lactosa Suero	1680 U/g 54% conversión
<i>K. lactis</i> 7(Gist Brocades)	Enzima adsorbida en membranas	Lactosa leche descremada suero permeado.	80% de conversión. Una vida de 9 lotes.
<i>K. lactis</i> (enzima)	Atrapamiento en fibras de triacetato de celulosa	Lactosa	200 U/g

U = μ moles de producto liberado por minuto (glucosa, ONP dependiendo del sustrato, suero, lactosa uONPG que se haya utilizado en su evaluación).

El grupo de científicos de la empresa Corning Glass intentó desarrollar un biocatalizador inmovilizando la enzima de levadura sin éxito, (comunicación personal Dr. Agustín López Munguía). En la empresa Gist Brocades se intentó inmovilizar la lactasa purificada de *K. lactis* en polivinil alcohol y fibras huecas de amicón (Vassilis y López-Leiva, 1985), y sus experiencias no pasaron de nivel laboratorio. La única experiencia que ha sido probada a nivel de producción es la reportada por la empresa italiana Snamprogetti (Marconi, y colaboradores 1979). En este desarrollo, la enzima es atrapada en fibras de triacetato de celulosa y se aplica en la hidrólisis de la lactosa en leche por la empresa "Central del Latte" en una planta cuya capacidad de operación es de 10 toneladas diarias.

Debido a la baja estabilidad de la enzima, los trabajos más recientes con respecto a la inmovilización de la lactasa de levaduras, se han realizado utilizando células completas.

Declaire y colaboradores (1986), inmovilizan células completas de *Kluyveromyces bulgaricus* en alginato de calcio y clara de huevo. El mejor catalizador se obtiene cuando las células se inmovilizan en albúmina de huevo. Este biocatalizador se aplica a bajas temperaturas (4°C y 20 °C) en suero dulce permeado y su actividad disminuye un 20% después de 17 días de operación. Otro trabajo importante es el desarrollado por Champluvier y colaboradores, 1988. Este trabajo consiste en la adsorción de un complejo de células permeabilizadas con una mezcla de etanol-cloroformo entrecruzadas con glutaraldehído en soportes tales como: vidrio, policarbonato y poliestireno activados con quitosan. Los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza vidrio como soporte, el biocatalizador así obtenido se aplica en lactosa al 5% en solución amortiguadora. Es importante acotar que en estos trabajos, los biocatalizadores no han sido probados en la hidrólisis de la lactosa en suero completo, lo que puede ser un indicativo de la complejidad para obtener un biocatalizador a base de enzima de levadura que se aplique en suero.

IV. Objetivo

El objetivo del presente trabajo es el de obtener un biocatalizador que pueda ser aplicado en la hidrólisis de la lactosa de suero dulce completo y leche a una escala de producción de suero hidrolizado de 40,000 lts diarios.

Para cumplir con dicho objetivo se plantea la obtención del biocatalizador a través de la inmovilización de células de levadura con actividad de lactasa; y a través de procedimientos que puedan ser implantados a escala de producción.

Objetivos Parciales.

Debido a que no hay disponibilidad en el mercado de células de levadura con actividad de β -galactosidasa, que puedan ser inmovilizadas, los objetivos parciales que se proponen para el cumplimiento del objetivo general son:

- El estudio de las condiciones de producción de la enzima β -galactosidasa en células de levadura cultivadas en suero dulce completo y su escalamiento en fermentadores de 100 lts.
- Obtención de células de levadura permeabilizadas con actividad de β -galactosidasa. El término de permeabilización se define como " El procedimiento para obtener la expresión de la enzima en el interior de la célula ".
- Obtención de un biocatalizador con una actividad enzimática de 200 U/g (utilizando lactosa como sustrato) y que mantenga su actividad inicial al menos durante un periodo de 150 hrs en suero dulce completo de leche, con un costo no mayor a 70 dls/kg.

Si el biocatalizador cumple con estas características de actividad y estabilidad, éste es un candidato adecuado para su aplicación en leche, sustrato tan complejo como el suero.

V. Producción de la β -galactosidasa en células de *K fragilis*.

Antecedentes y presentación de los trabajos.

Los estudios de producción de la β -galactosidasa o lactasa en células de *Kluyveromyces*, abarcan desde aspectos moleculares en la regulación de su expresión, así como aspectos bioquímicos y fisicoquímicos; a la fecha los resultados obtenidos en ambos sentidos, no son concluyentes.

Con respecto a la regulación de la expresión de la lactasa, los estudios más profundos han sido los realizados por el grupo encabezado por Dickson, (1989), quien establece que la lactasa producida en levaduras, es inducible, su regulación pertenece al regulón de carbono para la asimilación de la lactosa y galactosa por la levadura y son estos azúcares los que se reconocen como inductores del sistema. También se ha establecido una posible regulación por catabolito ya que la presencia de glucosa en el medio de cultivo disminuye la producción de la enzima. Por otro lado Ozilgen, 1988., postula una regulación autógena y además sugiere que, la actividad específica de la enzima está determinada por la cantidad y calidad del sustrato en el medio de cultivo.

En lo que se refiere a la composición del medio de cultivo, los resultados también son controvertidos ya que algunos autores como Bales L. y F. Castillo (1979), informan que la máxima producción de la enzima (U/l) se obtiene cuando la levadura es crecida en soluciones de suero desproteínizado con 2% de lactosa, suplementado con extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mientras que R. Mahoney y Whitaker (1975), reportan que ésta se obtiene creciendo la levadura en suero desproteínizado pero con 15% de lactosa además de no ser necesarios factores de crecimiento.

En el CEINGEBI.U.N.A.M., en estudios realizados por J. Torres, 1985; en un medio químicamente definido, no se encontró una relación entre la concentración de lactosa en el medio de cultivo y la producción de la enzima (U/l). Se observó que la diferencia entre un medio en donde se produce enzima y otro en donde no se produce, es el perfil de

oxígeno disuelto a través del proceso, en el primer caso la lectura de por ciento de oxígeno disuelto es de 0 a partir de la tercera hora del proceso mientras que en el segundo, éstas fueron del 10% de oxígeno durante la fase de crecimiento. Estas observaciones concuerdan con las realizadas por Mahoney (1975), quién asocia la producción de la enzima con la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), encontrando que para la producción de la enzima esta debe de ser baja, de al menos de 0.2mmol de oxígeno/litro minuto.

En la literatura se encuentran reportados un conjunto de genes denominados regulones aeróbios y anaeróbios. Los estudios han sido realizados en bacterias facultativas como *E. coli*. (Smith y Neidhardt, 1983) y en *Salmonella typhimurum* (Aliabadi y colaboradores, 1986, 1988) mostrando que hay un número de proteínas celulares bajo regulación por oxígeno molecular. En los trabajos se utilizó la metodología de fusión del fago Mud (Aplac), en donde a través de la expresión de la actividad de β galactosidasa se han logrado identificar locus que se prenden y se apagan en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Existen estudios que explican algunos de los mecanismos de control de expresión de locus regulados por oxígeno, tal es el caso del descubrimiento de Buck y Ames, 1984. Los autores encuentran que en bacterias crecidas aeróbicamente, el ácido ribonucleico de transferencia (TRNA) contienen un nucleósido hidroxilado, mientras que en bacterias crecidas anaeróbicamente no. En sus estudios demuestran, que el estado hidroxilado se debe a la presencia de oxígeno y no a la falta de las enzimas responsables de la hidroxilación.

Se postula que la forma hidroxilada puede influir en la transcripción del TRNA alterando la expresión de genes a través de una atenuación.

Otro mecanismo es el estudiado por Yamamoto y Droffner (1985) y se relaciona con el enrollamiento versus relajación del DNA de *Salmonella typhimurium*. Los resultados concluyen que la actividad de topoisomerasa I, asociada con la relajación del DNA es necesaria para la expresión de genes requeridos para el crecimiento aeróbico, mientras que la actividad de girasa asociada con el DNA enrollado es necesaria para la expresión de genes requeridos para el crecimiento anaeróbico.

Estos resultados, nos muestran que la regulación por oxígeno puede llevarse a cabo por mecanismos que no están relacionados con la presencia de proteínas difusibles. Los resultados mencionados son algunos de los que explican el comportamiento de locus regulados por oxígeno, ya que a la fecha no existe un fenotipo relacionado con la presencia de O_2 .

Los microorganismos aeróbicos contienen grandes cantidades de enzimas el ciclo de Krebs para la respiración aeróbica y bajas cantidades para la glicólisis. En contraste organismos anaeróbicos contienen grandes cantidades de enzimas glicolíticas para la obtención de la energía anaeróbica.

Las levaduras son organismos facultativos y presentan las enzimas tanto para el metabolismo fermentativo como para el oxidativo. El metabolismo fermentativo representado por la producción de etanol y el oxidativo por la producción de ácidos orgánicos y biomasa.

Algunas especies de levadura (*Sacharomyces sp*) pueden presentar ambas actividades (fermentativa u oxidativa) al mismo tiempo, así cuando la levadura se crece en un exceso de sustrato en condiciones aeróbicas, es capaz de producir etanol, a este fenómeno se le denomina efecto Crabtree (De Deken 1966).

Petrik y colaboradores, 1983., demostraron en *Sacharomyces uvarum*, que la respuesta primaria a la inhibición del crecimiento es la formación de etanol, y que esta formación de etanol no es una consecuencia de la represión en la actividad respiratoria, sino el resultado de la regulación de las actividades de la piruvato deshidrogenasa y descarboxilasa.

Ugalde y colaboradores (1989), mostraron que el efecto Crabtree está presente en células de *Kluyveromyces marxianus (fragilis)*.

En este contexto el operón de *lac* en las células de *Kluyveromyces fragilis* es especialmente importante, ya que éste es responsable del transporte de la lactosa, su hidrólisis y utilización de la galactosa en un microorganismo facultativo, en donde las vías fermentativas y oxidativas pueden ser prendidas simultáneamente. Así, la dilucidación del papel del oxígeno en la expresión de la β -galactosidasa en células de levadura cobra mayor relevancia.

Obtener una alta concentración de un metabolito de interés (U/l o g/l), es el objetivo principal en cualquier proceso de fermentación.

Para lograr esto es necesario un compromiso entre una alta producción específica y producción de biomasa. En el caso de la producción de enzimas intracelulares reguladas, la actividad específica (U/g) estará determinada por los eventos moleculares que permitan su expresión, mientras que la cantidad de biomasa por fenómenos físicos como es el transporte de los nutrientes de las fases gaseosas o líquidas a la célula.

Así la dilucidación del papel del oxígeno permitiría la optimización del proceso de producción de la enzima, planteando estrategias con el objeto de obtener una gran cantidad de biomasa con una actividad enzimática específica alta, además del control adecuado para su escalamiento.

La posible relación entre la disponibilidad O_2 y la producción de la β -galactosidasa en células de *K fragilis* puede darse a través de los siguientes mecanismos:

1. Que haya una regulación genética por oxígeno sobre la expresión de la β galactosidasa.
2. Que exista una retroregulación de los productos de los estados metabólicos de las células (fermentativo, oxidativo) que asocie a la producción de la enzima con la velocidad de transferencia de oxígeno y bajos rendimientos de biomasa.
3. Que el oxígeno afecte la concentración intracelular de los azúcares, lactosa glucosa y galactosa, efectores en la regulación de la expresión de la enzima, a través del aumento o disminución en su velocidad de consumo durante el proceso. Así, la concentración intracelular de los efectores determinará el estado de inducción o represión de la célula, en lo que concierne a la regulación de la producción de la enzima.

Presentación de los estudios realizados, para dilucidar el papel del oxígeno en la expresión de la enzima.

Para responder dicha pregunta se consideró la tercera hipótesis, ya que el operón de lac regula la expresión de las enzimas de una ruta catabólica, en donde los efectores del sistema de regulación también son la fuente de carbono y energía. Así, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, su velocidad de consumo varía, por la eficiencia con que éstos son utilizados debido al estado metabólico (oxidativo, fermentativo) de la célula, en donde siempre se presentará el compromiso entre funcionar como efectores del sistema de regulación y fuente de carbono y energía.

De esta manera, los estudios realizados consistieron :

• En el establecimiento de un parámetro que permitiera relacionar la actividad específica enzimática en la fermentación y la disponibilidad del oxígeno.

El parámetro que se eligió fué el coeficiente volumétrico de transferencia oxígeno (k_{la}). Este se tomó como un parámetro que nos indicaba la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que esta velocidad es difícil de medir, y cambia a lo largo de un proceso en lote. Otra razón por la que se eligió, fué que de encontrarse alguna relación, ésta podría ser utilizada como criterio de escalamiento. El coeficiente se midió en agua y se estableció una correlación empírica y se relacionó la actividad específica (U/g) de lactasa con el k_{la}, como se describe en el artículo titulado *Influence of oxygen transfer rate on β galactosidase production from Kluyveromyces marxianus* (anexo 2).

En el artículo, se observa que existe una relación inversa entre la actividad específica obtenida al final de la fermentación y el k_{la} establecido al inicio de cada uno de los procesos, sin embargo la producción de la enzima (U/l) es muy similar en todos, debido a que a menor actividad específica hay una mayor producción en biomasa. Esta observación nos lleva al cuestionamiento inicial: Como influye la disponibilidad del oxígeno en la producción de la enzima y esta

relación o influencia permite obtener una alta actividad enzimática específica en un cultivo con una alta velocidad de transferencia de oxígeno y un alto rendimiento de carbono en biomasa?

● **Relación entre la actividad enzimática específica y la velocidad específica de consumo de azúcares.**

Con el objeto de verificar la tercera hipótesis, en donde se plantea que el oxígeno en un cultivo en lote afecta la concentración intracelular de los azúcares, lactosa, glucosa y galactosa (efectores en la regulación de la expresión de la enzima) a través del aumento o disminución en su velocidad específica de consumo. Y que finalmente es ésta la que determina el incremento o decremento en la actividad específica durante el proceso. Se procedió a realizar procesos alimentados, con altas y bajas velocidades de transferencia de oxígeno, manteniendo constante la velocidad específica de consumo de lactosa.

Los estudios se encuentran descritos en el documento titulado: **Relación entre la velocidad específica de consumo de lactosa y la actividad específica de β -galactosidasa en células de *K fragilis*** (anexo 1). Los trabajos se realizaron en un medio a base de suero de leche como fuente de lactosa, ya que en este se obtiene una mayor actividad específica, que en el medio a base de lactosa, es más económico y disponible ya que la lactosa es una materia prima de importación todo esto resultando en un factor muy importante en el costo de obtención de la enzima (Varela J. 1987).

En estos trabajos se corrobora la relación entre la actividad específica de lactasa y k_{la} encontrada en el medio químicamente definido, y también se observa que en el transcurso de los procesos en lote en cualesquiera de las condiciones iniciales de agitación y aireación probadas, la actividad específica se incrementa cuando la velocidad específica de consumo de azúcar (q_s) es menor a 2 (g azúcar/g célula h). En base a estas observaciones es que se eligen las condiciones para llevar a cabo los estudios en un cultivo alimentado, manteniendo constante el q_s en valores de 1,2 y 3 (g azúcar/g célula h).

Los resultados nos indican que es posible lograr un incremento en la actividad enzimática específica durante el proceso con una alta velocidad de transferencia de oxígeno y un alto rendimiento en biomasa, siempre y cuando se mantengan velocidades específicas de consumo de azúcar alrededor de 1 (g azúcar/ g cell la h). A velocidades específicas de consumo de azúcares mayores a 2 (g azúcar/g células h) la actividad específica tiende a disminuir.

Con estos estudios indirectamente se demuestra que las hipótesis 1 y 2 propuestas:

1. Que haya una regulación genética por oxígeno sobre la expresión de la β -galactosidasa.
2. Que exista una retroregulación, de los productos de los estados metabólicos de las células (fermentativo, oxidativo) que asocie a la producción de la enzima con la velocidad de transferencia de oxígeno y bajos rendimientos en biomasa, no proceden.

Estos también explican la controversia entre los estudios de Mahoney, Castillo y Ozilgen. La actividad enzimática específica de la lactasa en células de levadura está relacionada con la velocidad específica de consumo de los azúcares. Esta velocidad de consumo varía con la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo que a su vez depende de varios factores, tales como: la composición del medio de cultivo, las condiciones de agitación y aireación y la cantidad de células.

● Escalamiento del proceso de producción de la β -galactosidasa en células de *K fragilis*.

Como se mencionó en el objetivo general, una de las metas establecidas en el trabajo es la de obtener un biocatalizador con actividad de lactasa a través de procedimientos factibles a escalas mayores. Así una vez establecida la relación entre el oxígeno y la producción de la enzima, se procedió a aplicar este conocimiento escalando el proceso de producción de la enzima a través de un proceso en lote utilizando suero de leche como fuente de carbono y energía y el k_{la} constante como criterio de escalamiento. El proceso se escaló de una escala de

14 litros a escalas de 130 y 500 litros en unidades de fermentación con diferentes geometrías y utilizando una correlación empírica desarrollada Ad hoc para el proceso. Los estudios de escalamiento cumplen un doble objetivo que es, por un lado obtener un criterio de escalamiento y dar los elementos suficientes para la implantación del proceso en escalas de producción, por lo que también se estudió si el cambio en la hidrodinámica afectaba la producción de la enzima

Se eligió el k_{la} como criterio de escalamiento ya que como se observa en los estudios es posible relacionar la actividad específica (U/g) y producción de la enzima (U/l) con éste, tanto en un medio químicamente definido como en un medio a base de suero. El cultivo en lote fué el proceso elegido para su escalamiento ya que en los estudios en el laboratorio cultivando la célula en suero se encuentra un punto a k_{la} de 136 hrs^{-1} en donde el compromiso entre la actividad específica (U/g) y la concentración de biomasa (g/l) es óptimo. Así la producción de la enzima (U/l) en estas condiciones es la mayor obtenida considerando los estudios realizados tanto en cultivo en lote como alimentado.

Conclusiones y aportaciones de los trabajos realizados con respecto a la producción de la β -galactosidasa en células de *K fragilis*.

A través de los estudios presentados en esta sección, se demuestra que ni el oxígeno ni los productos del estado metabólico de las células de *K fragilis* (oxidativo u fermentativo) están involucrados directamente en la regulación de la expresión de la enzima en estas células, ya que fué posible obtener una actividad específica alta, en condiciones con una alta transferencia de oxígeno en donde predomina el estado oxidativo, como en condiciones con una baja transferencia de oxígeno en donde predomina el estado fermentativo. Se demuestra que el incremento en la actividad específica se asocia a la velocidad específica de consumo de azúcar por la célula. Así, cuando esta es baja (alrededor de $1 \text{ g de lactosa/g cel h}$) la actividad específica tiende a incrementarse mientras que cuando ésta es alta la actividad tiende a disminuir, por lo que se sugiere que en un cultivo en lote la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo altera esta velocidad de consumo.

Esta velocidad de consumo refleja la disponibilidad intracelular de la lactosa, galactosa y glucosa, efectores en la regulación de la expresión de la enzima. La aclaración de este fenómeno no solo es importante por las implicaciones que puede tener el aplicar este conocimiento en la producción de esta enzima, sino que puede tomarse como modelo en la producción de otras enzimas, que como la lactasa se encuentran involucradas en vías catabólicas, en donde los efectores del sistema de regulación son fuentes de carbono y energía. Postular que la concentración intracelular de dichos efectores es importante en la regulación de una enzima no es un concepto novedoso. Sin embargo el puntualizar que su velocidad de consumo puede ser alterada por la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo y que esto debe de ser considerado antes que cualquier otro concepto de regulación, sobre todo en una escala de cultivo en donde es posible controlar condiciones de operación, si lo es.

A través de estos estudios se logró implementar un proceso para la producción de la lactasa en células de levadura. Esto significa un proceso, técnicamente viable, con materias primas grado industrial, con una producción de enzima adecuada y reproducible en escalas de laboratorio (14l) y piloto (130 y 500 l). En este punto es importante destacar que no solo se tiene un criterio de escalamiento adecuado, sino la herramienta adecuada para aplicarlo, como es la correlación desarrollada específicamente para el estudio en la producción de esta enzima y que predice el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y ha servido para poder establecer las condiciones de operación a diferentes escalas en tanques con diferentes geometrías. Durante los estudios se probaron otras correlaciones sin éxito.

Un aspecto más a resaltar en los trabajos de escalamiento del proceso es la estrategia seguida en lo que se refiere al hecho de que el valor de k_{la} que se mantiene constante a través del escalamiento no es el del proceso sino que es un valor de referencia con respecto a agua, este valor solo nos sirve para establecer las condiciones iniciales de operación, condiciones que determinan a lo largo del proceso las cinéticas de consumo de azúcar y biomasa que finalmente son las que afectan la concentración final de enzima (U/g), este

procedimiento es fácil de implementar y una vez más esta estrategia puede ser aplicada en el escalamiento de otros procesos. Por último los estudios con respecto a la influencia de la hidrodinámica en el proceso de producción, son un elemento más que permite implantar el proceso a escala industrial. Estos estudios muestran que el cambio en la hidrodinámica no es un factor determinante en la producción de la enzima.

Se han establecido otros procesos para la producción de la enzima en levaduras a escala industrial, sin embargo estos no son del conocimiento público y para los fines planteados, es indispensable contar con células de levadura con alta actividad de lactasa a través de un proceso con estas características.

VI. Diseño y obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa, que pueda ser aplicado en la hidrólisis de la lactosa en suero dulce de leche completo.

Antecedentes y presentación de los trabajos.

En el diseño de un biocatalizador, algunos de los factores que hay que considerar son: las propiedades bioquímicas de la enzima a inmovilizar, la naturaleza del sustrato y el sector en donde se va a aplicar dicho biocatalizador.

En base a estos parámetros es que se elige la enzima, el método de inmovilización, el soporte a utilizar y algunas otras recomendaciones específicas.

En la obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa en suero dulce de leche completo, uno de los factores más importantes a tomar en cuenta es la naturaleza del sustrato.

El suero, es un sustrato muy complejo que contiene, en p/v : 5% de lactosa, 0.32-0.7 de proteínas, 0.15-1% de grasa, y de 0.8% de minerales constituidos esencialmente por Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} con un pH de 6.6, y se utiliza en la elaboración de productos destinados al consumo humano como de mamíferos y aves.

Estas características hacen que su tratamiento con un biocatalizador, presente algunas particularidades a considerar:

1.- La interacción de los constituyentes del suero con el soporte y con la enzima misma; así tenemos que por un lado la concentración de iones puede afectar la actividad enzimática y las proteínas pueden ser adsorbidas por el soporte, compitiendo en espacio con la enzima inmovilizada y causando problemas de transferencia de masa.

2.- Debido a su contenido de azúcar y proteína existe un alto riesgo de contaminación, por lo que, para su tratamiento deberá considerarse el uso de preservadores y agentes sanitizantes, que pueden afectar la estabilidad del biocatalizador.

3.- La transformación del suero no debe de alterar considerablemente sus propiedades organolépticas y sanitarias; por lo que el uso de cualquier agente para eliminar cualesquiera de los efectos antes mencionados, deberá de ser muy cuidadosa.

Como se mencionó con anterioridad, la enzima que cumple tanto los requisitos bioquímicos como sanitarios para ser aplicada en la hidrólisis de la lactosa en suero dulce completo de leche, es la β -galactosidasa o lactasa de levaduras. Así debido a la dificultad que esta presenta para su inmovilización directa aunado a todos los problemas en el manejo del suero que afectan la estabilidad de la actividad enzimática, es que se recomienda el uso de células completas de levadura en la manufactura del biocatalizador.

Otras ventajas de la inmovilización de células sobre enzimas son: que se elimina el proceso de extracción y purificación de la enzima, muchas veces reduciéndose el costo de obtención del biocatalizador y las técnicas de inmovilización son sencillas.

Los métodos más usados en la inmovilización de células, son los de atrapamiento, agregados celulares y adsorción; sin embargo por las características que el suero presenta, no se recomienda el uso de éste último ni en general el uso de soportes cargados, como algunas resinas ya que la interacción de éste con las proteínas del suero podría provocar la desorción de células. Como ejemplo de esta situación, está el biocatalizador que obtiene British Mac Donalds. En su manufactura, se inmoviliza la lactasa de *A. orizae* por adsorción, resultando en un biocatalizador con una vida media de 3 meses cuando se aplica en suero permeado y de 7 días en suero completo (comunicación proporcionada por el fabricante).

Las principales desventajas en la inmovilización de células son: las actividades enzimáticas adicionales a la actividad requerida, los problemas de transferencia de masa y la baja actividad específica.

En el caso de la inmovilización de células en geles, el gel introduce una resistencia adicional a la transferencia de masa. Sin embargo, aún en los agregados celulares este problema existe, ya que diversos estudios han mostrado que las mismas células presentan un problema por el paso de sustratos y productos a través de la pared celular (en el caso de enzimas citoplasmáticas) y principalmente debido a que los mismos agregados celulares, disminuyen el tamaño de poro intraparticular (E. Brito, y colaboradores 1990).

La lactasa en levaduras no se encuentra en el espacio periplásmico, y para su expresión en el interior de las células, es necesario darles un tratamiento, con el objeto de permitir la difusión libre del sustrato y productos.

Este tratamiento debe de conservar solo la actividad de la lactasa, desactivando específicamente al complejo denominado zimasa que transforma a la glucosa y galactosa hasta etanol y CO₂. Otra característica que debe presentar este tratamiento es la de permitir solo la entrada y salida de sustrato y productos, más no la de la enzima para poder realmente inmovilizarla; por último éste debe de ser adecuado, para posteriormente aplicar las células en alimentos, como es el caso del suero dulce completo de leche.

En resumen, los dos aspectos más importantes en la obtención de un biocatalizador con células de levadura son: la obtención de células con un tratamiento adecuado para su inmovilización y la elección del soporte y método de inmovilización que permitan el uso del biocatalizador resultante en suero de leche. Todo esto a través de operaciones factibles de escalar, para poder cumplir con el objetivo establecido.

A continuación se muestran los trabajos realizados para cumplir con dicho objetivo.

Con respecto al tratamiento de las células para su inmovilización, se exploraron dos métodos; "la permeabilización" con sales y temperatura, y a través del secado por aspersion. Los estudios se encuentran

descritos en los trabajos titulados "Influence of Spray Drying on the permeability of *K. fragilis* Measured by β -galactosidase Activity" y " Reutilization of Free and Immobilized *Kluyveromyces fragilis* Yeast Cells With Controlled Permeabilization Treatment" (anexo 2)

Como se describe en los trabajos, lo primero que se define es el término de permeabilización como: "El procedimiento para obtener la expresión de una enzima en el interior de la célula". Esta definición es necesaria, ya que en la literatura se han descrito tratamientos en células de *K. lactis* y *K. fragilis*, con el objeto de obtener extractos enzimáticos que se puedan aplicar directamente en leche, por lo que en realidad se trata de métodos de extracción y no de permeabilización.

En los tratamientos probados en éste trabajo, se considera la temperatura como el parámetro, más importante, debido a que además de favorecer la permeabilización, elimina otras actividades enzimáticas como la zimasa.

Los tratamientos probados además, permiten el uso de las células en alimentos porque no se utilizan agentes tóxicos como sería el caso en el uso de solventes como el isopropanol, tolueno y no se confieren sabores indeseables como en el caso de células tratadas con proteasas. Ambos son fáciles de controlar y escalar, aunque en este rubro el secado por aspersión presenta ventaja sobre el tratamiento con sales y temperatura.

Por esta razón el tratamiento a través del secado por aspersión se planteó como una posibilidad de permeabilización ya que éste ha sido utilizado para el secado de levaduras en la obtención de células viables (levadura para panificación) como extractos celulares (extracción de la misma lactasa). El cuestionamiento entonces fué si es posible obtener células en un estado intermedio, es decir células completas, no viables, con la lactasa activa, confinada en el interior de las células?

El resultado de los estudios nos muestra que es posible obtener este estado intermedio además de poder relacionar el grado de permeabilidad de la célula con la temperatura de secado.

Un método ampliamente utilizado en la permeabilización de células es su tratamiento con sales, como ejemplo podríamos citar el uso de sales para la creación de poros y la introducción de DNA en la transformación de éstas (Das, S. y colaboradores, 1984). Los estudios realizados se basan con el trabajo realizado por Brodsky y Grootwassink, 1986; y Van Huynh y Declaire, (1985, 86) en donde se describe la extracción de la lactasa de *K. lactis*. Con estos antecedentes se planteó la permeabilización de células de *K. fragilis* a través de un tratamiento con temperatura y iones de K^+ , Mg^{++} y Mn^{++} ya que la actividad enzimática se incrementa en presencia de estos iones.

Los resultados muestran que es posible obtener células de levadura "permeabilizadas" y que estas pueden ser utilizadas como biocatalizadores con actividad de lactasa en forma libre o inmovilizada.

Inmovilización de células de *K. fragilis*, con actividad de β -galactosidasa.

Debido a las características que presenta el suero dulce completo y a los problemas de transferencia de masa que se presentan en biocatalizadores a base de células inmovilizadas, se elige como método de inmovilización la formación de agregados celulares.

La formación de agregados celulares fué inicialmente desarrollado por Venkatasubramanian, en la inmovilización de células de *Bacillus coagulans* y *Actinomyces missouriensis* para la expresión de la glucosa isomerasa en la producción de jarabes fructosados. Esta aglomeración se lleva a cabo utilizando glutaraldehído como agente reticulante. La formación de los aglomerados es eficiente, debido a la morfología de las células; sin embargo en el caso de células de levaduras, el tratamiento solo con glutaraldehído no es suficiente además de dañar mucho a las células. En 1978, D.C, Petre y colaboradores publican una pequeña nota en donde para formar agregados celulares con *E. coli* retícula utilizando albúmina y glutaraldehído. A través de este

método, reaccionan los grupos amino de la proteína y algunos disponibles de la célula con aldehído a través de la formación de una base de Shiff. Este tratamiento dá como consecuencia una especie de inmovilización por atrapamiento, solo que se logran inmovilizar células en una relación más alta que la que se tiene en la inmovilización con geles; en el primero se logra una relación en gramos, de 4 a 1 (células vs soporte) mientras que en el segundo la relación es de 1 a 1.

Como antecedente a los trabajos aquí presentados, se probó en el laboratorio la inmovilización de las células de *K. fragilis* permeabilizadas, en acetato de celulosa y en albúmina con glutaraldehído. Estos últimos se realizaron con el objeto de comprobar la agregación y la inmovilización de la enzima confinada en las células. Una vez probado el método, se eligió a la gelatina como proteína reticulante ya que además de ser barata y disponible gelifica a temperatura ambiente, esta propiedad propicia el atrapamiento de las células obteniéndose agregados celulares más resistentes y con mayor número de células.

Así a través de esta estrategia se podría obtener un biocatalizador con una actividad específica de 200 a 300 u/g, con una estabilidad adecuada, para que la aplicación de éste tuviera perspectivas económicas (1er informe técnico de avance, CONACyT, Kem Fuds, U.N.A.M 1987).

Los trabajos que describen los estudios con respecto a la obtención del biocatalizador se encuentran en los documentos :

" Inmovilización de células de *K fragilis* en gelatina -entrecruzando con glutaraldehído" presentado en el anexo 1 y que forma parte de los trabajos presentados en el Tercer informe técnico de avance presentado en el Programa Regional de Biotecnología para America Latina y el Caribe. PNUD/ONUDI, 1989. En la patente titulada "Procedimiento para Obtener un Biocatalizador Con Células con una Permeabilidad Controlada para la Hidrólisis de la Lactosa" (anexo 3) y en el artículo titulado " Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects" (anexo 2).

En los documentos se describen los trabajos de inmovilización de células, utilizando gelatina y glutaraldehído como agentes reticulantes, así como la caracterización del biocatalizador.

Estos trabajos muestran que efectivamente se obtienen agregados celulares, ya que se logran inmovilizar células de levadura en una relación de 8 gr de células por 1 de gelatina. Sin embargo como ya se había mencionado, en la caracterización se observa que se presentan problemas de transferencia de masa. Sin embargo se logra tener un biocatalizador con 400 u/g y retiene el 100% de su actividad inicial durante 180 h, cuando se aplica en la hidrólisis de lactosa en suero dulce completo de leche.

Conclusiones y aportaciones en los trabajos realizados en el diseño y obtención de un biocatalizador con actividad de β galactosidasa, para la hidrólisis de la lactosa de suero dulce completo de leche.

Los resultados nos muestran que a través de la estrategia planteada se logra resolver el problema de la estabilidad de la enzima y se obtiene un biocatalizador con características apropiadas para su evaluación en un proceso que pueda ser implantado a nivel de producción. Este no presenta actividades enzimáticas adicionales indeseables, su manufactura es técnicamente posible ya que tanto los procesos de obtención de las células (fermentación y permeabilización) como el de inmovilización son factibles a escalas mayores. Presenta una actividad de 500 U/g (peso seco) utilizando lactosa como sustrato y retiene el 100% de su actividad inicial después de 180 horas de uso continuo en suero de leche. En base a éstas características se evaluó el costo de obtención de jarabe (ver anexo 3), En esta evaluación se consideraron tres etapas: Producción de la enzima en células de *K. fragilis* vía fermentación, inmovilización de las células con actividad de β -galactosidasa y la obtención del jarabe. Los estudios se realizaron considerando la hidrólisis al 70% de 40,000 litros diarios de suero en un tiempo de 6.3 horas y una vida útil de 30 días. (Estudio para las empresas Kem Fuds y Productos del Golfo 1989). En este primer estudio se obtiene una tasa interna de retorno de 26.78% y 36.24% para la producción de jarabe y suero seco hidrolizado.

Estas evaluaciones nos indican que el biocatalizador tiene posibilidades para aplicarse a escala industrial y que es recomendable proseguir con los estudios para su utilización en reactores enzimáticos. Así considerando estos resultados, se solicitó el otorgamiento de un certificado de invención titulado "Procedimiento para obtener un Biocatalizador con Células con una Permeabilidad Controlada para la Hidrólisis de la Lactosa" presentada en el anexo 3 de este trabajo.

En lo particular, una aportación importante es el tratamiento de permeabilización de células con enzimas intracelulares que requieran ser inmovilizadas, ya que de éste depende la eficiencia de la inmovilización de la enzima en particular, el que permanezca confinada en el biocatalizador, dentro de la célula. En este rubro la demostración de que es posible permeabilizar células de levadura a través del secado por aspersion es muy importante.

Por último, si bien es cierto que la caracterización de un biocatalizador es un estudio obligado, los realizados al respecto de éste dieron lugar a un estudio más profundo que se encuentra descrito en el trabajo titulado "Design of two Immobilized cell Catalysts by Entrappment on gelatin: Internal Diffusion Aspects" .

En éste artículo se obtiene una correlación empírica entre el factor de efectividad y la concentración de sustrato que se puede integrar directamente a las ecuaciones de diseño de un reactor del tipo tanque agitado o flujo pistón. La ecuación modificada predice mejor la conversión en un tanque agitado, que la predicha por la misma ecuación pero considerando el factor de efectividad constante. Así en base a éstos estudios es posible aplicar biocatalizadores a base de células inmovilizadas en forma más eficiente, no solo considerando la carga enzimática o el tamaño de partícula como hasta ahora se había considerado sino también tomando en cuenta la concentración de sustrato en la mezcla de reacción en donde el factor de efectividad sea igual a la unidad.

VII. Discusión Final

Este trabajo se ubica en el área denominada como tecnología enzimática y ejemplifica una estrategia para la obtención de un biocatalizador de interés, en donde ha sido necesario abordar y manejar aspectos en diferentes disciplinas tales como: tecnología de fermentación, microbiología y bioquímica.

Sin duda la aportación más importante y puntual es de carácter tecnológico y se refiere a la obtención de un biocatalizador que puede aplicarse a la hidrólisis de la lactosa de suero dulce completo de leche, ya que en el mercado no existe un biocatalizador disponible para cumplir dicho objetivo.

Así en el planteamiento inicial se considera que para poder obtener un biocatalizador con perspectivas de aplicación a niveles de producción, es necesario que éste además de presentar una alta actividad específica y estabilidad operacional en suero, se obtenga a través de procedimientos técnicamente viables a escalas mayores.

Para obtener el biocatalizador propuesto, se eligió trabajar con la β -galactosidasa de *K. fragilis* ya que sus características bioquímicas y sanitarias, la hacen la enzima apropiada para la hidrólisis de la lactosa en suero dulce completo de leche. El valor de pH en donde su actividad es óptima es el mismo al cual se encuentra el suero dulce y corresponde a un valor de 6.6, por otro lado las levaduras son microorganismos considerados como seguros para su aplicación en alimentos de consumo humano o categoría de GRAS (Generally Recognized as Safe) de la FDA (Food and Drug Administration de los E.U.A.). Sin embargo no es muy estable en presencia de algunos agentes químicos por lo que se decide inmovilizar células completas de levadura.

En este contexto, los estudios se enfocan a dos aspectos importantes que son: La producción de la enzima en las células de levadura y la inmovilización de éstas.

Tanto en lo que concierne a la producción de la enzima, como a la inmovilización de las células, se presentaron cuestionamientos básicos que resolver y aclarar, para poder posteriormente establecer los procedimientos y estudios más adecuados para la obtención y aplicación del biocatalizador.

Los dos aspectos básicos a resolver fueron:

- 1.-Aclarar la controversia con respecto a la influencia de las condiciones fisicoquímicas en la producción de la enzima.
- 2.-Lograr la máxima expresión de la enzima en el interior de la célula, sin que se expresaran otras actividades adicionales que alteraran las propiedades organolépticas del suero como sería el caso de actividad de proteasas o el complejo zimasa que transforma la glucosa hasta etanol y CO₂.

Como se muestra en la sección de antecedentes en la producción de la enzima, al inicio de los estudios había una situación confusa con respecto a la influencia de los parámetros fisicoquímicos en la producción de la lactasa en células de levadura, de tal forma que autores como Ozilgen, 1988; llega a postular una posible regulación autógena en la producción de ésta, a pesar de los estudios de Dickson, 1989; que demuestran claramente que la regulación de la expresión de la enzima está dada a través del modelo de Jacob y Monod (regulación negativa) en donde el inductor es un metabolito parecido a la galactosa además de presentarse regulación positiva por catabolito. En la literatura existe discrepancia entre la concentración óptima de lactosa necesaria para inducir la producción de la enzima, así Bales, 1979; propone que ésta es de 2% p/v mientras, que Mahoney plantea que debe de ser de hasta un 15% p/v. Esta situación es similar con respecto a otros componentes del medio tales como el extracto de levadura. También se informa que otro componente importante es el oxígeno disponible en el medio de cultivo (Mahoney, 1975) asociando la actividad específica de β -galactosidasa (u/g) a bajos niveles de disponibilidad de oxígeno.

Debido a que los niveles de oxígeno en un medio de cultivo dependen de diferentes parámetros tales como: composición del medio, cantidad de células y condiciones de operación y a que se ha reportado que este parámetro afecta a la célula a niveles moleculares como por ejemplo a

través de los denominados regulones aeróbeos y anaeróbeos así como a niveles bioquímicos, favoreciendo reacciones de oxidación o simplemente fisicoquímicos desnaturalizando enzimas como el caso de la nitrogenasa de *Rhizobium* sp, se postula aclarar el papel del oxígeno en la producción de la enzima relacionando éste parámetro con la regulación negativa y positiva a través de la velocidad específica de consumo de azúcar por la célula (q_s).

Así la disponibilidad de oxígeno en procesos de fermentación es muy importante ya que además de actuar en diferentes niveles (a través de la oxidación de compuestos o a través de la regulación de sistemas de expresión), puede ser controlado de diversas formas a través de las condiciones de operación.

El parámetro elegido para aclarar el papel del oxígeno en la producción de la enzima fué el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, kl_a . Este parámetro nos indica la capacidad de transferencia de oxígeno de un sistema por lo que se convierte en una herramienta muy útil ya que además de darnos una idea de la disponibilidad de oxígeno en un proceso, se aplica como criterio de escalamiento y apoyo para el diseño de equipo que nos permita obtener la transferencia de oxígeno deseada.

En la literatura se encuentran descritas diferentes correlaciones que predicen el kl_a , las más utilizadas son de la forma $kl_a = k (P_g/V)^\alpha (V_s)^\beta$ y han sido desarrolladas en tanques con diferentes geometrías, en diferentes escalas, midiendo el oxígeno por diferentes métodos y en diferentes medios, por lo que no concuerdan en los valores que predicen y son consideradas como una guía en el diseño de fermentadores o escalamiento de procesos. Así, el desarrollo de correlaciones empíricas particulares a un proceso adquieren una gran justificación. Una de las aportaciones importantes que contribuyen finalmente a la obtención del biocatalizador a base de células de levadura inmovilizadas, es la correlación para la predicción de kl_a desarrollada en estos estudios, $kl_a = 3.139 \cdot 10^{-4} Q^{0.51} R^{2.166}$ que transformada en términos de potencia suministrada y velocidad de aireación resulta $kl_a = 24.2 (P_g/V)^{0.72} (V_s)^{0.51}$. Esta correlación se desarrolló específicamente para el estudio del proceso de producción de la enzima, el cual se caracteriza por ser muy sensible a cambios en la velocidad de transferencia de oxígeno, como se observa en los estudios

de producción en un proceso en lote utilizando tanto un medio de cultivo químicamente definido como un complejo.

A través de esta correlación, se tiene una idea de la transferencia de oxígeno en un sistema lo que permitió establecer las condiciones iniciales de agitación y aireación en un proceso en lote para poder relacionar la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo con la regulación negativa y positiva de la expresión de la enzima a través del q_s .

Se realizaron cultivos en lote en un medio a base de suero, a diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno observándose que la actividad específica al final de la fermentación disminuye conforme aumenta el k_{la} .

Obteniéndose una producción óptima de 36000 a un k_{la} de 136 h^{-1} , ya que en este punto la actividad específica es óptima y la producción de biomasa es adecuada. En estos procesos también se observa que independientemente de la disponibilidad de oxígeno en el medio, la actividad específica tiende a incrementarse cuando la velocidad específica de consumo de lactosa (q_s) tiende a 1, (g azúcar/g cel h) y que ésta tiende a disminuir cuando el q_s es mayor a 2 (g azúcar/g cel h). Esta observación resulta congruente con los estudios de Dickson ya que la velocidad específica de consumo de azúcar es un reflejo del balance entre el azúcar que entra a la célula y la velocidad en que éstos se utilizan en su interior, para funcionar como efectores en la regulación de la enzima y fuente de carbono y energía. Para comprobar que es el q_s el que determina el incremento o decremento de la actividad específica en el cultivo en lote independientemente de la disponibilidad del oxígeno en el sistema, es que se realizaron los estudios en cultivo alimentado manteniendo constante el valor de q_s y variando el valor de k_{la} . Los estudios comprueban que independientemente de la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo, es el q_s el que determina el incremento o disminución de la actividad específica observándose que a valores de q_s cercanos a 1 (g azúcar/g célula h) durante la fermentación el valor tiende a incrementarse tanto en cultivo con una alta tasa de transferencia de oxígeno como con bajas tasas de transferencia de oxígeno. Mientras que a valores mayores a 2 (g azúcar/g célula h) ésta tiende a disminuir.

Estos hallazgos nos muestran que la producción de la enzima se puede llevar a cabo en un cultivo a base de suero tanto en lote a kla de 136 h^{-1} como en un cultivo alimentado, operado en altas velocidades de transferencia de oxígeno y manteniendo el valor de q_s en $1 \text{ (g azúcar/g célula h)}$.

A través de los estudios realizados se obtuvo una mayor producción de la enzima (U/l) en un cultivo en lote, operado a un kla inicial de 136 h^{-1} , por esta razón y debido a que este tipo de procesos es más sencillo de operar y controlar es que se escaló el proceso en lote, sin embargo se recomienda estudiar el cultivo alimentado en unidades de fermentación de 14 l variando el volumen inicial, con el objeto de obtener una mayor producción (U/l) y evaluar el grado de complicación para su implementación a mayor escala.

Los estudios de escalamiento del proceso de producción de la enzima en un cultivo en lote, tuvieron como objetivo, obtener un criterio de escalamiento y dar elementos para el diseño de una planta o la implementación del proceso en diferentes tipos de tanques. Así, en base a los resultados con respecto a la relación de la producción de la enzima con el kla , se optó por tomar este parámetro como criterio de escalamiento. Con el doble objetivo de establecer el kla como criterio de escalamiento y observar como afectaba el cambio de la hidrodinámica del sistema, en la producción de la enzima, se estudió la producción de la enzima (U/l) analizando la actividad específica (U/g) y biomasa producida, en escalas de 130 y 500 l en tanques con diferentes geometrías a valores de kla de 13 , 136 y 320 h^{-1} . Los estudios nos muestran que la hidrodinámica del sistema no determina la concentración final de enzima (U/l) y que este está determinado por el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. Así, manteniendo un valor de kla constante de 136 h^{-1} se obtiene una producción de enzima de: $34,200 \text{ U/l}$ en una escala de 14 lts , $32,886$ y $34,320 \text{ U/l}$ en una escala de 130 l y $35,700 \text{ U/l}$ en una escala de 500 l . Para el establecimiento de las condiciones de operación en cada una de las escalas se utilizó la correlación desarrollada, que aunque predice el valor de transferencia de oxígeno de las unidades en agua, sirvió como punto de referencia, para lograr que durante el proceso se obtuviera la velocidad de transferencia de oxígeno, que determinara a su vez

la biomasa y velocidad específica de consumo de azúcar, que permitiera obtener una alta actividad específica (U/g) y biomasa (g/l), parámetros que determinan la concentración de enzima (U/l). La estrategia en el escalamiento aquí ensayada puede ser aplicada para la producción de otras proteínas reguladas, similares.

La β -galactosidasa representa una enzima eminentemente catabólica involucrada en el aprovechamiento de una fuente de carbono y energía como muchas enzimas presentes en los microorganismos. En la expresión de esta enzima los efectores en su regulación son también fuente de carbono y energía, una situación análoga se presenta en la regulación de la penicilino amidasa en células de *E. coli* en donde el ácido fenil acético induce el sistema y se utiliza como fuente de carbono y energía, otro ejemplo sería el de la proteína híbrida de β -galactosidasa-insulina en donde la lactosa se utiliza como inductor y fuente de carbono y energía, en estos ejemplos como en otros la producción de la proteína se asocia con ciertas velocidades de transferencia de oxígeno y bajos rendimientos en biomasa. Los estudios aquí realizados pueden servir como guía para estudiar la producción de proteínas de interés, en donde los efectores en su regulación sean a su vez fuente de carbono y energía.

Una vez obtenidas las células con una alta actividad específica, había que lograr su máxima expresión en el interior de ésta, para lograr una mayor eficiencia en la inmovilización. Este aspecto aparentemente tan obvio ha recibido poca atención. Por un lado es común encontrar trabajos en los que se avocan al estudio de la extracción de una enzima intracelular con el objeto de purificarla. Con respecto a la lactasa en células de levadura los estudios se han enfocado a la obtención de extractos celulares para su aplicación directa en la hidrólisis de la lactosa de la leche. En general las células que requieren de un tratamiento de permeabilización para su posterior inmovilización son tratadas con solventes y una vez manufacturado el biocatalizador no se verifica que no haya salida de la enzima.

Así el paso limitante para lograr el objetivo planteado (obtener un biocatalizador que hidrolice la lactosa del suero de leche), era poder

expresar la enzima intracelularmente sin la expresión de otras enzimas que actuaran con los componentes del suero, los productos de hidrólisis o con la enzima misma, además a través de procedimientos viables en escalas mayores. En este punto los dos procedimientos ensayados, se basaron en el tratamiento de las células a altas temperaturas (50-60°C) para eliminar actividades adicionales, aprovechando la propiedad de la lactasa de *K. fragilis* de resistir hasta temperaturas de 50°C.

Sin duda de entre los dos procedimientos ensayados, el que mayores ventajas ofrece es el secado por aspersión ya que esta operación unitaria es una de las más estudiadas y empleadas en la industria por lo que su control y disponibilidad de equipos es muy alta. En este caso la cuestión a investigar era aclarar si era posible obtener células en estado intermedio, esto significa: células muertas pero con actividad de lactasa, ya que en la literatura se ha reportado la obtención de células de levadura viables para panificación o extractos enzimáticos. Los estudios de secado por aspersión de la levadura, nos muestran que es posible obtener células íntegras secas no viables, pero con actividad de lactasa.

Las temperaturas de secado ensayadas fueron de 110, 120, 130, 140 y 160°C, con tiempos de residencia entre 21 y 27 segundos. En el rango de temperatura de 110 a 140° encontramos que no hay actividad enzimática en la mezcla de reacción o sea que toda se detecta en el interior de la célula y ésta es mayor conforme aumenta la temperatura de secado. Si se someten éstas células a un tratamiento de extracción encontramos en todas las muestras el 90% de la actividad antes de ser secada. Estas observaciones sugieren que las células presentan diferentes grados de permeabilidad y que ésta depende de la temperatura de secado.

La observación de las células a través del microscopio electrónico de barrido sugieren que el fenómeno de permeabilización es independiente del mecanismo de secado. Beck, 1982; ha sugerido que el mecanismo de secado se realiza de la siguiente forma: la gota al ser esparcida en la torre de secado, contiene células en su interior, primero se evapora

el agua de la superficie formandose una costra, dentro de las células se tiene vapor de agua, la presión se incrementa y la célula sufre una pequeña explosión en un punto a través del cual escapa el vapor, quedando esferas huecas con un hoyo o crater eruptivo.

Al observar las células secas en el microscopio se observa un crater eruptivo en todas ellas, independientemente de la temperatura de secado, por lo que al parecer éste no determina el grado de permeabilización. Sin embargo las células secas presentan un mayor tamaño y una estructura de red, que no presentan las células que no han sido secadas. Esta estructura de red es más abierta conforme se incrementa la temperatura de secado, hasta el punto en donde se observan células rotas, cuando éstas han sido tratadas a una temperatura de 160°C. Así se sugiere que ésta estructura se asocia con el grado de permeabilidad de la célula y por tanto el mecanismo de permeabilización y secado son independientes. El secado por aspersion permite la obtención de células de levadura íntegras permeabilizadas con una alta actividad enzimática, las células en este estado son muy manejables y se obtiene una gran eficiencia en su inmovilización, esto es toda la enzima que se expone se logra inmovilizar.

Habiendo solucionado este problema el siguiente paso a considerar era el soporte y método de inmovilización adecuado considerando las características del sustrato. En el tratamiento del suero dulce completo de leche con un gran contenido de proteínas 0.3 % (P/V) y sales no se recomienda un biocatalizador obtenido a través de la adsorción de las células ya que las proteínas y sales provocan la desorción de la enzima.

Así el método que se elige es la agregación y atrapamiento de las células en gelatina entrecruzando con glutaraldehído y se elige la gelatina por ser una proteína disponible y barata. Los procedimientos estudiados e implementados en la obtención del biocatalizador, son sencillos en su control y conocidos y utilizados en el sector productivo, éstas características en el proceso de obtención de un biocatalizador que quiere aplicarse a nivel industrial son muy convenientes, siendo éste un aporte muy importante del trabajo. Una

vez más es importante resaltar que si se ha entendido el problema, e identificado los pasos que lo limitan, toca resolverlo de la manera más sencilla para que el proceso tenga mayor oportunidad de ser implantado en el sector productivo.

La obtención del biocatalizador se planteó en términos de actividad específica y estabilidad operacional. El biocatalizador obtenido presenta una actividad específica de 500 U/g retiene el 100% de su actividad inicial durante 180 horas de operación a 37°C tanto en soluciones de lactosa y suero (fig 1) y con 0.8 de catalizador por litro de suero se obtiene el 75% de conversión en 90 minutos (fig. 2).

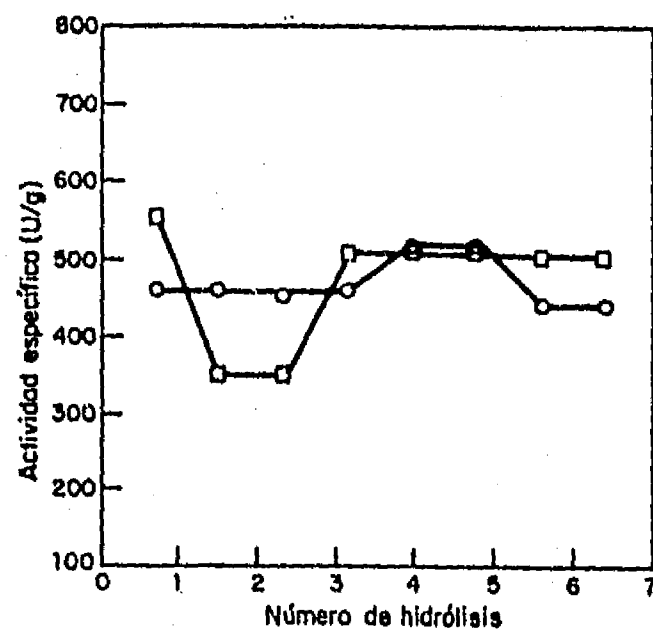


Fig. 1. Estabilidad operacional en soluciones de suero (□) y lactosa (○), en lotes de 24 horas y 37°C.

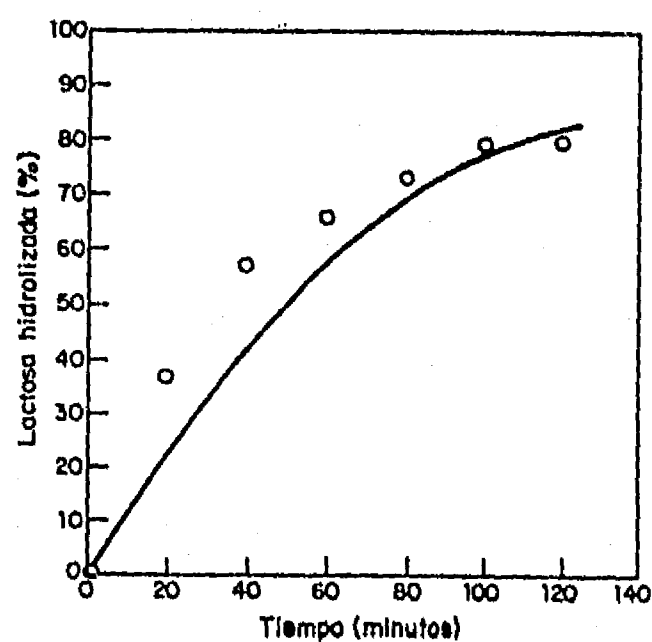


Fig 2. Hidrólisis de suero utilizando 0.8 g de biocatalizador/litro, en un matraz agitado a 37°C.

Con estos primeros datos se integra el perfil económico mostrado en el anexo 2. Este estudio nos muestra que considerando la actividad y estabilidad del biocatalizador obtenidos en estos estudios, así como la obtención del biocatalizador desde la producción de las células, se tiene una tasa interna de retorno de 26.78% y 36.24% para la producción de jarabe y suero seco hidrolizado comparada con la tasa real, que aproximadamente es de 3%. Estos datos junto con el dato de estabilidad y actividad similares a otros biocatalizadores manufacturados con enzima de hongos para el tratamiento de suero ácido permeado, muestran la posibilidad de aplicar este biocatalizador.

Ciertamente este es el primer biocatalizador y se tendrán que realizar más estudios sobre la caracterización física de éste así como lo que concierne al uso de reactores enzimáticos. En este trabajo se muestran los primeros estudios realizados en este sentido, la primera caracterización nos muestra que como se esperaba en esta clase de biocatalizadores existen problemas de transferencia de masa interna obteniéndose un factor de efectividad de 0.5. También se realizan los primeros estudios con respecto a la aplicación más racional del biocatalizador en reactores. Se estudiaron los aspectos de transferencia de masa interna en el biocatalizador y se obtuvo una correlación empírica entre el factor de efectividad y la concentración de sustrato. En los estudios se observa que para un tamaño de partícula dado, a altas concentraciones de sustrato el factor de efectividad tiende a uno, pero conforme ésta concentración disminuye, el factor también disminuye. Así durante el transcurso de una reacción se tiene que dependiendo de la velocidad de desaparición del sustrato la reacción pasará de un control cinético a un control difusional. Este aspecto debe de ser considerado ya que puede ser una fuente de error en el diseño de un reactor. Estos elementos nos sirven para realizar una aplicación más racional del biocatalizador en donde habrá que considerar: el costo, eficiencia y estabilidad del biocatalizador.

En conclusión, a través de los estudios aquí realizados se obtuvo un biocatalizador a base de células inmovilizadas, para su aplicación en la hidrólisis de la lactosa de suero a gran escala. Así la aportación, más importante es de naturaleza tecnológica, en el área de la

denominada tecnología enzimática, área de creciente importancia con el obtención de una enzima de interés industrial.

VIII. Bibliografía General.

1. Aliabadi Z. Warren F. Mya S. and Foster J.W. 1986 Oxygen regulated stimulations of *Salmonella typhimurium* identified by μ d (Ap lac) operon fusions. Jour. of Bacteriol. Mar. p. 780-786.
2. Aliabadi Z. Park Y.K. Slonczewski J.L. and Foster J.W. 1988 Novel regulatory loci controlling oxygen - and pH - regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. Jour. of Bacteriol. Feb: 842-851.
3. Allum D. Whey - The international science. 1980. Journal of the Society of Dair. Technol. Vol. 33, Nol 2: 59-67.
4. Bales S.H. and Castillo J.F. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* growt in whey. Appl and Env. Microb. June: 1201-1205.
5. Brito E. Don Juan J. Domínguez F. and Casas L.T. 1990. Diffusion coefficients of carbohydrates in modified K. Carrageenan gels with and without *Escherichia coli* immobilized. Jour. of Ferm. and Bioeng. Vol. 69, No. 2:135-137.
6. Brodsky J.A y Grootwasink J.W.D. 1986. Development and evaluation of whole cell yeast lactase for use in dairy processing. J. Food Sci. 51 (4), 897-903.
7. Buck M. and Ames B.N. 1984. A modified nucleotide in TRNA as a possible regulator of aerobiosis: synthesis of cis-2-methylthioribosylzeatin in the TRNA of salmonella. Cell, vol. 356: 523-531.
8. Canales A. Inmovilización de células con actividad β -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa en leche. Tesis para obtener el grado de licenciado. Fac. Química U.N.A.M. 1985.

9. Casas L. Nuevos enfoques en biocatálisis. Prospectivas de la biotecnología en México. 175-200. Compilador Rodolfo Quintero. Edit. Fundación Javier Barros Sierra y CONACYT, 1985.
10. Champluvier B. Marchal F. and Rouxhet P.G. 1989. Immobilization of lactase in yeast cells retained in a glass wool matrix. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 11: 422-430.
11. Champluvier B. Kamp B. and Rouxhet P.G. 1988. Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 10: 611-618.
12. Craven G.R., W. Steers y C.B. Anfinsen. 1965. Purification, composition and molecular weight of β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Journal Biol. Chem.* 240: 2468-76.
13. Das S. Kellermann E. and Hollenberg, c.P. 1984. Transformation of *Kluyveromyces fragilis*. *Jour. of Bacteriol.* vol. 154: 1165-1167.
14. Declaire M., De Cat W. and Huynh N. 1986. Appearance of cell-bound β -galactosidase activity in *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 323-325.
15. De Deken R.H. 1966. The crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J.G. Microb.* 44: 149-156.
16. Dickson R.C. y Riley M. The lactose-galactose regulation of *Kluyveromyces lactis*. *Molecular genetics of galactose metabolism in yeasts.* 1989. p. 91-41.
17. Dickson R.C. y Markin J.S. 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137 (1), 51-61.

18. Huynh N. and Declaire M. 1985. In situ activation of β -galactosidase of *Kluyveromyces fragilis* resting cells by sodium and potassium phosphates and chlorides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:390-393.
19. Informe técnico de avance No. 1. Proyecto hidrólisis del suero de leche para la obtención de jarabes dulces. Dic. 1987-feb. 1988. Programa de Riesgo Compartido, UNAM. CONACYT. Kem Fuds.
20. Lisker R. López-Halib G., Daltabuit. 1974. Lactose deficiency in Rural Area of México. *Amer. J. Clin. Nutr.* 27: 756-59.
21. Lisker, R., González B. and M. Daltabuit 1975. Recessive Inheritance of Adult Type of Intestinal Lactase Deficiency. *Amer. J. Human Genetics.* 27(5): 662-64.
22. Lisker R. 1980. Estudio doble ciego sobre la tolerancia a la lactosa de la leche en un grupo de niños rurales. *Rev. Inv. Clin. México,* 32,363-68.
23. Mahoney R.R., Nickerson R.A y Whitaker J.R. 1975. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* 58 (11), 1620-29.
24. Mahoney R. R. and Whitaker J.R. 1977. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Jour. Food. Biochem.* 1: 327-50.
25. Mahoney R.R. and Whitaker J.R. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Jour. Food. Sci.* 43: 584-91.
26. Marconi Wand Morisi, F. 1979. Hydrolysis of lactase of milk of milk by immobilized lactase. *Applied Biochem. and Bioeng.* 2: 219-221.

27. Marwaha, S.S., and Kennedy, J.F. 1988. Review: Whey-pollution problem and potential utilization. *International Jour. of Food Sc. and Technol.* 23: 323-336.
28. Nijpels H.H. 1981. Enzyme and food processing. Birch G.G., Blakebrough N. y Parker K.J. (eds) *Appl. Sci. Londres.*
29. Olivares A., Casas L. 1989. Estudio de prefactibilidad económica para la obtención e Jarabes de Suero por Hidrólisis Enzimática. Estudio para las empresas Kem Fuds y Productos del Golfo. CEINGEBI/UNAM.
30. Özilgen M. Ollis D.F. and Ogrydziak D. Kinetics of batch fermentations with *Kluyveromyes fragilis*. 1988. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 10: 165-172.
31. Petrik M. Kappell O. Flechter H. 1983. An expanded concept for glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short and long-term regulation. *J.G. Microb.* 129: 43-49.
32. Petre D.C. Noel and D. Thomas 1978. A new method por cell immobilization. *Biotech and Bioeng* 20: 127-34.
33. Polastro, T. Walker A y W.A. Harold 1989. Enzymes in the fine chemicals industry: dreams and realities. *Biotechnology* vol. 7: 1238-41.
34. Quintero R. Apuntes en el curso Procesos Biotecnológicos, 12-30. noviembre, 1990. CEINGEBI/UNAM México.
35. Rosado J.L., Morales M. and Pasquetti A. 1989. Lactose digestion and Clinical Tolerance to milk, lactose prehydrolyzed Milk and Enzyme-Added Milk: a study in Undernourished continuously enteral-fed patients. *Jour. of Parenteral and Enteral Nutrition.* 13(2): 157-161.

36. Segel I.H., Enzyme Kinetics, A. Wiley Interscience Publication, New York, pp. 1-17. 1975.
37. Takatoshi F., Masaru S. y Susumu A. 1982. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. Agric. Biol. Chem. 46(4) 899-904.
38. Torres J.A. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de la β -galactosidasa en células de levadura. Estudios para la obtención del grado de licenciado de Q.F.B. Facultad de Química U.N.A.M.
39. Ugalde U.O. Castillo J.I. and Diez R. 1989 Producción de proteínas a partir de suero lácteo. II Biotechnology Cuban and International Semminar. La Habana, Cuba.
40. Uwajima T., Yagi H. y Terada O. 1972. Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. Agric. Biol. Chem. 36, 570-77.
41. Varela J. Perfil técnico económico de un proceso para la producción de una lactasa de levadura (1987). Tesis para la obtención de grado de licenciado en Ingeniería Química. U.A.P.
42. Vassilis G y López-Leyva M. 1985. Hydrolysis of lactose Process Biochemistry 20, 2-12.
43. Wallenfels K. y Malhotra O.P. 1960. β -galactosidase. The enzymes vol. 4. Academic Press, London. 409-430.
44. Wendorff W.L. y Amundson C.H. 1971. Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. J. Milk Food Technol. 35(6), 300-306.
45. Yamamoto N. y Droffner M.L. 1985. Facultative anaerobe *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 82: 2077-2081.

46. Zabin, I. y Fowler, V. 1978. β -galactosidase, the lactose permease protein and thio-galactoside transacetylase en : "The Operon". Ed. Jeffrey H. Miller and William S. Renznikoff. Cold Spring Harbor Laboratory. 89-121.

A N E X O 1

Escritos Elaborados para la Presentación de este Documento

Relación entre la velocidad específica de consumo de azúcar y la actividad específica de β -galactosidasa en células de *K. fragilis*.

Escrito elaborado para la presentación de este documento.

Resumen.

Se estudió la actividad específica (U/g) y la concentración (U/l) de β -galactosidasa en células de *K. fragilis*, variando la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos en lote y alimentado, utilizando como parámetro de control la velocidad específica de consumo de lactosa por la célula (q_s). Los resultados indican que a valores de q_s cercanos a 1 (g lactosa/g célula h) la actividad específica tiende a incrementarse, mientras que a valores de q_s mayores de 2 (g lactosa/g célula h) ésta tiende a disminuir independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno y del estado metabólico de la célula. Los resultados encontrados se discuten en relación a otros previamente publicados.

Introducción.

Como se mencionó en la sección de antecedentes, los estudios con respecto a la producción de la β -galactosidasa (E.C.3.2.1.2,3) o lactasa en células de levadura, son confusos y contradictorios, tanto en lo que concierne a la influencia de los parámetros fisicoquímicos como, concentración y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno y disponibilidad de oxígeno, así como en lo referido a los aspectos de regulación a nivel molecular.

A través de los resultados de estos estudios, Özilgen (1988), propone que la producción de la enzima está determinada por la cantidad y calidad de sustrato en el medio de cultivo y que existe una regulación autógena además de la regulación a través del modelo del operón y regulación positiva.

El interés en cualquier proceso de fermentación es el de obtener una alta producción (g/l) del metabolito de interés. En el caso de enzimas es muy importante obtener la mayor cantidad de unidades por litro (U/l).

En enzimas intracelulares, esta producción dependerá del compromiso entre obtener una alta actividad específica (U/g) y biomasa (g/l).

La actividad específica depende de los eventos moleculares en la regulación de la producción de la enzima y la obtención de biomasa de fenómenos físicos como la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al líquido y a las células (Quintero, 1981).

En el caso de la producción de la lactasa en células de *K. fragilis* el resultado del compromiso entre actividad específica y producción de biomasa es de especial interés. Tanto Mahoney y Whitaker (1975) como García y Colaboradores (1987), encuentran que la actividad específica al final de un proceso en lote se relaciona en forma inversa a la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, aunque la producción de la enzima (U/l) fué la misma ya que la baja actividad específica fué compensada con una mayor producción en biomasa.

En los estudios de Mahoney y Whitaker (1975), se observa que la máxima actividad específica se obtiene en un rango de velocidades de aireación de 0.6 a 12 m Moles de O_2 /l h, si se ha reportado que para levadura la demanda específica de oxígeno es de 8mM O_2 /g células h (Quintero 1981), tendremos que en el mejor de los casos en el que todo el oxígeno fuese transferido a las células (los 12 mM de O_2 1/h) una vez que las células empiecen a crecer y alcancen tan solo 2g/l de biomasa, el cultivo estará limitado por oxígeno con una consecuente disminución en la obtención de biomasa.

Dada esta situación es que es importante aclarar si es posible obtener células con una alta actividad específica en un cultivo sin limitación de oxígeno, en donde también se pueda obtener una alta producción de biomasa. De tal forma que la obtención de una gran cantidad de células con una alta actividad específica en el proceso, permite obtener en forma más eficiente un producto enzimático más concentrado ya sea a través de la purificación de la enzima, la inmovilización de las células en la obtención de un biocatalizador o el uso mismo de las células completas.

En la sección de antecedentes de la producción de la enzima, se discuten y presentan hipótesis sobre la posible relación entre la disponibilidad del oxígeno y la producción de la lactasa en un proceso en lote.

Así, en base a los estudios realizados por Dickson (1989), que demuestra que la regulación en la producción de la enzima sigue el modelo del

operón, en donde el inductor del sistema es un metabolito análogo a la galactosa además de la existencia de represión catabólica por glucosa. Y a la importancia del oxígeno en las levaduras, en el metabolismo de esteroides, ácidos grasos, glucosa y en general cualquier fuente de carbono y energía, así como en la determinación de su estado fermentativo a través de los efectos Pasteur y Crabtree (Fraenkel, 1982); se propone como hipótesis que, el parámetro importante en el control de la producción específica (actividad específica U/g) de la enzima en un proceso, es la velocidad específica de consumo de azúcar, independientemente del estado metabólico de la levadura (fermentativo u oxidativo), y que es esta velocidad de consumo, la que se ve afectada por la velocidad de transferencia de oxígeno en el sistema.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo es el estudio de la actividad específica (U/gcélula) y producción (U/l) de la lactasa, en células crecidas a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno, utilizando como parámetro de control, la velocidad específica de consumo de lactosa por la célula.

Materiales y métodos.

Microorganismo. Células de *K. fragilis* NRRL Y-1109 se mantuvieron en slants con YM agar.

Medio de cultivo. Se utilizó un medio de cultivo con la siguiente composición en % P/V: 6.6 de suero de leche, 0.75 de extracto de levadura, 0.84 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05 de Mg_2SO_4 y H_3PO_4 (1ml/l). El pH se ajustó en un valor de 5.5 con KOH. El inóculo se creció en un matraz fembach con un litro de medio a 29°C y 200rpm durante 18 h.

Cultivo en lote. Se realizaron corridas de 10 l en un fermentador de 14l marca New Brunswick Scientific U.S.A. a 29°C y valores de k_{la} iniciales, con respecto a agua de 13, 136 y 320 h^{-1} . Para establecer las condiciones de aireación y agitación se utilizó la correlación previamente descrita por García y colaboradores, 1987.

Cultivo alimentado. En los estudios se utilizó el medio previamente descrito, con una concentración inicial de suero de leche de 2.6% p/v, y

se alimentó una solución de suero al 33%(p/v) a velocidades de 0.8 a 2.8 ml/min. El resto de los componentes del medio se añadieron al inicio de cada proceso. Las condiciones iniciales de aireación y agitación fueron establecidas según el kla requerido, como previamente lo describe García y colaboradores, 1987.

Determinación de biomasa. Esta se determinó utilizando una curva estándar en donde la biomasa se relaciona con la absorbancia a 650nm. El procedimiento fué descrito con anterioridad por García y colaboradores, 1987.

Determinación de actividad enzimática. La actividad de lactasa se determinó como lo describe previamente García y colaboradores, 1987.

Determinación de lactosa. Esta se determinó por el método descrito por Summner y Howell, 1935.

Velocidad específica de consumo de lactosa. Esta se calculó a partir de los datos de lactosa(s) y biomasa (x) en intervalos de tiempo de 1 h. Y se define como: $q_s = \frac{ds}{dx} \frac{1}{dt} ds = S_{n-1} - S_n, dx = \frac{X_n + X_{n-1}}{2} dt = 1h.$

Parámetros metabólicos. Los índices de consumo de oxígeno (QO_2) y producción de CO_2 (QCO_2) fueron determinados con un analizador de gases marca Servomex serie 1400.

Determinación de etanol. Se determinó por cromatografía de gases, en un cromatógrafo varian modelo 3700 con una columna carbowax, a una temperatura de $140^\circ C$.

Resultados.

Producción de la lactasa, velocidad de transferencia de oxígeno y estado metabólico de la levadura.

Se crecieron células de *K. fragilis* a través de un cultivo en lote, en un medio a base de suero y a diferentes valores iniciales de coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{la} , como se describe en materiales y métodos). Con el objeto de que no hubiese limitación en el transporte de la lactosa al interior de la célula, se utilizaron células de levadura inducidas con lactosa, ya que según lo reportado por Dickson y Barr en 1983, la proteína que introduce a la lactosa es inducida por el mismo inductor y a la misma velocidad que la lactasa. Los resultados se muestran en la tabla 1 y figura 1.

Se observa que las condiciones de transferencia de oxígeno probadas en los diferentes procesos, determinan diferentes estados metabólicos de la célula, así tenemos que en un k_{la} de 320 h^{-1} , el cultivo no está limitado por oxígeno, denotado por un valor de RQ de 1.2, y un rendimiento de etanol con respecto a lactosa de $0.11 \text{ g et-oh/ g lactosa}$. Estos índices nos indican que la cantidad de oxígeno consumida por gramo de célula es equimolar a la producción de CO_2 y que la célula aprovecha mejor su fuente de carbono y energía en la producción de células que en la producción de etanol, por lo que ésta presenta un estado eminentemente oxidativo. A valores de k_{la} de 136 y 13 h^{-1} el estado de la célula es fermentativo con valores de RQ de 2.2 y 3.6 respectivamente. Los resultados presentados en la figura 1 apoyan la discusión anterior, ya que se observa que a un k_{la} de 320 h^{-1} , la célula aprovecha los azúcares más eficientemente para crecer que a un k_{la} de 13 h^{-1} .

A través de estos experimentos se puede asociar la producción específica de la enzima con un estado fermentativo de la célula, ya que tanto a valores de k_{la} de 13 y 136 h^{-1} la actividad específica de lactasa es de alrededor de 4000 unidades mientras que a k_{la} de 320 h^{-1} , este valor es de 2500 U/g.

Estas observaciones concuerdan con los resultados reportados por García y colaboradores, 1987; y Mahoney y Whitaker; 1975. Quienes asocian la producción específica de la enzima a bajos niveles de transferencia de oxígeno y por tanto a bajos rendimientos en biomasa y un estado fermentativo de la célula.

Tabla 1. Producción de β -galactosidasa, velocidad de transferencia de oxígeno y estado metabólico.

Kla (h^{-1})	Y_x (g cel/g az)	Y_{et-oH} (g et-oH/g az)	RQ (Q_{co} / Q_o) 2 2	Biomasa (g/l)	Act. Esp. (U/g)	Produc. Enz. (U/l)
320	0.22	0.11	1.2	11	2500	27500
136	0.18	0.16	2.2	9	3800	34200
13	0.11	0.25	3.6	5	4000	20000

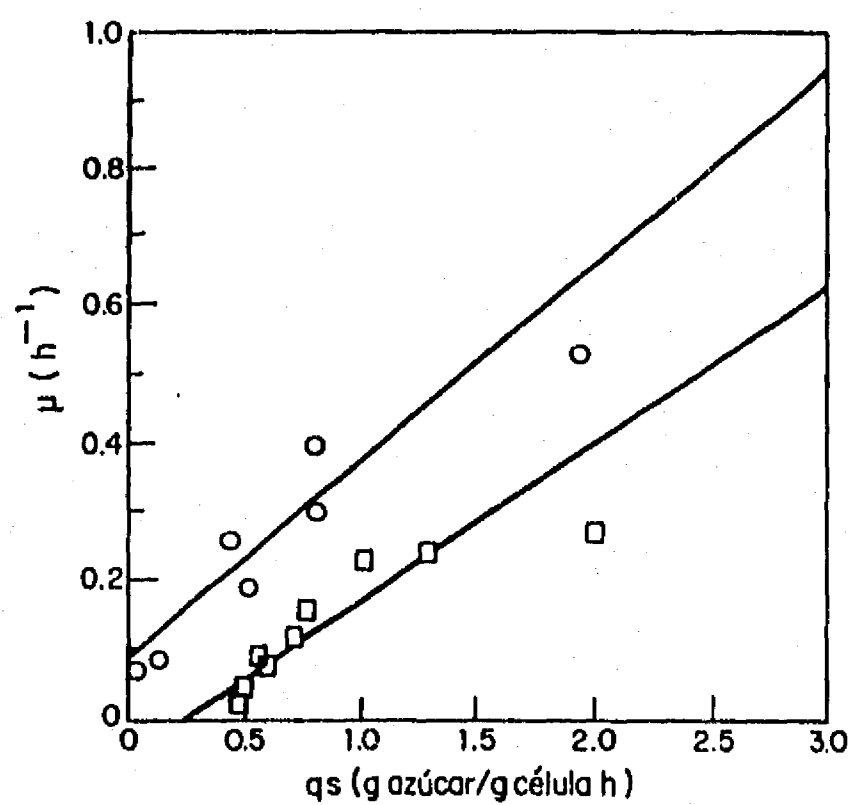


Fig 1. Relación entre la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica de consumo de lactosa, de células crecidas en un cultivo en lote a kla de 13 (\square) y 320 (\circ) h^{-1} .

En la figura 2 se presenta el cambio de la actividad específica así como el del q_s a través de cada uno de los procesos. Se observa que la actividad específica tiende a disminuir al inicio de la fermentación cuando la levadura está creciendo en cualesquiera de las condiciones probadas, sin embargo la disminución es mayor a un k_{la} mayor. Durante este periodo, en el cultivo hay una mayor disponibilidad de oxígeno y una mayor velocidad de consumo de lactosa por la célula.

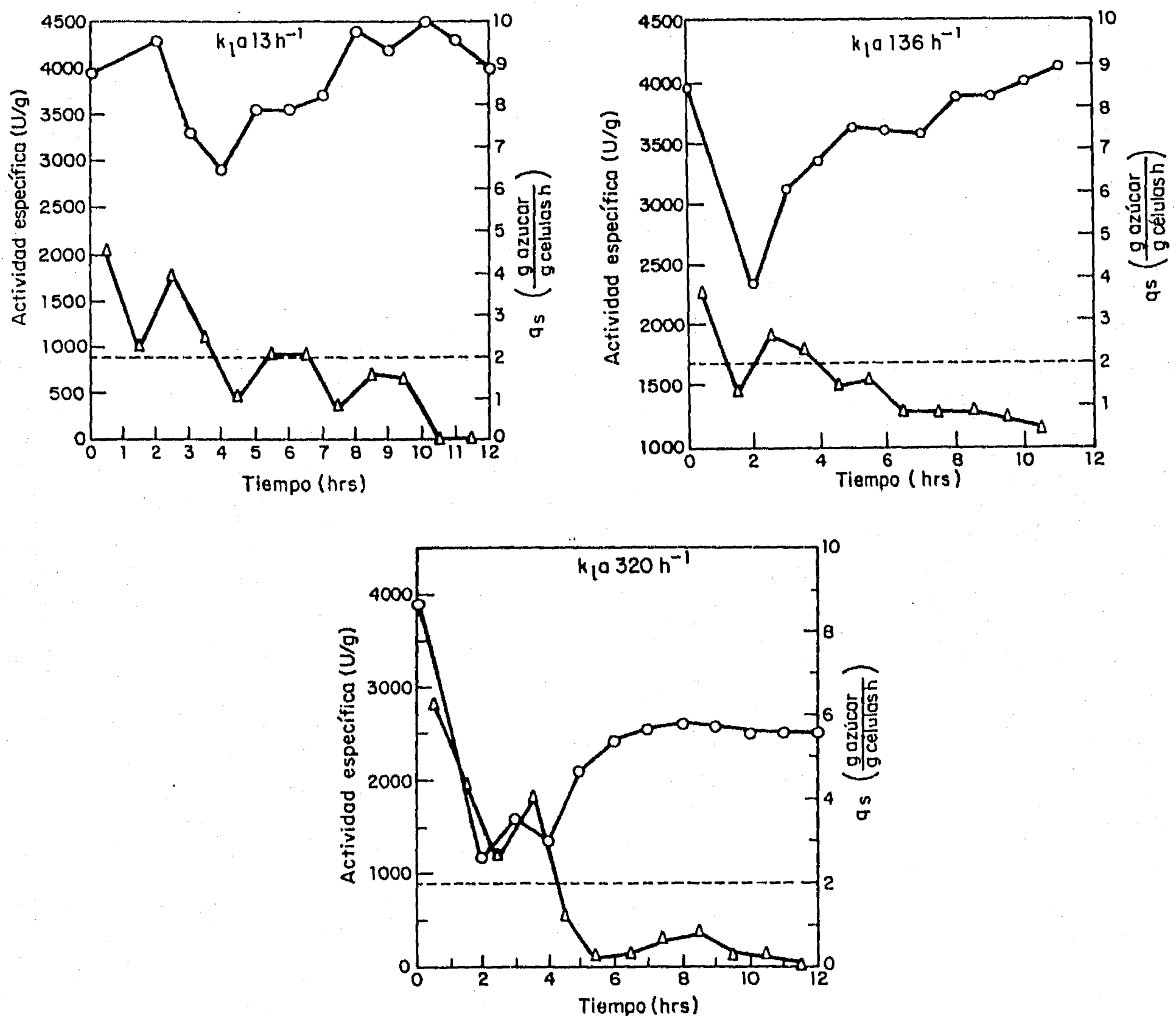


Fig 2. Actividad específica de β -galactosidasa (o) y velocidad específica de consumo de azúcar (Δ) de células crecidas en cultivos en lote a diferentes valores de k_{la} .

La disminución de la actividad específica, se presenta cuando el q_s es mayor a 2 (g de azúcar/g de célula h), posteriormente cuando el q_s es menor, la actividad específica tiende a incrementarse. Al parecer la obtención de una actividad específica alta al final del proceso dependerá de que tan pronto se alcance un valor de q_s menor a 2 (g azúcar/g célula h) y se empiese a producir una mayor cantidad de enzima por gramo de célula.

Velocidad específica de consumo de azúcar y actividad específica de β -galactosidasa.

Como se mencionó con anterioridad la lactosa, galactosa y glucosa son efectores importantes en el control de la producción de la β -galactosidasa de levaduras, por lo que la actividad específica depende de la concentración intracelular de estos azúcares (Dickson, 1983). Esta concentración resulta del balance entre el azúcar que entra a la célula y el que es consumido, por lo que la velocidad específica de consumo de azúcar (q_s) refleja de manera indirecta este balance.

Los resultados mostrados en los estudios de los cultivos en lote, sugieren que cuando los azúcares se consumen más lentamente (a bajos valores de q_s , y menor velocidad de transferencia de oxígeno) se permite que éstos actúen como efectores antes de ser aprovechados por la célula como fuente de carbono y energía. Así, se propone que el q_s puede ser utilizado como parámetro de control para la producción específica de la enzima, independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno en el proceso y del estado metabólico de la célula. Con el objeto de explorar esta posibilidad, se creció la levadura en diferentes condiciones de transferencia de oxígeno, a través de un proceso alimentado, manteniendo constante el valor de q_s . Los valores de q_s ensayados se basan en las observaciones hechas en los procesos en lote previos.

En la figura 3, se grafica la variación de la actividad específica a través del proceso, las condiciones ensayadas corresponden a valores de k_{la} de 320 y 13 h^{-1} manteniendo constante el q_s en un valor de 1 (g azúcar/g célula h), los resultados nos muestran que al igual que en los cultivos en lote, cuando se mantiene el q_s en un valor cercano a 1, la actividad específica tiende a incrementarse independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno en el proceso (k_{la} 13 h^{-1} ó k_{la} de 320 h^{-1}).

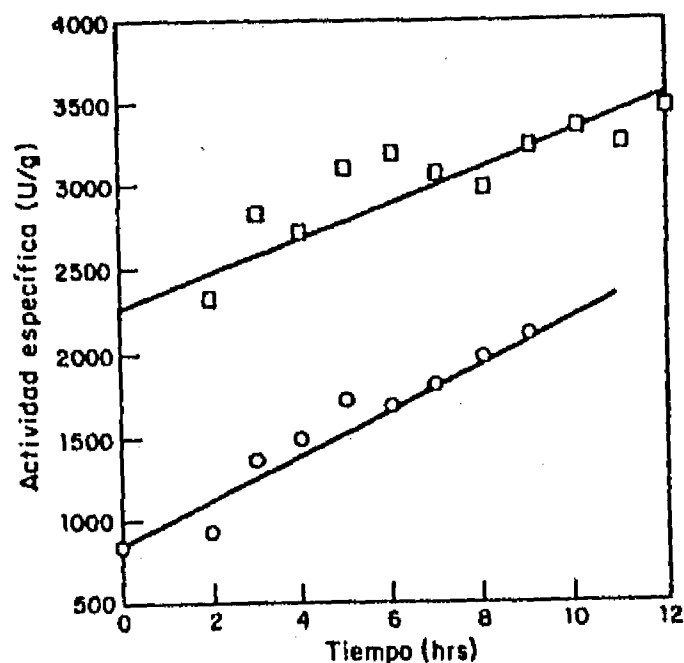


Fig 3. Actividad específica de lactasa en un cultivo alimentado a kla de 13 h^{-1} (□) y 320 h^{-1} (○), manteniendo un valor de q_s constante en un valor de 1 (g azúcar/g célula h).

En la figura 4 se muestra la actividad específica en procesos alimentados manteniendo constante valores de q_s cercanos a 2 y 3 (g azúcar / g célula h) a valores de kla de 13 y 136 h^{-1} respectivamente. Una vez más el comportamiento es similar al observado en los estudios en lote: la actividad específica de lactasa tiende a disminuir cuando el q_s se mantiene en valores mayores a 2 g azúcar/g célula h, mientras que cuando el valor se mantiene en un valor de 2 la actividad específica tiende a permanecer constante.

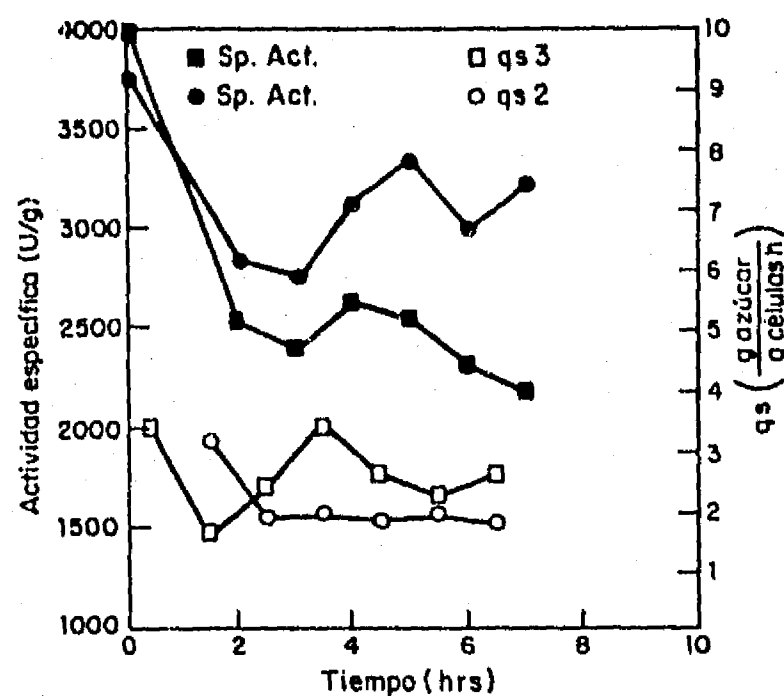


Fig 4. Actividad específica de lactasa, en un cultivo alimentado a kla de 13 h^{-1} (●) y 136 h^{-1} (■) manteniendo valores de q_s constantes a 2 (○) y 3 (□) g azúcar/g de célula h.

Tabla 2. Características de los procesos en lote alimentado.

k _{la} (h ⁻¹)	q _s (g Az/g cel h)	biomasa (g)	Act. Esp. (U/g)		Y _x (g cel/g Az)	Y _{et-OH} (g et-OH/g Az)
			inicial	final		
320	1	84	800	- 2000	0.25	0.12
13	1	61	2300	- 3500	0.13	0.22
13	2	64	2800	- 3200	0.135	0.2
136	3	75	4000	- 2340	0.18	0.14

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en los procesos alimentados. En esta tabla no se presentan los valores de producción de enzima (U/l) debido a que los inóculos utilizados presentaban una actividad específica diferente según el caso; por lo que no habría punto de comparación en la producción de la enzima al final de la fermentación.

Para la realización de estos estudios se utilizaron como inóculo células inducidas. Así en los experimentos en donde se mantuvo el q_s constante en un valor de 1 (g azúcar/g células) y se esperaba un incremento en la actividad específica, se utilizaron células con un grado de inducción intermedia, mientras que en los experimentos en donde se mantuvieron valores de q_s cercanos a 2 y 3 (gramos de azúcar/g de células) en donde se esperaba que la actividad específica disminuyera, el nivel de inducción en el inóculo fue el máximo encontrado. En ninguno de los casos se utilizaron células con el nivel basal de enzima, que para el caso de esta célula el determinado experimentalmente corresponde a 400 U/g.

En el resumen de los resultados de los estudios en lote alimentado, se pueden apreciar que es posible el incremento en la actividad específica, independientemente del estado metabólico de la célula y de la velocidad de transferencia de oxígeno (k_{la} 13 h⁻¹ y 320 h⁻¹) siempre y cuando se mantenga una velocidad específica de consumo de lactosa por la célula de 1 g azúcar/ g célula h. Así, en los procesos alimentados con un k_{la} de 13 h⁻¹ y 320 h⁻¹ se obtiene un incremento en la actividad específica de 1200 U/g célula, pero con una mayor producción de biomasa a un k_{la} de 320 h⁻¹ por lo que la producción neta de la enzima en estas condiciones es de 100,800 unidades mientras que a k_{la} de 13 h⁻¹ es de 73,200

unidades. También se puede observar que cuando el q_s se mantiene en un valor mayor a 2 (g azúcar/ g célula h) la actividad específica disminuye.

Una vez aclarado que es posible obtener una alta actividad específica a altas velocidades de transferencia de oxígeno, se procedió a realizar un cultivo alimentado, a un kla de 320 h^{-1} manteniendo el valor de q_s en 1 pero con un inóculo que contenía el máximo valor de inducción encontrado. En la figura 5 se muestran los resultados.

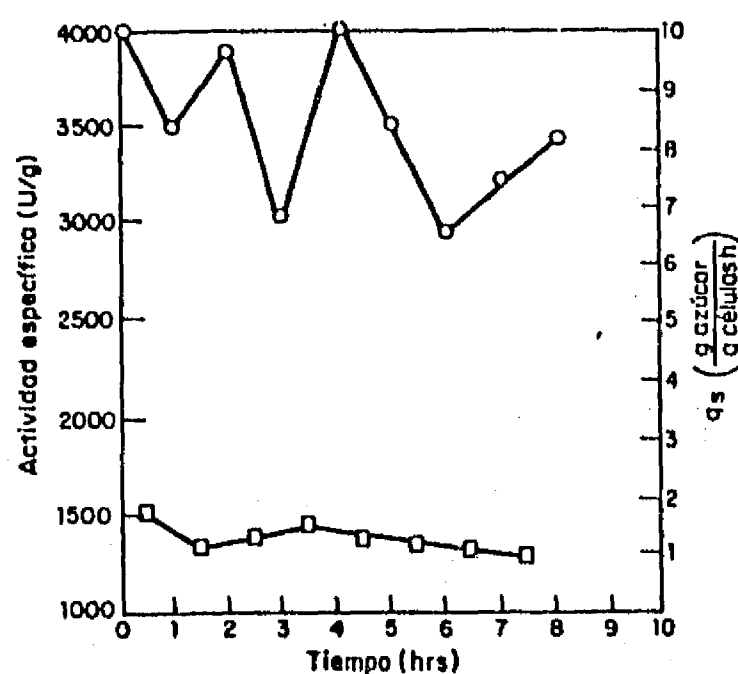


Figura 5. Cinética de actividad específica en un proceso en lote alimentado manteniendo la velocidad específica de consumo de lactosa (q_s) en un valor de 1 a un kla de 320.

En la figura se observa que la actividad específica no tiende a incrementarse, sino que oscila entre valores de 3000 y 4000 U/g, con un valor promedio de 3500 U/g que es el que se obtiene al final del proceso. En este experimento no se obtuvo un valor mayor a 4000 U/g de actividad específica ya que como se mencionó al parecer este valor es el límite superior de actividad posible en dicha cepa. Un argumento que soporta dicha hipótesis es que esta misma actividad para esta cepa ha sido reportado por otros autores (Mahoney y Whitaker; 1975). Lo importante a señalar, es el hecho de que la actividad específica no tendió a disminuir en estas condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno. Como se observa en el proceso en lote, a este mismo valor de kla y que por el contrario se logró obtener una actividad específica alta de

3500 U/g al final del proceso.

Estos experimentos una vez más indican que es posible realizar un cultivo de levadura para la producción de la enzima, en donde se puede obtener una alta actividad específica y un alto rendimiento de sustrato en biomasa. En la tabla 3 se compara la producción de enzima en el mejor cultivo en lote y en lote alimentado, con la reserva de que es posible optimizar el proceso alimentado.

Tabla 3. Producción de lactasa en células de *K. fragilis* cultivadas en un cultivo en lote y un cultivo alimentado.

Tipo de cultivo	U totales	Yenz (U/g az)	Yx (g cel/g az)	Act.Esp. (U/g)	Biomasa (g)
En lote	342 000	648	0.18	3800	90
En lote alimentado	276 000	1040	0.25	3450	80

Escala de 10 lts.

En la tabla se observa que el rendimiento de enzima por gramo de azúcar utilizado es mayor en el cultivo alimentado, sin embargo se obtienen 70,000 unidades más en un cultivo en lote que en un cultivo alimentado, debido a que en el primero se obtiene mayor biomasa. Estos resultados nos indican que el proceso a elegir para la producción de la enzima, dependerá de la influencia del costo de la fuente de carbono en el costo de la producción de la enzima y de la facilidad en la operación y control de cada uno de los procesos en escalas mayores.

Conclusiones.

A través de los estudios, se observa que la producción específica de β -galactosidasa en células de levadura, no tiene una relación directa con la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo, ni con el estado metabólico de la célula, ya que fué posible obtener células con una actividad específica de 3500 U/g al final de procesos sin limitación de oxígeno ($k_{la} 320 h^{-1}$) así como al final de procesos con limitación de

oxígeno y un estado fermentativo de la célula ($k_{la} 13 \text{ h}^{-1}$). Esto nos indica que es posible manejar de manera independiente los parámetros que determinan la producción de la enzima y que son, la actividad específica y la obtención de biomasa, pudiendo optimizar la producción de la enzima de una manera más eficiente.

En los estudios se muestra que un parámetro de control en la producción o actividad específica, es la velocidad específica de consumo de la lactosa q_s . Así cuando esta velocidad es cercana a 1 (g azúcar/g célula h) la actividad específica tiende a incrementarse tanto en un cultivo en lote como en un cultivo alimentado, mientras que cuando el valor del q_s es mayor a 2 la actividad tenderá a decrecer; por lo que si se desea obtener células con una alta actividad específica es importante tratar de controlar el q_s durante el proceso, en un valor cercano a 1 (g azúcar /g célula h). Una explicación posible a este fenómeno es que cuando la célula consume los azúcares a bajas velocidades, éstos están disponibles en el interior de la célula para actuar como efectores en la regulación de la producción de la enzima antes de ser utilizados por la célula como fuente de carbono y energía.

Estos estudios explican la controversia con respecto a la composición del medio de cultivo y su relación con la producción de la enzima, así como la relación de ésta con la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo. La disponibilidad de oxígeno en un cultivo influye en la velocidad de consumo de los azúcares (siempre y cuando esta no sea controlada artificialmente) a su vez la composición del medio influye en la disponibilidad del oxígeno en el medio ya que de esta composición depende su solubilidad; por ejemplo en los estudios realizados se determinó, que la solubilidad del oxígeno en un medio químicamente definido o a base de lactosa es del 90% de su valor en agua mientras que en el medio a base de suero esta es del 45% con respecto a agua, lo que nos indica que si utilizamos ambos medios bajo las mismas condiciones de operación, la disponibilidad de oxígeno en cada uno de ellos será diferente.

Los resultados de este trabajo también podrían explicar la relación entre la velocidad de transferencia de oxígeno y la producción de otras proteínas en donde los efectores que regulan la producción de la enzima también son fuente de carbono y energía, tal es el caso de la proteína híbrida β -galactosidasa-cadena b de insulina (Galindo y colaboradores,

1990) y de la penicilino amidasa (Casas, 1981), ambas proteínas producidas por *E.coli* en donde los efectores y fuente de carbono y energía son la lactosa y el ácido fenilacético respectivamente.

Referencias.

- 1.- Casas T.L. (1981). Producción del ácido 6-APA por hidrólisis enzimática de la penicilina-G. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM, México.
- 2.- Dickson R.C and Barr K. (1983). Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 154(3): 1245-1251.
- 3.- Dickson R.C and Rile M. (1989). The lactose-galactose regulation of *Kluyveromyces lactis*. Molecular genetics of galactose metabolism in yeast. 19-41.
- 4.- Frankel D.G. Molecular Biology of the yeast *Sacharomyces*: Metabolism and gene expression. Strathern J.N. Jones E.W. and Broach J.R., Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982).
- 5.- Galindo E. Bolívar F. and Quintero R. (1990). Maximizing the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. J. Ferment. and Bieng. 69(3): 1-6.
- 6.- García M. Torres J. López-Munguía-Canales A. and Casas L.T. (1987). Influences of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol. Letters. 9(6): 417-420.
- 7.- Mahoney R.R. Nickerson T.A and Wtaker J.R. (1975). Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci. 58 (11): 1620-1629.
- 8.- Özilgen M. and Ogryziak D. (1988) Kinetics of batch fermentation with *Kluyveromyces fragilis* Enzyme Microb. Technol. 10: 165-172.
- 9.- Quintero R. (1981). Balance de materia y energía en fermentación. Ingeniería Bioquímica Teoría y aplicaciones. pp 225, Editorial Alhambra Mexicana, S.A.
- 10.- Summer J.B. and Howell S.F. (1935). A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. (108): 51-53.

Escalamiento del proceso de producción de la lactasa en células de *K. fragilis*.

Escrito elaborado para la presentación de este documento.

RESUMEN

Se realizaron estudios con respecto al escalamiento del proceso de producción de la lactasa en células de *K. fragilis*. Con el objeto de observar como afectaba el cambio en la hidrodinámica del sistema, en la producción de la enzima, se utilizaron unidades con una geometría diferente y equipadas con diferentes tipo de impulsores, en escalas de 14, 130 y 500 l, utilizando el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) como criterio de escalamiento. Para esto se desarrolló una correlación empírica, variando en rangos muy estrechos las condiciones de aireación y agitación, con el objeto de obtener una correlación que pudiese predecir variaciones pequeñas de transferencia de oxígeno. Los resultados muestran que el criterio es adecuado, que la correlación desarrollada es una herramienta útil para el escalamiento del proceso y que el cambio en la hidrodinámica del sistema no afecta la producción de la enzima.

Introducción.

Para poder establecer un proceso a nivel de producción, se requiere de una serie de estudios que van desde los básicos que explican los fundamentos del fenómeno, hasta el estudio de disponibilidad de materias primas, de servicios e instrumentación. Todos éstos necesarios para su mejor control.

Uno de los problemas de mayor importancia, es precisamente el establecimiento del proceso en diferentes escalas, para lo cual es necesario determinar un criterio de escalamiento, con el objeto de garantizar la mayor eficiencia de un proceso (en términos de rendimientos y productividad) independientemente de la escala, para asegurar su economía a escala industrial

Los volúmenes de las escalas se definen dependiendo del proceso y del mercado. En procesos de fermentación se acepta, que una escala piloto es aquella en donde se manejan volúmenes de 200 a 500 l (Johannes y Mooyman, 1987) en esta escala se establecen las bases para el escalamiento a nivel industrial, y el predecir resultados a escala de

producción basandose en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio o en planta piloto, requiere de un análisis cuidadoso de las variables fisicoquímicas como biológicas del proceso (Quintero, 1981).

Lo ideal sería poder conservar una similitud, geométrica, química, hidrodinámica, etc del proceso, en las diferentes escalas. Sin embargo, esto es imposible ya que por un lado el cambio de escala, implica al menos cambios físicos en el proceso que pueden o no tener implicaciones en los fenómenos biológicos y por otro, la limitación económica en el costo del equipo junto con la disponibilidad del equipo en escalas de producción.

Por ejemplo tenemos que la similitud geométrica es muy difícil de conservar conforme la escala se incrementa, las relaciones de diámetro del tanque vs altura del tanque de un fermentador a nivel laboratorio no corresponden a los tanques en plantas de producción, así como el rango de velocidad en las que pueden ser operados los motores. Aunque hubiese una similitud geométrica en los dos tanques hay que considerar que en un tanque pequeño se tiene: una mayor capacidad de bombeo, un menor tiempo de mezclado, una mayor velocidad de corte promedio y un menor rango de esfuerzo de corte (Oldshue, 1983).

La operación de una planta de producción debe de ser rentable, por lo que los parámetros de diseño a considerar reflejan la economía basada en los costos de inversión, mantenimiento, instalación y vida de operación de ésta. Así pueden haber varias alternativas de potencia, velocidad, diámetros de impulsores que cumplan con las mismas especificaciones de mezclado y la decisión de utilizar una u otra dependerá del costo.

En un tanque, la fuerza que se aplica para obtener un buen mezclado, es la fuerza inercial y está determinada por la elección del diámetro y velocidad del impulsor (Oldshue, 1983). En adición hay tres fuerzas que se oponen a la fuerza que se aplica y se determinan por la viscosidad, la gravedad y tensión superficial. Para conservar la similitud dinámica en el tanque piloto como en el de producción, se requiere que en el escalamiento se conserve esta misma relación de fuerzas, pero en el mejor de los casos si tenemos el mismo fluido solo se conservaran dos de las fuerzas, las que corresponden a la viscosidad y a la densidad. Por ejemplo en algunos de los procesos de fermentación el

cambio de la viscosidad del fluido a través del proceso cambia en forma importante debido al crecimiento de los microorganismos como los hongos o a la producción de algunos metabolitos como los polisacáridos. Así en términos de diseño y reproducción del proceso mismo en diferentes escalas, es muy importante estudiar en escala piloto como responde el proceso a cambios a la hidrodinámica de este, por lo que se sugiere realizar estudios con diferentes tipos de impulsores (Oldshue, 1985).

El examen de la velocidad física o criterio de uniformidad de un proceso puede ser tratado con números adimensionales, sin embargo hay que aclarar que esta uniformidad nada tiene que ver con una reacción química o de transferencia de masa. En procesos de fermentación además de considerar todos los aspectos físicos de un fluido, también hay que tomar en cuenta las reacciones químicas, eventos moleculares que se llevan a cabo, así como la transferencia de nutrientes del medio a los microorganismos. En estos procesos la relación entre los aspectos físicos y biológicos es muy compleja por lo que no hay mediciones adecuadas que puedan ser representadas a través de números adimensionales, utilizándose otros criterios.

Los criterios de escalamiento que a la fecha han sido utilizados con mayor éxito son: potencia por unidad de volumen, tiempo de mezclado, coeficiente de transferencia de masa (kla) y velocidad de la punta del impulsor. El uso de estos criterios es indiscriminado y generalmente se aplican de una manera empírica sin considerar o conocer el paso limitante en la obtención de un producto.

La transferencia de oxígeno ha sido estudiada por diversos autores. De éstos trabajos se han derivado diferentes correlaciones, cuyas fórmulas generales son:

La primera en función de la potencia por unidad de volumen y velocidad de aireación como:

$$kla = f_2 (P/V, V_{ag} \dots \dots \dots) \dots \dots \dots (1)$$

y una segunda derivada de los trabajos de Calderbank, Miller, y Titton (Johannes, 1987)

$$kla = (1\phi + 2\log(P_m/V)\phi) \phi \dots \dots \dots (2)$$

en donde ϕ es igual a la fracción de volumen desplazada por la

aireación y Pm/V , a la potencia mecánica efectiva por unidad de volumen.

Las correlaciones más utilizadas, son las expresadas en la fórmula general No 1, y las más citadas se enumeran en la Tabla 1 y una comparación de los resultados predichos por éstas se presenta en la Tabla 2.

Tabla 1. Correlaciones para transferencia de oxígeno en fluidos newtonianos.

Correlación	Comentarios	Ref
(A) $kla = 22.93 (Pg/V)^{0.53} (Vs)^{0.67}$	No considera factores geométricos ni reológicos.	Cooper (1944)
B) $kla = 0.519 (Pg/V)^{0.4} Vs^{0.5} N^{0.5}$	Los mismos comentarios que para la correlación de Cooper.	Richards (1961)
C) $kla = (57 (2+2.8Nl) (Pg/V)^{0.56} (Vs)^{0.7} N^{0.7}) 10^{-3}$	El número de impulsores tiene un efecto muy pronunciado difiere considerablemente de otras correlaciones.	Fukuda (1968)

*Las correlaciones se presentan como fueron citadas en Dynamic Modelling of Fermentation Systems por M.L. Shuler (Comprehensive Biotechnology, Vol. 2. 1985).

Tabla 2. Coeficiente volumetrico de transferencia de oxígeno predicho por las correlaciones presentadas en la Tabla 1.

Pg/V (Hp/m^3)	Vs ($cm\ min$)	N (min^{-1})	Nl	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (hr^{-1})		
				A	B	C
0.18	34.33	200	3	99	21.66	110
0.603	34.33	300	3	187.5	43	287
1.44	19.5	400	3	203.62	53	385
4.18	34.33	570	3	523.26	128	1333

Como podrá observarse existen discrepancias importantes entre ellas; las diferencias presentadas, han sido explicadas en base a diferentes aspectos, como son: la metodología usada, el uso de unidades pequeñas para su determinación así como su geometría.

En la literatura también se ha mencionado que una posible causa de esta discrepancia es que estas correlaciones no contemplan las propiedades reológicas del líquido (Kawase y M. Moo Young 1988). Recientemente, Kawase y Moo-Young, 1988 han presentado una correlación para fluidos newtonianos y no newtonianos en donde se contemplan propiedades reológicas tales como, viscosidad, tensión superficial, el índice de consistencia y el índice de flujo de la ley de la potencia.

Todas estas correlaciones pueden ser tomadas como una guía en el diseño de fermentadores así como para el escalamiento de procesos. Sin embargo no se puede afirmar que exista una correlación que pueda ser aplicada en forma universal, así a pesar de todos los problemas, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_L a$, es el parámetro que establece la capacidad de transferencia de oxígeno de un sistema; por otro lado el desarrollo de correlaciones empíricas particulares a un proceso determinado adquieren una gran justificación.

La producción de la lactasa o β -galactosidasa en levaduras ha sido relacionada con la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) Mahoney, 1975. En estudios iniciales realizados en el CEINGEBI, U.N.A.M. por Javier Torres, se observó que en un medio químicamente definido en unidades de fermentación de 2 y 14 lts la actividad específica (U/g) obtenida al final de la fermentación, variaba al cambiar las condiciones iniciales de agitación y aireación. Con el objeto de poder relacionar la producción de la enzima con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se echó mano de las correlaciones antes mencionadas y de una determinada por Sagal y colaboradores, 1983; en agua con lones en un tanque de 25 lts. Sustituyendo las condiciones de operación en éstas, se obtenían valores muy diferentes de $k_L a$.

Debido a la relevancia que presentan los estudios de escalamiento para el establecimiento del proceso de obtención de la lactasa en niveles

de producción, se decide dar los elementos suficientes para el posterior diseño de una planta. Así en base a los estudios previos, se decide estudiar la posibilidad de utilizar el k_{la} constante como criterio de escalamiento y observar como afecta el cambio en la hidrodinámica del sistema en la producción de la enzima. Para ello se desarrolló y evaluó una correlación empírica y se estudio el proceso de producción de la enzima en tanques con diferente geometría y tipos de impulsores.

Materiales y Métodos

Microorganismo: *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y1109. Medio de cultivo: Suero de leche, 6.6% (equivalente a 5% de lactosa); extracto de levadura, 0.75%; $(NH_4)_2SO_4$, 0.84%; $MgSO_4$, 0.05%; H_3PO_4 , 1 ml/l; pH 6.6 ajustado con KOH.

Propagación: Los inóculos para las jarras de 14 litros se crecieron en matraces Fernbach de 2800 ml a 29°C y 200 rpm en una incubadora con agitación rotatoria (New Bruswick Co.). Como inóculo para las fermentaciones de 130 y 500 litros se utilizaron células crecidas en las jarras de 14 litros a 29°C, 200 rpm y 0.2 vvm.

Unidades de fermentación. Se utilizaron unidades de fermentación con capacidad nominal de: 500l ($HL/Dt = 1.36$), 130l ($HL/Dt = 1.77$) y 14l ($HL/Dt = 1.36$) operadas con volúmenes de trabajo de 350, 100 y 10l respectivamente. En los diferentes estudios éstas fueron equipadas con turbinas Rushton con relaciones de $D_i/D_t = 1/3$ y $D_i/D_t = 1/2$ y una propela marina $D_i/D_t = 1/2$.

Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno k_{la} . Este se obtuvo midiendo el k_{la} en agua a través del método dinámico de eliminación de gas reportado por Sobotka y colaboradores (1982).

Determinación de biomasa. Se utilizó una curva de peso seco como ha sido reportado por García y Colaboradores, 1987.

Permeabilización celular. Las células fueron tratadas con alcohol isoamílico por el método previamente reportado por García y colaboradores, 1987.

Determinación de actividad enzimática. Esta se determinó utilizando el orto-para-nitrofenil- β -galactosido (ONPG) como sustrato, como previamente lo reportó García y colaboradores, 1987. Una unidad de lactasa se define como: la cantidad necesaria de enzima para hidrolizar una μ m de ONPG por minuto en las condiciones dadas y la actividad específica se establece como las unidades de lactasa por gramo de célula.

Resultados

Establecimiento de una correlación para la predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{la}).

Se procedió a determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{la}) en un fermentador de 14 litros. Esta caracterización se llevó a cabo en agua por el método de eliminación de gas con sulfito (Sobotka y colaboradores, 1982) (ver materiales y métodos). Para su determinación se abarcó un amplio rango de condiciones de operación a través de variaciones muy estrechas entre cada una de ellas (Tabla 3) con el objeto de obtener una correlación que pudiese predecir variaciones pequeñas de transferencia de oxígeno, es decir que presentara la característica de ser muy sensible a la capacidad de transferencia de oxígeno del sistema, de tal forma que pudiese aplicarse en procesos que se viesen afectados por pequeñas diferencias en la velocidad de transferencia de oxígeno y como herramienta en el escalamiento de éstos.

Tabla 3. Parámetros evaluados en la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

RPM	VVM	KLa(H ⁻¹)
200	0.2	10.0
	0.4	18.3
	0.8	22.6
	1.4	32.4
300	0.2	48.6
	0.4	51.4
	0.8	68.7
	1.4	83.8
400	0.2	67.6
	0.4	97.2
	0.8	133.2
	1.4	223.2
570	0.2	93.6
	0.4	169.2
	0.8	237.6
	1.4	295.2

En la figura 1, se muestran el conjunto de curvas logarítmicas y exponenciales que se obtienen, para las condiciones probadas.

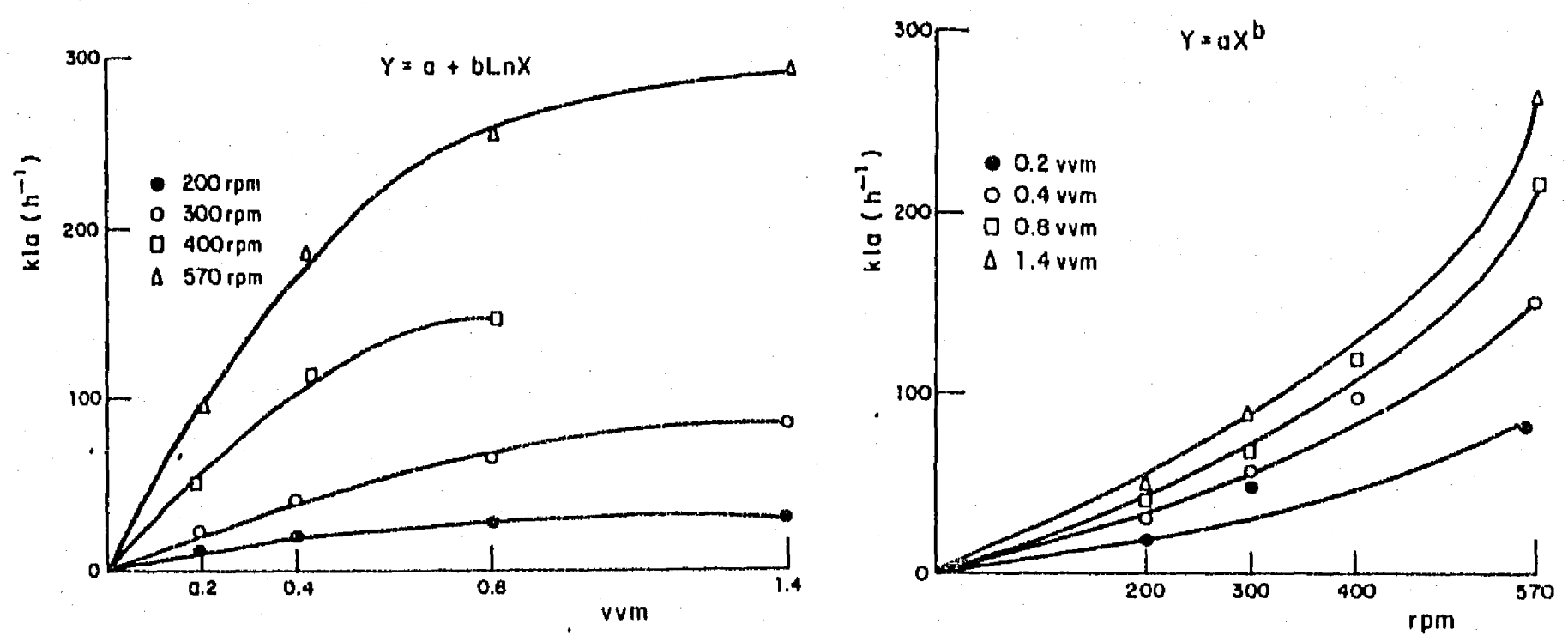


Figura 1. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en función de rpm y vvm, en jarras de 14 l.

La expresión que se obtiene de éstos datos es:

$$k_{la} = 3.319 \times 10^{-4} (\text{RPM})^{2.16} (\text{VVM})^{0.51}$$

La correlación así expresada no puede ser utilizada como herramienta para el escalamiento de un proceso, ya que el k_{la} que predice está en función de las variables de operación y no de los parámetros de diseño como potencia por unidad de volumen y velocidad de aireación, que son los que finalmente determinan la capacidad de transferencia, en éste caso de oxígeno en un tanque.

Lo mejor para la determinación de potencia en un tanque es el uso de un dinamómetro, sin embargo este equipo es poco común en plantas y unidades de laboratorio por lo que Oldshue (1983), comenta que ésta puede ser calculada adecuadamente a través de la relación entre el número de potencia (N_p) y el Reynolds (Re) para cada tipo de impulsor. Las correlaciones reportadas en la literatura están en función de parámetros de diseño como P_g/V y la mayoría de estas han sido calculados teóricamente a partir de las condiciones de operación. Así la correlación anterior fue transformada en función de P_g/V y V_s , quedando de la siguiente forma:

$$k_{la}^* = 24.2 (P_g/V)^{0.72} (V_s)^{0.51}$$

Esta transformación se realizó a partir de los valores de agitación y aireación de la tabla 3. El cálculo de P_g (potencia gaseada) se calculó de la siguiente manera:

Primero se calculó N_{re} a partir de la fórmula $\frac{nD^2cP}{\mu}$ posteriormente, se calculó el valor de la potencia, P_o a partir de la fórmula

$$P_o = \frac{\rho n^3 D_i^5 N_p}{gc}$$

el valor de N_p se obtuvo a partir de su relación con el número de Reynolds para el tipo de impulsor en cuestión (Aiba, 1973). Posteriormente el valor de P_g se obtiene de la relación P_g/P_o y el número de aireación (Na) (Ohyama, y Endoh, 1955) en donde el valor de Na se calcula a partir de la fórmula

$$Na = \frac{F}{n D_i^3}$$

una vez calculada la potencia se multiplica por el número de

impulsores utilizados (cuando se trata de impulsores del mismo tipo), en el caso de que se utilicen diferentes tipos de impulsores, (como turbina rushton y 1 propela marina) se calcula la potencia para cada uno de ellos y posteriormente se suma.

En lo sucesivo los valores de kla utilizados en el escalamiento serán calculados a través de esta correlación, por lo que éstos se refieren a la capacidad de transferencia de oxígeno del equipo en agua.

Obtención de la lactasa a diferentes valores de kla .

Como ya se ha mencionado con anterioridad en este mismo documento, la actividad específica de la enzima que se obtiene al final de un proceso en lote se relaciona con el kla en el que se opere, tanto en un medio químicamente definido como en un medio a base de suero, solo que en el primero, en donde la solubilidad del oxígeno es mayor se obtiene una actividad específica menor de 2000 U/g, mientras que en el segundo, un medio más complejo en donde el oxígeno es menos soluble, ésta puede llegar a ser de 4000 U/g. Con el objeto de comprobar la relación de la actividad específica con el kla , se procedió a producir la lactasa en un medio a base de suero de leche, en unidades de 14 l, pero en un rango más amplio de kla que el antes ensayado. En la tabla 4 se muestra la actividad específica y la concentración de enzima obtenida al final de cada uno de los procesos.

Tabla 4. Actividad específica y concentración de lactasa obtenida en procesos en lote realizados en unidades de 14 l a diferentes valores de kla .

kla (h^{-1})	Biomasa (g/l)	Act. Esp. (U/g)	Concentración de Enzima (U/l)
320	11.6	2500	29000
240	9	2800	25200
136	9	3800	34200
70	7	4000	28000
36	6.5	3800	24700
13	5.5	4000	22000

Como puede observarse la actividad específica de lactasa es menor conforme se incrementa el valor de kla , así tenemos que a kla de 320 h^{-1} , se obtiene una actividad específica al final de la fermentación de

2500 U/g mientras que a valores de kla de 9 a 136 h^{-1} este valor es de 4000 U/g.

Evaluación de la correlación desarrollada y establecimiento de las condiciones de operación en diferentes escalas.

Con el objeto de evaluar la correlación desarrollada y poder establecer las condiciones de operación para realizar los estudios de escalamiento del proceso de producción de la enzima, se procedió a calcular los valores de potencia gaseada (P_g) y velocidad de aireación (V_s) para fermentadores con diferente relación geométrica y equipados con diferente tipo de impulsores, en escalas de 14, 130, y 500 l. Los valores de kla ensayados fueron de 13 y 136 h^{-1} ya que en estas condiciones: se obtiene una alta actividad específica, en el último se obtiene la mayor concentración de enzima (U/l), además de catalogarlos como de valores bajos de kla , y por tanto difíciles de escalar.

Los valores de P_g/V como de V_s establecidos estuvieron en función de las limitaciones del equipo. Una vez establecidas las condiciones de operación se procedió a verificar el valor del kla^* a través del método dinámico de eliminación de gas. En la tabla 5 se muestran las condiciones de operación y los valores de kia predichos así como los determinados experimentalmente.

Tabla 5. Establecimiento de las condiciones de operación y evaluación de la correlación desarrollada en unidades en diferentes escalas.

Escala (l)	P_g/v (Hp/m ³)	rpm	V_s (M/h)	vvm	kla^* (h^{-1})	
					esperado	medido
14 [*]	0.18	200	2.9	0.2	13	9.5
14 [*]	1.9	400	12	0.8	136	128
130 [*]	0.145	235	4.6	0.1	13	16
130 [*]	3.66	440	4.6	0.1	136	130
130 ^{**}	3.66	235	4.6	0.1	136	128
500 ^{***}	1.0	140	27.2	0.5	136	135

^{*} 3 Turbinas Rushton $D_1/D_t = 1/3$

^{**} 2 Turbinas Rushton, 1 Propela Marina $D_1/D_t = 1/2$

^{***} 2 Turbinas Rushton $D_1/D_t = 1/2$

Los valores de k_{ia} esperados y medidos son muy similares. Los resultados concuerdan con lo reportado por Smith (1985), con respecto a la relación de la potencia por unidad de volumen con el k_{ia} , en fluidos newtonianos, para diferentes tipos de impulsores. Esto quiere decir, que para una misma velocidad de aireación, es posible utilizar una propela marina o una turbina rushton con diferente diámetro para transferir la misma cantidad de oxígeno al medio, siempre y cuando se aplique la misma potencia. Esto es posible ya que la transferencia del oxígeno no depende de la hidrodinámica del sistema sino de la potencia disipada a través del impulsor.

Escalamiento del proceso de producción de la lactasa e influencia de la hidrodinámica del sistema en este.

Una vez establecidas las condiciones de operación, se procedió a verificar si el k_{ia} podía ser utilizado como criterio de escalamiento por lo que se procedió a producir la enzima en escalas de 130 y 500 l. Así, debido a que la concentración de lactasa al final de los procesos (U/l) depende de la actividad específica (U/g) y de la concentración de biomasa (U/l), se determinaron estos parámetros al final de cada uno de los procesos. En la figura 2 y tabla 6 se presentan la actividad específica y concentración de biomasa obtenida al final de cada uno de los procesos.

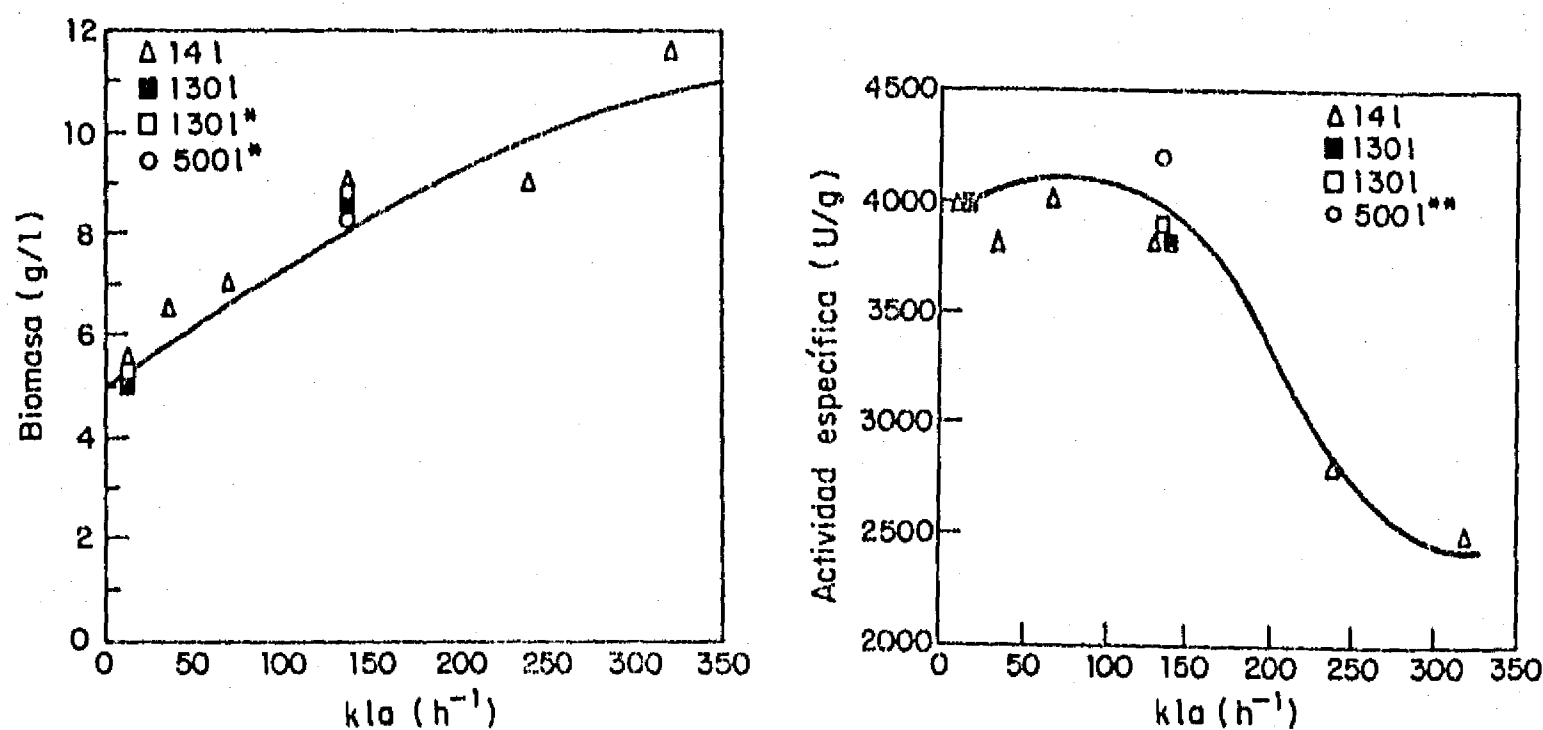


Figura 2. Actividad específica de lactasa y concentración de biomasa en función del k_{ia} a diferentes escalas.

Se puede observar que la tendencia en los diferentes valores de kla^* ensayados es la misma, independientemente de la escala y de la geometría del tanque. Estos resultados nos sugieren que el kla^* (kla con respecto a agua) puede ser utilizado como criterio de escalamiento.

Tabla 6. Producción de lactasa en células de levadura crecidas en diferentes escalas a un kla^* de 13 y 136 h^{-1} .

Escala (1)	kla h^{-1}	Biomasa final (g/l)	Act. Esp. final (U/g)	Conc. final de enzima (U/l)
14 [*]	13	5.5	4000	22000
130 [*]	13	5	4000	20000
14 [*]	136	9	3800	34200
130 [*]	136	8.6	3824	32886
130 ^{**}	136	8.8	3900	34320
500 ^{***}	136	8.7	4200	35700

* 3 Turbinas Rushton $Di/Dt = 1/3$

** 2 Turbinas Rushton y 1 propela marina $Di/Dt = 1/2$

*** 2 Turbinas Rushton $Di/Dt = 1/2$

Con respecto a la variación en la hidrodinámica del sistema podemos decir que no es un factor determinante en la obtención de la concentración final de la enzima. Por otro lado, con la correlación utilizada es posible establecer las condiciones de operación del proceso a pesar de las diferencias en la geometría del equipo utilizado en las diferentes escalas. Así, la producción de la enzima (U/l) fue muy similar en cada uno de los procesos.

Conclusiones.

Los estudios aquí realizados muestran que el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kla) constante, puede ser utilizado como criterio para el establecimiento del proceso de producción de la β -galactosidasa en células de *K. fragilis*, en diferentes escalas y equipos. Este valor de kla^* no corresponde al proceso, es un valor de referencia que nos permite establecer las condiciones adecuadas de

velocidad de transferencia de oxígeno. Al parecer estas condiciones iniciales, determinan las cinéticas de consumo de azúcar y de crecimiento por la célula que son las que definen la actividad específica y biomasa en el proceso. Con respecto a la influencia en la hidrodinámica del sistema se observa que cambios en ésta no afectan de manera importante en el resultado final del proceso.

Una herramienta útil para la adaptación de este proceso en equipos estándares con diferentes tipos de impulsores y geometrías, es el uso de la correlación aquí reportada ya que los valores predichos a través de ella fueron muy cercanos a los medidos experimentalmente.

Los resultados obtenidos en estos estudios fueron los esperados ya que, el sistema estudiado es un fluido newtoniano, en donde la viscosidad a través del proceso no cambia de manera importante, pudiéndose considerar constante. Esto permite utilizar la correlación desarrollada para la predicción del kla en agua, así como el uso de unidades con diferente geometría siempre y cuando se mantenga el valor de kla a través de las escalas.

Bibliografía.

- 1.- Biochemical Engineering. Alba S. Humphrey A.E. and Millis N.F. Academic Press, Inc. 1973 p. 171-178.
- 2.- Kawase Y. and Moo-Young M. 1988. Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with newtonian and non-newtonian media Chem Eng Res Des, 66:284-288.
- 3.- M. García-Garibay, L. Torres, A. López-Munguía-Canales and L.T. Casas (1987). Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology Letter Vol. 9 No. 6 417-420.
- 4.- Mooyman Johannes G.(1987). Scaling oxygen mass transfer in agitated fermentors. Biotechnology and Bioeng. vol. 29: 180-186.
- 5.- Ohyama, Y. and Endoh K. (1955). Power characteristics of gas-liquid contacting mixer. Chem. Eng. Progress. (Japan) 19,2.
- 6.- Ohyama, Y and Endoh K. (1955). Power characteristics of gas-liquid contacting mixer. Chem. Eng. Progress. (Japan) 19,2.
- 7.- Oldshue J. Y.(1983) Fluid Mixing Technology. Mc. Graw Hill Publications Co., New York, N.Y. capítulo II, III, IX y XIII.
- 8.- Oldshue J.Y.(1985) Current trends in mixer scale-up techniques. In Mixing of liquids by mechanical agitation. Edited by Jaromir J. Ulbrecht and Gary K. Patterson. Gordon and Breach Science Publishers.
- 9.- Quintero R.(1981). Escalamiento de Fermentaciones. Ingeniería bioquímica Teoría y Aplicaciones. pp. 97 Editorial Alhambra Mexicana, S.A.
- 10.-Salgal R., Salvador M. y Quintero R. Caracterización de un reactor biológico. Informe final, proyecto de Investigación.

- 11.- Sobotka M., Prokop A., Dunn I.J. and Einsele A. (1982). Review of Methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. In Annual Reports on Fermentation Processes. Vol. 5 Tsao G.T. (ed) New York. Academic Press.
- 12.- Smith J. (1985) Dispersions of gases in liquids. Mixing of liquids by mechanical agitation. Edited by Jaromir J. Ulbrecht and Gary K. Paterson. Gordon and Breach Science Publishers.

Inmovilización de células de *K. fragilis* en gelatina-entrecruzando con glutaraldehído.

Resumen

En los estudios que se presentan a continuación, se describe la obtención del biocatalizador a través de la inmovilización de células de *K. fragilis* atrapadas en gelatina. Los parámetros estudiados en la obtención del biocatalizador fueron: la relación óptima de gelatina vs células y tiempo de curtido, así como su estabilidad operacional. También se estudiaron los posibles problemas de transferencia de masa interna. Esta determinación se realizó observando los parámetros cinéticos aparentes y el factor de efectividad. Posteriormente en el trabajo titulado "Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects", se discute la relación entre el factor de efectividad y la concentración de sustrato, en el transcurso de la reacción.

Introducción.

Como se mencionó con anterioridad una desventaja que presentan las células inmovilizadas, es el problema de transferencia de masa. Este es más patente en el caso de la inmovilización por atrapamiento y agregados celulares ya que la enzima se encuentra en el interior del biocatalizador y el tamaño de los poros intraparticulares se ve disminuido por las mismas células (Brito y col. 1990).

En estos biocatalizadores, en estado estacionario la reacción ocurre simultáneamente a la difusión y en el interior de la partícula se establece un perfil de concentración de sustrato y producto diferente a la que se tienen en la superficie.

La existencia de limitaciones de transferencia de masa en el biocatalizador puede ser detectado en formas diversas tales como:

- 1) El aumento de la energía de activación aparente de la reacción.
- 2) Aumento considerable en el valor de la constante de Michaelis (K_m) aparente.

- 3) Disminución de la relación productividad/actividad cuando el contenido de las células se incrementa etc.

Los efectos de transferencia de masa interna se pueden cuantificar en términos de factor de efectividad η , el cual se define como la relación entre la velocidad observada y la velocidad sin problemas de transferencia de masa o de la enzima soluble. Así mientras el factor de efectividad sea mucho menor a la unidad mayores serán los problemas de transferencia de masa interna.

Una vez que el factor de efectividad ha sido definido, la ecuación de diseño para un reactor en lote puede considerarse como:

$$v_{obs} = - \frac{ds}{dt} = \eta \frac{K_E S}{K_m + S}$$

Los datos más confiables de η son los obtenidos experimentalmente, así para determinar la actividad enzimática en ausencia de problemas de transferencia de masa, se desintegra o reduce al máximo el biocatalizador.

A continuación se presentan los estudios de inmovilización de células de *K. fragilis*, atrapadas en gelatina así como su caracterización en términos de estabilidad y difusional.

MATERIALES Y METODOS**INMOVILIZACION DE CELULAS DE LEVADURA EN UN SOPORTE DE GELATINA.****Fundamento**

El método de inmovilización de células de levadura en un soporte de gelatina, se combina el atrapamiento con el entrecruzamiento permitiendo la formación de agregados celulares mayores que los que se obtendrían por un simple atrapamiento. El atrapamiento de las células se lleva a cabo en la matriz de gelatina a la que posteriormente se le da un tratamiento de curtido o entrecruzamiento con glutaraldehído. El glutaraldehído ha sido elegido como agente entrecruzante por ser un reactivo muy eficaz (Brodski J.A. 1986). El objetivo de este método es el de evitar el empleo de disolventes que dañen a las células. La reacción de entrecruzamiento se lleva a cabo entre el glutaraldehído y el soporte, principalmente y, en mínima proporción, con las células, por lo que la pérdida de actividad no es considerable.

Reactivos

Gelatina; buffer de fosfato, pH 6.6; 0.1 M células de levadura *K. fragilis* permeabilizadas con sales; glutaraldehído al 1.25%.

Procedimiento

Se pesan 0.4 g de gelatina y se disuelven en 18.4 ml de buffer a 50°C. Se enfría la solución a 37°C y se agregan 1.6 g de células de *K. fragilis* (peso seco) agitando vigorosamente para homogenizar. Se enfría la suspensión hasta 13°C-15°C y se vacía a una jeringa hipodérmica de 20 ml. Se extruye la mezcla de 200 ml de solución de glutaraldehído. Se deja reposar el extruido 15 minutos y después se agita lentamente hasta completar 40 minutos. Posteriormente se separan las fibras de gelatina formadas y se lavan en 100 ml de buffer, agitando lentamente durante 10 minutos. En seguida se mide la actividad enzimática.

MEDICION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA A CELULAS INMOVILIZADAS.**Fundamento.**

La medición de actividad enzimática en las células inmovilizadas, se basa en la hidrólisis del cromógeno ONPG a ONP (color amarillo) y su detección en solución a 410 nm con ayuda del espectrofotómetro mediante el uso de soportes con células inmovilizadas. Con este método es posible observar la eficiencia de la inmovilización de los soportes al detectar la salida de enzima hacia la mezcla de reacción.

Reactivos

Buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 6.6; solución 3.36 M de β -mercaptoetanol; solución 0.068 M de ONPG (pesar 20.5 mg en 1 ml de buffer y disolver calentando ligeramente); células de levadura permeabilizadas con sales (INF; ONUDI; SEP. 1988).

Procedimiento

El método para medir la actividad enzimática, en biocatalizadores con células de levadura utilizando diferentes soportes, se realiza llevando a cabo los mismos procedimientos que con células de levadura permeabilizadas con sales, variando solamente el volumen original de la mezcla de reacción de 3 ml a 42 ml y muestreando cada 4 minutos. La eficiencia de la inmovilización se evalúa determinando la cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción. Se toman 5 ml de mezcla de reacción cada 4 minutos; se divide en 2.5 ml colocándose en tubos diferentes. Con el objeto de comprobar si existe enzima liberada del soporte en la mezcla de reacción, uno de los tubos se coloca en un baño a ebullición durante 5 minutos a fin de detener la reacción enzimática. Esto, con el propósito de compararla con el otro tubo donde no se detiene la reacción. Posteriormente a los dos tubos se les determina la aparición del color amarillo, resultado de la hidrólisis del ONPG, a 410 nm. Si no existe enzima en la mezcla de reacción no se presentará desarrollo de color.

DETERMINACION DEL FACTOR DE EFECTIVIDAD.

La estimación experimental del factor de efectividad se llevó a cabo comparando las velocidades de reacción entre la fibra íntegra y la fibra previamente molida. En ambos productos, la actividad fué medida usando lactosa como sustrato a un pH 6.6 y 37°C. El factor de efectividad fué definido como la relación entre la velocidad de reacción de la fibra íntegra y la fibra molida.

Se varió la carga celular de las fibras de gelatina manteniendo constantes los demás componentes de la formulación (Tabla 1).

Lote	1	2	3	4
gramos de células	0.6	2.5	3.2	3.5
gramos de sólidos en el soporte	2.54	4.44	5.14	5.44

RESULTADOS

Una vez desechada la inmovilización de las células en acetato de celulosa y habiendo probado la inmovilización en albumina entrecruzando con glutaraldehído, el soporte elegido fué el de gelatina (Sección de Metodología) con el uso de glutaraldehído como agente entrecruzante. La gelatina es una proteína más barata y disponible.

Se realizó un barrido de concentración celular para definir la máxima capacidad de atrapamiento de la matriz de gelatina. (Tabla 2). Los resultados muestran que la máxima concentración de células que se pudo inmovilizar sin que hubiese salida de la enzima fué de 4.8 g en 0.6 gr de gelatina.

TABLA 2. EVALUACION ACTIVIDAD ENZIMATICA DE UN BIOCATALIZADOR ELABORADO CON FIBRA DE GELATINA Y 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, reportado en metodología.

Se eligió la condición de inmovilización de 4.8 g de célula porque presentaba la mayor actividad enzimática. Al efectuarse las lecturas de densidad óptica de los tubos testigo se observó que ambas lecturas (tubos testigo y cinética de reacción) fueron iguales es decir no hubo salida de enzima.

Una vez optimizada la carga celular a inmovilizar, se procedió a optimizar el tiempo de reticulación con glutaraldehído. 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 periodo mayor de 30 minutos, puesto que las otras presentaron poca consistencia en su estructura. En la tabla 3 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%

TABLA 3. OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE CURTIDO DEL BIOCATALIZADOR.

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

Los tiempos de curtido obtenidos fueron bastante aceptables si se considera que el proceso se piensa escalar, éstos son suficientes para poder manipular volúmenes más grandes de biocatalizador. Por otro lado la actividad enzimática que se obtuvo es mayor a 200 U/g que fué la actividad establecida como mínimo al inicio de los estudios (ver las secciones de introducción y objetivos). Estas características hacen al biocatalizador bastante atractivo para su aplicación, por lo que se realizó una evaluación de la potencialidad de reutilización, probándolo en la hidrólisis de soluciones de lactosa y de suero de leche. La evaluación se realizó en lotes de hidrólisis durante 8 días, muestreando cada 24 h. (Figura 1). La actividad enzimática se mantuvo constante durante todo el experimento, además se lograron conversiones de 63% para suero dulce y de 72% para lactosa. En el experimento anterior no se tomaron en cuenta factores tales como las constantes cinéticas, relación enzima-sustrato, etc. porque el interés principal era de probar la estabilidad operacional del biocatalizador.

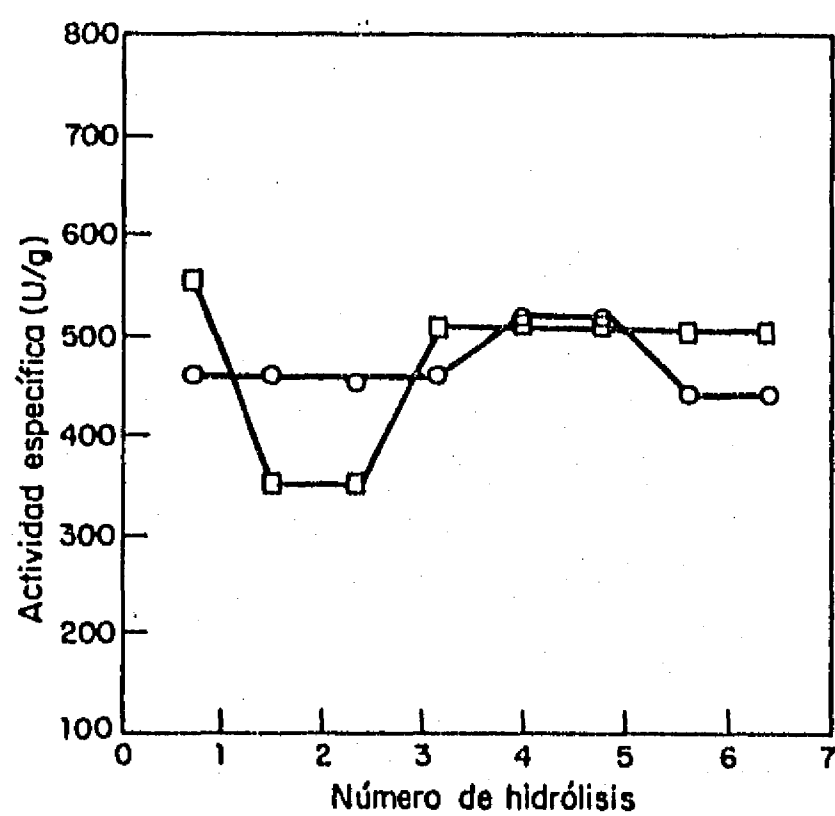


Fig. 1. Estabilidad operacional del biocatalizador con actividad de lactasa, en la hidrólisis de la lactosa en suero (□) y soluciones de lactosa (○) a 37°C, en un matraz agitado en lotes de 24 horas.

Evaluación de los parámetros cinéticos aparentes y ajuste a modelos reportados en la literatura.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se fijó una cantidad conocida de biocatalizador (0.035 g peso húmedo, 80% humedad) y se realizó un barrido de concentraciones del sustrato lactosa de 5 mM a 201 mM. Se evaluaron las diferentes velocidades de reacción, así como actividad específica del biocatalizador (unidades/gramo de biocatalizador).

Los datos experimentales se procesaron con el fin de obtener los parámetros cinéticos, a través de la linearización de los datos, se graficó de acuerdo a los siguientes modelos: Line Weaver-Burk; Hanes Wolf; Wolf-Agustinsson-Hofstee; Eadie-Scatchard.

El objetivo fue encontrar aquel en el que se tuviera la mejor correlación y que proporcionara mayor fidelidad de las constantes cinéticas. En la tabla 4 se presentan los datos experimentales procesados.

TABLA 4. DATOS EXPERIMENTALES MODIFICADOS PARA CARACTERIZACION CINETICA.

S(mM)	V(U/g)	1/S(mM) ⁻¹	1/V(U/g) ⁻¹	S/V mM(U/g) ⁻¹	V/S(U/g)mM ⁻¹
5	30	.200	.0333	.1666	6
10	42	.100	.02381	.2380	4.2
16	109	.0625	.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	.0111	.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

Con los datos modificados se construyen las siguientes figuras:

Tipo de gráfica	se grafica	Figura #
Lineweaver-Burk	$1/V$ VS $1/[S]$	2
Hanes-Wolf	S/V VS $[S]$	3
Wolf-Agustínsson-Hofstee	V_v VS $[S]$	4
Eddie-Scatchard	$[S]$ VS V	5

y que se ilustran en las figuras anotadas.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , así como la correlación que presentan estas gráficas. Como se puede observar el método de linearización que presenta mejor ajuste con los resultados obtenidos es el método de Lineweaver-Burk. Por lo que los valores escogidos de V_{max} y K_m serán: 525 μ moles de glucosa/minutos y 87 mM respectivamente. Estos valores serán tomados con reserva ya que los coeficientes de correlación obtenidos por los otros métodos y el valor de K_m tan alto con respecto a la enzima soluble (14-24 mM), son indicativos de problemas de transferencia de masa en el biocatalizador tan comunes en sistemas con células inmovilizadas.

TABLA 5. RESULTADOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES REPORTADOS PARA LINEARIZACION DE DATOS CINETICOS.

Parámetro	Coficiente de correlación	K_m	V_{max}
Lineweaver-Burk	0.97	87	525
Hanes-Wolf	0.083	120	671
Wolf-Agustínsson-Hofstee	0.62	65	482
Eadie-Scatchard	0.62	166	870

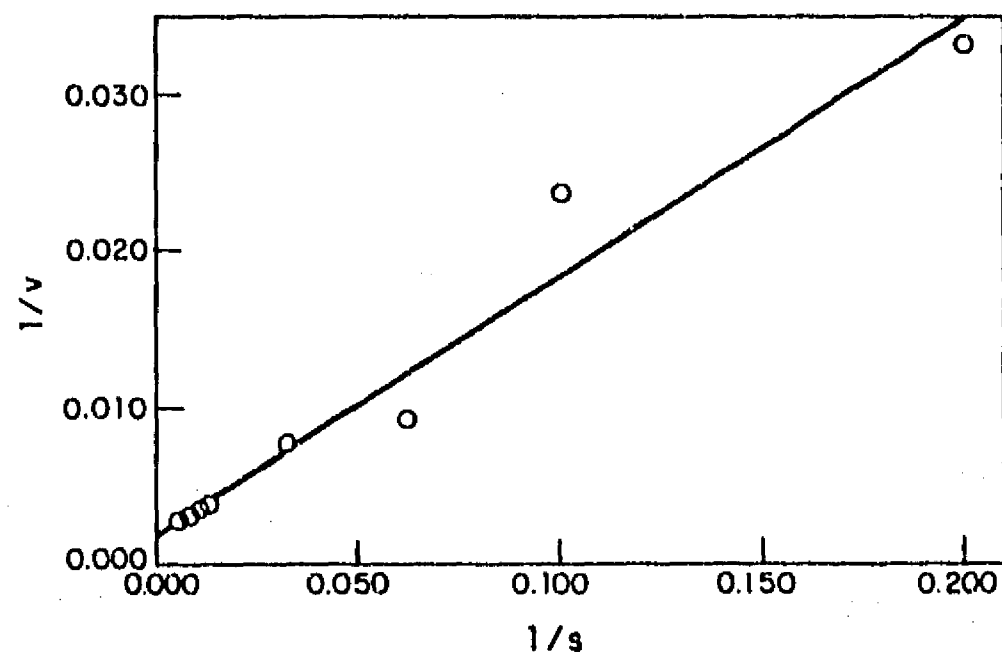


Fig. 2. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Lineweaver-Burk.

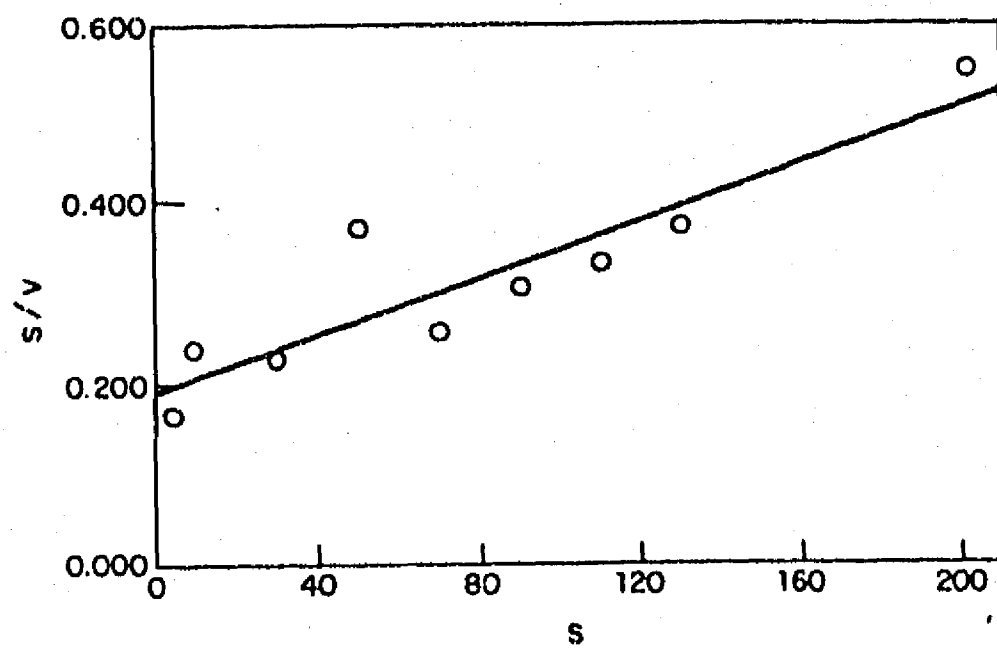


Fig. 3. Linearización de la ecuación de Michaelis Menten según el modelo de Hanes-Wolf.

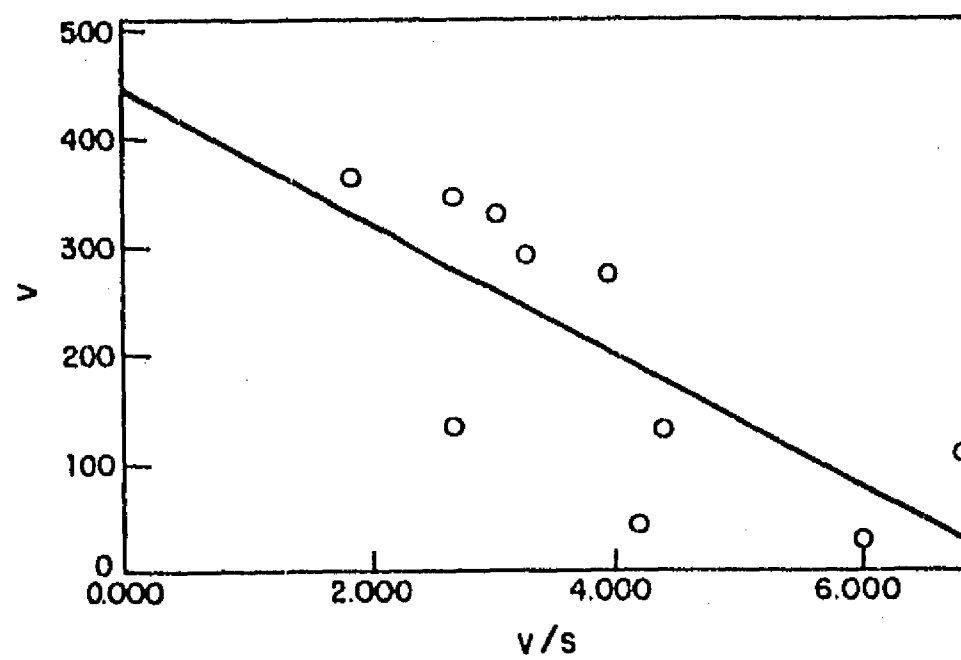


Fig. 4. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Wolf-Agustnsoon Hofstee.

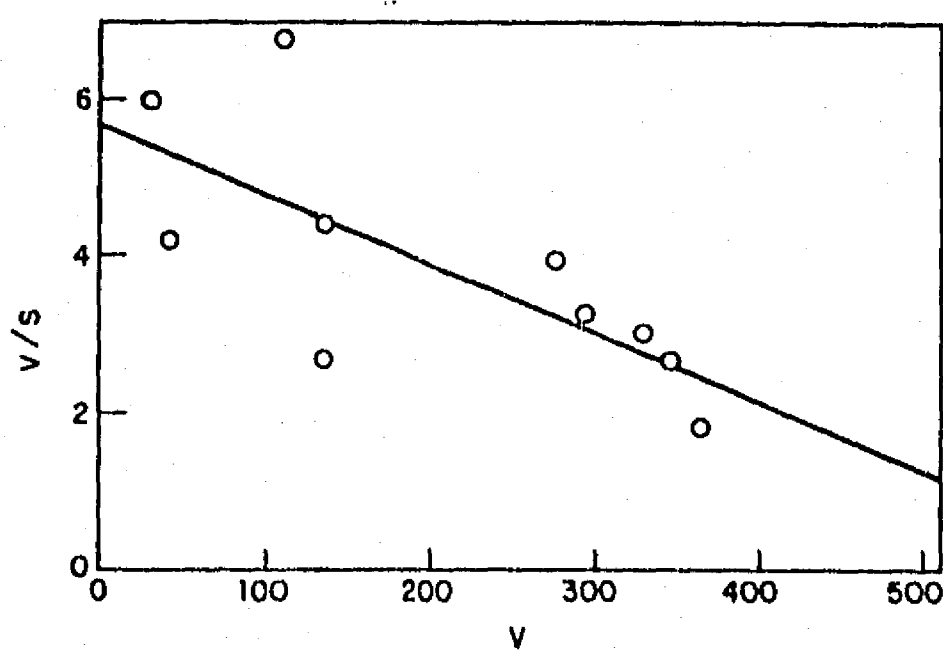


Fig. 5. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Eadie-Scatchard.

Efecto de la concentración de galactosa sobre la actividad del biocatalizador.

Otro parámetro evaluado fué el efecto de la galactosa en la actividad enzimática. En la tabla 6 se presenta el porcentaje de inhibición en presencia de diversas concentraciones de galactosa. La velocidad de hidrólisis de lactosa se ve inhibida solo en un 47% en presencia de 150 mM de galactosa, esta misma concentración de galactosa inhibe hasta en un 60% la reacción, cuando se trabaja con la enzima libre (Malacara, 1990).

Tabla 6 Efecto de la galactosa sobre la actividad de la lactasa

Concentración de galactosa mM	Actividad enzimática U/G	Inhibición %
0	444	0
50	364	16.5
100	340	22.5
150	233	47

En la figura 6 se muestra el efecto de la galactosa en la actividad de la lactasa inmovilizada. La galactosa se comportó como inhibidor de tipo competitivo y la constante de inhibición (k_i) calculada por el método de Lineweaver-Burk fué de 220 mM. Una vez más el valor tan elevado de la constante nos indica problemas de transferencia de masa internos.

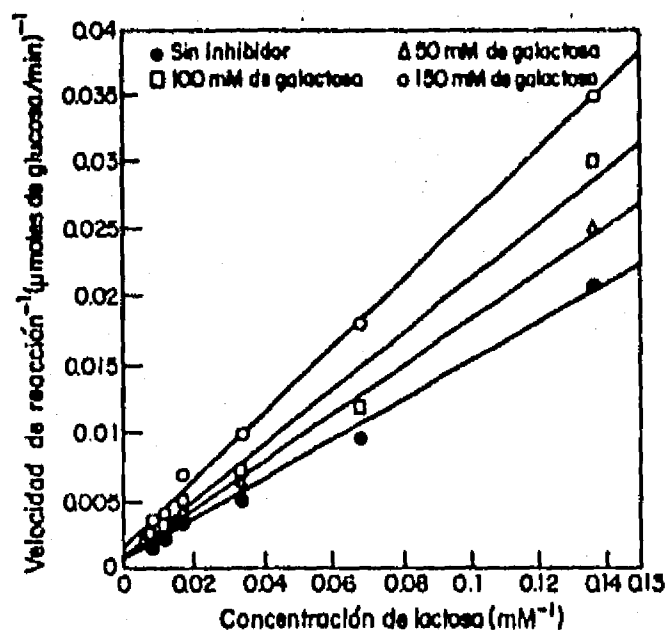


Fig. 6. Efecto de la concentración de galactosa sobre la velocidad de hidrólisis de la lactosa en suero.

Identificación y cuantificación de la resistencia a la transferencia de masa interna en el biocatalizador.

Con el objeto de observar si el control de la reacción en las fibras es cinético o difusional, se determinó el factor de efectividad en las fibras elaboradas con diferentes cargas de células (ONUDI, enero 1989). En la tabla 7 se muestra dicha variación, así como los factores de efectividad obtenidos. El factor de efectividad se calculó como sigue:

$$\eta = \frac{\text{Actividad del biocatalizador sin moler}}{\text{Actividad del biocatalizador molido}}$$

TABLA 7. DETERMINACION DEL FACTOR DE EFECTIVIDAD EN FIBRAS CON DIFERENTES CARGAS CELULARES.

Lote	1	2	3	4
gr de células	0.6	2.5	3.2	3.5
act. del biocatalizador (U/g sop) molido	250	665	1220	1450
act. del biocatalizador sin moler (U/g)	245	432	561	627
factor de efectividad	1.000	0.65	0.46	0.44

En base a los resultados de la tabla anterior, observamos que el biocatalizador más eficiente (factor de efectividad de 1) es aquel en el que se utilizan 0.6 g de células. En este biocatalizador el control de la reacción es cinético, es decir, depende de la concentración de sustrato en la mezcla de reacción, mientras que en el resto la reacción es controlada por la difusión del sustrato en la partícula. Este problema habrá que analizarlo cuidadosamente, ya que si bien es cierto que en el primero se tiene una mayor eficiencia en el uso de la enzima, en el segundo se tiene una mayor actividad específica y sobre todo, una mejor estabilidad.

Conclusiones.

A través de los estudios ,se obtiene un biocatalizador con una actividad de lactasa mayor a 200 U/g,y con una estabilidad operacional en donde éste conserva el 100% de su actividad después de 180hrs de operación en suero,lo cual resulta muy conveniente para los objetivos planteados en el trabajo.La caracterización difusional del biocatalizador muestra que existen problemas de transferencia de masa interna por lo que se recomienda que para los objetivos del proyecto,que es la aplicación del biocatalizador en la hidrólisis de la lactosa del suero se busque la condición en donde el compromiso entre la eficiencia y estabilidad de éste, sean adecuados para que el proceso de hidrólisis sea rentable.

Bibliografía

- 1.- Brodsky J.A. y Grootwasink J.W.D. 1986. Development and evaluation of whole cell yeast lactase for use in dairy processing, J. Food Sci 51(4), 897-903.
- 2.- Malacara F.C. 1990. Recuperación, formulación y caracterización de un extracto enzimático con actividad de lactasa obtenido por secado. Estudios para obtener el título de M. en C. en Biotecnología. UACPyP. CCH. U.N.A.M.

A N E X O 2

Artículos Publicados y Aceptados

INFLUENCE OF OXYGEN TRANSFER RATE ON
 β -GALACTOSIDASE PRODUCTION FROM *Kluyveromyces marxianus*

M. García-Garibay (1), J. Torres (1), A. López-Munguía-Canales (2)
and L. T. Casas (1)*

(1) Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología
(2) Departamento de Alimentos, Facultad de Química
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
A.P. 70-479 México D.F. 04510, México.

SUMMARY.

β -Galactosidase specific production from *K. marxianus* was shown to be related with k_a at low rates. A power type curve fitted very well when specific activity was plotted vs. k_a . Significant difference in total activity yields among the k_a treatments were not found, as every increase in specific activity was compensated by a decrease in biomass concentration.

INTRODUCTION.

Kluyveromyces marxianus (synonym *Kluyveromyces fragilis*) has been widely used in research studies involving whey utilization. Single cell protein, alcohol and β -galactosidase production are the most frequent topics. The strain most frequently used in these studies is NRRL Y 1109 (Bothast *et al.*, 1986) due to its high capability to use lactose as a carbon source, which is necessarily related to its capability to produce β -galactosidase. Oxygen transfer rate (OTR) is associated to the yield of these products in a direct manner, and a relationship between OTR and β -galactosidase specific activity at low OTR has also been reported (Mahoney *et al.*, 1975). This relationship can affect the yields in some instances. Studies on the relationship between low OTR and β -galactosidase in *K. marxianus* NRRL Y 1109 are the subject of the present paper.

MATERIALS AND METHODS.

- Organism. *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1109 was used and it was maintained on YM agar slants (Difco).

- Medium. A medium with the following composition was used (g/l): lactose U.S.P. grade, 50; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8.4; yeast extract, 7.5; K_2HPO_4 , 4.5; and MgSO_4 , 0.5. The pH value was adjusted to 5.5 with H_2SO_4 . Reagents were analytical grade (Baker and Bioxon). Distilled and deionized water was used.

- Fermentation conditions. 10 l runs were performed in a three 14 l jar New Brunswick fermenter set. All the fermentations were carried out at 29°C during 12-13 h, sampling hourly.

- Analyses. Biomass concentration (X g/l) was calculated from a standard plot of dry cell mass vs. absorbance at 650 nm from a 50 fold diluted culture medium in a Beckman model 35 spectrophotometer. β -Galactosidase activity was measured as follows: a volume of culture containing 10-20 mg cell biomass was mixed with 5 ml isoamyl alcohol (Baker) in a 25 ml volumetric flask and taken up to volume with 0.1 M, pH 6.6 phosphate buffer containing MgSO₄ (1 mM) and MnSO₄ (0.1 mM) (buffer A). This was shaken for 1 h at room temperature and 0.1 ml of this solution was mixed with 2.7 ml buffer A, 0.1 ml 3.36 M 2-mercapto-ethanol and 0.1 ml 0.068 M solution of o-nitrophenol- β -D-galactoside (ONPG from Sigma); this mixture was prepared at 40°C and kept at this temperature in a spectrophotometer cell (Beckman 35). The absorbance at 410 nm was recorded continuously for 5 min. Specific activity (α) was established as the β -galactosidase units per gram of cell biomass, being one β -galactosidase unit (u) the amount of enzyme needed to hydrolyse one μ mole of ONPG per minute at the given conditions. Specific growth rate (μ) was computed by linear regression from exponential growth phase data according to the following equation:

$$\ln X = \mu t + b$$

- Statistical analyses. Basic statistics and curve fitting were calculated with a Hewlett Packard 41CV calculator with a statistics software module.

- Oxygen transfer coefficient ($k_L a$). As the actual OTR is difficult to measure because it depends on several conditions of the medium that change along with the fermentation, $k_L a$ was taken as the oxygen transfer parameter. $k_L a$ was measured in water by the gassing-in liquid technique according to Sobotka *et al* (1982), for different air flow rates as vvm (Q) and agitation speeds as rpm (R). With these data a multiple linear regression was performed and the following equation was established:

$$k_L a = 3.139 \times 10^{-4} Q^{0.51} R^{2.166}$$

From this equation $k_L a$ values (all values referred to water) were obtained for every Q and R couple used during a particular fermentation.

RESULTS AND DISCUSSION.

Five different $k_L a$ values were tested per duplicate (*i.e.* sets of two fermentations were performed for every $k_L a$). Table 1 shows the mean specific activities, the mean maximum cell concentrations, the specific growth rates and the total yields of β -galactosidase activity. Mean values were obtained from the mean of the three last samples of every set of fermentations where growth had stopped. For fermentation sets 1 and 2 the three last samples were taken at 11 to 13 h, and for the others at 10 to 12 h. Every value is the mean of six samples, *i.e.* the three last samples from duplicate fermentations.

Biomass growth showed a normal behavior being practically equal those of lower $k_L a$ and being different only the highest value. Biomass and μ data from L fermentation set 2 showed unexpected high values; a compromise between high α and OTR could be the reason, but not enough data are available to support this hypothesis.

On the other hand, different enzyme production profiles were observed for different fermentation sets (data not shown). For set 1 it tended to increase slightly up to the final value (Table 1); for sets 2

and 3 a remained nearly constant during the fermentation time; and for sets 4 and 5 it tended to decrease, being much faster in the later, up to the final values shown in Table 1.

TABLE 1. Means for specific activity (a), and maximum concentration of cell biomass (X_{max}) with standard deviations (s) and coefficients of variation (v), specific growth rates (μ) and total activity yield ($a \times X_{max}$) for different $k_L a$ values.

	$k_L a$ (h^{-1})	a u/g	s	v %	X_{max} g/l	s	v %	μ (h^{-1})	Total yield u/l
1	9.32	1915	79	4.2	6.64	0.16	2.4	0.176	12 715
2	13.29	1810	28	1.5	7.50	0.53	7.1	0.361	13 575
3	16.34	1737	39	2.3	6.83	0.25	3.6	0.307	11 863
4	20.20	1628	52	3.2	6.94	0.11	1.7	0.315	11 298
5	36.00	1485	56	3.8	8.30	0.13	1.5	0.335	12 325

In order to find a mathematical relationship between $k_L a$ and a , a power type curve ($y = a x^b$) regression was applied to the data ($k_L a$ vs. a) shown in Table 1. This is shown in Figure 1. Data fitted very well with this equation and the following values were obtained:

$$a = 2963.27 (k_L a)^{-0.194}$$

with $r^2 = 0.9888$

Expressing this relationship in a linear regression:

$$\ln a = 7.99 - 0.194 \ln (k_L a)$$

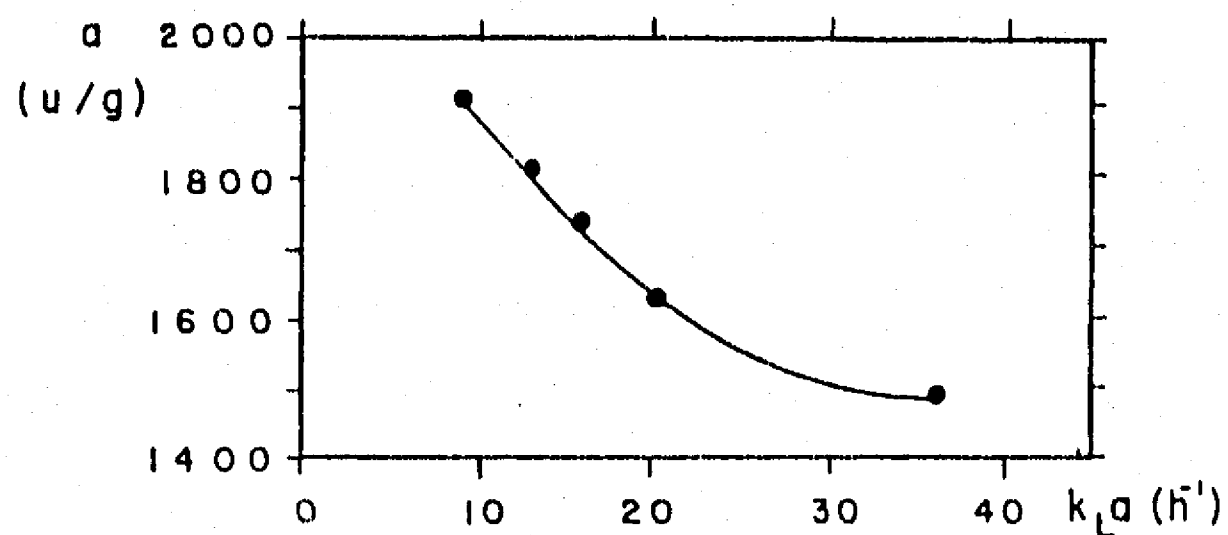


FIGURE 1. Curve resulted from plotting $k_L a$ vs. a . Every point is the mean value of duplicate fermentations.

Results show that the higher the k_a the lower the specific β -galactosidase activity. These results agree with those reported by Mahoney *et al* (1975), but according to our mathematical expression a became asymptotic in such a way that for higher k_a values it should be practically a constant.

The net increase of a from the highest to the lowest k_a value (Table 1) was 29 % since X_{max} decreased 20 %. The total yields obtained between these two values were practically the same, and the highest total yield was obtained at k_a 13.29, due to the combination of a high biomass concentration and a high activity value obtained. Therefore, in order to obtain higher total yields k_a should be increased significantly to obtain higher values of X_{max} understanding that a will not be further greatly reduced.

REFERENCES.

- Bothast R.J., Kurtzman C.P., Saltarelli M.D. and Slininger P.J. (1986). Ethanol Production by 107 Strains of Yeast on 5, 10, and 20 % Lactose. *Biotechnology Letters* 8 (8), 593-596.
- Mahoney R.R., Nickerson T.A. and Whitaker J.R. (1975). Selection of Strain, Growth Conditions, and Extraction Procedures for Optimum Production of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science* 58 (11), 1620-1629.
- Sobotka M., Prokop A., Dunn I.J. and Einsele A. (1982). Review of Methods for the Measurement of Oxygen Transfer in Microbial Systems. In *Annual Reports on Fermentation Processes Vol. 5*. Tsao G.T. (ed.) New York: Academic Press.

INFLUENCE OF SPRAY DRYING ON THE PERMEABILITY OF *K. fragilis* MEASURED
BY β -GALACTOSIDASE ACTIVITY

L. Casas^{1*}, C. Peña¹, M. Salvador¹ and P. Frias².

Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. México. A.P. 510-3,
Cuernavaca, Mor., 62271, México.

²Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, U.N.A.M. México.

ABSTRACT

The influence of spray drying on the permeability of the *K. fragilis* cells was studied. Inlet air temperature and yeast cell concentration were varied in the spray drying process. The degree of cell permeability was evaluated through the intra cellular detection of β -galactosidase activity. Results indicated that the degree of cell permeability was related to the drying temperature. Additionally, the spray dried cells were observed with the scanning electron microscope. The structure of permeabilized spray dried cells is discussed in reference to the drying mechanism.

INTRODUCTION

Lactase or β -galactosidase is an enzyme of industrial interest (EC. 3, 2, 1, 23) and it is used to hydrolyze the lactose in milk and in whey. Lactase produced by several yeast strains is accepted by the FDA as a food additive and due to its optimal pH of activity it is specially recommended for the treatment of lactose in milk and sweet whey (Vassilis and López-Leyva, 1985). Lactase, an intra cellular enzyme, can therefore be employed using whole cells, immobilized cells

Nota: Artículo en prensa en Food Biotechnology Journal.

or the free purified enzyme, either soluble or immobilized on a suitable support.

In any case, when whole cells are used as catalysts, they must be treated to allow free diffusion of the substrate and the products, by altering their permeability in order to reach the enzyme.

Several methods for the permeabilization of *Kluyveromyces* cells have been reported. Solvents such as toluene (Mahoney *et al*, 1975), chloroform (Bales and Castillo 1979), acetone, ethanol, n-propanol, isopropanol, terbutanol and dimethylsulphoxide are commonly used (Decleire *et al*, 1987); alternatively, cells can be treated with detergents (Joshi *et al*, 1989). *K. fragilis* cells treated with digitonine lack zymase activity (bioconversion of lactose into CO₂); this activity remains when cells are treated with other detergents such as triton X-100.

Drying has also been proposed as a method of cell permeabilization, particularly spray drying (Stimpson and Saville 1954). Other physical treatments include freeze-thawing (Decleire 1987) and addition of salts (Brodsky 1986, Decleire 1986, Huynh 1985). Most of these studies pursue the liberation of an enzymatic cell extract which might be directly added to milk. We can therefore say that these are not strictly cell permeabilization methods but rather enzyme extraction methods. An evaluation of some permeabilization methods is shown on Table I.

In the context of this work we deemed it important to clarify the term "permeabilization" as intra cellular detection of β -galactosidase activity, avoiding its diffusion into the surrounding medium.

TABLE 1.

Evaluation of the Permeabilization Methods (Castillo and Casas, 1990)

Method	Enzymatic Activity	
	intra cellular (U/g cells)	extra cellular (U/g cells)
Freeze-thawing	196	1460
Solvents		
a) ET-OH	101	111
b) Et-OH-acetone	98	134
c) Toluene	n.a.d.	2104
d) Acetone	n.a.d.	293
Proteases	735	980
Salting-out	2060	700
Isoamylc Alcohol	n.a.d.	2970

n.a.d. no activity detected.

The permeabilization of cells becomes critical when enzymatic activity needs to be determined in an immobilized whole cell catalyst.

There is clearly no ideal permeabilization method as shown on Table I, i.e. none of these methods retains all of the enzyme activity within the cell. The object of this study was to find a permeabilization method which would retain maximum enzymatic activity inside the cell. Research concerning this has been published by Champluvier *et al*, (1988) and Castillo and Casas (1990). The first work reports a permeabilization treatment with chloroform-ethanol, and in the second, cells are permeabilized with salts. In both cases the catalyst is later on cross-linked with glutaraldehyde to stop the process of permeabilization and avoid the loss of the enzyme into the reaction mixture.

A well-studied unit operation employed in industry is spray drying (Brennan 1970, Heldman 1981). This procedure applied to microbial cells can accomplish other functions such as concentration, a certain degree of purification, and a stabilization of the end-product, preserving the biological activity of cells or enzymes. Spray drying has been used to obtain viable cells, as in the case of baker's yeast or active cellular extracts, or as in lactase used for commercial products (Beck 1982, Bryam and Silman 1991). However, the possibility of obtaining non-viable whole yeast cells, which retain an enzymatic activity confined to the inner cell has not been studied systematically.

The main objective of the present work is to study the relation between spray drying conditions and the degree of permeabilization of *Kluyveromyces fragilis* cells, by determining enzymatic activity retained within the cell compared to the activity detected in the reaction mixture.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. O-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) was purchased from Sigma, Co (U.S.A.). The rest of the chemicals were products of J.T. Baker, Co (U.S.A.). YM agar was obtained from DIFCO laboratories.

Microorganisms. *K. fragilis* NRRL-Y1109 cells were provided by the Northern Regional Research Laboratories in USA and were kept in YM agar, at 4°C.

Biomass. It was produced in 1 l Fernbach flasks containing medium composed of the following substances (% w/v): 6.6 % sweet whey of

(Kem-Fuds de México), 0.75 % yeast extract, 0.48 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05 % MgSO_4 and 1 ml/l H_3PO_4 . The pH was adjusted to 5.5 with KOH. Cells were grown at 29° C and 200 rpm for 18 h. This medium was used as inoculum for a 10 l fermentation performed in a 14 l New Brunswick fermenter (New Brunswick Company, U.S.A.). This fermentation was maintained for 12 h with an air rate of 2 vvm and shaken at 400 rpm. Cells were collected by centrifugation in a Sharples centrifuge (Model AS-16) at a flow rate of 60 l/h. Yeast cells were subsequently resuspended in water to the desired concentration before spray drying.

Enzyme Activity. As control, β -galactosidase activity was measured in non dried cells as follow: a volume of culture containing 10-20 mg cell biomass was mixed with 5 ml isoamyllic 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) (buffer A). This was shaken for 1 h at room temperature and 0.1 ml of this solution was mixed with 2.7 ml of buffer A, 0.1 ml 3.36 M β -mercaptoethanol and 0.1 ml 0.068 M solution of O-nitrophenol- β -D-galactoside (ONPG); this mixture was prepared at 40° and kept at this temperature in a spectrophotometer cell (Beckman 35). The absorbance at 410 nm was recorded continuously for 5 min. Specific activity (U/g) was established as the β -galactosidase units per gram of cell biomass, being one β -galactosidase unit (U) the amount of enzyme needed to hydrolyze one μ mole of ONPG per minute at given conditions.

The intra and extra cellular activity in dried cells was measured as follow : 20 mg of spray dried cells were resuspended in 100 ml of buffer A, this was shaken for 30 minutes at room temperature, the cellular suspension was centrifuged at 5 000 rpm for 15 minutes. The

pellet or cellular fraction and the supernatant were separated.

The cellular fraction were resuspended in 5 ml of buffer A. 0.1 ml of cellular suspension and 0.1 ml of supernatant were mixed with 2.7 ml of buffer A and the enzymatic activity was measured as was described above, these values were considered the intra and the extra cellular enzymatic activities, respectively. Enzymatic activity determinations were double-checked in the supernatant of the cellular fraction thereafter; one group of samples was left untouched while in the other, the reaction was stopped by heating. Enzymatic activity was measured in both samples after two hours. Constant absorbance values in both samples after this lapse, were taken to signify that the enzyme had remained within the cell.

Spray Drying. A spray dryer (Niro, Model P-6-3) was used within a temperature range of 100 °C to 160 °C and flow rates of 8-12 l/h. Spray drying was accomplished by electrically heated air.

Degree of Enzyme Released from Permeabilized Cells. To determine the extent of β -galactosidase escape from cells, the spray-dried and non dried cells were heated as follows: 10 g of spray dried and non dried cells were resuspended in 40 ml of 0.15 M phosphate buffer, pH 6.6, and heated to 40 °C with shaking. Samples were taken every 30 min to determine activity both in the cells and in the supernatant.

The spray dried and permeabilization studies were carried up three times, the standard deviation was 5%. From these results, we have been continued the lactose hydrolysis studies with immobilized cells using dried cells at 110 and 140°C.

Escanning Electron Microscopy. Scanning Microscope Jeal, model JSM-35 was used for the observation of spray dried and non-dried cells. Spray dried cells were observed directly after a cover treatment with gold in a fine coat-sputter model JFC1100. The non dried cells were dehydrated with ethanol and fixed with glutaraldehyde before observation.

RESULTS

Spray Drying Conditions for *K. fragilis* Cells. The two parameters which varied in the spray drying conditions of *K. fragilis* cells were: i) the inlet air temperature and ii) solids concentration of the feed. The temperature range tested oscillated between 110° and 160 °C with an inlet solids concentration of 10, 15 and 20% w/v, after Stimpson and Saville (1954).

The results are shown in Figure 1, the total recovered enzymatic activity depends on the temperature of the spray drying process and is rather independent of the solids concentration in the feed.

The maximum enzymatic activity recovered was 90% of total activity fed to the dryer, referred to previously measured isoamyllic alcohol treated cells. This result was obtained at an inlet air temperature of 140°C. When the temperature was increased to 160 °C, the enzyme denatured rapidly in the dryer.

Evaluation of the Degree of Permeabilization of *K. fragilis* Cells Achieved by Spray Drying. Considering the results shown above, we investigated the location of lactase by verifying intra and extra cellular enzymatic activity (Table 2).

In all cases activity was detected inside the cell and the data suggested that between 110 and 140 °C, permeabilization of the yeast cell increased as the drying temperature rises.

TABLE 2.

Permeability of Spray Dried Yeast Cells

Dry Temperature (°C)	Enzymatic Activity	
	intra cellular (U/g)	extra cellular (U/g)
110	2000	n.a.d.
120	2400	n.a.d.
130	2750	n.a.d.
140	3500	n.a.d.

n.a.d. = no activity detected.

This is true if we consider the maximum enzymatic activity recovered after spray drying at 140 °C as 100 %, as shown above. Spray drying offers the advantage of permeabilizing the *K. fragilis* cell wall, retaining the enzyme within the cellular space while the substrate and products diffuse freely. We can therefore conclude that spray drying is a recommendable method for yeast cell permeabilization.

Nevertheless, spray dried cells exhibit less enzymatic activity than control cells treated with isoamyl alcohol. There are three possible explanations for this observation; a) some enzymatic activity may be lost by denaturation during drying or b) the enzyme is only partially entered during the determination of enzymatic activity or c) both.

To analyze this issue, we determined the enzymatic activity while cells were kept under conditions in which the enzyme could escape. Enzymatic activity was then measured in the reaction mixture at regular intervals for the next 7h. Results are shown in Figure 2.

The enzymatic activity in non-dried cells was not detected during the time of treatment, while the three of the four spray dried products (corresponding to the drying temperatures of 110, 120 and 130 °C) displayed an increase in enzymatic activity with incubation time.

In all cases, 3500 U/g were obtained at the end of the permeabilization process. This value represents 90 % of the total activity measured in cells treated with isoamyllic alcohol. Maximum enzymatic activity is achieved in a shorter period when cells are spray dried at higher temperature. Thus, cells dried at 140 °C reached

this level of activity very rapidly, whereas those dried at 110 °C, 120 °C, and 130 °C took 6, 4 and 2 1/2 h, respectively. Finally, we studied the enzyme distribution in cells spray dried at 140°C at various incubation times. As can be seen in Table 3, at the beginning of the experiment the total activity was intracellularly located, and as time passed by, the activity increased outside the cells with a concurrent decrease in intra cellular activity. It is important to notice, that 30 % of the enzyme activity remained inside the cells even at long incubation times.

TABLE 3
Kinetics of β -galactosidase Extraction in Spray Dried Yeast Cells*

Time (hrs)	Enzymatic Activity	
	intra cellular %	extra cellular %
0	100	0
1	63	37
2	49	51
3	29	71
4	29	68
5	29	53

*Cells dried at 140 °C.

In conclusion, both explanations offered above are true. Within the spray drying temperature range of 110 to 140 °C, *K. fragilis* cells are permeabilized to different degrees. Part of the enzyme is in fact denatured, and another part is not measured in the reaction mixture.

It is important to emphasize that microbial analysis of the product dried at 140 °C, performed in a culture medium specific for yeast, revealed that cells are not viable after the process.

Although a mechanism of permeabilization has not been established, Beck (1982), proposed that when a droplet is sprayed in the drying tower, the water on the yeast surface evaporates first, forming an external skin; inside, a vapor phase forms. As the pressure increases, the sphere bursts at one point and the water vapor escapes. The final product is a hollow sphere with an eruptive opening.

Observation of Spray Dried Cells With the Scanning Electron Microscope. Figure 3 shows the photographs of cells spray dried at 110, 130 and 160°C and of non-dried cells.

Dried cells exhibit an uneven surface with an eruptive opening which could be the result of the spray drying process as proposed by Beck (1982), they are bigger and present what may be called an "open structure" compared to non-dried cells. This structure distends sufficient, becoming more open as the drying temperature increases: cells dried at 110 °C appear as compact spheres whereas those dried at 160°C seem ruptured in some cases.

One conclusion that may be drawn from these photographs is that the degree of permeability and the facility of the loss of the enzyme into the reaction mixture, seems to be associated to the open structure observed in spray dried cells.

CONCLUSIONS

Results presented here show that the spray drying process of *K. fragilis* cells generates non-viable whole cells with lactase activity confined to the intracellular space. We can therefore propose that this unit operation is recommendable not only for the recovery of enzymatic activity but also as a permeabilization treatment for cells which are intended for the manufacture of a biocatalyst. When spray dried cells are resuspended in solution at 40 °C, the enzyme can be extracted at a rate akin to the history of the drying process.

Spray dried cells show an open structure, compared to non-dried cells. This structure appears to be more spacious as the drying temperature rises up to a limit of 160 °C when the number of ruptured cells becomes meaningful. Therefore, it is possible to conclude that the degree of permeabilization is related to the drying temperature. Since spray dried cells retain 90% of the enzymatic activity compared with control cells, thus we may obtain permeabilized yeast cells with lactase activity through this economic and common unit operation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their special thanks to Dr. Agustín López Munguía for his helpful comments and revision of the manuscript. The translation was corrected and edited by Isabel Pérez Montfort. This work was partially supported by the PNUD-ONUDI (Regional Biotechnology Program for Latin America and the Caribbean). We are indebted to Susana Saval and Abel Blancas for their help with the spray drying of yeast cells at the pilot plant of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

REFERENCES

Bales S.A. and Castillo F.J. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis*. Growth in whey. Appl. and Environmental Microbiology. June: 1201-1205.

Beck. 1982 Part II. UNESCO. Processes and technologies for the concentration and cleaning of microbial biomass. Course Biotechnology G.D.R.

Brennan J.G., Butters J.R. Cowell N.D. and Lilly A.E.V. 1970. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia Zaragoza.

Brodsky J. A., Grootwasink J.W.D. 1986. Development and evaluation of whole cell yeast lactase for use in dairy processing. J. Food Sci. 51 (4), 897-903.

Bryam W.L. and Silman R.W. 1991. Viability and initial kinetic parameters for dry yeast inocula in batch fermentations. *Enzyme Microbiol Technol.* vol. 13 No. 1: 2-8.

Castillo, E. and Casas, L.T. 1990. Reutilization of free and immobilized *Kluyveromyces fragilis* yeast cells with a controlled permeabilization treatment. *Physiology of immobilized cells.* Elsevier. 213-218.

Champluvier B., Kamp B. and Rouxhet. 1988. Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enzyme Microbiol. Technol.*, vol. 10 October: 611-617.

Decleire M., De Cat W. and Huynh N. Van. 1986. Appearance of cell-bound β -galactosidase activity in *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 323-325.

Decleire M., De Cat W. and Huynh N. Van. 1987. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ β -galactosidase activity. *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 9, May: 300-302.

García-Garibay, M. Torres, J. López-Munguía-Canales, A. and Casas, L.T. 1987. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotech. Letters.* Vol. 9 No. 6: 417-420.

Heldman D.R. and Singh R.P. 1981 Food Process Engineering 2nd. Edition AVI West Port.

Huynh N. Van and Declaire M. 1985. In situ activation of β -galactosidase of *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells by sodium and potassium phosphates and chlorides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 390-393.

Joshi M.S., Wonda L.R., Katwa L.C. and Bath S.G. 1989. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 11, July: 439-443.

Mahoney R.R., Nickerson R.A. and Whitaker J.R. 1975. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci. 58 (11): 1620-29.

Stimpson E.G. and Sayville N.Y. 1954. Drying of yeast to inactive zymase and preserve lactase. U.S. Pat 2693440.

Vassilis G. and López-Leyva M. 1985. Hydrolysis of lactose. Process Biochemistry. vol. 20: 2-12.

FIGURE CAPTION**Figure 1**

Recovered enzymatic activity after the spray drying process at varying inlet air temperatures and solid concentrations in the feed. The studies were carried up three times, the standard deviation was 5 %. The solid concentrations tested were (% w/v) = (o) 10 (Δ) 15 and (□) 20.

Figure 2

Enzyme activity of permeabilized cells after incubation at 40 °C at various times. The enzyme activity of products dried at different temperatures was measured by duplicate. (●) 140°C, (■) 130 °C, (Δ) 120°C and (▲) 110°C.

Figure 3

Scanning electron microscope photographs of *K. fragilis* cells with and without spray drying treatment. One cell is shown, except figure 3c where two cells are shown. 3a cell without treatment, 3b cell dried at 100°C, 3c cells dried at 130°C, 3d cells dried at 160°C. The non dried cell is ten times smaller than the cells spread dried.

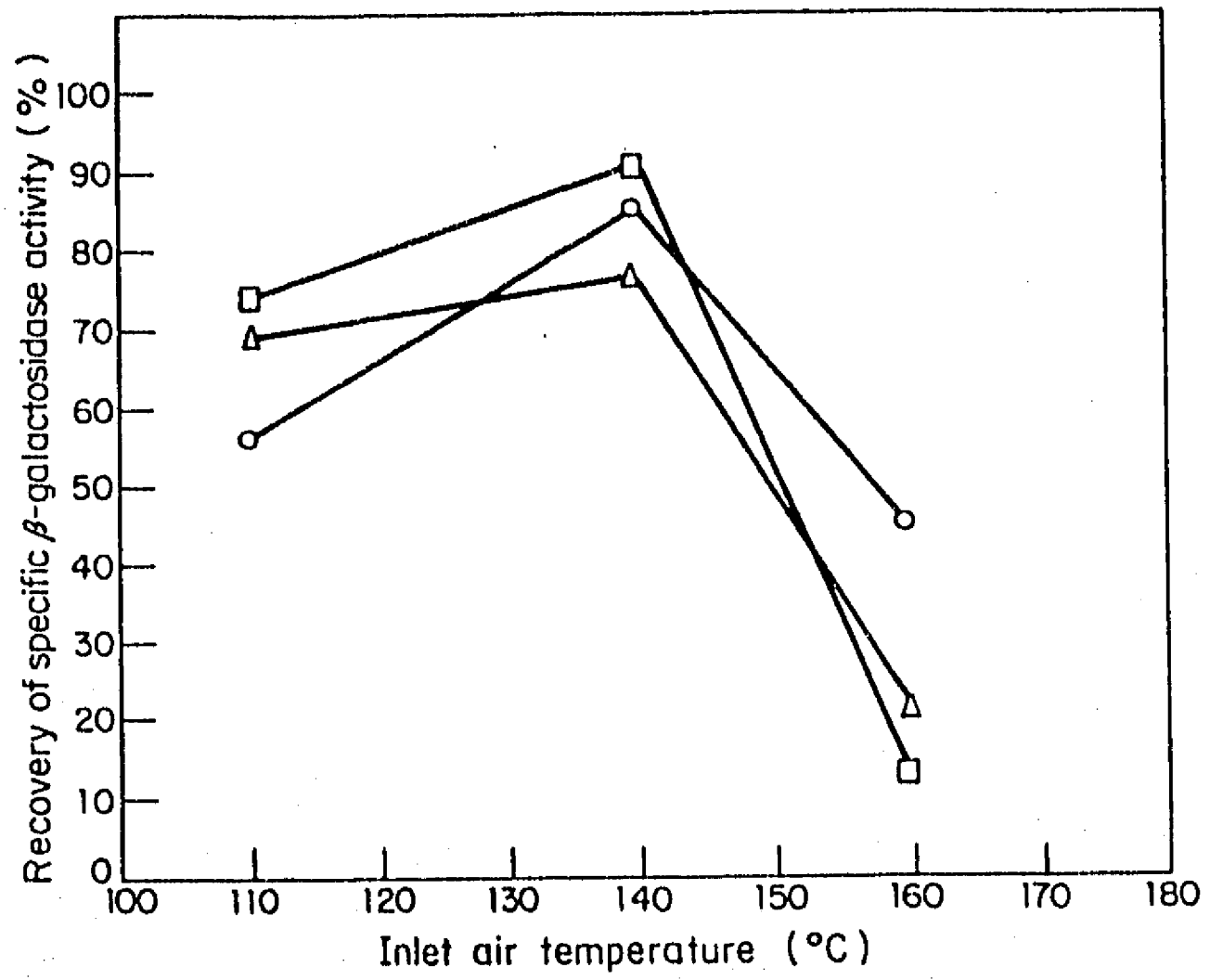


Fig. 1

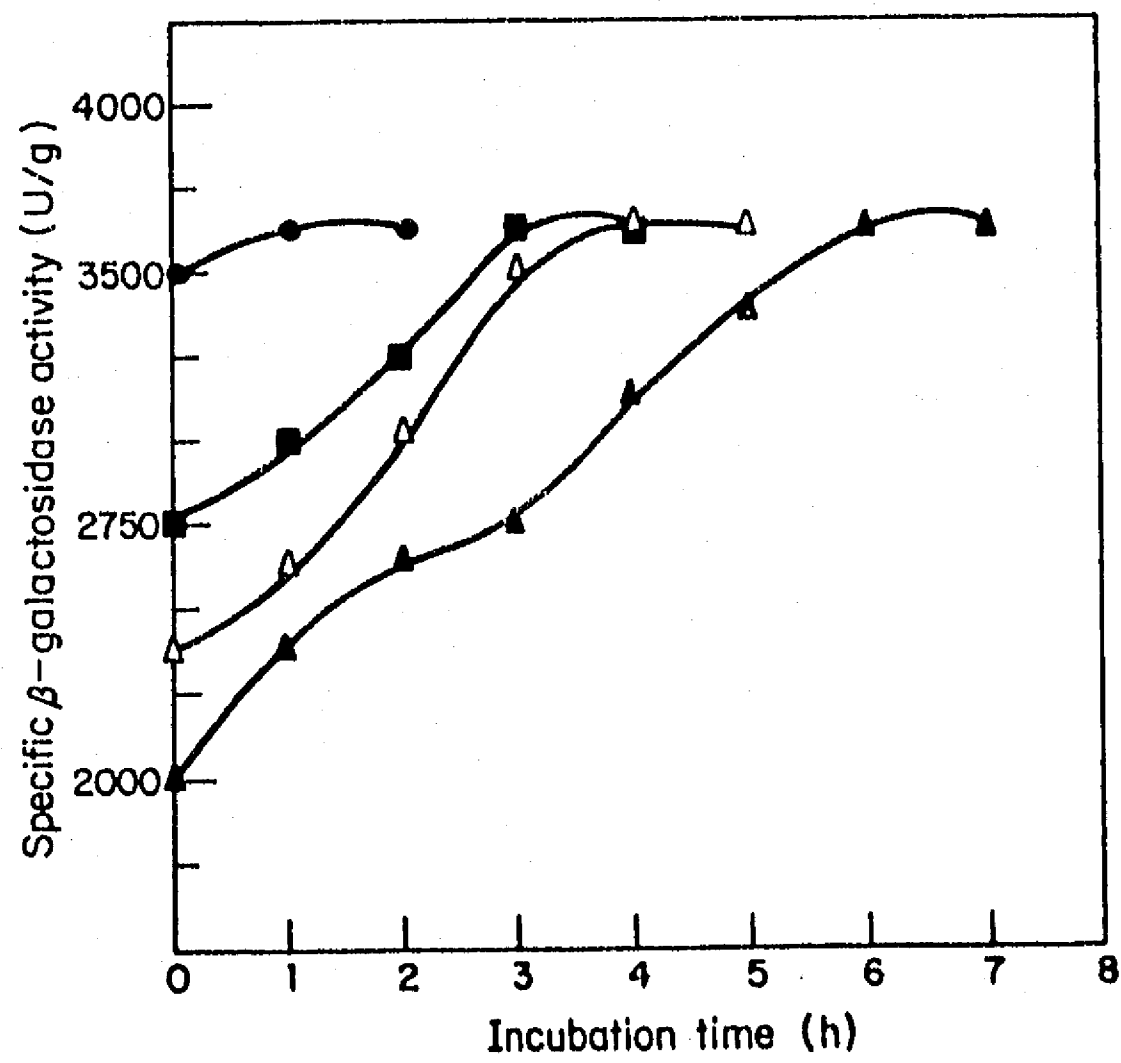
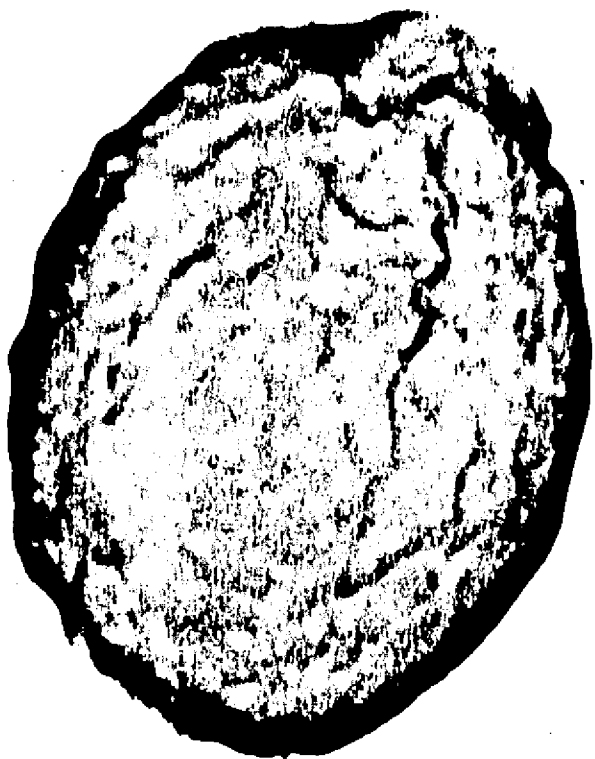


Fig. 2



a)



b)



c)



d)

Fig. 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REPRINTED FROM:

PHYSIOLOGY OF IMMOBILIZED CELLS

PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ORGANIZED UNDER THE AUSPICES OF THE WORKING
PARTY ON APPLIED BIOCATALYSIS, THE WORKING PARTY
ON MICROBIAL PHYSIOLOGY OF THE EUROPEAN
FEDERATION OF BIOTECHNOLOGY AND THE WORKING
PARTY ON BIOCATALYSTS OF THE AGRICULTURAL
UNIVERSITY, WAGENINGEN

Wageningen, The Netherlands, 10-13 December 1989

Edited by

J.A.M. de Bont

*Division of Industrial Microbiology, Department of Food Science, Agricultural
University, Wageningen, The Netherlands*

J. Visser

*Department of Genetics, Agricultural University, Wageningen,
The Netherlands*

B. Mattiasson

*Department of Biotechnology, Chemical Center, University of Lund, Lund,
Sweden*

J. Tramper

*Food and Bioengineering Group, Department of Food Science, Agricultural
University, Wageningen, The Netherlands*



ELSEVIER

Amsterdam — Oxford — New York — Tokyo 1990

REUTILIZATION OF FREE AND IMMOBILIZED *Kluyveromyces fragilis*
YEAST CELLS WITH A CONTROLLED PERMEABILIZATION TREATMENT

E. CASTILLO and L.T. CASAS

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

SUMMARY

After the permeabilization treatment, lactase activity was not detected outside the cells, so the reutilization of permeabilized yeast cells was evaluated on lactose hydrolysis, conversions up to 60% were reached. Two statistical methods were used to determine the most important parameters in the permeabilization, and to optimize the process; 676 lactase units per gram of cells were obtained; the cells were immobilized in gelatine with 510 lactase U/g support and evaluated during 200 h in a batch system.

1. INTRODUCTION

Several methods have been reported for cell permeabilization, such as *Kluyveromyces sp* with intracellular lactase (1,2). Because there does not exist a specific definition for permeabilization in literature, we defined it as "the procedure to allow the expression of intracellular enzymatic activity but, without enzyme leakage out of the cell", for those cells which enzymatic expression depends on the cells permeabilization.

J.A. Asenjo et al. (3), proposed the utilization of lytic enzyme systems, for the release of cell associated product. M.S. Joshi et al. (4) showed the expression of enzymatic activity, by means of anionic detergent in cells of *K. fragilis* for enzymatic hydrolysis of milk lactose. However, they did not report the degree of cell lysis nor the possibility of catalyst reutilization. Brodsky and GrootWassink (5) found that permeabilization of *K. fragilis* by salts and temperature effects caused lactase leakage. The aim of the present work was to improve a procedure to control the permeabilization of *K. fragilis* cells keeping the enzyme inside the cell and reused it, free or immobilized, in enzymatic reactors several times.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Organism

The yeast *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y1109 was obtained

214

from USA Northern Regional Research Laboratories.

2.2 Chemicals

All the chemicals were purchased from SIGMA Chem. Co., and from J.T. Baker, Co. (USA). Agar from DIFCO Laboratories (USA).

2.3 Cultivation

The yeast was transferred from the slants to a 2800 ml Fernbach flask containing 1000 ml of medium (6). The cells were harvested by centrifugation and washed three times with deionized water to prepare them for the permeabilization step.

2.4 Permeabilization treatment

The washed cells were resuspended with deionized water in an Erlenmeyer flask. The pH was adjusted to 7.1, either with KOH or HCl. All tested conditions are reported in the text. The cells were harvested from permeabilization suspension at 7500 rpm for 15 min and washed three times with deionized water.

2.5 Lactase activity determination.

For lactase activity determination in the control cells, a modified method reported in literature was used (6). To measure the activity of salt permeabilized cells the same methodology was used, eliminating the isoamyl alcohol permeabilization step. Activity of the permeabilized cells and the supernatant was measured. Specific activity was established as the lactase units per gram of cell biomass. One lactase unit is defined as the amount of enzyme needed to hydrolyze one μ Mole of ONPG to ONP or one μ mole of lactose to glucose per minute.

2.6 Gelatine support.

Gelatine (0.4 g) was dissolve in 18.4 ml of phosphate buffer 0.1 M, pH 6.6 at 50°C, 1.6 g of *K. fragilis* cells (dry weight) were added to the solution, until homogenized. The suspension was cooled to 13°C- 15°C, emptied in a 20 ml hypodermic syringe and extruded in 200 ml of 1.25% (v/v) glutaraldehyde solution. The fibers were separated and washed. Enzymatic activity was measured by glucose liberation through colorimetric enzymatic determination (Kit 510 Sigma Chemical Company).

3. RESULTS

Different permeabilization methods were evaluated under the same conditions reported in literature: freeze-thawing, solvents (2), proteases, and a procedure, based on *salting out* (5). The isoamyl alcohol method was used as reference (6). The evaluation was based on the retention of enzymatic activity inside the cells. Generally, every method showed particular advantages

(Table 1); activity was detected outside the cells in all the methods. The freeze-thawing method presented high enzymatic activity, but all outside the cell. Permeabilization with proteases apparently was a good method; it only affected membrane proteins but the protease tested (HT Proteolytic and papaine) produced some peptides and amino acids, and resulted in a product with disagreeable smell and taste. The use of solvents has been the most frequently reported. The solvents evaluated in this study are listed in table 1. It was observed that the solvent permeabilization method was appropriated for maximum expression of activity, however, the cells were completely broken. In this evaluation, the solvent-cell contact time was changed, and the enzyme, in almost every condition, was detected outside the yeast. The residual solvent in the cell carried out the lysis of cell wall and resulted hard to eliminate without damaging the enzymatic activity resulting an inefficient method.

TABLE 1
Evaluation of permeabilization methods.

METHOD	ENZYMATIC ACTIVITY*	
	INTRACELLULAR	EXTRACELLULAR
FREEZE-THAWING	196	1460
S O L V E N T S		
a) Ethanol	101	111
b) et OH-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

Brodsky and GrootWassink (5), reported a permeabilization treatment using phosphate salts. They obtained good expression of enzymatic activity, but after a few hours a total lysis of the yeast *K. fragilis* took place. We evaluated the method modifying the time for permeabilization to check the activity leakage point. After a short permeabilization time few enzymatic activity occurred outside the cell (Table 2). The level enzymatic activity expression increased as the test occurred. The method was easy to control because the soluble phosphates were eliminated by simple centrifugation and water washing. For these reasons the method was further optimized.

216

TABLE 2

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

TIME min	Enzymatic Activity (U/g cell)			TOTAL
	INSIDE	+	OUTSIDE	
30	420		75	495
60	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
(reference)				2970

3.1 Optimization

The optimization of the parameters was achieved with the aid of the statistical methods Plackett-Burmann, (PBM) and Box-Wilson (BWM) (7,8). The initial permeabilization conditions (5), were taken as experimental center. The superior and inferior limits of the evaluation and the experimental center are shown in Table 3; the number of combinations was fixed for eight variables and intracellular and extracellular enzymatic activities were continuously measured, the enzymatic activity inside the cells fluctuated between 107 and 733 U/g cell and no activity was detected in the supernatants recovered after every experiment.

TABLE 3

Parameters evaluated in PBM. Superior and inferior limits.

PARAMETER	SUPERIOR	INFERIOR	EXPERIMENTAL CENTER
pH	7.2	6	6.6
Temp (°C)	53	43	48
KH ₂ PO ₄ (M)	0.15	0.05	0.10
Time (min)	180	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

The most important variables for the permeabilization process were: salt concentration, temperature, time, and cellular concentration. The BWM was carried out taking in account the combined effects of these variables. The results of the optimization step were temperature 51°C, phosphate salt concentration 0.045 M, time 75 minutes, cellular concentration 90 g/l and 0.02 mM of MgCl₂. The highest level of enzymatic activity, reached after the optimization step, was 676 U/g cell.

The cells were evaluated like a biocatalyst on lactose hydrolysis; the remaining activity inside the cells was measured after each cycle (Fig. 1). The enzymatic activity remained the same for the first six hydrolysis cycles and it decayed over 50% in the last two hydrolysis, may be due to a slow lysis of the cells, caused by the temperature and the phosphate ions used in the lactose-buffer solutions since probably a small quantity of enzyme was lost in each run, after the centrifugation and harvesting of remnant cells.

3.2 Gelatine fibers with immobilized *K. fragilis*

The permeabilized cells were then immobilized in gelatine with glutaraldehyde. This biocatalyst was later characterized in terms of its kinetic parameters and operational stability. The different reaction speeds and the biocatalyst specific activity were tested. Data were processed with the aim to obtain the kinetic parameters through a linearization. The Lineweaver-Burk form was used to plot the data. The values obtained were 87 mM for K_m and 525 μ Moles of glucose/minute, for V_{max} .

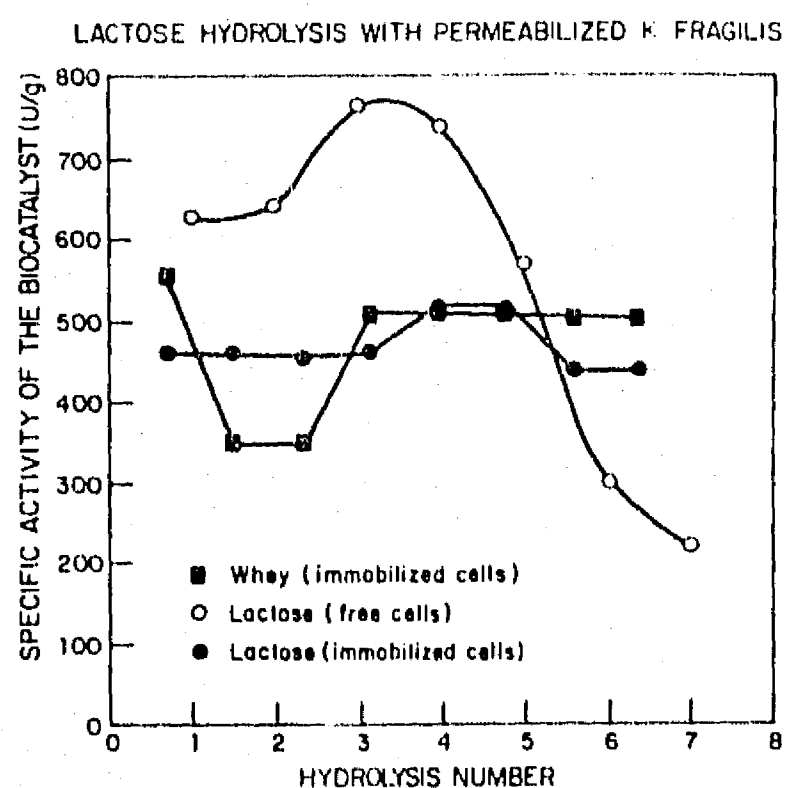


Figure 1. Biocatalyst reutilization in lactose hydrolysis. Control permeabilized cells free and immobilized were used. The hydrolyses for whey and lactose solutions were performed at 37°C, with 5% (w/v) of lactose.

An evaluation of the potential reutilization was carried out in lactose solutions and whey lactose hydrolysis. The evaluation was performed in hydrolysis batches during eight days, sampling

218

every 24 hours (figure 1). The enzymatic activity was constant during the experiment, and also yields up to 63% for whey and 72% for lactose were obtained.

4. Conclusions

The development of a method that offers controlled permeabilized *Kluyveromyces fragilis* yeast cells, results very useful in lactose hydrolysis. The permeabilization method, based in a *salting out* (10) of protein membranes, was modified in those parameters that play an important role in the retention of enzyme inside the cells, using statistical methods to find the additive and combined effects of these parameters. If the cells are considered like a biocatalyst and then compared with commercial biocatalysts (1) a very good enzymatic activity can be observed. In the optimal conditions of BWM all the enzymatic activity, inside the cell, was around 600 U/g cell. These yeast cells were evaluated on lactose hydrolysis they showed reutilization ability, but only six times. After the sixth hydrolysis the enzymatic activity decayed below 50% with regard to the initial activity. The reutilization of permeabilized cells is a good option instead of the use of free enzyme or immobilized enzyme.

Nevertheless the cells were immobilized in gelatine. The biocatalyst presented a V_{max} of 525 μ Moles glucose/minute and a K_m of 87 mM this biocatalyst preserved its initial activity after 192 hours of hydrolysis in whey and lactose.

Acknowledgements

The authors thank M. Ocampo for helpful comments and revision of English style.

REFERENCES

- 1 G. Vasilis and M. Lopes-Leiva. *Process. Biochem.*, **2**, (1985) 2-13.
- 2 M. Declaire, M. De Cat and N. Van Huynh. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, (1987) 300-301.
- 3 J.A. Asenjo, B.A. Andrews, J.B. Hunter and S. Lecorre. *Process Biochem.*, **20**, (1985) 158-164.
- 4 M.S. Joshi, L.R. Gouda and S.G. Bath. *Biotechnology Letters*, **9**, (1987) 549-554.
- 5 J.A. Brodsky and J.W.D. GrootWassink. *J. Food Sci.*, **51**, (1986) 597-903.
- 6 M. García Garibay, J. Torres, A. López-Munguía and T.L. Casas. *Biotechnology Letters*, **9**, (1986) 417-420.
- 7 R.L. Plackett and J.P. Burmann. *Biometrika*, **33**, (1946) 105.
- 8 G.E.P. Box and K.B. Wilson. *J. Royal Statistical Society*, **13**, (1951) 1-45.

Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects

E. Castillo, M. Rodríguez, L. Casas, R. Quintero and A. López-Munguía

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

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

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.²⁻⁵ In general, the use of immobilized cells overcomes 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 the 1970s and the early 1980s, 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 has reached the industrial scale, as shown in *Table 1*.

In this table, the catalysts are produced by different methods. There are products based on ionic binding, such as the immobilization of fungal spores; methods based on cell aggregates, where the group of Vojtisek³ has contributed with industrial applications in socialist countries; 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 for the processes developed by Tanabe Seiyaku Co.¹⁰ based on cells entrapped on carrageenan for malic acid, aspartic acid, alanine, and phenylalanine 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. On the one hand, what is the highest specific activity that can be obtained from a given cell host by genetic improvement? 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 cell systems, when the cell entrapment method is used.

Address reprint requests to Dr. López-Munguía at the Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, Mexico
Received 2 February 1990; revised 16 April 1990

Papers

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	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 ammonialyase	Phenylalanine	Genex Corp.
<i>Rhodococcus sp</i>	Nitrilase	Acrylamide	Nitto Chem. Ind.

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 nonlimiting step. This information is important when designing biocatalysts and provides a clear demonstration of why both geneticists and biochemical engineers should be involved in this and other activities 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.¹²⁻¹⁴ Although not always verified, external mass transfer in immobilized cells and enzymes is often considered negligible, due to the possibility of handling 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, no doubt, a major limitation in developing new catalysts with immobilized cells 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 activity. Catalyst design is thus of particular importance, since due to the new technologies, geneticists are developing high 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 criterion for selection 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:

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

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:

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

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 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 that involves the kinetic parameters of the enzyme (kE_i and K_m), the particle radius (R), and the effective diffusivity of the substrate (D_e). Equation (2) can be written for spherical beads as follows:

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

where:

$$\Phi = \frac{R}{2} \sqrt{\frac{kE_i}{D_e K_m}}$$

$$\beta = S/K_m$$

$$z = r/R$$

In this plot, the effectiveness factor is also a function of the surface concentration (S_0), as the initial dimensionless boundary condition is: $\beta_0 = S_0/K_m$ at $z = 1$. The surface concentration is assumed to be 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:

$$v_{\text{obs}} = -\frac{ds}{dt} = \eta \frac{kE_i S}{K_m + S} \quad (4)$$

The relationship between the effectiveness factor 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. Radovich¹ 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.¹⁵⁻¹⁷ 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 Tsao¹⁸ 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.

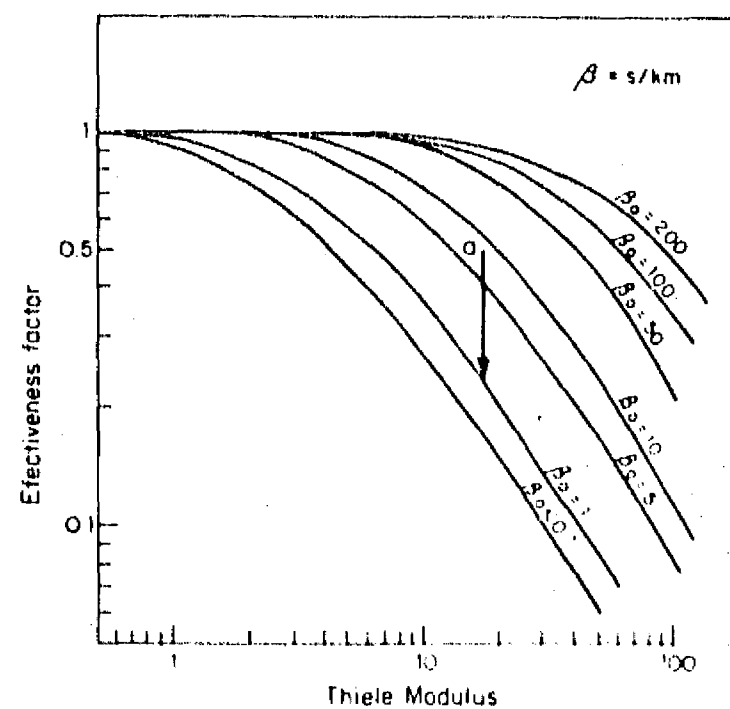


Figure 1 Effectiveness factor as a function of the Thiele modulus, for Michaelis-Menten kinetics in a spherical catalyst. The bold arrow illustrates a reaction with $\Phi = 18$, and $S_0 = 50 \text{ gl}^{-1}$; point a

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 occurs. It follows that the relationship between effectiveness factor and substrate concentration is important for the design of 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 Satterfield²⁰ is commonly used with arbitrary values for the porosity (ϵ) and tortuosity factor (τ): $D_e = D\epsilon/\tau$ 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.²¹ Cells of *E. coli* with penicillin acylase activity were kindly provided by the Mexican company GENIN S.A. de C.V.

Papers

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 solution, without modifications of the particle properties, was used (200 gl^{-1}). 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 extrusion in cold water. In both cases, the catalyst is treated with 1.25% glutaraldehyde solution for 45 min. After several washes, the catalyst is stored under 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 as has been described.²³ One unit is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse $1 \mu\text{mol}$ of lactose in 1 min. The cells produced contained $1.666 \text{ Ug}^{-1} \text{ cell}$ and followed Michaelis-Menten kinetics with a $K_m = 5.33 \text{ gl}^{-1}$, galactose being a competitive inhibitor.²⁴

Penicillin acylase activity was measured with 2% potassium penicillin-G (PGK) solution in phosphate buffer 0.1 M, 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 $1 \mu\text{mol}$ of 6-APA per minute. The cells with approximately 50% protein content presented an enzymatic activity of $200 \text{ Ug}^{-1} \text{ cell}$.

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 min. 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 ($\text{Ug}^{-1} \text{ cell}$), protein in the cells ($\text{Ug}^{-1} \text{ prot}$), or dry catalyst ($\text{Ug}^{-1} \text{ cat}$).

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 utilizes 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 $510 \text{ Ug}^{-1} \text{ cat}$, while the disintegrated catalyst resulted in an increased activity of $1.050 \text{ Ug}^{-1} \text{ cat}$; both measurements were carried out at 50 gl^{-1} of lactose. This gives 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 equation (3) were available, with the exception of the Thiele modulus. The equation was solved in

Table 2 Lactose diffusivities in various systems

System	Diffusivity ($\text{cm}^2 \text{ seg}^{-1}$)	Ref.
<i>K. fragilis</i> in gelatin (5%, 37°C)	$4.21 \cdot 10^{-8}$	this work
Gelatin (5%, 5°C)	$1.44 \cdot 10^{-6}$	28
<i>E. coli</i> in carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	$3.53 \cdot 10^{-8}$	27
Carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	$1.285 \cdot 10^{-8}$	27
Water (25°C)	$4.9 \cdot 10^{-6}$	30

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, and therefore 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 ($4.21 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$) is very similar to the one obtained in carrageenan, giving indirect evidence of a similar diffusional process. However, the effective diffusivity is two 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 and Yamashita²⁶ for *E. coli* cells on carrageenan and Brito *et al.*²⁷ for *E. coli* on carrageenan and locust bean gum. The value reported by Friedman and Kraemer²⁸ 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.

In conclusion, in this case it is not possible to obtain the effective diffusivity by 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 behavior 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 measurement 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 gl^{-1} 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 nonlogarithmic 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 these two parameters, an empirical polynomial correlation was obtained:

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

where:

$$a = 0.1552$$

$$b = 1.4327 \times 10^{-2}$$

$$c = -2.5951 \times 10^{-4}$$

$$d = 2.25 \times 10^{-6}$$

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

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

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

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

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.

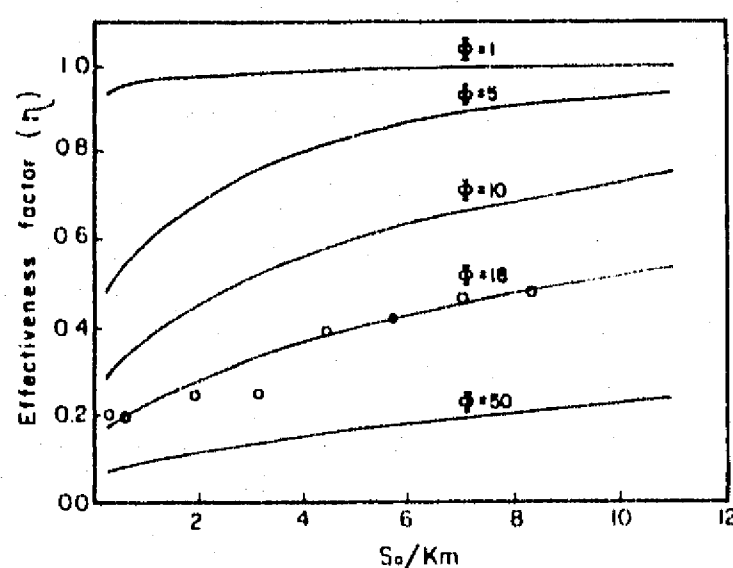


Figure 2 Experimental effectiveness factors obtained at different initial substrate concentrations for the immobilized *K. fragilis* catalyst, a modified presentation of Figure 1

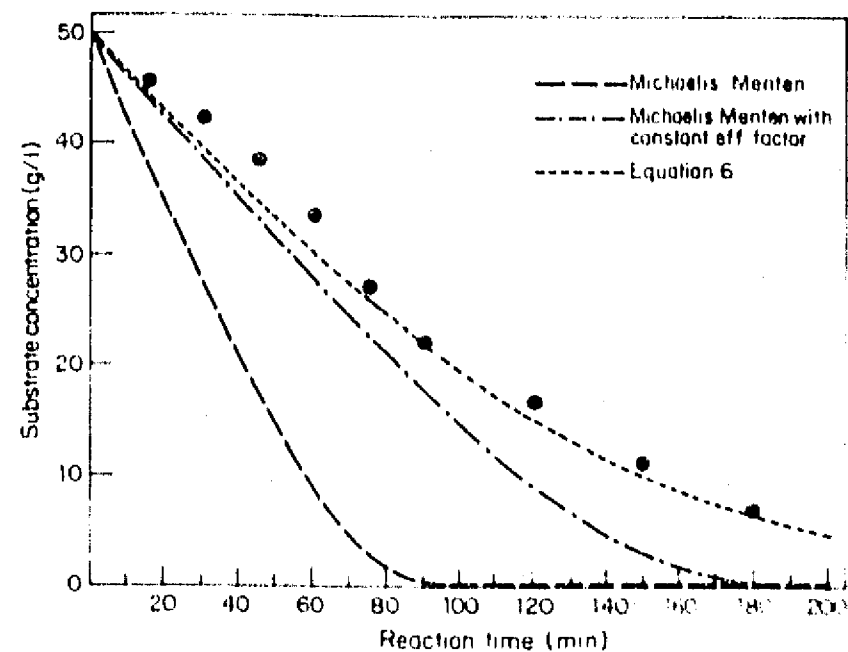


Figure 3 Evolution of a batch reaction limited by internal diffusion with an immobilized cell β -galactosidase catalyst as described by different models

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 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⁻¹ of lactose and 20 g l⁻¹ 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

Papers

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 a limit, 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 energy of the enzyme in the catalyst becomes equal to that 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

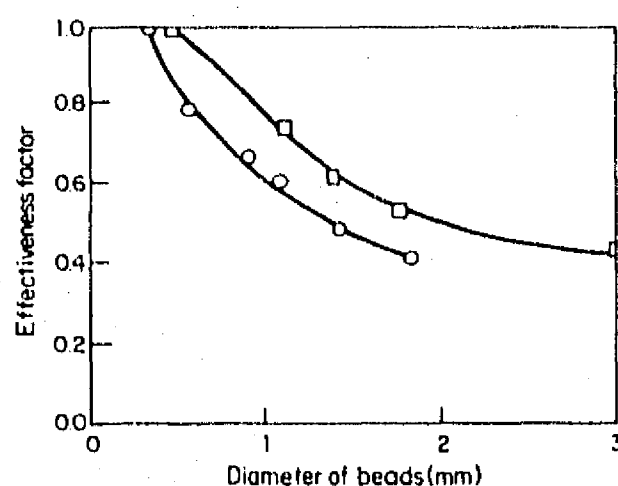


Figure 4 Effectiveness factor as a function of particle size for a penicillin acylase (○) and β -galactosidase (□) immobilized cell catalysts

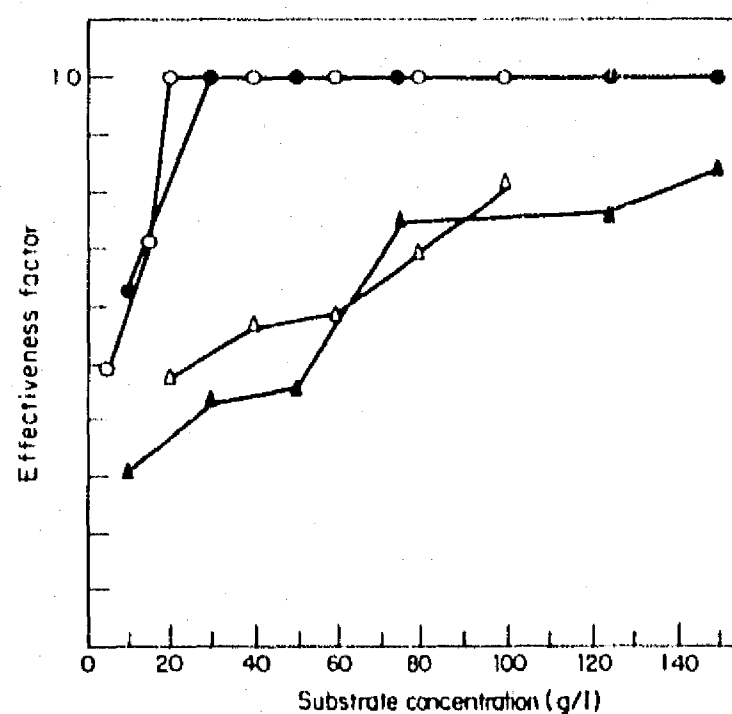


Figure 5 Effect of substrate concentration on effectiveness factor for two particle sizes of immobilized cell catalysts. *E. coli*: (○) 0.35 mm, (△) 1.44 mm; *K. fragilis*: (●) 0.35 mm, (▲) 1.44 mm

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

	Effectiveness factor		
	$S_0 = 50 \text{ g l}^{-1}$	$S_0 = 10 \text{ g l}^{-1}$	$S_0 = 1 \text{ g l}^{-1}$
1 2 V_{\max}	0.620	0.370	0.230
Actual activity (V_{\max}) ^a	0.500	0.278	0.170
2 V_{\max}	0.390	0.205	0.122
3 V_{\max}	0.328	0.172	0.100
5 V_{\max}	0.257	0.134	0.080
10 V_{\max}	0.197	0.093	0.055

^a Actual value is 1,666 Ug^{-1} cell

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 make 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 1,666 Ug^{-1} cell. A fivefold 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^{-1} . The specific activity of the catalyst would, however, increase from 550 to 1,485 Ug^{-1} cat, so the enzyme production cost will be an important criterion to define the catalyst production process.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Alfredo Martinez and Mario Caro for pilot plant support.

References

- 1 Radovich, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* 1985, 7, 2-10
- 2 Champluvier, B., Marchal, F. and Roussel, P. G. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, 11, 422-430
- 3 Vojtisek, V. and Jirka, V. *Food Microbiol.* 1983, 28, 309-340
- 4 Kolot, E. B. *Process Biochem.* 1980, 10-11, 2-8
- 5 Durand, G. and Navarro, J. M. *Process Biochem.* 1978, 9, 14-23
- 6 Cheetham, P. S. J. in *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Vol. 4 (Wiseman, Alan, ed.) Ellis Harwood Limited, England, 1980, pp. 189-238
- 7 Vojtisek, V. and Vaneek, Z. in *Overproduction of Microbial Metabolites: Strain Improvement and Process Control Strategies* (Vaneek, Z. and Hostalek, Z., eds.) Butterworths, Boston, 1986, pp. 183-212
- 8 Chibata, I., Tosa, T. and Takata, I. *Trends Biotechnol.* 1983, 1, 9-11
- 9 Kolarik, M. J., Chen, B. J., Emery, A. H. and Lim, H. C. in *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Process* (Olson, A. C. and Cooney, C. L., eds.) Plenum Press, New York, 1974, pp. 71-83
- 10 Tosa, T. *Abstract and Proceedings of the Bio Fair Tokyo 1986*, pp. 94-99
- 11 Hamilton, B. K., Hsiao, H. Y., Swann, W. E., Anderson, D. M. and Delente, J. J. *Trends Biotechnol.* 1985, 3, 64-68
- 12 Halwachs, W. *Process Biochem.* 1979, 6, 25-27
- 13 Engasser, J. M. and Horvath, C. in *Applied Biochemistry and*

- Bioengineering, Vol. 1* (Wingard, L., Katchalski, E. and Goldstein, L., eds.) Academic Press, New York, 1976, pp. 127-220
- 14 Webster, I. A. and Shuler, M. L. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, **21**, 1725-1748
- 15 Lee, Y. Y., Fratzke, A. R., Wun, K. and Tsao, G. T. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, **18**, 389-413
- 16 Rovito, B. J. and Kittrel, J. R. *Biotechnol. Bioeng.* 1973, **15**, 143-161
- 17 Lopez-Munguia, C. A. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 1981, **25**, 522-528
- 18 Lee, Y. Y. and Tsao, G. T. *J. Food Sci.* 1974, **39**, 667-672
- 19 Manjon, A., Iborra, J. L., Gomez, J. L., Gomez, E., Bastida, J. and Bodalo, A. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, **30**, 491-497
- 20 Satterfield, C. N. and Sherwood, T. K. *The Role of Diffusion in Catalysis* Addison-Wesley, Reading, MA, 1963, pp. 20-26
- 21 Castillo, R. E. and Casas, T. L. in *Physiology of Immobilized Cells, an International Symposium* (J. A. M. de Bont, J. Visser, B. Mattiasson and J. Tramper, eds.) Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, 1990, pp. 213-218
- 22 Su, H., Bajpai, R. and Preckshot, W. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989, **20/21**, 561-569
- 23 Wendorf, W. L. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, 1969
- 24 Casas, T. L. Research report. Regional Program of Biotechnology for Latin America and the Caribbean. PNUD/ONUDI December, 1989
- 25 Casas, T. L. Master in Science Thesis. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico, 1981
- 26 Furui, M. and Yamashita, K. *J. Ferment. Technol.* 1985, **63**, 167-173
- 27 Brito, E., Donjuan, J., Dominguez, F. and Casas, T. L. *J. Ferment. Bioeng.* 1990, **69**, 135-137
- 28 Friedman, L. and Kraemer, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1930, **52**, 205
- 29 Boersma, J. G., Vellenga, K., De Wilt, H. G. J. and Joosten, G. E. H. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, **21**, 1711-1724
- 30 Perry, R. H. and Chilton, C. H. *Chemical Engineers' Handbook* 5th ed. McGraw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo, 1973

A N E X O 3

Documentos Base para la Discusión de los Resultados

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN BIOCATALIZADOR CON CELULAS CON UNA PERMEABILIDAD CONTROLADA PARA LA HIDROLISIS DE LA LACTOSA.

INVENTORES: EDMUNDO CASTILLO ROSALES, de nacionalidad mexicana con domicilio en: Zolzahualcingo No. 13 Xochimilco C.P. 1600; LIDIA TERESITA CASAS DE TERRES, de nacionalidad mexicana con domicilio en: Blvd. Adolfo López Mateos 2109 Int. 501; CARLOS PEÑA, de nacionalidad mexicana con domicilio en Andador 2 Casa 98 Col. Altavista Cuernavaca Mor.

CAUSAHABIENTE: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, organismo descentralizado de nacionalidad mexicana con domicilio en el 9o. Piso de la Torre de Rectoría Ciudad Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F.

EXTRACTO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un procedimiento para obtener un biocatalizador con células con una permeabilidad controlada para la hidrólisis de la lactosa, el cual comprende los pasos de: preparar un cultivo para crecimiento de células de *K. fragilis* o *K. Lactis* en un medio de suero de leche y nutrientes; recuperación de las células; permeabilización controlada de las células obtenidas ya sea mediante tratamiento de las mismas con sales de Mg y Mn a bajas temperaturas o bien se someten a un secado por aspersión a temperaturas elevadas; inmovilización del biocatalizador mediante reacción con gelatina y glutaraldehído, caracterizado porque las células con permeabilidad controlada pueden reutilizarse en forma libre o inmovilizada, ya que permiten la entrada de sustratos y salida de productos sin que la enzima tal como la lactasa o β -galactosidasa u otro tipo de enzimas se liberen de la célula hacia la mezcla de reacción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se conocen diversas técnicas para la hidrólisis ácida de la lactosa para la obtención de sueros de leche o leche deslactosados, ya sea mediante blocatalizadores, o bien se puede llevar a cabo mediante reacción homogénea en la que el ácido se encuentra libre en la solución, o por reacción heterogénea, catalizada por iones de hidrógeno en una resina ácida de intercambio catiónico. Un alto grado de hidrólisis se obtiene en un período de tiempo corto bajo severas condiciones de pH y temperatura. Un ejemplo típico es efectuar un 80% de hidrólisis ácida en tres minutos con un pH de 1.2 y una temperatura de 150°C. El método es simple y no requiere de enzimas costosas, sin embargo estas técnicas presentan inconvenientes tales como:

No puede aplicarse a la hidrólisis de leche y a soluciones de lactosa con contenido protéico. Ejemplo suero de queso, por la desnaturalización de la proteína, que ocurre a altas temperaturas y bajos pH. Así su uso es limitado a suero UF permeada.

La presencia de sales en el suero causa la desactivación del ácido. Así se requiere una desmineralización del 90-95%. La aparición de una coloración café hace necesaria la adición de un paso de decoloración, mediante carbono activado.

Formación no deseada de productos de desecho, y el costo de materiales específicos para la construcción de plantas que resistan condiciones químicas agresivas, por ejemplo el uso de titanio.

La hidrólisis enzimática se conoce a partir de los años sesenta cuando Katchalski introduce el concepto de enzima inmovilizada, a partir de entonces el procedimiento de células inmovilizadas es desarrollado por Tosa y colaboradores. Hasta ese momento las enzimas se habían utilizado en forma libre o soluble con un costo muy alto ya que éstas se perdían o sacrificaban en cada reacción. Por lo tanto la inmovilización de las enzimas y/o células abren la posibilidad de su reutilización (la aplicación de la misma enzima o complejo enzimático

en diferentes reacciones); disminuyendo el costo de los procesos.

Cuando las enzimas son intracelulares, existe la alternativa de inmovilizar a las células que las contienen, eliminándose el proceso de purificación de la enzima, proporcionándole un medio ambiente más adecuado logrando una mayor estabilidad.

Las enzimas intracelulares pueden encontrarse en el citoplasma o en el espacio periplásmico de la célula. Cuando se localizan en este último no es necesario dar un tratamiento de permeabilización a las células para que haya una expresión adecuada de la enzima en cuestión; tal es el caso de la penicilino amidasa producido por células de *E. coli*; sin embargo cuando la enzima se encuentra en el citoplasma es necesario dar un tratamiento de permeabilización a la célula, para que ésta se exprese en forma adecuada.

La β -galactosidasa o lactasa es una enzima intracelular, y para que se exprese en células de la levadura ésta ha de sufrir un tratamiento de "permeabilización" que hasta la fecha ha sido más bien de extracción, ya que después de permeabilizadas las células, la enzima se localiza en la mezcla de reacción. Como ejemplo de estos tratamientos tenemos los realizados por: Mahoney (Tolueno), Castillo (Cloroformo) Vasilis (alcohol y acetona) y la permeabilización con sales realizadas por Brodski. En todos estos casos el objetivo a sido el de llevar a cabo una ruptura celular para liberar la enzima de las células y lograr una mayor expresión.

Existen un sin número de biocatalizadores con actividad de lactasa, la gran mayoría han sido elaborados con la lactasa extracelular producida por hongos, pocos son los biocatalizadores desarrollados con la enzima purificada de levadura *K. lactis* o *K. fragilis*, en ningún caso se ha reportado el uso repetido de células de levadura con permeabilidad controlada para la hidrólisis de la lactasa.

Los trabajos realizados sobre la elaboración de biocatalizadores con actividad de β -galactosidasa a partir de enzimas de levaduras, son pocos, comparados con los desarrollados con las enzimas de hongos. El

trabajo más sobresaliente es el realizado por Pastore y Morisi, quienes inmovilizaron la lactasa de *K. lactis* en fibras de triacetato de celulosa. Otros estudios menos exitosos son los realizados por Gist Brocades, por Kohlwey y Knopf; todos ellos con enzima purificada de levadura inmovilizada.

En la presente invención se ha desarrollado la obtención de un biocatalizador con actividad de lactasa, a partir de células de levadura, con una permeabilidad controlada, a través de su tratamiento por secado o en condiciones específicas de concentración de sales y temperatura.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un biocatalizador con células con una permeabilidad controlada para la hidrólisis de la lactosa, el cual comprende los pasos de preparar un cultivo para crecimiento de células de *K. fragilis* o *K. lactis* en un medio formulado a base de suero de leche y nutrientes a base de sales de sulfatos; en seguida se recuperan las células por métodos convencionales de separación; las células obtenidas se someten a permeabilización controlada mediante las alternativas de tratamiento de las células con sales de Mg y Mn mezclando a bajas temperaturas, o bien a un tratamiento de secado por aspersión de las células pero a temperaturas elevadas; en seguida si se requiere se inmoviliza el biocatalizador en una matriz a base de una solución de gelatina amortiguada y luego se extruye en glutaraldehído.

Es por lo tanto uno de los objetos de la presente invención, describir la producción de células de *K. fragilis* o *K. lactis*, con actividad de β -galactosidasa o lactasa, en un medio formulado a base de suero de leche.

Un objeto más del invento es la obtención de las células de levadura, con una permeabilidad controlada, a través de un tratamiento con sales y temperatura.

Otro objetivo más de la invención es procurar un proceso en el cual las condiciones en el secado de células de levadura, son críticas para obtener células con una permeabilidad controlada.

Otro objetivo es procurar un biocatalizador que puede actuar así o inmovilizado en donde la inmovilización de células de levadura con permeabilidad controlada es en una matriz de gelatina entrecruzada con glutaraldehído.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la obtención de un biocatalizador con actividad de lactasa, a partir de células de levadura, con una permeabilidad controlada, a través de su tratamiento por secado o en condiciones específicas de concentración de sales y temperatura. Estos tratamientos, controlados en ciertos límites, permiten que la enzima permanezca en el interior de la célula "inmovilizada" de tal forma que las células por si solas pueden ser reutilizadas; ésto permite que la enzima sea más estable ya que permanece en su medio ambiente.

En la presente invención también se describe, la obtención de un biocatalizador con actividad de lactasa, a partir de la inmovilización de células de levadura con una permeabilidad controlada, en una matriz a base gelatina y glutaraldehído.

Las células de levadura con permeabilidad controlada, protegen a la enzima permitiendo el tratamiento con glutaraldehído y gelatina estableciéndose una inmovilización por atrapamiento y entrecruzamiento; entrecruzando los grupos amino de la gelatina y de la célula de levadura con los grupos de aldehído del glutaraldehído, dá como resultado que esta doble inmovilización permite una mayor estabilidad del biocatalizador; por otro lado la cantidad de gelatina utilizada es mínima, por lo que los problemas difusionales son mínimos, así en este biocatalizador tenemos una eficiencia en la inmovilización del 50% (se expresa la mitad de la actividad enzimática inmovilizada) y en 50 lotes se tiene el 70% de conversión de lactosa y

el 100% de la actividad inicial.

En los siguientes ejemplos se describe la preparación del biocatalizador en forma más detallada con el objeto de ilustrar mejor la invención.

E J E M P L O

En un recipiente se lleva a cabo la preparación del biocatalizador en las siguientes etapas:

Etapa A: Se crecen células de *K. fragilis* o *K. lactis* en un medio constituido en % peso/volumen por 6.6 de suero de leche secado por aspersión, 0.75 de extracto de levadura, 0.84 de sulfato de amonio, 0.05 de sulfato de magnesio. Se ajusta el pH a 5.5 con ácido fosfórico; y se crecen las células a 29°C durante 12 a 18 horas. Después de este período de crecimiento de células son cosechadas por centrifugación.

Etapa B: Permeabilidad controlada por sales. Las células obtenidas como el inciso anterior, se resuspenden en una mezcla de fosfato de potasio dibásico 300 a 400 mM y sulfato de magnesio 20 a 40 mM. La suspensión de células y sales se coloca en un baño a temperatura entre 45°C y 60°C y se agita a 160, 180 rpm durante 75 a 130 minutos. Las células así tratadas son lavadas tres veces con agua destilada.

El biocatalizador preparado por las etapas A y B pueden operar en estas condiciones o también mediante la siguiente alternativa:

Etapa C: Permeabilidad controlada por secado por aspersión.

Las células crecidas y obtenidas como en el primer inciso se suspenden para tener una concentración de sólidos del 10% al 30%, estas células son alimentadas a un secador por atomización centrifuga, con control de tamaño de partícula mediante el ajuste de velocidad y que opere con una corriente paralela a la atomización. Las células son alimentadas al secador, manteniendo una temperatura del aire seco entre 130°C a 155°C y una temperatura de aire húmedo de 80°C a 100°C.

El biocatalizador preparado por las etapas A y B ó A y C puede también ser operativo bajo condiciones de inmovilización si es que se requiere, el cual se lleva a cabo en la siguiente etapa D.

Etapa D: Inmovilización del biocatalizador.

Se pesan a 40 a 120 gramos de gelatina, y se disuelven a 180 ml de solución amortiguadora de fosfatos, pH de 6.0 a 7.5, 0.1 a M, a 50°C la solución de gelatina se enfría a 37°C y se añaden de 40 a 64 gramos de células de *K. lactis* o *K. fragilis* con permeabilización controlada (células de levadura permeabilizadas con sales y temperatura o secado, la suspensión se agita vigorosamente para homogenizar y se enfría hasta 13° a 17°C. La suspensión se extruye en una solución de glutaraldehído 1 a 4%.

Las fibras se separan y se lavan exhaustivamente.

En los siguientes ejemplos se describe la aplicación del biocatalizador en sus diferentes formas de su preparación:

E J E M P L O

Hidrólisis de la lactosa con el biocatalizador con células con permeabilidad controlada y con actividad galactosidasa.

Dos gramos de células de *K. fragilis* o *K. lactis* con permeabilidad controlada, obtenidas por secado, o con tratamiento de sales y temperatura, como se describe en los ejemplos anteriores, se colocan en un litro de suero de leche o en un litro de una solución de lactosa al 15%, en un litro de leche, se ajusta el pH entre 6.4 y 6.6 y la temperatura entre 25°C y 37°C. La mezcla de reacción se agita durante 90 minutos, las células se filtran y se vuelven a utilizar en las mismas condiciones. La conversión de lactosa obtenida es del 65% al 75%.

Esta operación se lleva a cabo las veces que se requieran hasta que las células ya no presenten actividad de lactasa.

E J E M P L O

Se pesan de 1.5 a 6 gramos de fibras de gelatina, y se colocan en un litro de suero dulce de leche o una solución de lactosa al 5% o un litro de leche, se vigila que el pH oscile entre 6.4 y 6.6 y se ajuste la temperatura en un rango de 25°C a 37°C., la solución se agita y se deja que la reacción se lleve a cabo durante 90 minutos, tiempo en el que se obtendrá una conversión del 65% al 75%. Una vez concluida la reacción, se separan las fibras y se lavan con alguna sal cuaternaria de amonio y se vuelven a utilizar de la misma forma. La operación se realiza las veces que se desee hasta que las fibras ya no presenten actividad de lactasa.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la invención, se considera como una novedad y por tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas.

1. Procedimiento para obtener un biocatalizador con células con una permeabilidad controlada para la hidrólisis de la lactosa el cual comprende los pasos de: preparar cultivo para crecimiento de células de *K. fragilis* o *K. lactis* en un medio de suero lácteo y nutrientes a base de sales de sulfato a temperaturas comprendidas de 26°C a 30°C y un pH ligeramente ácido; separación de las células crecidas; permeabilización controlada de las células mediante mezclado de las mismas con sales de Mg y Mn a temperaturas bajas o a un secado sin sales por aspersion a temperaturas comprendidas entre 120°C y 160°C caracterizado porque las células con permeabilidad controlada pueden reutilizarse en forma libre o inmovilizada para permitir la entrada de sustratos y salida de productos sin que la enzima se libere de las células hacia la mezcla de reacción.

2. Un procedimiento para obtener un biocatalizador de conformidad con la cláusula 1, caracterizado porque la permeabilidad de las células con sales de fosfatos y sulfatos se resuspenden a temperaturas de 40°C a 70°C.

3. Un procedimiento para obtener un biocatalizador de conformidad con la cláusula 1, caracterizado porque la inmovilización del biocatalizador se efectúa en una matriz a base de una solución de gelatina, amortiguada con fosfatos y enseguida se extruye con un compuesto de glutaraldehído obteniéndose una inmovilización doble por atrapamiento y entrecruzamiento.

4. Un procedimiento para obtener un biocatalizador de conformidad con la cláusula 1, caracterizado porque los nutrientes empleados son preferentemente sales de sulfato de amonio y magnesio.

En testimonio de lo cual firmo la presente en la Ciudad de México Distrito Federal a los 10 días del mes de noviembre de mil novecientos ochenta y nueve.

POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MTRO. JOSE DE JESUS OROZCO HENRIQUEZ
A P O D E R A D O

HIDROLISIS ENZIMATICA DE SUERO DE LECHE

Introducción

En el Instituto de Biotecnología de la UNAM se han desarrollado las tecnologías para la producción y aplicación de la enzima β -galactosidasa. Con esta enzima es posible hidrolizar la lactosa, azúcar presente en la leche y suero de leche, dando así aplicaciones potenciales a los productos hidrolizados en la elaboración de bebidas de frutas, helados, rellenos para confitería, yogurt, cajetas, etc.

Durante el período de 1988-89 se trabajó en colaboración con la empresa Kem Fuds, realizando estudios en la obtención, utilización de jarabes dulces (suero dulce de leche completo, con el 70% de la lactosa hidrolizada y 70% de sólidos). Durante los estudios se aplicó la enzima soluble producida en el Instituto, y se observó la necesidad de abaratar el jarabe, por tener su mercado principal como sustituto de suero seco, cuyo costo aproximado de producción es de 1,545.75 kg. Así, se contempla la alternativa de inmovilizar la enzima β -galactosidasa y disminuir de esta forma los costos de producción del jarabe que se calcularon de \$ 1,304.8 kg de producto utilizando la enzima soluble. Así con el objeto de tener una idea de la viabilidad económica y factores económicos que afecten la obtención del producto utilizando la enzima inmovilizada, se procedió a realizar un perfil financiero y estudio de sensibilidad. A continuación se presentan los procedimientos y resultados de dichos análisis.

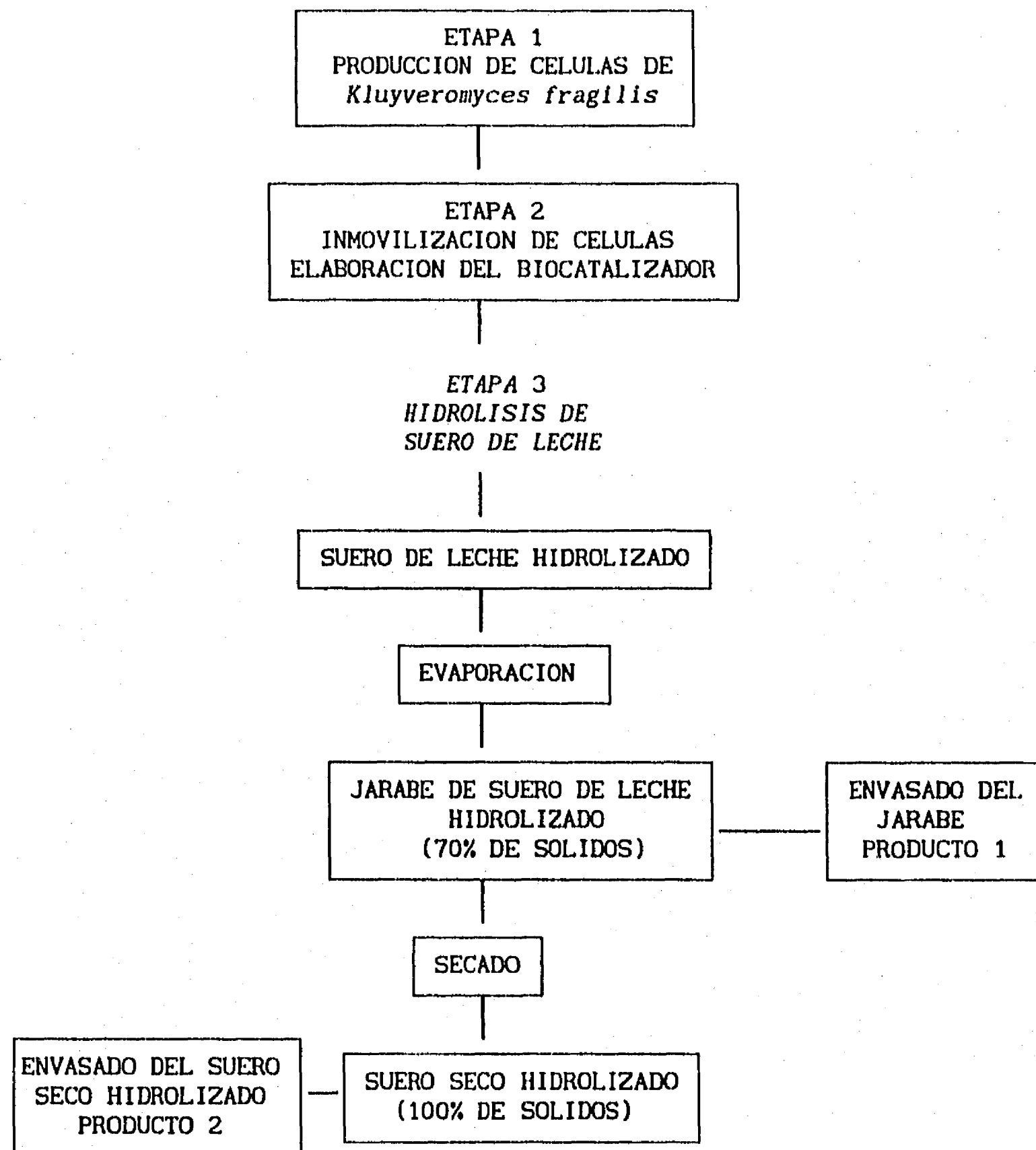
Análisis Financiero

A fin de evaluar el costo de la implementación de la enzima inmovilizada en el proceso de hidrólisis para la obtención de jarabes dulces y/o suero seco hidrolizado, se elaboró un perfil financiero cuyos resultados apoyan la integración del paquete tecnológico del proyecto mencionado.

En este sentido, se presenta el desarrollo y los resultados del ejercicio financiero considerando dos alternativas, la primera, que contempla la producción de jarabe y la segunda la producción de suero seco hidrolizado.

Cabe mencionar que inicialmente el desarrollo tecnológico estuvo orientado específicamente a obtención de jarabes, sin embargo, en base a la versatilidad del proceso para obtener tanto jarabe como un producto en polvo con el mismo equipo, y debido a las ventajas que presenta el segundo, en cuanto a manejo e incorporación en la formulación de los productos, como un producto en polvo, se consideró la importancia de realizar el análisis financiero contemplando estas dos alternativas. En la figura 1, se describe el proceso general para la obtención de los dos productos mencionados.

FIGURA 1 DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE
JARABE O SUERO SECO HIDROLIZADO



Los resultados se presentan en pesos constantes y contemplan un horizonte de planeación de 5 años, asimismo se contempla la utilización de factores reportados en la literatura especializada para el cálculo de varios rubros dentro del proyecto (1).

La implementación del proceso de hidrólisis de suero de leche con enzima inmovilizada no considera financiamiento.

A continuación se describen las consideraciones técnicas y de mercado, tomadas en cuenta para el análisis financiero.

Bases de Cálculo del Análisis

1. Consideraciones Técnicas

El proceso de hidrólisis de suero contempla tres etapas, desde la producción de la enzima vía fermentativa hasta la obtención del hidrolizado (suero seco y jarabe). Las etapas se definen de la siguiente manera:

ETAPA 1 Producción de enzima β -galactosidasa, vía fermentación utilizando *K. fragilis*.

Condiciones de producción de células de *K. fragilis*.

- * 70% de eficiencia en el proceso de recuperación
- * Una fermentación por mes
- * 12 fermentaciones por año
- * Producción de 270 kg de células al año

ETAPA 2 Inmovilización de células con actividad β -galactosidasa.

Condiciones para la producción del Biocatalizador

- * Composición de biocatalizador.
75% agua y 25% sólidos (60% células de *K. fragilis*).
- * Requiere control variable de temperaturas que van desde 40° hasta 50° C en las diferentes etapas.
- * 150 kg. de biocatalizador con un tiempo de operación 6.3 h por día y una vida útil de 30 días.
- * Una producción de 1800 kg de Catalizador por año.

ETAPA 3 Proceso de hidrólisis enzimática de suero utilizando células de *K. fragilis* inmovilizadas, para la producción de jarabe.

Condiciones de hidrólisis del suero de leche.

- * Hidrolizar 40,000 l de suero diarios.
- * Tiempo de hidrólisis 6.3 horas por día.
- * Temperatura de hidrólisis 40°C.
- * 300 días de operación al año.

Cabe mencionar que se consideran estas tres etapas, bajo la premisa de que la empresa hidrolice el suero de leche, tenga también la capacidad de producir biocatalizador para autoconsumo.

2. Volumen de Producción

De la reunión previa con la empresa interesada en la transferencia de la tecnología, se estableció que la producción de jarabe de suero hidrolizado y de suero seco hidrolizado se defina en función de la disponibilidad de la materia prima, es decir, suero de leche fresco, la cual asciende a 40,000 l diarios, lo que corresponde a 12 millones de litros al año.

Por otro lado, se considera una programación de la producción en función de la utilización capacidad de la planta estimada, es decir, al primer año se utilizará el 75%, 90% al segundo y del tercero al quinto año el 100%.

Por lo anterior, el volumen de producción tanto para jarabe de suero hidrolizado como para suero seco hidrolizado, para los fines de este estudio, queda comprendido de la siguiente manera:

P R O D U C C I O N
(Kg)

PRODUCTO	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5
JARABE	900,000	1,080,000	1,200,000
SUERO SECO	630,000	756,000	840,000

3. Precio de Venta

El precio de venta del jarabe y del suero seco hidrolizado, se estimó en función del precio de venta del suero seco en polvo, cotizado en Nutrical S.A. de C.V. que es de \$ 2,100.00/Kg, estableciéndose para el jarabe un precio de \$ 1,470.00/Kg, en base al contenido de sólidos y de \$ 2,100.00/Kg para el suero seco hidrolizado.

4. Ingresos anuales

El monto por concepto de ingresos en la venta de jarabe de suero hidrolizado y de suero seco hidrolizado, se presentan en los cuadros 1a y 1b para cada uno de los productos. Tales ingresos ascienden a \$ 1,323 millones de pesos en ambos análisis.

CUADRO 1a

PRESUPUESTO DE INGRESOS DEL PROYECTO
OBTENCION DE JARABE

	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5
PRODUCCION DE JARABE (Kg/año)	900,000	1,080,000	1,200,000
PRECIO (\$/Kg)	1,470	1,470	1,470
INGRESO ANUAL (miles \$)	1,323,000	1,587,600	1,764,000

(1) Sobre la base de 300 días laborables.
El precio se ajusta sobre la base de sólidos que contiene y el precio de venta del suero seco hidrolizado en donde se considera el 100% de sólidos.

CUADRO 1b

PRESUPUESTO DE INGRESOS DEL PROYECTO
SUERO SECO HIDROLIZADO

	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5
PRODUCCION DE SUERO SECO (Kg/año)	630,000	756,000	840,000
PRECIO (\$/Kg)	2,100	2,100	2,100
INGRESO ANUAL (miles \$)	1,323,000	1,587,600	1,764,000

(1) Sobre la base de 300 días laborables.
El precio se ajusta sobre la base de sólidos que contiene y el precio de venta del suero hidrolizado en donde se considera el 100% de sólidos.

5. Inversión

A partir de la información proporcionada por el Instituto, sobre el proceso de hidrólisis de suero de leche, se estimó el equipo mínimo necesario y el resto de los conceptos de la inversión total, la cual asciende a \$ 1,121.3 millones de pesos, para la primera alternativa y \$ 1,110.2 para la segunda ver, cuadros 2a y 2b. La inversión total comprende: la inversión fija, la inversión diferida y el capital de trabajo, con respecto al equipo necesario, hay que aclarar que el secador de spreas se necesita para el secado de las células así como para el secado del suero hidrolizado, es por esto que el monto de la inversión en equipo es la misma para ambas alternativas. Como se mencionó con anterioridad, en el estudio se utilizaron factores reportados en la literatura especializada (1), por lo que muchos de los rubros considerados en la inversión fija se basan en el costo del equipo del proceso, el cual se detalla en el anexo I.

CUADRO 2a

INVERSION TOTAL REQUERIDA PARA EL PROYECTO OBTENCION DE JARABE
(MILES PESOS)

CONCEPTO	MONTO
1. INVERSION FIJA	820,032
- EQUIPO DE PROCESO	613,567
- OBRA CIVIL (1)	49,085
- INSTALACIONES (2)	73,628
- INSTALACION ELECTRICA (3)	9,204
- IMPREVISTOS (4)	74,548
2. INVERSION DIFERIDA	102,375
- INGENIERIA Y SUPERVISION (5)	83,007
- PUESTA EN MARCHA (6)	19,368
3. CAPITAL DE TRABAJO	198,885
- CAJA Y BANCOS	16,550
- INVENTARIOS	102,403
- CUENTAS POR COBRAR	110,250
- CUENTAS POR PAGAR	30,318
TOTAL	1,121,292

- (1) Equivalentes al 8% de Maquinaria y Equipo
 (2) Equivalentes al 12% de Maquinaria y Equipo
 (3) Equivalentes al 1.5% de Maquinaria y Equipo
 (4) Equivalente al 10% del Equipo de Proceso obra civil, instalaciones e inst. eléctrica.
 (5) Equivalente al 20% del cto. directo de producción
 (6) Equivalente a 2 semanas de costo directo de producción

CUADRO 2b

INVERSION TOTAL REQUERIDA PARA EL PROYECTO
OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	MONTO
1. INVERSION FIJA	820,032
- EQUIPO DE PROCESO	613,567
- OBRA CIVIL (1)	49,085
- INSTALACIONES (2)	73,628
- INSTALACION ELECTRICA (3)	9,204
- IMPREVISTOS (4)	74,548
2. INVERSION DIFERIDA	102,813
- INGENIERIA Y SUPERVISION (5)	83,362
- PUESTA EN MARCHA (6)	19,451
3. CAPITAL DE TRABAJO	187,358
- CAJA Y BANCOS	16,555
- INVENTARIOS	91,019
- CUENTAS POR COBRAR	110,250
- CUENTAS POR PAGAR	30,466
TOTAL	1,110,204

- (1) Equivalentes al 8% de Maquinaria y Equipo
 (2) Equivalentes al 12% de Maquinaria y Equipo
 (3) Equivalentes al 1.5% de Maquinaria y Equipo
 (4) Equivalente al 10% del Equipo de Proceso, obra civil, instalaciones e inst. eléctrica
 (5) Equivalente al 20% del cto. directo de producción
 (6) Equivalente a 2 semanas de costo directo de producción

Para la estimación del capital de trabajo se consideró: un mes de sueldos y salarios así como otros gastos para la cuenta de caja y bancos, los inventarios se calcularon a partir del costo de tres días de materia prima y el costo de un mes de producto terminado a costo de producción, las cuentas por cobrar comprenden 30 días de producto terminado a precio de venta y en las cuentas por pagar se estimó en 30 días de crédito por compra de materia prima e insumos.

El cuadro 3 muestra el detalle de capital de trabajo necesario para indicar los trabajos de operación de la planta con cada uno de los conceptos anteriormente descritos.

CUADRO 3a
CAPITAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCION DE JARABE
BASES DE CALCULO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	MONTO INICIAL	MONTO AÑO 1	MONTO AÑO 2	MONTO AÑO 3
1. CAJA Y BANCOS 1 mes de sueldos y salarios y otros gastos.	16,550	16,550	16,550	16,550
2. INVENTARIOS	102,403	102,403	114,007	118,509
(A) MATERIA PRIMA 3 días de materias primas.	3,356	3,356	4,027	4,474
(B) PRODUCTO TERMINADO 1 mes de costo de pdon.	99,047	99,047	109,981	114,035
3. CUENTAS POR COBRAR 30 días de producto a precio de venta.	110,250	110,250	132,300	147,000
4. CUENTAS POR PAGAR 30 días de crédito por compra de materia prima e insumos.	30,318	30,318	36,381	40,424
TOTAL	198,885	198,885	226,476	241,636

CUADRO 3b
CAPITAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
BASES DE CALCULO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	MONTO INICIAL	MONTO AÑO 1	MONTO AÑO 2	MONTO AÑO 3-5
1. CAJA Y BANCOS 1 mes de sueldos y salarios y otros gastos.	16,555	16,555	16,555	16,555
2. INVENTARIOS	91,019	91,019	100,345	103,328
(A) MATERIA PRIMA 3 días de materias primas.	3,356	3,356	4,027	4,474
(B) PRODUCTO TERMINADO 1 mes a costo de pdon.	87,663	87,663	96,318	98,853
3. CUENTAS POR COBRAR 30 días de producto a precio de venta.	110,250	110,250	132,300	147,000
4. CUENTAS POR PAGAR 30 días de crédito por compra de materia prima e insumos.	30,466	30,466	36,559	40,621
TOTAL	187,358	187,358	212,641	226,262

6. Presupuesto de egresos

En el presupuesto de egresos se consideran: los costos variables, costos fijos, gasto de administración y gastos de venta. Es importante señalar que para el análisis de ambos productos se contemplan las mismas consideraciones salvo el caso de los costos variables de insumos, transporte y el precio de venta, que debido a las particularidades de cada una de ellos resultaron diferentes. Este presupuesto se presenta en el cuadro 4, de cada uno de los productos.

CUADRO 4a
PRESUPUESTO DE EGRESOS DEL PROYECTO PARA LA OBTENCION DE JARABE
(MILES PESOS)

CONCEPTO	AÑOS DE OPERACION				
	1	2	3	4	5
1. COSTOS VARIABLES	805,412	824,684	1,004,199	1,004,199	1,004,199
- MATERIAS PRIMAS (1)	335,559	402,671	447,412	447,412	447,412
ETAPA I	4,275	5,130	5,700	5,700	5,700
ETAPA II	61,013	73,216	81,351	81,351	81,351
ETAPA III	270,272	324,326	360,362	360,362	360,362
- INSUMOS (2)	28,253	33,903	37,670	37,670	37,670
- MANO DE OBRA (3)	51,223	51,223	51,223	51,223	51,223
- ETAPA I	550	550	550	550	550
- ETAPA II	550	550	550	550	550
- ETAPA III	50,124	50,124	50,124	50,124	50,124
- COSTO TRANSPORTE (4)	192,857	231,429	257,143	257,143	257,143
- PERSONAL SUPERV. (5)	10,245	10,245	10,245	10,245	10,245
- MANTENIMIENTO (6)	18,448	18,448	18,448	18,448	18,448
- REGALIAS (7)	39,690	47,628	52,920	52,920	52,920
- SERVICIOS (8)	129,137	129,137	129,137	129,137	129,137
2. COSTOS FIJOS DEPREC. Y AMORT.	267,112	267,112	231,832	20,151	20,151
3. GASTOS ADMIN. (9)	7,992	7,992	7,992	7,992	7,992
4. GASTOS DE VENTA (10)	108,052	119,979	124,402	103,234	103,234
TOTAL	1,188,567	1,319,766	1,368,424	1,135,576	1,135,576

- (1) Corresponde a la producción de 900,000 Kg, 1'080,000 y 1'200,000 Kg de Jarabe de suero hidrolizado, en los años 1, 2 y 3 al 5, respectivamente.
(2) Incluye el costo de 5,556 envases de hojalata de 19 l, de \$ 6,780.12/ envase.
(3) Corresponde a sueldo de: 15 Operarios \$ 278,464/mes por un año y además 5 operarios que trabajan 12 días con un sueldo de \$ 9,160/día.
(4) Costo de flete de 100,000 kg por mes de Tampico-México-Tampico \$212.32/Kg.
(5) Equivalente al 20% de la mano de obra directa.
(6) 2% de Inversión Fija + Diferida.
(7) Corresponde al 3% de las ventas totales.
(8) 14% de Inversión Fija + Diferida.
(9) Corresponde al 10% de Mano de Obra, Personal de Supervisión y Mantenimiento.
(10) Considera el 10% de los costos fijos, variables y de admon.

CUADRO 4b
PRESUPUESTO DE EGRESOS DEL PROYECTO PARA LA OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	AÑOS DE OPERACION				
	1	2	3	4	5
1. COSTOS VARIABLES	681,180	775,592	838,533	838,533	838,533
- MATERIAS PRIMAS (1)	335,559	402,671	447,412	447,412	447,412
ETAPA I	4,275	5,130	5,700	5,700	5,700
ETAPA II	61,013	73,216	81,351	81,351	81,351
ETAPA III	270,272	324,326	360,362	360,362	360,362
- INSUMOS (2)	30,029	36,034	40,038	40,038	40,038
- MANO DE OBRA (3)	51,223	51,223	51,223	51,223	51,223
- ETAPA I	550	550	550	550	550
- ETAPA II	550	550	550	550	550
- ETAPA III	50,124	50,124	50,124	50,124	50,124
- COSTO TRANSPORTE (4)	66,780	80,136	89,040	89,040	89,040
- PERSONAL SUPERV. (5)	10,245	10,245	10,245	10,245	10,245
- MANTENIMIENTO (6)	18,457	18,457	18,457	18,457	18,457
- REGALIAS (7)	39,690	47,628	52,920	52,920	52,920
- SERVICIOS (8)	129,198	129,198	129,198	129,198	129,198
2. COSTOS FIJOS DEPREC. Y AMORT.	267,156	267,156	231,832	20,195	20,195
3. GASTOS ADMIN. (9)	7,992	7,992	7,992	7,992	7,992
4. GASTOS DE VENTA (10)	95,633	105,074	86,672	96,672	86,672
TOTAL	1,051,962	1,155,614	953,393	953,393	953,393

- (1) Corresponde a la producción de 630,000 Kg, 756,000 y 840,000 Kg de suero seco hidrolizado, en los años 1, 2 y 3 al 5, respectivamente.
(2) Incluye el costo de 37,038 sacos de papel de 50 lb con un precio de \$ 1,081.00.
(3) Corresponde a sueldo de: 15 Operarios \$ 278,464/mes por un año y además 5 operarios que trabajan 12 días con un sueldo de \$9,160/día.
(4) Costo del flete de 70,000 Kg por mes de Tampico-México \$ 160.00/Kg.
(5) Equivalente al 20% de la mano de obra directa.
(6) 2% de Inversión Fija + Diferida.
(7) Corresponde al 3% de las ventas totales.
(8) 14% de Inversión Fija + Diferida.
(9) Corresponde al 10% de Mano de Obra, Personal de Supervisión y Mantenimiento.
(10) Considera el 10% de los costos fijos, variables y de admon.

Dentro de los servicios se consideraron: el suministro de energía eléctrica, vapor, agua, gas, compresión del aire, refrigeración, comunicación, almacén, seguridad y salubridad. Es importante señalar que el costo de materias primas asciende a 335.6 millones de pesos al año, representando entre el 41 y 48% del total de los costos variables. Su desglose se presenta en el cuadro 5 de cada variante.

CUADRO 5a
BALANCE DE MATERIAS PRIMAS E INSUMOS PARA LA OBTENCION DE JARABE

ETAPA I PRODUCCION DE CELULAS	REQUERIMIENTOS				PRECIO UNITARIO	COSTO ANUAL (MILES DE PESOS)		
	DIA	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5		AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5
ACIDO FOSFORICO	4	32	39	43	3,850	124	148	165
EXTRACTO DE LEVADURA	27	241	289	321	12,500	3,014	3,617	4,019
SUERO DE LECHE	3,572	32,144	38,572	42,858	30	964	1,157	1,286
SULFATO DE AMONIO	30	273	328	364	500	137	164	182
SULFATO DE MAGNESIO	2	16	19	21	2,250	36	43	48
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						4,275	5,130	5,700
ETAPA II INMOVILIZACION DE CELULAS								
CLORURO DE SODIO	1,010	9	11	12	2,157	20	24	26
GLUTARAL- DEHIDO	70,310	633	759	844	95,550	60,463	72,556	80,617
GRENETINA	4,220	38	46	51	13,600	517	620	689
HIDROXIDO DE SODIO	0.135	1.2	1.5	1.6	10,350	13	15	17
SULFATO DE MAGNESIO	0.040	0.4	0.4	0.5	2,300	0.83	0.99	1.10
SULFATO DE MANGANESO	0.003	0.03	0.04	0.04	9,890	0.30	0.36	4.40
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						61,013	73,216	81,351
ETAPA III HIDROLISIS DE SUERO								
SUERO DE LECHE	40,000	9,000,000	10,800,000	12,000,000	30	270,000	324,000	360,000
BENZOATO DE SODIO	0.21	47	57	63	5,750	272	326	362
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						270,272	324,326	360,362
TOTAL ANUAL TRES ETAPAS (MILES DE PESOS)						335,559	402,671	447,412
COSTO POR LITRO DE SUERO HIDROLIZADO						37.28	37.28	37.28
COSTO POR LITRO DE JARABE						372.84	372.84	372.84

CUADRO 5b
BALANCE DE MATERIAS PRIMAS E INSUMOS PARA LA OBTENCION DE SUERO
SECO HIDROLIZADO

ETAPA I PRODUCCION DE CELULAS	REQUERIMIENTOS				PRECIO UNITARIO	COSTO ANUAL (MILES DE PESOS)		
	DIA	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5		AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3-5
ACIDO FOSFORICO	4	32	39	43	3,850	124	148	165
EXTRACTO DE LEVADURA	27	241	289	321	12,500	3,014	3,617	4,019
SUERO DE LECHE	3,572	32,144	38,572	42,858	30	964	1,157	1,286
SULFATO DE AMONIO	30	273	328	364	500	137	164	182
SULFATO DE MAGNESIO	2	16	19	21	2,250	36	43	48
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						4,275	5,130	5,700
ETAPA II INMOVILIZACION DE CELULAS								
CLORURO DE SODIO	1,010	9	11	12	2,157	20	24	26
GLUTARAL- DEHIDO	70,310	633	759	844	95,550	60,463	72,556	80,617
GRENETINA	4,220	38	46	51	13,600	517	620	689
HIDROXIDO DE SODIO	0.135	1.2	1.5	1.6	10,350	13	15	17
SULFATO DE MAGNESIO	0.040	0.4	0.4	0.5	2,300	0.83	0.99	1.10
SULFATO DE MANGANESO	0.003	0.03	0.04	0.04	9,890	0.30	0.36	0.04
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						61,013	73,216	81,351
ETAPA III HIDROLISIS DEL SUERO								
SUERO DE LECHE	40,000	9,000,000	10,800,000	12,000,000	30	270,000	324,000	360,000
BENZOATO DE SODIO	0.21	47	57	63	5,750	272	326	362
SUBTOTAL ANUAL (MILES DE PESOS)						270,272	324,326	360,362
TOTAL ANUAL TRES ETAPAS (MILES DE PESOS)						335,559	402,671	447,412
COSTO POR LITRO DE SUERO HIDROLIZADO						37.28	37.28	37.28
COSTO POR KG DE SUERO EN POLVO HIDROLIZADO						532.63	532.63	532.63

Los costos fijos corresponden a las depreciaciones y amortizaciones de la inversión que se determinaron en base a lo establecido por la ley fiscal para estos conceptos.

El cálculo de la tabla de amortizaciones y depreciaciones se muestra en el cuadro 6 de ambas alternativas.

CUADRO 6a
DETALLE DE AMORTIZACIONES Y DEPRECIACIONES CONSIDERADAS
PARA EL PROYECTO OBTENCION DE JARABE
(MILES PESOS)

CONCEPTO	INVERSION	TASAX	AÑOS	AÑO 1 Y 2	AÑO 3	AÑO 4 Y 5
1. INVERSION FIJA	857,306			256,874	221,594	9,914
- EQUIPO DE PROCESO	705,602	35	3	246,961	211,681	0
- OBRA CIVIL	56,448	5	20	2,822	2,822	2,822
- INSTALACIONES	84,672	8	13	6,774	6,774	6,774
- INSTAL. ELECTRICA	10,584	3	33	318	318	318
2. INVERSION DIFERIDA	102,375			10,238	10,238	10,238
- ING. Y SUPERVISION	83,007	10	10	8,301	8,301	8,301
- PUESTA EN MARCHA	19,368	10	10	1,937	1,937	1,937
T O T A L	959,682			267,112	231,832	20,151
VALOR DE RESCATE						153,324

*Porcentajes autorizados en la legislación fiscal.

CUADRO 6 b
DETALLE DE AMORTIZACIONES Y DEPRECIACIONES CONSIDERADAS PARA
EL PROYECTO OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	INVERSION	TASAX	AÑOS	AÑO 1 Y 2	AÑO 3	AÑO 4 Y 5
1. INVERSION FIJA	857,306			256,874	221,594	9,914
- EQUIPO DE PROCESO	705,602	35	3	246,961	211,681	0
- OBRA CIVIL	56,448	5	20	2,822	2,822	2,822
- INSTALACIONES	84,672	8	13	6,774	6,774	6,774
- INSTAL. ELECTRICA	10,584	3	33	318	318	318
2. INVERSION DIFERIDA	102,813			10,281	10,281	10,281
- ING. Y SUPERVISION	83,362	10	10	8,336	8,336	8,336
- PUESTA EN MARCHA	19,451			1,945	1,945	1,945
T O T A L	960,120			267,156	231,876	20,195
VALOR DE RESCATE						153,543

*Porcentajes autorizados en la legislación fiscal.

A continuación se presenta un cuadro resumen de las erogaciones estimadas para cada alternativa analizada.

CUADRO RESUMEN

CONCEPTO	ALTERNATIVAS (Millones de pesos)	
	J (JARABE)	B (BUEBO)
INGRESOS		
Año 1	1.323.0	1.323
Año 2	1.587.6	1.587.6
Año 3-5	1.766.0	1.766.0
INVERSION		
Fija	820.0	820.0
Diferida (a)	102.3	102.8
Capital de trabajo (a)	198.9	187.3
COSTOS VARIABLES		
MATERIAS PRIMAS		
Año 1	335.6	335.6
Año 2	402.7	402.7
Año 3-5	447.4	447.4
INSUMOS		
Año 1	28.2	30.0
Año 2	33.9	36.0
Año 3	37.7	40.0
COSTO DE TRANSPORTE		
Año 1	192.9	66.8
Año 2	231.4	80.1
Año 3	257.1	89.0
MANO DE OBRA		
Años 1-5	51.2	51.2
PERSONAL DE SUP.		
Años 1-5	10.2	10.2
MANTENIMIENTO		
Años 1-5	18.5	18.5
REGALIAS		
Año 1	39.7	39.7
Año 2	47.6	47.6
Años 3-5	52.9	52.9
COSTOS FIJOS		
DEPRECIACIONES Y AMORT.		
Años 1 y 2	267.1	267.1
Año 3	231.9	231.9
Año 4 y 5	20.1	20.1
GASTOS DE ADMINISTRACION		
Años 1-5	7.9	7.9
GASTOS DE VENTA		
Año 1	108.0	95.6
Año 2	119.9	105.1
Año 3	124.4	107.8
Año 4 y 5	103.2	86.7

Como se puede observar las diferencias resultan por el costo de producción, que incluye diferentes costos de insumos y transporte.

RESULTADO DEL ANALISIS DE LA EVALUACION FINANCIERA

Para la realización de la evaluación financiera del proyecto se procedió a elaborar los documentos contables en los que se resume el desarrollo del análisis.

Los cuadros 7a y 7b presentan el Estado de Resultados Proforma, observándose que los costos de producción tanto de jarabe como de suero seco hidrolizado, son menores que los ingresos por ventas realizadas durante el horizonte del ejercicio, lo que se refleja en la obtención de una utilidad neta que en el primer año es de 73.9 millones de pesos en el caso de jarabe y de 149.1 millones para el suero seco hidrolizado.

CUADRO 7a

ESTADO DE RESULTADOS PROFORMA PARA LA OBTENCION DE JARABE
(MILES PESOS)

CONCEPTO	1	2	3	4	5
1. INGRESOS POR VENTAS (1)	1,323,000	1,587,600	1,764,000	1,764,000	1,764,000
2. COSTOS DE PRODUCCION	1,072,524	1,191,796	1,236,030	1,024,350	1,024,350
- COSTOS DIRECTOS	737,029	848,363	922,586	922,586	922,586
- COSTOS INDIRECTOS	335,495	343,433	313,445	101,764	101,764
3. UTILIDAD BRUTA	250,476	395,804	527,970	739,650	739,650
4. GASTOS ADMINIST.	7,992	7,992	7,992	7,992	7,992
5. GASTOS DE VENTA	108,052	119,979	124,402	103,234	103,234
6. UTILIDAD DE OPERACION	134,433	267,834	395,576	628,424	628,424
7. I.S.R. Y R.U. (2)	60,495	120,525	178,009	282,791	282,791
8. UTILIDAD NETA	73,938	147,309	217,567	345,633	345,633

(1) Considera el precio de \$ 1,470/Kg de jarabe, 3 turnos de producción y 300 días laborados.
(2) Aplicando conforme a la base nueva un 10% de P.T.U. y 35% de I.S.R.

CUADRO 7b

ESTADO DE RESULTADOS PROFORMA PARA LA OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	1	2	3	4	5
1. INGRESOS POR VENTAS (1)	1,323,000	1,587,600	1,764,000	1,764,000	1,764,000
2. COSTOS DE PRODUCCION	948,336	1,042,784	1,070,409	858,728	858,728
- COSTOS DIRECTOS	612,789	699,263	756,912	756,912	756,912
- COSTOS INDIRECTOS	335,547	343,485	313,497	101,816	101,816
3. UTILIDAD BRUTA	374,664	544,852	693,591	905,272	905,272
4. GASTOS ADMINIST.	7,992	7,992	7,992	7,992	7,992
5. GASTOS DE VENTA	95,633	105,074	107,840	86,672	86,672
6. UTILIDAD DE OPERACION	271,038	431,786	577,759	810,607	810,607
7. I.S.R. Y R.U. (2)	121,967	194,304	259,991	364,773	364,773
8. UTILIDAD NETA	149,071	237,482	317,676	445,834	445,834

(1) Considera precio de \$ 2,100 /Kg suero seco hidrolizado, 3 turnos/día y 300 días laborados.
(2) Aplicando conforme a la base nueva un 10% de P.T.U. y 35% de I.S.R.

En los cuadros 8a y 8b se muestra el Estado de Origen y Aplicación de los Recursos, el origen de los recursos está dado por la suma de la utilidad neta más las depreciaciones y amortizaciones de la inversión. Adicionalmente en el último año del horizonte se agrega el valor de rescate y la recuperación del capital de trabajo.

Por otro lado el rubro que comprende la aplicación de los recursos del proyecto consisten en la inversión fija en activos fijos, la inversión diferida y el capital de trabajo.

CUADRO 8a

ESTADO PROFORMA DE ORIGEN Y APLICACION DE RECURSOS
PARA LA OBTENCION DE JARABE
(MILES PESOS)

CONCEPTO	0	1	2	3	4	5
1. ORIGEN DE LOS RECURSOS	1,121,292	341,050	414,421	449,399	365,785	760,744
- UTILIDAD NETA		73,938	147,309	217,567	345,633	345,633
- DEPREC. Y AMORT.		267,112	267,112	231,832	20,151	20,151
- APORTAC. DE CAPITAL	1,121,292					
- VALOR DE RESCATE						153,324
- CAPITALIZACION DEL C.T.						241,636
2. APLICACION DE LOS RECURSOS	1,121,292					
- INVERSION EN ACTIVOS FIJOS	820,032					
- GASTOS PREOPERATIVOS	102,375					
- INCREMENTOS AL CAP. DE TRAB.	198,885	0	27,591	15,160	0	
3. SUPERAVIT,	0	341,050	414,421	449,399	365,785	760,744
ANALISIS DE FLUJO DE EFECTIVO						
UTILIDAD		73,938	147,309	217,567	345,633	345,633
DEPRECIACION		267,112	267,112	231,832	20,151	20,151
VALOR DE RESCATE						153,324
RECUP. DE CAP. DE TRABAJO						241,636
S U M A		341,050	414,421	449,399	365,785	760,744
INVERSION	1,121,292					
4. FLUJO DE EFECTIVO (1,121,292)	341,050	414,421	449,399	365,785	760,744	
T. I. R.	26.78%					
PUNTO DE EQUILIBRIO	0.67%		0.38%			

CUADRO 8b

ESTADO PROFORMA DE ORIGEN Y APLICACION DE RECURSOS
PARA LA OBTENCION DE SUERO SECO HIDROLIZADO
(MILES PESOS)

CONCEPTO	0	1	2	3	4	5
1. ORIGEN DE LOS RECURSOS	1,110,204	416,227	504,638	549,643	466,029	845,833
- UTILIDAD NETA		149,071	237,482	317,767	445,834	445,834
- DEPREC. Y AMORT.		267,156	267,156	231,876	20,195	20,195
- APORTAC. DE CAPITAL	1,110,204					
- VALOR DE RESCATE						153,543
- CAPITALIZACION DEL C.T.						226,262
2. APLICACION DE LOS RECURSOS	1,110,204					
- INVERSION EN ACTIVOS FIJOS	820,032					
- GASTOS PREOPERATIVOS	102,813					
- INCREMENTOS AL CAP. DE TRABAJO	187,358	0	25,282	13,621	0	
3. SUPERAVIT,	0	416,227	504,638	549,643	466,029	845,833
ANALISIS DE FLUJO DE EFECTIVO						
UTILIDAD		149,071	237,482	317,767	445,834	445,834
DEPRECIACION		267,156	267,156	231,876	20,195	20,195
VALOR DE RESCATE						153,543
RECUP. DE CAP. DE TRABAJO						226,262
S U M A		416,227	504,638	549,643	466,029	845,833
INVERSION	1,110,204					
4. FLUJO DE EFECTIVO (1,110,204)	416,227	504,638	549,643	466,029	845,833	
T. I. R.	36.24 %					
PUNTO DE EQUILIBRIO	0.50 %	0.29%				

A partir de la obtención del flujo de efectivo se obtiene la Tasa Interna de Retorno (TIR) del Proyecto, la cual nos indica el porcentaje de recuperación de la inversión durante el horizonte de planeación.

La TIR obtenida para la producción de jarabe es de 26.78% y de 36.24% para el suero seco hidrolizado, las cuales son atractivas comparándolas con la tasa real que aproximadamente es del 3%.

Por último, el punto de equilibrio, es decir, el porcentaje de utilización de capacidad instalada, en el cual no se tiene ni pérdidas ni ganancias, para el caso de jarabe es en el primer año del 67% y del 38% para el tercer año, de igual manera para el suero seco hidrolizado es de 50 y 29% para el primer y tercer año respectivamente.

Análisis de Sensibilidad

Con el objeto de identificar el impacto que tendría el cambio en la actividad o estabilidad del biocatalizador en el proyecto, se procedió a realizar un análisis de sensibilidad considerando el decremento del 50% e incremento del 100% de la actividad del biocatalizador. Bajo estas circunstancias tenemos que en el primer caso se tendrían que obtener 300 kg de biocatalizador mensual, mientras que para el segundo éste sería de 75 kg. En la tabla 9 y anexos 2 y 3 se muestran los resultados del análisis.

TABLA 9. RESUMEN DEL ANALISIS DE SENSIBILIDAD VARIANDO LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL BIOCATALIZADOR Y EL COSTO DEL EQUIPO.

ALTERNATIVA	COSTO UNITARIO DE PRODUCCION (PESOS)	COSTO DEL EQUIPO (MILES DE PESOS)	INVERSION TOTAL (MILES DE PESOS)	TIR (%)	PUNTO DE EQUILIBRIO (%)
BASE					
JARABE	1,140	613,567	1,121,292	26.78	38
SUERO	1,412	613,567	1,110,204	36.24	29
50% DE ACT. ESP.					
JARABE	1,277	660,813	1,205,813	18.95	49
SUERO	1,564	660,813	1,194,725	28.11	37
INCREMENTO DE 50% EN LA ACT. ESP.					
JARABE	1,052	530,358	994,984	30	30
SUERO	1,278	530,358	983,895	45.10	23
DISMINUCION DEL 53% EN EL COSTO DEL EQUIPO					
JARABE	987	323,992	712,835	49.59	19
SUERO	1,193	323,992	701,747	63.17	15
INCREMENTO DEL 20% EN EL COSTO DEL EQUIPO					
JARABE	1,205	736,280	1,294,384	20.79	47
SUERO	1,505	736,280	1,283,296	29.31	36
INCREMENTO DEL 25% EN EL COSTO DEL EQUIPO					
JARABE	1,221.58	766,959	1,337,657	19.49	50
SUERO	1,528.23	766,959	1,326,569	27.81	38

Como se puede observar, la disminución en la actividad específica hasta de un 50% no incide drásticamente en la inversión del proyecto, el costo unitario de producción se incrementa en un 12 y 10.76 % para el jarabe y el suero respectivamente, con la consecuente disminución en la TIR de 1.4 veces para jarabe y 1.3 veces para suero. Como era de esperarse el incrementar el 100% la actividad, mejora la oportunidad de negocio pero no la impacta drásticamente. Así tenemos que el costo unitario de producción disminuye en un 7.7% para el jarabe y 9.5% para el suero, el costo de la inversión disminuye un 10% y la TIR se incrementa 1.12 veces para la obtención de jarabe y 1.24 veces en la obtención del suero, obteniéndose una tasa muy atractiva de 45.1 %.

Estos resultados se deben a que la variación en la actividad específica afecta esencialmente las etapas I y II y no la etapa III que corresponde a la hidrólisis en donde el costo del suero como materia prima, la distribución del producto y el costo del equipo no

se ven afectados y son los factores que más inciden en la obtención del jarabe como del suero hidrolizado.

Debido a que la empresa cuenta con evaporadores, secadores y pasteurizadores y a que en el estudio no se detalló el equipo de apoyo y control, en el análisis de sensibilidad se incluyeron variaciones con respecto al costo en la inversión en equipo. Así se analizó el impacto que tendría la disminución del 53% e incrementos del 20 y 25% en el costo de equipo, los resultados también se muestran en la tabla 9.

Como era de esperarse el aprovechamiento de la capacidad instalada de la empresa aumenta considerablemente la oportunidad de negocio, obteniéndose tasas internas de retorno de 49.6 y 63%.

El incremento en el costo del equipo disminuye estas tasas, pero el proceso continúa siendo rentable ya que en ningún caso las tasas son menores al 19%.

CONCLUSIONES

Del análisis base realizado se desprende que el proyecto es rentable, tanto para la alternativa de producción de jarabe como para la producción de suero seco hidrolizado, obteniéndose una tasa interna de 26.78% y 36.24% respectivamente.

Como era de esperarse el proyecto es sensible tanto a los cambios en el costo de equipo como al incremento o decremento de la actividad específica.

En términos de costo unitario no se presentan diferencias significativas entre los análisis base y sus respectivas variantes. Sin embargo, entre la producción de jarabe y la producción de suero, se presentan algunos cambios que se deben fundamentalmente a la consideración del costo de transporte.

En términos globales, en la alternativa de producción de suero seco hidrolizado se obtienen las tasas internas de retorno más altas, comparadas con las mismas variantes de la alternativa de producción de jarabe.

De los resultados anteriores se desprende, que el proyecto es económicamente atractivo y que habrá que hacer un estudio más profundo detallando mejor el equipo necesario y hacer una estimación más precisa de la inversión, otra recomendación es que habrá que precisar la información por parte del empresario, en relación al mercado que se pretende absorber, tanto de tamaño como de prácticas de comercialización. En este sentido, se sugiere continuar con la distribución de muestras del producto a los usuarios potenciales, para lograr una mayor definición y evaluación de la aceptación por parte de los usuarios hacia la presentación del producto final, es decir jarabe y/o suero seco hidrolizado.

Finalmente, se sugiere definir las políticas que regirán para establecer el precio de los productos.

Bibliografía

- (1) Peters and Timmerhaus. "Plant Design and Economics for Chemical Engineers". Third edition, Edit. Mc. Graw Hill.

ANEXO 1
DETALLE DEL EQUIPO DE PROCESO REQUERIDO
(MILES DE PESOS)

EQUIPO	CAPACIDAD	CANTIDAD	COSTO
E T A P A I			
TANQUE FERMENTADOR CERRADO DE ACERO INOX. 316, CON AGITACION	5,000 l 500 l	1 1	56,303 15,892
CENTRIFUGA DE ACERO INOX.	4,000 l/h	1	75,832
SECADOR POR ASPERSION DE ACERO INOX. 304	450 lb/h	1	114,603
E T A P A II			
TANQUE ABIERTO DE ACERO INOX. 304 CON AGITACION	2,500 l 300 l	1 1	35,315 13,097
EXTRUSOR DE ACERO INOX.		1	47,568
E T A P A III			
PASTEURIZADOR DE ACERO INOX.		1	116,513
COLUMNAS DE ACERO INOX. 304	70 l	3	11,884
EVAPORADOR DE DOBLE EFECTO SECADOR POR ASPERSION		1	126,560
T O T A L (MILES DE PESOS)			613,567

ANEXO 2
 INVERSION EN EQUIPO CONSIDERANDO EL 50% DE LA ACTIVIDAD
 ESPECIFICA EN EL BIOCATALIZADOR

EQUIPO	CAPACIDAD	CANTIDAD	COSTO
E T A P A 1			
TANQUE FERMENTADOR CERRADO DE ACERO INOX. 316, CON AGITACION	7000 l 700 l	1 1	68,898.3 19,447.12
CENTRIFUGA DE ACERO INOX.	400 l/h	1	75,832
SECADOR POR ASPERSION DE ACERO INOX. 304	450 lb/h	1	114,603
E T A P A II			
TANQUE ABIERTO DE ACERO INOX. 304 CON AGITACION	5000 l 600 l	1 1	53,527.5 19,851.34
EXTRUSOR DE ACERO INOX.		1	47,568
E T A P A III			
PASTEURIZADOR DE ACERO INOX.		1	116,513
COLUMNAS DE ACERO INOX. 304	140 l	3	18,012.7
EVAPORADOR DE DOBLE EFECTO		1	126,560
TOTAL (MILES DE PESOS)			660,812.96

ANEXO 3
 INVERSION EN EQUIPO CONSIDERANDO UN INCREMENTO DEL 50%
 EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL BIOCATALIZADOR

EQUIPO	CAPACIDAD	CANTIDAD	COSTO
E T A P A 1			
TANQUE FERMENTADOR CERRRADO DE ACERO INOX. 316, CON AGITACION	3000 l 300 l	1 1	41,440.24 11,696.86
CENTRIFUGA DE ACERO INOX.	1000 l/h	1	33,008
SECADOR POR ASPERSION DE ACERO INOX. 304.	450 lb/h	1	114,603
E T A P A II			
TANQUE ABIERTO DE ACERO INOX. 304 CON AGITACION	1300 l 150 l	1 1	23,854 8,640.8
EXTRUSOR DE ACERO INOX.		1	43,568
E T A P A III			
PASTEURIZADOR DE ACERO INOX.		1	116,513
COLUMNAS DE ACERO INOX. 304	50 l	2	6,474.32
EVAPORADOR DE DOBLE EFECTO		1	126,560
TOTAL (MILES DE PESOS)			660,813