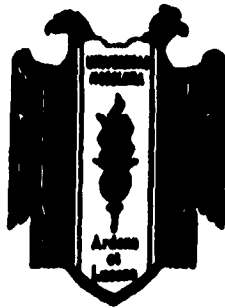


302827

23

24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

INMOVILIZACION DE *Kluyveromyces marxianus* CON  
ACTIVIDAD DE INULINASA POR LA TECNICA DE  
ATRAPAMIENTO CON ALGINATO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALEJANDRA MONTALVO RANGEL

TESIS CON MEXICO, D. F.  
FALLA DE ORIGEN

1966

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Bajo la dirección de:

M. en C. Juan Esteban Barranco Florido.

M. en C. Alejandro A. Azaola Espinoza.

El proyecto fue parcialmente financiado por:

SEP, convenio 91 - 01 - 09 - 002 - 0689.

A mis Padres Carlos (Charlie) y Lourdes (Marycoco)  
por ser mi apoyo, por todo lo que me han dado,  
por sus buenos consejos y por guiarme por el buen  
camino, así como alentarme a llegar a terminar una  
de mis metas en mi vida.

Los amo.

A mis hermanos Carlos Alberto y Gabriel por  
compartir y ser parte de mi vida, por confiar en mí y  
brindarme siempre su apoyo en este camino que  
apenas empiezo.

Los quiero mucho.

A Salvador Rangel por ser siempre mi "mejor consejo"  
y por todo lo que me has enseñado.

Te quiero mucho y muchas gracias.

A mis compañeras y amigas de carrera: Clau,  
Cabi, Cis, Jackie, Moni, Montse y Rebe, por hacer  
de cada día y de cada clase un momento ameno y  
compartir tan divertidos y angustiosos momentos.

A todos y cada uno de mis profesores que con su tiempo,  
paciencia y dedicación aportaron un granito de arena  
para mi formación personal y profesional.

Gracias por sus enseñanzas.

A la Universidad Motolinía, que me permitiste ser parte de tus aulas en las que se quedaron grandes recuerdos y en la que también conocí a tantos amigos y grandes profesores.

Por siempre, muchas gracias.

A Alejandro Azaola por haber creído y confiado siempre en mí, gracias por contribuir en mi formación profesional, nunca lo olvidaré.

Te quiero mucho y mil gracias.

A Esteban Barranco, por darme parte de su tiempo y dedicación, por compartir sus conocimientos, y enseñarme a ser mejor cada día.

Por siempre, muchas gracias.

A la UAM - X. Gracias por abrirme tus puertas durante dos años, por permitirme ser parte del tiempo abierto al cambio y por darme la oportunidad de conocer gente maravillosa, en donde pasé las mejores etapas de mi vida estudiantil.

Mil gracias.

A mi amiga Claudia Araceli que a pesar de la distancia nunca se olvidó de mí, gracias por tu siempre confianza y tu grandiosa amistad.

T.Q.M.

A Nancy, gracias por tu confianza y amistad,  
gracias por no dejarme caer, y por alentarme a  
seguir adelante, nunca lo olvidaré.

T.Q.M.

A mis asesores y sinodales por preocuparse por mí  
y por el tiempo empleado para la realización de este  
trabajo, que sin su aportación y cooperación no  
hubiese sido posible su culminación.

Gracias.

A mis amigos: Miguel Angel M., Pati R., Gabi Meza,  
Malena Moreno, Eliezer R., los "chicos azules", Mauricio M.,  
José Alfredo V., Graciela Sosa, Ricardo Gómez, José Luis Contreras,  
Sergio Vega, Francisco N., Memo Hernández, Alejandro López,  
Javier Arenas, Alejandro Alva, Alejandro Munguía,  
Blanca Rosa, Mónica Chinchot, Rocío P., Luis Jisita,  
Ricardo Alexandre, por alentarme a seguir siempre adelante,  
por compartir conmigo momentos tan felices y agradables.

Muchas gracias.

A Mimi (mi amor chiquito) por ser siempre mi  
compañía incondicional de noche y de día y hacerme  
tan feliz, gracias por velar de mis sueños. ☺

A la vida por darme la oportunidad de estar  
aquí y permitirme aportar algo de mí para  
bien de la humanidad.

A todos los que comparten conmigo este momento.

Mil gracias.

# Í N D I C E

## CAPÍTULO I

<b>Introducción.</b>	<b>Página</b>
1.1. Planteamiento del Problema.	2
1.2. Objetivos.	4

## CAPÍTULO II

<b>Antecedentes.</b>	
2.1. Generalidades.	6
2.2. Sistemas de Inmovilización.	9
2.3. Clasificación de las técnicas de inmovilización.	10
2.4. Clasificación de los tipos de soportes (matrices).	11
2.5. Tipos de matrices.	12
2.6. Técnicas de inmovilización.	14
2.6.1. Atrapamiento.	14
2.6.2. Adsorción.	15
2.6.3. Intercambio iónico.	15
2.6.4. Microencapsulación.	16
2.6.5. Flocculación.	16
2.7. Ventajas de los sistemas de inmovilización.	17
2.8. Usos de los sistemas de inmovilización.	18
2.9. Propiedades de los alginatos.	19
3.0. Obtención de los alginatos.	20
3.1. Características de <i>K.marxianus</i> .	21
3.2. Enzima.	21

3.3. Inulina.	22
3.4. Inulinasas.	26
3.5. Aplicaciones.	26
3.6. Fructosa.	26
3.7. Producción de Fructosa.	26
3.8. Existencia en la naturaleza.	27
3.9. Fructosa como endulzante.	27
4.0. Metabolismo de la fructosa.	27
4.1. Ventajas metabólicas comparativas.	28
4.2. Localización de la enzima.	28
4.3. Efecto del pH.	29
4.4. Efecto de la temperatura.	29
4.5. Efecto de la difusión (Transferencias de masas).	30

### CAPÍTULO III

#### Parte experimental.

3.1. Diagrama general.	32
3.2. Material, reactivos y equipo.	33
3.2.1. Material biológico.	33
3.2.2. Material de laboratorio.	33
3.2.3. Reactivos.	34
3.2.4. Equipo.	34
3.3. Metodología.	35
3.3.1. Condiciones de cultivo.	35
3.3.2. Técnica de inmovilización.	36
3.3.2.1. Preparación del alginato de sodio.	36
3.3.2.2. Solución de cloruro de bario 0.125 M.	36
3.3.2.3. Inmovilización celular.	36
3.3.3. Determinación de la actividad enzimática.	38



3.3.3.1. Preparación del reactivo de DNS.	38
3.3.3.2. Preparación de inulina al 6 %.	39
3.3.3.3. Determinación de la actividad enzimática.	39
3.4. Análisis estadístico.	40

## CAPÍTULO IV

### Resultados y discusión.

4.1. Resultados.	42
4.1.1. Cinética de azúcares reductores para células libres e inmóviles durante dos horas.	42
4.1.2. Cinética de la actividad enzimática de inulinasa para células libres e inmóviles durante dos horas.	44
4.2. Efecto de la concentración contra el diámetro de esfera.	46
4.2.1. Efecto de la concentración de la esfera contra el diámetro de la esfera.	48
4.2.2. Efecto de la concentración de masa celular contra el diámetro de la esfera para determinar la productividad en células libres e inmóviles.	50
4.3. Efecto de la concentración de glutaraldehído con respecto al diámetro de la esfera.	52
4.3.1. Efecto de la concentración del glutaraldehído en células inmóviles con glutaraldehído y sin glutaraldehído con respecto al diámetro.	54
4.3.2. Efecto de dos tamaños de esferas con una concentración celular de 178.5 mg/ml contra el efecto en ausencia de dos concentraciones de glutaraldehído.	56
4.4. Cinética de azúcares reductores para un tamaño de 2.8 mm y una concentración celular de 178.5 mg/ml y glutaraldehído 0.1 M durante tres horas.	57

**4.4.1. Cinética de la actividad enzimática para un tamaño  
de 2.8 mm y una concentración celular de 178.5 mg/ml  
y glutaraldehído 0.1 M durante tres horas. 59**

**Conclusiones.**

**Bibliografía.**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las características químicas de la fructosa que la hace la más distinguible por encima de los otros azúcares es su alta solubilidad, éste es el azúcar más abundante en la naturaleza ya que se encuentra en jugos y miel de frutas.

Otras de las propiedades importantes de la fructosa es que se convierte fácilmente en D-glucosa dentro del cuerpo.

A partir de los años 50's, se ha tratado de obtener fructosa, de una manera sencilla, barata y eficiente empleando la tecnología alimenticia y métodos biotecnológicos así como sistemas alternativos a través de hidrólisis enzimáticas, como son los sistemas de inmovilización, en donde se emplean microorganismos no patógenos y que además poseen las enzimas requeridas para la transformación bioquímica de sustratos a productos.

Como una respuesta a esta búsqueda se han llegado a tener grandes beneficios, como la obtención de jarabes con altos contenidos de fructosa que dentro de la medicina beneficiará a enfermos que padecen diabetes, esto es importante ya que en este padecimiento es producido por una deficiencia en la acción o en la secreción de insulina, siendo ésta una hormona pancreática, la cual presenta grandes anomalías en el metabolismo de la glucosa no pudiendo convertir el exceso de glucosa en ácidos grasos para su acumulación como triglicéridos de reserva (Lehninger., A.L., 1982), no siendo la única ventaja de los sistemas de inmovilización, sino que además ofrecen múltiples aplicaciones como obtención de antibióticos, vitaminas, producción de alcohol, producción de biomasa, usos en procesos fermentativos, en tratamientos de aguas residuales, etc.

Además ofrecen ventajas como: reacciones enzimáticas estables, permiten reutilizar a la enzima, su elaboración es simple, bajo costo, termoestabilidad de la enzima, protege a la enzima o a las células, las condiciones de trabajo permiten evitar contaminación microbiana, no tóxicas e inertes. Las desventajas son principalmente las limitaciones de difusión.

La importancia de considerar a los sistemas de inmovilización como una nueva alternativa para obtener fructosa trae como consecuencia, la innovación y el estudio de procesos biológicos y enzimáticos que generen el interés de la investigación para apoyo de la ciencia y la tecnología.

## 1.2 OBJETIVO GENERAL:

Establecer las mejores condiciones de un sistema de inmovilización de *Kluyveromyces marxianus* en alginato de bario modificando, el diámetro de la esfera y la concentración de masa celular dentro de la esfera.

## 1.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Diseñar un sistema de inmovilización con alginato.
- Comparar el efecto del diámetro de esfera en el sistema de inmovilización de *K. marxianus* en la hidrólisis de polifruktanos (Inulina).
- Mostrar el efecto de la concentración de masa celular en la hidrólisis de inulina por las células inmovilizadas de *K. marxianus*.
- Comprobar la acción del glutaraldehído como agente endurecedor en el sistema de inmovilización.
- Determinar las condiciones óptimas de acuerdo con los tres parámetros que se tienen.
- Comprobar el sistema más eficiente en relación a las células libres.

## CAPÍTULO II

## **ANTECEDENTES.**

### **2.1. GENERALIDADES:**

En 1820, en Schützenbach's, se empleó por primera vez la inmovilización celular para obtener industrialmente vinagre, en el que el alcohol obtenido fue filtrado por partes a través de una cama de viruta. La base microbiológica de este proceso fue descubierta más tarde por Pasteur. En 1960, se estudió principalmente la inmovilización de enzimas, debido a los resultados encontrados se incrementó el interés en los años 70's, década que se encargó del estudio de sistemas de inmovilización de células completas, las cuales pueden llevar a cabo múltiples reacciones de catálisis, implicando a series completas de diferentes enzimas. (Núñez. J.M., 1987).

La técnica de inmovilización de células microbianas por atrapamiento en alginato de calcio fue establecida por Hackel en 1975, desde entonces se ha utilizado en la fermentación de etanol empleando células de levaduras inmovilizadas. (Johansen. A. y FlinK. M.J., 1986).

La hidrólisis de inulina y sus polímeros de fructosa solo pueden ser catalizados por la enzima inulinasa, localizada en levaduras de *K. marxianus* la inulina se retienen en la pared celular siendo útil para la sacarosa, ya que esta puede ser hidrolizada a monosacáridos de glucosa y fructosa. (Rouwnhorst R.J. y Ritmeester W.S., y col. 1990).



Un sistema de inmovilización de células microbianas se define, como una técnica que se puede emplear en diversos procesos biocatalíticos aprovechando un medio líquido para la formación de sustratos a productos. Es posible emplear diferentes técnicas de inmovilización tales como la adsorción, atrapamiento, cruzamiento molecular y acoplamiento covalente (Guiraud J.P., Demeulle S y Galzy P., 1981). El acoplamiento covalente incluye un tratamiento con agentes cruzantes, el atrapamiento se lleva a cabo por materiales semipermeables inertes como los hidrogeles, fibras o membranas (Núñez M.J. y Lema J.M., 1987).

Las técnicas de inmovilización sin acarreadores incluye la formación de células agregadas por floculación natural o floculación inducida por agentes que modifiquen la superficie de las células como pueden ser polielectrolitos aniónicos y catiónicos, minerales, etc.

El emplear un sistema de inmovilización presenta como ventaja el emplear fracciones celulares, organelos, enzimas, células completas, así como el uso de células vegetales, animales, plantas superiores, teniendo la facilidad de poder llevar a cabo reacciones catalizadas por enzimas, para obtener productos a partir de sustratos en medios líquidos y, esto ha llevado a la tarea de investigar los procesos que pueden llegar a tener aplicación industrial.

Existen ciertos problemas inducidos por la inmovilización, como la difusión que se lleva entre sustratos y productos, que se presenta empleando células viables o células muertas y éstas últimas, sirven para reacciones enzimáticas simples. (Núñez, M.J., y Lerma, M.J., 1987).

Se utilizan principalmente células completas como levaduras para procesos de fermentación. La aplicación de los sistemas de inmovilización es muy diversa, usando técnicas como la adsorción, floculación o de atrapamiento en matrices gelatinosas, siendo la última la más comúnmente empleada, en la que se tienen células libres en contacto con el sustrato, no presentando problemas de difusión, pero sus enzimas se desnaturalizan a altas temperaturas, y no son reutilizables para otras determinaciones ni termoestables como las células inmóviles, a pesar de que éstas presentan problemas de difusión por transferencia de masas. (Núñez. M.J., y Lerma. J.M., 1987).

Las limitaciones de la transferencia de masa se pueden presentar aún teniendo una distribución homogénea en la biomasa dentro de las matrices inmovilizadas. Los sistemas de inmovilización se utilizan principalmente para la transformación de sustratos a productos más que para la producción de biomasa.

Dentro de la industria, las células inmovilizadas son empleadas en diversos tipos de biotransformaciones un ejemplo es la conversión enzimática de azúcares, la isomerización de glucosa a fructosa, obteniendo JMAF [HFCS] (jarabes de maíz altamente fructosados) (Conable., B. D., 1996, Núñez. M.J., y Lerma J.M., 1987), así mismo se han empleado en la producción de 6-aminopenicilánicos, (6-APA) para penicilina. La inmovilización tiene aplicaciones a pequeñas escalas en química analítica y medicina.(Núñez. M.J. y Lerma J.M., 1987).

## **2.2. SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN.**

La inmovilización puede llevarse por diferentes caminos, los métodos más comúnmente usados son la adsorción y atrapamiento en matrices gelatinosas. Estas técnicas pueden ser aplicadas de manera práctica en todos los sistemas de células viables o no viables de interés.

Se tienen varias definiciones de esta técnica como " un proceso biocatalítico para la determinación y medición de la actividad de una enzima dentro de un medio líquido el cual actúa como sustrato para la transformación a producto" (Steven , 1989). " El confinamiento o localización de las células microbianas en una pequeña región de espacio, de tal manera que sean retenidas y que presentan actividad catalítica pudiendo ser usadas en repetidas ocasiones y continuamente" (Dervakos.G.A. y Colin W., 1991), Siendo este proceso de inmovilización una propiedad natural de las levaduras.

### 2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN.

Técnica	Ventajas	Desventajas
<b>Adsorción</b>	Barato reutilizables no tóxico simple	Células con fugas Sensibilidad a cambios de pH
Soportes neutros	no tóxico simples benéficos	
Soportes cargados	benéficos no tóxicos reutilizables simples	
<b>Floculación</b>	Simple Barato No tóxico	Células con fugas Limitaciones difusionales
<b>Atrapamiento</b>		
Polímeros naturales	benigno no tóxico Simple	Limitaciones difusionales
Polímeros sintéticos	Simple	Tóxico Caro Limitaciones difusionales
<b>Acoplamiento Covalente</b>	Permanente	Limitaciones difusionales Tóxico Cero

(Tampion.J. y Tampion .M.D.,1989).

## 2.4. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE SOPORTES(MATRICES).

Materiales empleados en los sistemas de inmovilización.

<b>Tipo</b>	<b>Categoría</b>	<b>Materiales</b>
<b>Inorgánicos</b>	<b>Naturales</b>	Alúmina, magnesio sílica y zirconia.
	<b>Manufacturados</b>	Carbón activado, ladrillo, cerámicas, coque y vidrio.
<b>Orgánicos</b>	<b>Polisacáridos</b>	Agar, agarosa, alginato, carragenina, celulosa, dextran, Pectato, madera con lignina, etc.
	<b>Proteínas</b>	Colágeno, clara de huevo y gelatina.
	<b>Polímeros sintéticos</b>	Poliacrilamidas, resinas fenólicas, poliestireno y poliuretano.

Cabe mencionar que la duración de estos materiales en los sistemas de inmovilización dependen de la técnica, el sistema y las condiciones que se empleen, por lo que estos soportes pueden llegar a durar algunas horas o varios años. (Tampion.J. y Tampion. M.D.,1989).

## 2.5. TIPOS DE MATRICES.

Las matrices gelatinosas que se emplean para las técnicas de inmovilización son las siguientes:

**AGAR.** El agar es un polímero natural formado por polisacáridos de varias especies marinas se emplea mucho en microbiología por las propiedades físicas que tiene, pero presenta desventajas ya que no soporta altas temperaturas (Tampom, J. y Tampom, M.D., 1987). El agar es un gel térmicamente reversible y no depende de la presencia de cationes, fue reportado por primera vez en 1882 como un medio de cultivo bacteriológico por Koch, además se le consideró como el primer agente inmovilizante (Guisseley, K.B., 1989). El agar requiere de una previa purificación aunque esta suele hacerse de manera libre al adicionarle sustancias que puedan o tengan la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, siendo empleable esta propiedad para la inmovilización, el agar presenta pobreza en el contenido de sus nutrientes pero se utiliza en estudios bioalálticos con microorganismos como *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium batyricum*, *E. coli*, *Lactobacillus arabinosus*, *Saccharomyces*, etc (Tampom, J. y Tampom, M.D., 1987). Básicamente existen dos tipos de agar, los físicamente porosos con propiedades de temperatura para gelificación y los que químicamente contienen cierta cantidad de grupos metoxi, ambos tipos de agares son extraídos de varias especies de *Gracilaria*, el primer tipo de agar gelifica a 40°C y contiene bajas cantidades de grupos metil éster y los obtenidos de *Gelidium* y *Pterocladia* los cuales gelifican a temperaturas por abajo de los 30°C pero poseen esencialmente altos contenidos de grupos metil éster. En la actualidad el agar se emplea dentro de la industria alimenticia como agente estabilizante y gelificante, en microbiología como medio de cultivo y en química como agente cromatográfico para electroforesis (Guisseley, K.B., 1989).

**AGAROSA.** Es una de las mejores fracciones encontradas en el agar, se separa del agar, se purifica y con algunos grupos sulfo ester se remueve, posee bajo punto de fundición, se emplea en ocasiones para sustituir al agar; la agarosa se emplea en la Inmovilización siendo uno de los soportes más eficaces, aunque su uso es más común en Biología para el entrapamiento de algas fotosintéticas como *Chlorella Vulgaris* y bacterias verde-azules como *Anacystis nidulans*. La agarosa tiene intervalos de gelificación similares a los del agar y no soporta altas temperaturas (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

**KAPPA-CARRAGENINA.** Es un polímero natural formado por polisacáridos extraídos de diversas especies marinas y macro algas, su fuente principal de obtención es *Chondus crispus*, *Eucheuma cottonii*. químicamente las carrageninas poseen una estructura 1,3-β-D-galactosa, su diferencia entre los alginatos es que tiene en su estructura grupos ester sulfónicos, son inestables en presencia de iones de calcio pero estable en presencia de iones de sodio. Soportan cuando mucho temperaturas máximas hasta de 70°C y; se desintegran a elevadas temperaturas (Guiseley, K.B., 1989). La agarosa resiste la degradación de la mayoría de los microorganismos, depende principalmente de los iones de potasio que son los que le proporcionan estabilidad al gel; de ahí su uso en la industria alimenticia como espesante y gelificante (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

**PROTEÍNAS.** Se obtienen de origen animal principalmente de tejido conectivo como el cartílago, se disuelve a bajos valores de pH, se emplea como soporte para enzimas. La estabilidad de su estructura se debe principalmente al glutaraldehído tomando un color café claro en el que el glutaraldehído se une a su estructura por enlaces covalentes, pero su mayor desventaja es que se desnaturalizan con la temperatura y son materiales caros (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

**ALGINATOS.** Son geles que también se obtienen de algas marinas, por su formación, químicamente han sido representados como "estructura de caja de huevo" debido a su conformación axial de las uniones en el carbono 1 y en el 4 en los bloques de poliguluronato, siendo más rígida que con respecto a los bloques de polimanurano; el resultado de esta estructura son los espacios de los grupos carboxil que son idealmente sustituibles por enlaces de tipo iónico-covalente, dependen principalmente de iones de calcio, pero se mejora mecánicamente la fuerza de las esferas de alginato empleando bario en lugar de calcio como agente gelificante. Los alginatos son geles térmicamente irreversibles por lo que las esferas de alginato pueden ser usadas a elevadas temperaturas y se emplean para inmovilizar bacterias o levaduras termófilas, además tiene una alta capacidad de gelación por la presencia del ácido alginico (Guiseley, K.B., 1989), (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

## **2.6. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN.**

### **2.6.1. ATRAPAMIENTO.**

Es técnica consiste en retener de manera unida en una sola esfera cierta cantidad de masa celular de tal manera que las células se manengan agrupadas por las fuerzas intramoleculares a través de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y por la presencia de cationes multivalentes o divalentes. La matriz en la cual las células son atrapadas generalmente se describen como geles, considerados como polímeros, esta técnica es muy simple y sencilla aunque una de sus principales limitaciones son el tamaño de esfera en la preparación de células inmovilizadas y que la matriz en la cual se encuentran atrapadas las células pueda actuar como una barrera para la difusión, pero una de sus múltiples ventajas son que protege a las células de la degradación y la abrasión.



El método de atrapamiento se realiza mezclando células en una suspensión gelificante para obtener una suspensión homogénea de células en gel, que a través de una bomba peristáltica y un capilar se puede dar la formación de esferas en las que se encuentran contenidas las células (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

### **2.6.2. ADSORCIÓN.**

La inmovilización por adsorción es un proceso en el que interactúan la superficie de las células entre el material de soporte, la unión se da por la fuerza por enlaces de hidrógeno o enlaces iónicos, para esta técnica únicamente las propiedades naturales de la superficie de la célula son capaces de mantenerse en la superficie del material; éste es un método no específico, los cambios de pH afectan el proceso presentan grandes limitaciones para la difusión de nutrientes, le afecta principalmente el intercambio gaseoso causando desintegración de la célula y a su vez en la actividad celular, se utilizan dos tipos de soportes: orgánicos e inorgánicos como madera para el primero y sales de hierro o sulfatos para el segundo. Empleando esta técnica se obtienen bajas actividades y es muy fácil que se contaminen las células (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

### **2.6.3. INTERCAMBIO IÓNICO.**

Esta técnica se lleva a cabo por un intercambio iónico empleando materiales o soportes para la inmovilización con iones, se usa principalmente en la industria química, laboratorios y experimentos. Consiste en la unión por grupos ionizables sobre la superficie donde se lleva el intercambio iónico empleando resinas ya que estas tienen propiedades fisicoquímicas para poder retener iones y llevar a cabo dicho intercambio; tienen como desventaja que los materiales son muy costosos (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

#### **2.6.4. MICROENCAPSULACIÓN.**

Ésta consiste en seleccionar una membrana permeable o impermeable creada a manera de pequeñas gotitas de partículas que impiden la difusión libre de sustancia predeterminadas, depende directamente de la temperatura, su uso es más enfocado a enzimas o pigmentos que poseen alta superficie de contacto, presenta como desventaja que los solventes empleados en los que se disuelve la membrana son altamente tóxicos (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

#### **2.6.5. FLOCULACIÓN.**

La floculación es una agregación en conjunto o de células individuales dentro de un grupo, en el cual la densidad altera principalmente las propiedades físicas y en presencia de un gas o un líquido fluido hacen que las células tiendan a mantenerse en una suspensión (Tampiom, J. y Tampiom, M.D., 1987).

## **2.7. VENTAJAS DE LOS SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN.**

- Aumento de la estabilidad enzimática.
- Alta concentración de biomasa.
- Incremento en los rendimientos de producción.
- Facilidad de purificación del producto.
- Facilidad de trabajo
- Empleo de pequeñas cantidades de biomasa.
- Utilización de células viables, de enzimas y organelos. (Steven, 1989)
- Alta actividad biocatalítica.
- Gran termoestabilidad biocatalítica.
- Posibilidad de recuperación y reutilización de células para determinar posteriormente actividad biocatalítica.
- Alta resistencia a la abrasión.
- Resistencia a la degradación microbiana.
- Densidad apropiada.
- Materiales de soporte baratos.
- Empleo de materiales no tóxicos. (Tampion, J. y Tampion M.D., 1989).

## **2.8. USOS DE LOS SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN.**

Los sistemas de inmovilización de células completas se emplean principalmente en procesos bioquímicos para la transformación de productos que poseen múltiples enzimas, como los que se mencionan a continuación:

- Producción de ácido aspártico a ácido fumárico.
- Transformación de esteroides.
- Oxidación de glucosa a ácido glucurónico.
- Fermentación de glucosa a etanol.
- Oxidación de cafeína.
- Síntesis de ácido glutámico.
- Síntesis de proinsulina.
- Utilización de productos orgánicos en el tratamiento de aguas.

## 2.9. PROPIEDADES DE LOS ALGINATOS.

En un principio el agar fue empleado en 1882 como medio de cultivo por Koch, considerado como el primer polisacárido obtenido de algas para la inmovilización de células, posteriormente se estudiaron otro tipo de polisacáridos entre los que se encontraron el alginato y la K-carragenina.

Los alginatos son polisacáridos de origen natural, su principal fuente de obtención son las algas marinas (*Macrocystia pyrifera*), los geles de alginatos son térmicamente irreversibles por que se polimerizan los geles con iones de calcio (Johansen, A. y Flink M. J., 1985). Los iones de calcio se difunden dentro de los geles de alginato que en presencia de una hidrólisis liberándose los iones de calcio hacia el medio dan como resultado una mejor gelación y estabilidad en la superficie, así como dentro de la esfera para los efectos de la velocidad de difusión (Johansen, A. y Flink. M. J.1986). Los alginatos se usan principalmente por su especificidad en la inmovilización de células, además son geles porosos que permiten la difusión de sustratos a productos y viceversa.

Químicamente los alginatos tienen una estructura lineal de polímeros de 1,4- $\beta$ -D-ácido manurónico y 1,4- $\alpha$ -L-ácido gulurónico. En su estructura se encuentran azúcares divididos en tres bloques, como son los formados únicamente por ácido manurónico, los formados por ácido gulurónico y por último los que contienen una parte de residuos de ácido manurónico y gulurónico.

Los alginatos tienen múltiples aplicaciones en las industrias farmacéutica, hulera, textil, papelera, de los alimentos y cervecera. Se utilizan para espesar, dar consistencia de gel, dar estabilidad y suavizar los productos. En México se han cosechado desde 1958, teniendo producciones promedio de 28 mil 300 toneladas por año. (Investigación y Desarrollo, 1995).

Las ventajas que ofrece el emplear alginato en un sistema de inmovilización son las siguientes:

- Térmicamente irreversibles (Guiseley, K.B., 1989), (Johansen, A. y Flink M.J., 1985).
- Soportan altas temperaturas.
- Presentan gran estabilidad con respecto a otros soportes como carragenina o gelatina.
- Por la estructura de red que posee permite conservar a las células evitando que éstas se salgan de las esferas.
- Material no tóxico

### **3.0. OBTENCIÓN DE LOS ALGINATOS.**

El proceso de producción de los alginatos se inicia al extraer el alginato del alga verde-azul principalmente con ácido diluido, se purifica y ya purificado se somete a una solución alcalina de carbonato de sodio para que el alginato quede integrado a la solución y por último nuevamente se purifica y se obtiene un polvo de color amarillo claro.

Actualmente, los alginatos se emplean en industrias farmacéuticas como Sandoz de México, Ciba Geige, Provequím, Grinted de México, Vitradrog y Empresa Industrial de Guadalajara. (Investigación y Desarrollo, 1995).

### **3.1. CARACTERÍSTICAS DE *K. marxianus*.**

Este microorganismo es una levadura que se emplea principalmente en la producción de lactasa, además de poseer un potencial económico alto, tiene enzimas como endopoligalacturonasa, la cual ha sido probada para la clarificación del jugo de manzana, y en la estabilización del jugo de naranja.

Esta levadura también posee enzimas como la inulinasa, la cual ha sido empleada en la producción de fructosa obtenida de inulina, la lactasa y pectinasa. La lactasa es una enzima intracelular, la pectinasa es una enzima extracelular y la inulinasa puede ser encontrada intra y extracelularmente. La separación de estas enzimas del microorganismo pueden obtenerse de las siguiente manera, la lactasa es posible obtenerla en el medio de cultivo antes de la disrupción, mientras que las otras dos enzimas pueden obtenerse por precipitación con un surfactante (Espinoza. P., Bárzana. E., García.G.M., Gómez.R.L., 1992).

### **3.2. ENZIMA.**

Una enzima se define como una proteína con actividad catalítica para llevar a cabo una reacción bioquímica. (Snyder. E.D, 1992). Los microorganismos tienen numerosas enzimas, las cuales tienen una función específica durante el proceso de crecimiento y metabolismo, la mayoría de estas enzimas actúan dentro de la misma célula, en un ambiente ideal y protegido, (Scriban, 1985). En el caso de las enzimas externas que tienen como función facilitar el acceso de los nutrientes hacia el microorganismo, le dan una estabilidad hacia las variaciones del medio físico y químico que las rodea; así como el poder hidrolizar compuestos de alto peso molecular que emplearán como parte de sus nutrientes. (Barford,H.C,1981).

### 3.3. INULINA.

La Inulina fue descubierta por Rose, quien la separó de extractos de tubérculos de alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*). La inulina se encuentra formada esencialmente de unidades de fructofuranosa; se acumula como un carbohidrato de reserva en varias plantas y levaduras, la inulina se localiza externamente sobre la pared celular (Azhari y col., 1989). La hidrólisis de inulina libera grandes cantidades de fructosa y pequeñas cantidades de glucosa (Edelman y Bacon, 1950), la fructosa es un monosacárido que posee el poder edulcorante y la solubilidad más alta de todos los azúcares por lo cual su utilización es muy común para la elaboración de jarabes fructosados (Snyder y Phaff, 1962).

El nombre de inulina fue primeramente usado por Thompson en 1811, su nombre se deriva por haber sido encontrada en plantas de *Inula helenium* (Bernal. M.A., 1994). Es posible que en varias plantas de la familia *compositae* como Alcachofa de Jerusalem o *Chicoria* y *Dahlia* se encuentren reservas ricas en inulina que constituyen una fuente de fructosa (Bekum. V. H., 1996). La producción de jarabes altamente fructosados a partir de los extractos de las plantas mencionadas anteriormente empleando el método de la hidrólisis química, tiene grandes ventajas, sin embargo, los jarabes obtenidos sufren modificaciones tales como obscurecimiento en el color (Galzy, P., y col. 1981) y existe también la formación de productos secundarios como los furfuranos.



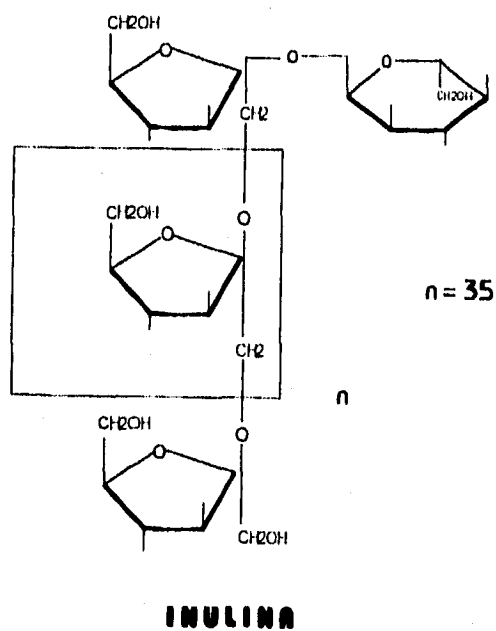
La inulina constituye aproximadamente el 80% de los materiales de reserva en plantas de Alcachofa de Jerusalem, donde se encuentra como fuente de carbohidratos. Es soluble en agua caliente y se hidroliza a fructosa y glucosa por una enzima: *la inulinasa* (Rhee.S.K. y Kim.G.H., 1989). El proceso de producción de fructosa por hidrólisis enzimática utilizando inulina en el cual la fructosa es producida a partir de una sola enzima es más conveniente, comparado con los procesos en donde intervienen más de una enzima. La obtención de fructosa a partir de inulina es a través de una reacción enzimática simple con rendimientos del 95% de fructosa; en contraste, la producción convencional de fructosa por medio de almidón necesita de tres enzimas tales como alfa-amilasa, amiloglicosidasa y glucosaisomerasa que actúan dando rendimientos del 45% de solución de fructosa y esta puede ser la mejor causa del equilibrio termodinámico entre glucosa y fructosa, en un 50% de glucosa y 50% de fructosa (Rhee,S.K. y kim. G.H., 1989).

La inulina también tiene aplicaciones dentro de industrias alimenticia y farmacéutica, ya que en la primera es utilizada principalmente en dietas o como fuente de fructosa, mientras que para la segunda tiene una demanda en la producción de productos industriales basados en materiales renovables o biodegradables, como por ejemplo las formulaciones de detergentes biodegradables que pueden reemplazar a los detergentes que contienen fosfatos, esto se debe, a que a partir de la inulina se pueden obtener derivados después de una oxidación y eterificación (Bekkum, V. H., 1996).

La inulina está compuesta por la unión de enlaces y cadenas de a aproximadamente 35 2-1 anillos de residuos  $\beta$ -D-fructofuranosa terminados en una molécula de D-glucosa. La concentración de D-fructosa en azúcares reductores varía entre 74.2 y 84.7%, mientras que la concentración de D-glucosa es entre 15.3 y 28.5%.

La estructura general del polímero  $\beta$ -D-fructofuranosidasa (inulina) es G-F-Fn donde G y F representan glucosa y fructosa respectivamente y Fn un grupo de azúcares, donde n indica el número de residuos azucarados de fructosa en el polímero, donde las variedades son 1 para inulobulosa y 35 para inulina. La inulina contiene una mol de glucosa por molécula de inulina. (Byun, S.M. y Nahn. B.H., 1978).

Estructura del polímero de la inulina:



### 3.4. INULINASAS.

Las inulinasas son enzimas  $\beta$ -fructofuranosidasas (E.C. 3.2.1.7), que se encargan de liberar como producto moléculas de fructosa, también se les conoce como 2,1- $\beta$ -D-fructan-fructanohidrolasas. ( Margaritis, A. y Bajpai, P., 1985).

El uso de levaduras con inulinasas es común para aquellas levaduras que pertenecen a la familia de *Saccharomyces* para emplearlas en procesos fermentativos. Las levaduras con inulinasas (2,1- $\beta$ -D-fructan fructanohidrolasas), pueden utilizarse en la hidrólisis de inulina encontrada en los tubérculos de Alcachofas de Jerusalem entre muchas plantas más.

Las  $\beta$ -inulinasas fructofurasidasas o inulinasas que son las enzimas que hidrolizan la inulina para obtener fructosa, han sido descritas en plantas, hongos, levaduras y bacterias. (Galzy, P. y col., 1981). La inulinasasa es una enzima altamente específica con respecto a la invertasa, y la termoestabilidad de la inulinasasa fue determinada a una temperatura de 50°C a 55°C por Eday y Wesley en 1983.

La inulinasasa tiene un posible uso en alimentos y productos farmacéuticos debido a que estas enzimas se encuentran en microorganismos y plantas que pueden ser la fuente de obtención de carbohidratos. (Byun, M., S. y Nahm, B., 1978). La inulina se hidroliza en fructosa mediante la inulinasasa microbiana. Las inulinasas se encuentran presentes en bajas concentraciones en vegetales tales como *Liliaceae*, *Iridaceae* y *compositae*. También se han encontrado inulinasas en microorganismos como: *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *C. kefir*, *Candida lactosa*, *K. cicerisporus*. (Manzoni, M. y Cavazzoni, V., 1988).

### 3.5. APLICACIONES:

La producción de fructosa a partir de la inulina por medio de las células inmovilizadas de *K. marxianus* se lleva a cabo por procesos continuos, aunque en células que han sido sometidas a altas temperaturas y medios muy ácidos es posible que la actividad de la enzima disminuya y no sea posible metabolizar inulina. (Rouwnhorst. J.R., y Col., 1990). También se utilizan las inulinasas en la producción de alcohol principalmente.

### 3.6. FRUCTOSA.

Uno de los primeros tautómeros estudiados en química orgánica es la sacarosa, es un disacárido que puede hidrolizarse a una cantidad equivalente de dos monosacáridos, la D-glucosa y D-fructosa. (Gelardi. R. y Dekkev.M., 1991). La fructosa es muy importante por su uso en varios procesos en la industria alimenticia, los jarabes altamente fructosados son comúnmente obtenidos en procesos que a través de una hidrólisis de la sacarosa, con una subsecuente isomerización enzimática de glucosa a fructosa.

### 3.7. PRODUCCIÓN DE FRUCTOSA.

Se han realizado grandes esfuerzos para la producción de fructosa, éstos datan desde los años 50's. La conversión de sacarosa por acción enzimática o hidrólisis ácida seguida por la oxidación enzimática del azúcar invertido para producir ácido glucónico, seguido de la cristalización de gluconato, permite la obtención de fracciones de levulosa de alta pureza y llegar finalmente a la fructosa. La comercialización de plantas como *Dalias*, Alcachofas de Jerusalem, y plantas *Ti* hawaiana, logrando una hidrólisis controlada de los polifruktanos, de la inulina y la disrupción de enlaces glicosídicos  $\beta$  (2-1) en donde las unidades de fructofuranosa son los más estables del anómeros de fructopiranososa.

### **3.8. EXISTENCIA EN LA NATURALEZA.**

La fructosa es conocida como azúcar de frutas o levulosa (Tyler. H. S., 1996). La fructosa es una sustancia de origen natural encontrada en frutas como manzana, zarzamora, frambuesa, pera, fresa, grosella, uva, cereza, etcétera y en miel (Gerald R. C., 1991).

### **3.9. FRUCTOSA COMO ENDULZANTE.**

La propiedad de la fructosa que más la distingue sobre todos los demás carbohidratos son las altas características endulzantes, se puede emplear como granulados y en formas líquidas o jarabes. Además su alta absorción metabólica y rápida solubilidad, podría hacerla útil en la tecnología alimenticia o química farmacéutica para sustituir a la sacarosa por la fructosa.

### **4.0. METABOLISMO DE LA FRUCTOSA.**

En los animales la fructosa puede transformarse en otros monosacáridos además de la glucosa, de tal modo que sea posible incorporarse a la secuencia glucolítica y almacenar la suficiente energía durante la degradación. La D- fructosa se halla presente en forma libre en muchas frutas y se forma en la hidrólisis de sacarosa.

En el intestino delgado, es posible que se fosforile a través de la enzima hexoquinasa, constituyendo la ruta principal en los músculos y en el riñón, aunque en el hígado, la fructosa se incorpora a la ruta glucolítica por un camino diferente. En las células epiteliales que recubren el intestino delgado se lleva a cabo la absorción de la fructosa, llegando al hígado para transportarla a través de la sangre. (Lehninger. A. L., 1988).

#### **4.1. VENTAJAS METABÓLICAS COMPARATIVAS.**

El incremento de enfermedades como la diabetes, han dado como resultado el emplear el uso de la tecnología alimenticia y biotecnológica para mejorar o solucionar este tipo de problemas para lo cual se ha recurrido al empleo de endulzantes que por sus características metabólicas sean más fáciles de digerir y obtener, tal es el caso de la fructosa para preferencia de los diabéticos (Gelardi. R. y Dekkev.M.,1991), substituyendo a la glucosa y a la sacarosa por fructosa.

#### **4.2. LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA.**

Snyder y Phaff (1960) describieron por primera vez la producción de inulinasa por *Saccharomyces fragilis*, una levadura que ahora es conocida como *Kluyveromyces marxianus var marxianus*.

La fructosa puede ser catalizada por la inulinasa secretada por la levadura, teniendo ésta un peso molecular de aproximadamente de 165KDa, además de estar constituida por 2 subunidades proteicas que contienen el 34% de este peso como carbohidratos. (Rounhorst. R.J., y col., 1990).

La retención de la inulinasa en la pared celular de *K. marxianus* puede ser una ventaja, debido a que la inulina se localiza en la pared celular, además que tiene como principal función fisiológica la formación de furfanos en el exterior de la pared celular que en comparación con la sacarosa que además de no poderse retener en la pared es más probable que se hidrolice en el exterior, mientras que la inulina se hidroliza dentro de la pared celular (Rounhorst. R.J., y col., 1990).

La principal característica fisiológica de la inulinasa es la hidrólisis de polifruktanos fuera de la pared celular. La inulina como sustrato, se hidroliza por la enzima dentro del medio de cultivo; penetrando fácilmente los polímeros hacia la misma pared celular de la levadura.

#### **4.3 . EFECTO DEL pH.**

Bajpai y Argyrios en 1985 demostraron que para producción de biomasa el pH en intervalos de 4.0 a 6.0 era donde mejores producciones de azúcares reductores se obtenían para las células libres, mientras que para las células inmóviles el pH se determinó en valores de 3.5 a 5.0 y en cuanto a la actividad enzimática se encontraron valores de pH entre 4.5 y 5.0 siendo la actividad óptima para ambas células.

#### **4.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA.**

La temperatura tiene cierto efecto sobre la masa celular o biomasa de células libres. La máxima concentración celular se encontró en intervalos de temperatura de 25°C a 35°C en 24 horas para células inmóviles, mientras que para las células libres se obtuvo la mayor producción de biomasa y azúcares reductores por encima de los 35°C. (Bajpai.P., y Argyrios,M.1985).

Se demostró que la temperatura óptima para la actividad enzimática para las células inmóviles fue de 60°C y 50°C para células libres, pero que la temperatura óptima para la enzima fue de 30°, 40° y 50°C en células libres y permanecían constante su actividad en temperaturas de 50°C (Bajpai.P., y Argyrios,M.1985), posteriormente la actividad decrecía por encima de los 70°C para las células inmóviles.

La temperatura óptima en la determinación de la actividad enzimática tanto para células inmovilizadas como libres es entre 50°C - 55°C ya que se obtienen rendimientos hasta de un 75 % para las células libres; aunque éstas últimas se desnaturalizan mientras que las primeras conservan su actividad hasta en un 95 %, en este intervalo de temperatura y con un pH de 4.5 a 5.0. (Guiraud J.P. y Galzy P., 1981).

#### **4.5. EFECTO DE LA DIFUSIÓN (transferencia de masas).**

Las características de difusión de varios sustratos varían en relación al peso molecular del sustrato tales como glucosa que puede ser difundida y distribuirse libremente a través de los poros del gel dentro de las esferas de alginato de calcio, la difusión de sustratos de alto peso molecular se ven limitados por el incremento de la concentración de células y por la concentración del gel de alginato más que por la concentración del cloruro de calcio usado en el gel (Tanaka. H. y col., 1984).

Los sustratos de bajo peso molecular son fácilmente difundibles desde las matrices gelatinosas (Tanaka. H. y col., 1984).

Las características físicoquímicas de las matrices de gel pueden tener cierto efecto en las reacciones biológicas/activas del material atrapada en el gel (Tanaka. H. y col., 1984).

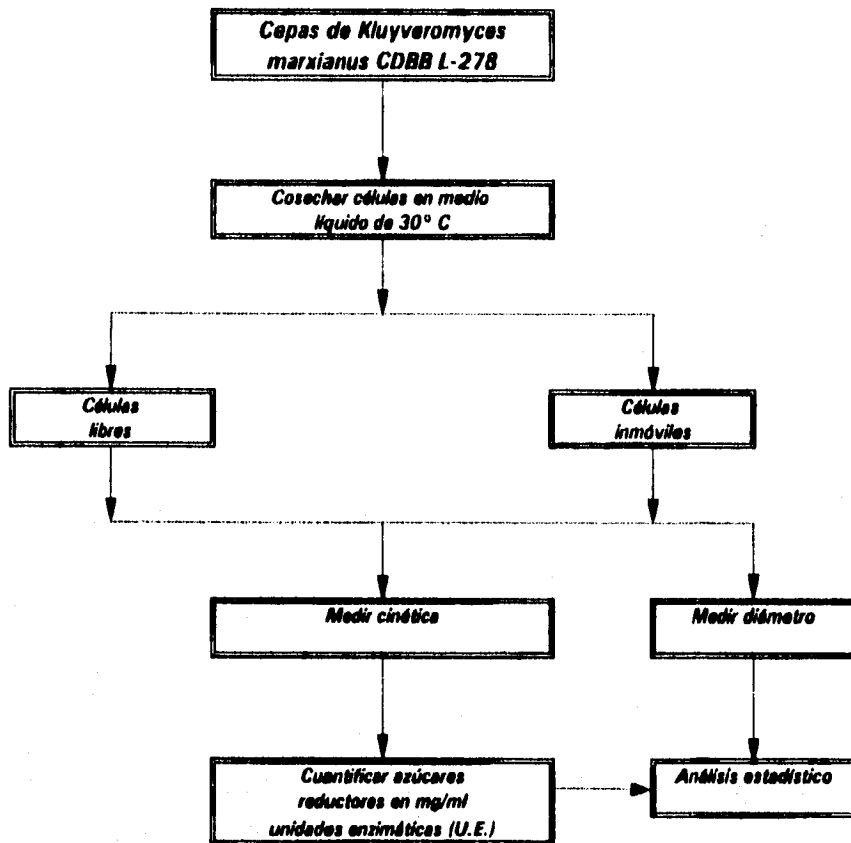
La difusión presenta ciertos efectos sobre las células inmóviles, aunque la difusión está directamente relacionada con el tipo de matriz, de la concentración de alginato o cloruro de calcio que se utilice para inmovilizar células.



**CAPÍTULO III**

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. DIAGRAMA GENERAL.



## **3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.**

### **3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

Cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB L - 278.

### **3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO**

Tubos de vidrio de 16 x 150 (Pyrex).

Gradilla para tubos.

Matraces Erlenmeyer de 25, 250 y 500 ml (Pyrex, Kimax).

Vasos de precipitados de 1000 ml (Pyrex).

Probeta graduada de 25 ml (Pyrex).

Micropipetas de 100  $\mu$ l-1000 $\mu$ l (Sartorius, Mitutoyo).

Cucharilla de acero inoxidable (acinox).

Agujas hipodérmicas de diferentes tamaños.

Colador de malla regular.

### **3.2.3 REACTIVOS**

Agar de Soya Trypticaseína (J.T.Baker).  
Inulina [Dahlia Tuber](Sigma).  
Extracto de Levadura (Monterrey).  
Ácido 3,5 DiNitroSaliclico [DNS] (Sigma).  
Alginato de Sodio (Sigma).  
Cloruro de Bario (Merck).  
Glutaraldehído (Merck).  
Acetato de Sodio Anhidro (Merck).  
Ácido Acético glacial (Sigma).

### **3.2.4. EQUIPO**

Incubadora Orbital Gallen Kamp.  
Centrífuga con refrigeración Sorvall RC-5B.  
Potenciómetro Conductometric PH 20.  
Bomba peristáltica Masterflex.  
Parrilla eléctrica con agitación Corning.  
Espectrofotómetro Spectronic 20D.  
Balanza analítica Sartorius.  
Autoclave All american.  
Mangueras Tygon No. 13

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1. CONDICIONES DE CULTIVO.

Se utilizó una cepa de levadura de *Kluyveromyces marxianus* CDBB L-278. El medio de cultivo que se empleó fue un medio líquido de inulina (1%) y extracto de levadura (0.5%) ajustado a un pH de 4.5, se esterilizó a 0.703 Kg/cm<sup>2</sup> por 10 minutos .

Se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 100 ml del medio con una agitación de 210 rpm, 30°C durante 24 horas en una incubadora orbital (Gallem Kamp), para su adaptación; después se tomó una alícuota de 5 ml y se transfirió a un matraz Erlenmeyer bajo las mismas condiciones, los cuales contienen 90 ml del medio que se usa como inóculo, por último se inocula en el matraz de fermentación bajo las mismas condiciones un volumen que contenga una concentración celular de 0.3 mg/ml de medio de cultivo durante 24 horas.

Posteriormente se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos (Centrífuga con refrigeración Sorvall RC-5-B). Se midió la concentración celular por absorbancia. Se separó el paquete celular y se realizó una dilución 1:5 se tomó 1 ml y se diluyó 1:10 ml en agua destilada, se leyó la concentración celular a una longitud de onda de 550 nm (Espectrofotómetro Spectronic 20D).

### **3.3.2. TÉCNICA DE INMOVILIZACIÓN.**

#### **3.3.2.1. PREPARACIÓN DEL ALGINATO DE SODIO.**

Se prepara una solución de alginato de sodio al 1.5% (p/v). Éste se disuelve en agua destilada con calentamiento y agitación constante hasta su ebullición en una parrilla eléctrica, se enfría a temperatura ambiente hasta aproximadamente 30° a 35°C con agitación (Corning).

#### **3.3.2.2. SOLUCIÓN DE CLORURO DE BARIO 0.125 M.**

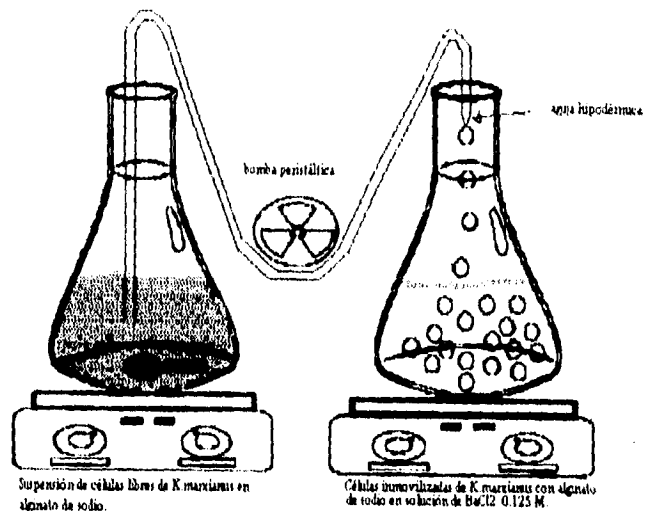
Pesar 30.53 g y se afora a 1000 ml de agua destilada en un malraz volumétrico.

#### **3.3.2.3. INMOVILIZACIÓN CELULAR.**

Cuando la temperatura del alginato sea de 30° a 35°C se suspenden las células de *K.marxianus var. marxianus* a una concentración de 100 mg de peso seco/ml de solución de glutaraldehído, se agita para homogenizar la suspensión de células en el alginato.

La formación de esferas se obtiene por medio de una manguera (laygon No. 13) que se conecta a través de una bomba peristáltica, un extremo de la manguera queda sumergido en la suspensión de células en el alginato, en el otro extremo de la manguera se conectan agujas hipodérmicas de 21G, 27G y 29G para producir tres diferentes tamaños, las esferas de alginato con la suspensión de células, se depositan en una solución de BaCl<sub>2</sub> 0.125 M en agitación constante durante 24 horas para dar consistencia a las esferas.

### Esquema de la inmovilización celular por la técnica de atrapamiento



Para endurecer las esferas se prepara una solución de glutaraldehído en diferentes concentraciones (0.1, 0.2 y 0.3 M de acuerdo a las condiciones experimentales que se establecieron, se tomó un volumen de 3.73, 7.46 y 11.2 ml de glutaraldehído al 25 % y aforándolo a 100 ml en un matraz volumétrico).

Posteriormente las esferas se enjuagan con agua destilada y se colocan en una solución de glutaraldehído 0.3 M en agitación por 30 minutos, al término de este se enjuagan las esferas con agua destilada nuevamente y se conservan a  $4^{\circ}C$  en una solución de  $BaCl_2$  0.125 M.

Para medir el diámetro se separan aproximadamente 30 esferas de cada tamaño, se emplea un vernier para determinar el diámetro de cada una de las esferas, y se calcula la media.

Para determinar la concentración de masa celular real de cada tamaño de esfera se tomó 1 ml de esferas, se disuelve en 50 ml de EDTA 0.1 M y se calienta por 15 minutos a 65°C, se adiciona carbonato de potasio hasta la completa disolución de las esferas, posteriormente se toma una alícuota de 1 ml se lava tres veces y se realiza una dilución 1:5 para leerse por absorbancia a 550 nm.

### **3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

Se medirá la cantidad de azúcares reductores por el método de del DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico) [Miller.G.L. 1959].

#### **3.3.3.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO [DNS].**

El reactivo se prepara de la siguiente manera:

NaOH	1.4 %	7.0 g
DNS	0.75% *	3.75 g
Tartrato de Na y K	21.6 %	108 g
Fenol	0.54%	2.7 g
Metabisulfito de Na	0.59%	2.95 g

0.6% si es hidratado.\*

Cantidad calculada para 500 ml.



Se disuelven los reactivos en el orden anteriormente mencionados hasta su completa solubilidad en un volumen de 300 ml de agua destilada con agitación constante, posteriormente se afora para completar un volumen de 500 ml, se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 horas protegido de la luz en un frasco ámbar.

### **3.3.3.2. PREPARACIÓN DE INULINA AL 6%.**

Inulina (6%) como sustrato para la hidrólisis enzimática.

Pesar 3 g de inulina se disuelven en 25 ml de agua destilada con calentamiento y agitación constante en una parrilla eléctrica, se enfría y se afora a 50 ml en un matraz volumétrico.

### **3.3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

Se mezclaron 5 ml de inulina al 6% en 7.5 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.3M, a pH 5.0, con un volumen de 2.5 ml de esferas de alginato de Bario a diferentes concentraciones de 178.5, 256 y 348 mg de células en peso seco/ml de acuerdo con las condiciones que se establezcan, con una agitación de 205 rpm y con temperatura de 50°C; tomándose una alícuota de 100µl, cada 10 minutos durante 1 hora, se transfiere la alícuota en un tubo de ensaye que contenga previamente 1.4 ml de agua destilada y 3 ml del reactivo DNS, inmediatamente se pone en baño maría a ebullición durante 5 minutos, para detener la reacción enzimática se deja enfriar a temperatura ambiente y se completa el volumen a 15.5 ml de agua destilada, se lee a una longitud de onda de 550 nm.

Una unidad enzimática (U.E.) queda definida como la producción de 1µmol de azúcares reductores por mg de células en peso seco por minuto (M. Manzoni and V. Cavarzoni, 1988).

### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

A todos los datos cuantitativos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA o ANOVA), empleando la prueba de Tukey el cual analiza los valores por tratamientos.

Este análisis se utiliza para agrupar las medias de los tratamientos para demostrar si existe o no diferencia significativa entre cada muestra.

A la prueba de Tukey se le conoce también como la prueba DVS (diferencia verdaderamente significativa), (Wayne.D.,1993).

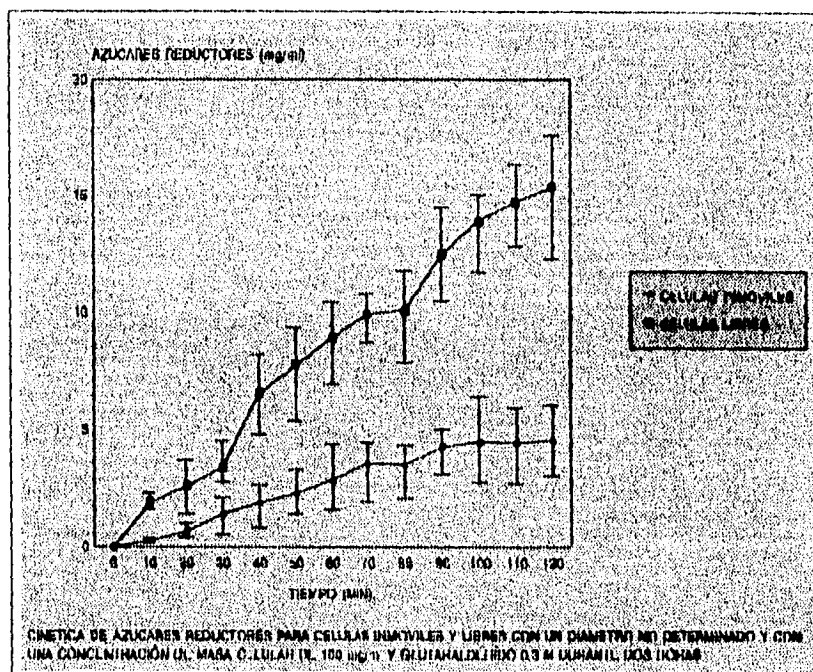
Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESULTADOS

#### 4.1.1. CINÉTICA DE AZÚCARES REDUCTORES PARA CÉLULAS LIBRES E INMÓVILES DURANTE DOS HORAS.

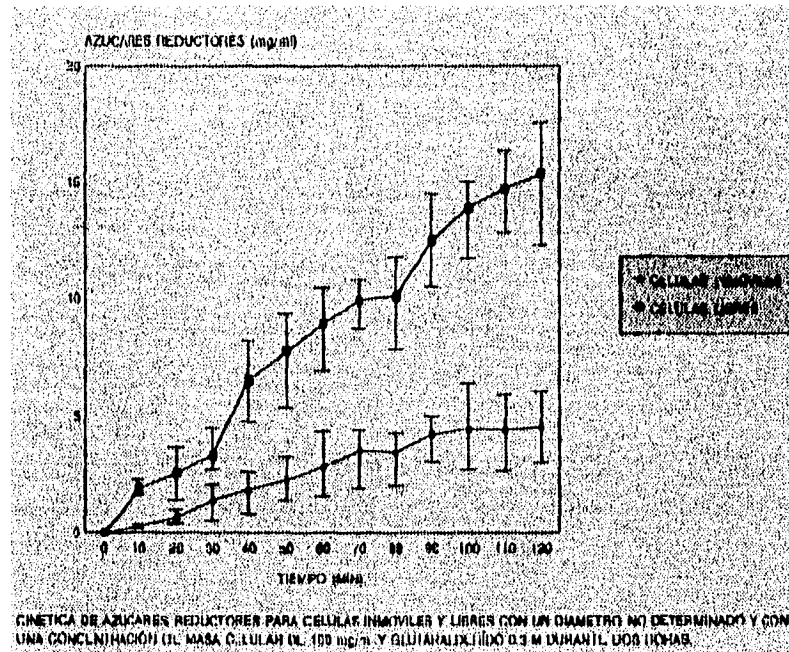


En la figura 1 se muestra la comparación de la cinética obtenida para la producción de azúcares reductores en células libres e inmóviles durante 2 horas

Para la determinación de la cinética de producción de azúcares reductores, la carga celular y el diámetro de la esfera, se consideraron como teóricos, es decir, se tomaron alícuotas con concentraciones de masa celular de 100 mg/ml aproximadamente, y no se midió el diámetro de la esfera, esto se hizo con el fin de observar el comportamiento de las células inmóviles con respecto a las células libres para mejorar u optimizar el sistema de inmovilización.

Se observa que la máxima producción de azúcares reductores para las células libres e inmóviles es al término de las dos horas, siendo que la mayor producción de azúcares reductores que se observa es para las células libres que con respecto a las células inmovilizadas, se encontró que a partir de los 30 minutos el incremento de la producción va aumentando para las células libres, mientras que para las células inmóviles empieza a partir de los 40 minutos ambas hidrólisis presentan un perfil cinético muy semejante; obteniéndose una producción de 4501.53 mg/ml de azúcares reductores para las células inmóviles y 15375.50 mg/ml para las células libres.

#### 4.1.2. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE INULINASA PARA CÉLULAS LIBRES E INMÓVILES DURANTE DOS HORAS.



En la figura 2. Se muestran los valores obtenidos para la curva de actividades enzimáticas en células libres e inmóviles bajo las mismas condiciones que la figura 1 durante 2 horas

En esta figura se observan las actividades enzimáticas tanto para células libres como para células inmóviles, en donde las células libres tienen una mayor actividad enzimática de 0.34 U.E a los 10 minutos, disminuyendo poco a poco su actividad hasta mantener un comportamiento no variable a partir de los 80 minutos hasta el término de las dos horas, mientras que para las células inmovilizadas que alcanzan su mayor actividad enzimática a 0.080 U.E en 30 minutos, manteniendo éstas su actividad enzimática casi estable a partir de los 40 minutos hasta el término de los 120 minutos, esto se debe, a que influye la concentración de masa celular la cual, se consideró como teórica para las células libres y para las células inmóviles y el tamaño de esfera para éstas últimas, el cual no fue establecido.

Comparando la actividad obtenida entre las células libres y las células inmóviles se observa que la mayor actividad enzimática es en las células libres en menor tiempo que en las células inmóviles, debido a que en las células libres la concentración de masa celular es la que corresponde a la teórica, esto es, 100 mg/ml.

#### 4.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN CONTRA EL DIÁMETRO DE ESFERA.

En el siguiente cuadro se muestran los valores obtenidos en el efecto de la concentración de masa celular contra el diámetro de la esfera para células Inmóviles, donde podemos observar la producción de azúcares reductores (mg/ml) y actividad enzimática (U.E.) en tiempos establecidos de 10, 20, 30, 45 y 60 minutos.

Cuadro 1.

#### EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN CONTRA DIÁMETRO DE ESFERA.

Tamaño	t	[ ] 178.5 mg/ml		[ ] 256 mg/ml		[ ] 348 mg/ml	
		A.R.	U.E.	A.R.	U.E.	A.R.	U.E.
1.8 mm	10	863.77	0.0127	529344	0.0068	698.77	0.0068
	20	1781.24	0.0166	1740.51	0.0113	2297.82	0.0110
	30	3855.58	0.0239	2816.55	0.0122	3826.13	0.0122
	45	5005.08	0.0207	4323.43	0.0125	7446.50	0.0158
	60	7435.07	0.0231	6569.10	0.0143	7076.97	0.0113
2.4mm	10	968.71	0.0180	553.02	0.0072	506.86	0.0048
	20	2544.32	0.0237	1828.39	0.0119	2363.55	0.0112
	30	3985.46	0.0246	3071.83	0.0133	4186.24	0.0133
	45	5354.45	0.0222	4582.98	0.0132	6546.23	0.0139
	60	6880.62	0.0124	6448.45	0.0139	7472.22	0.0189
2.8 mm	10	788.80	0.0147	728.78	0.0068	445.84	0.0048
	20	1849.83	0.0172	1828.39	0.0119	2363.55	0.0112
	30	3263.97	0.0203	3165.94	0.0137	3003.08	0.0098
	45	5193.12	0.0125	4887.91	0.0144	4837.88	0.0102
	60	6610.53	0.0205	6349.03	0.0137	8236.37	0.0068

A.R. = Azúcares Reductores  
 U.E. = Actividad Enzimática (Unidades enzimáticas).  
 t = tiempo en minutos.

En los primeros 10 minutos la producción de azúcares reductores es baja, esto se debe a que la esfera apenas inicia un equilibrio dentro del medio, es decir, la enzima tiene contacto con el sustrato pero aún no se difunde completamente, mientras que a los 20, 30, 45 y 60 minutos la producción de azúcares reductores va aumentando, las esferas se equilibran dentro del medio y la enzima se encuentra difundida completamente. Después de ese tiempo la actividad enzimática permanece constante, por lo que establecimos este tiempo como el óptimo de la reacción.



Si observamos los valores obtenidos entre las actividades enzimáticas se muestra que existe variación de la actividad enzimática al analizar las concentraciones celulares de 178.5, 256 y 348 mg/ml, para cada uno de los tamaños de esferas que se tienen pero, al comparar cualquiera de los diámetros que se establecieron a diferentes concentraciones se encontró que existe diferencia significativa.

Por otro lado se observó que al utilizar la carga celular de 178.5 mg/ml en los 3 diámetros que se tienen, se obtuvieron los valores con mayor actividad enzimática. Al relacionar el efecto del diámetro con la carga celular observaremos que para el diámetro de 2.8 mm y una concentración de 348 mg/ml tienen las actividades mas bajas, en comparación con las actividades obtenidas para el tamaño de 2.4 mm con una concentración de 178.5 mg/ml.

#### 4.2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ESFERA Y EL DIÁMETRO DE LAS ESFERA.

En el cuadro se muestra el efecto de la efectividad de un sistema de células inmóviles entre concentración de masa celular y diámetro de esferas.

Cuadro 2.

#### EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ESFERA Y DEL DIÁMETRO DE LA ESFERA

CONCENTRACIÓN CELULAR				
Tamaño	t	( ) 170.5 mg/ml	( ) 250 mg/ml	( ) 340 mg/ml
1.0 mm	10	0.34	0.18	0.27
	20	0.51	0.35	0.29
	30	0.77	0.40	0.38
	45	0.63	0.43	0.56
	60	0.77	0.59	0.46
2.4 mm	10	0.46	0.19	0.19
	20	0.73	0.37	0.30
	30	0.78	0.44	0.42
	45	0.67	0.46	0.49
	60	0.71	0.56	0.49
2.8 mm	10	0.39	0.25	0.17
	20	0.53	0.40	0.20
	30	0.65	0.46	0.31
	45	0.65	0.50	0.36
	60	0.66	0.58	0.41

t = tiempo en minutos.

La efectividad ( $\eta$ ) se determina dividiendo la actividad enzimática de células inmóviles entre la actividad enzimática de células libres. La efectividad se calcula para determinar que tan efectivo es un sistema de inmovilización contra un sistema de células libres, este cuadro se utilizó para observar que tanta diferencia existía entre el efecto de la concentración de la masa celular dentro de la esfera y el diámetro de la misma, y poder determinar cual era la concentración y el tamaño adecuado, determinándose que existe una diferencia significativa a través de una ANOVA.

Se observa que para los datos obtenidos en una misma concentración de masa celular a tres diferentes tamaños no existe diferencia significativa, aunque para la concentración de masa celular de 178.5 mg/ml se tienen valores más altos que para los obtenidos en la concentración celular de 348 mg/ml.

El determinar la efectividad sirvió para observar y demostrar que si existe diferencia significativa entre tres concentraciones de masa celular 178.5, 256 y 348 mg/ml respectivamente, contra un solo tamaño de esfera, que con respecto al efecto que presenta el tamaño de esfera a una sola concentración de masa celular.

Los datos obtenidos de la efectividad en relación al tiempo varían, ya que para los primeros 10 minutos se tienen diferencias entre cada una de las concentraciones celulares de 178.5, 256 y 348 mg/ml, esto se debe que a existen problemas de difusión, es decir, que la concentración de masa celular interviene en la concentración del sustrato para que tenga contacto con las células atrapadas dentro de la esfera.

A los 20 minutos se observa que incrementa su actividad hasta los 60 minutos no habiendo diferencia significativa a una sola concentración celular.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

#### 4.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA CELULAR CONTRA EL DIÁMETRO DE LA ESFERA PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD (P) EN CÉLULAS LIBRES E INMÓVILES.

En el cuadro se muestran los resultados obtenidos para la productividad entre células libres e inmóviles en el efecto contra carga celular y el diámetro de la esfera.

Cuadro 3.

#### EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA CELULAR CONTRA EL DIÁMETRO PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD (P) DE CÉLULAS LIBRES Y CÉLULAS INMÓVILES.

CONCENTRACIÓN CELULAR			
Tamaño	[ ] 178.6 mg/ml	[ ] 286 mg/ml	[ ] 348 mg/ml
1.8 mm	7.98 g/P.h	7.08 g/P.h	8.47 g/P.h
2.4 mm	6.98 g/P.h	6.96 g/P.h	8.56 g/P.h
2.8 mm	7.17 g/P.h	6.82 g/P.h	7.07 g/P.h
Células libres	9.44 g/P.h	10.06 g/P.h	14.36 g/P.h

g/l.h = gramos / litro por hora.

La pendiente se determinó a los 60 minutos por que se obtuvieron los valores más altos para la misma y un valor de r de 0.99 en las tres concentraciones celulares que se tienen contra los diámetros.

Para las células libres se determinó la concentración de masa celular manteniendo una relación equivalente, es decir, tener la misma concentración de células libres con respecto a las células inmóviles en mg de peso seco / ml.

La productividad en las células libres, es mucho mayor, ya que en las células libres se encuentran en contacto directo con el sustrato y no tienen ninguna barrera que impida la difusión del medio a la célula, sin embargo, para las células inmóviles la concentración del alginato, así como la concentración celular forma una barrera para la difusión por lo que la productividad disminuye y que al comparar la productividad obtenida por las células libres con respecto a las células inmóviles presentan cierta diferencia significativa, mostrando que para el tamaño 1 (1.8 mm) la diferencia es de 1.46, 2.27 y 2.44 para los tamaños de 2.4 y 2.8 mm respectivamente con respecto a las células libres de la concentración de 178.5 mg/ml, para las concentraciones celulares de 256 y 348 mg/ml las diferencias son de 2.98, 3.1 y 3.24 para la segunda y 5.89, 5.8 y 7.29 para la última en cada uno de los tamaños que se tienen, es decir, 1.8, 2.4 y 2.8 mm.

Aunque sí se observan los valores obtenidos entre una sola concentración celular con respecto a los tres tamaños de esfera se muestra que no existe diferencia entre éstos, en comparación con el efecto entre la carga celular con respecto al diámetro de la esfera donde sí existe diferencia significativa

### 4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTARALDEHÍDO CON RESPECTO AL DIÁMETRO DE LA ESFERA.

En el cuadro 4. Se muestra el efecto de la concentración de glutaraldehído contra el tamaño de esfera.

Cuadro 4.

#### COMPARACIÓN ENTRE EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTARALDEHÍDO.

##### Concentración de glutaraldehído

Tamaño	t	0.1M		0.2M		S/G	
		A.R. mg/ml	U.E.	A.R. mg/ml	U.E.	A.R. mg/ml	U.E.
2.4 mm	10	51.44	0.0096	145.75	0.0027	171.47	0.0032
	20	805.94	0.0075	906.83	0.0064	1146.76	0.0107
	30	1817.66	0.0113	2077.04	0.0129	2081.33	0.0129
	45	3041.62	0.0128	3292.40	0.0136	2947.30	0.0122
	60	4199.10	0.0130	4807.86	0.0146	4728.55	0.0147
2.8 mm	10	139.32	0.0026	87.86	0.0016	227.20	0.0042
	20	1138.19	0.0108	1043.87	0.0097	1099.61	0.0108
	30	2233.52	0.0139	2044.89	0.0127	2805.83	0.0174
	45	3541.05	0.0146	3521.76	0.0146	3425.30	0.0142
	60	5003.11	0.0155	4754.27	0.0147	4732.83	0.0147

S/G = Sin glutaraldehído.  
 A.R. = Azúcares Reducidos.  
 U.E. = Unidades Enzimáticas.  
 t = tiempo en minutos.

Los datos en este cuadro muestran el efecto de la concentración del glutaraldehído de 0.1 y 0.2 M con dos tamaños de esferas de 2.4 y 2.8 mm con una concentración de masa celular de 178.5 mg/ml.

Estos tamaños se eligieron después de haberles realizado un tratamiento estadístico empleando la prueba de Tukey, en los que se obtuvieron los valores de las medias más altas y presentaban menor diferencia significativa entre sí, obteniéndose 2 tamaños de diámetros 2.4 y 2.8 mm respectivamente, y una sola concentración celular que en este

caso fue de 178.5 mg/ml. Después de haber determinado el efecto de la concentración contra el diámetro se determinó el efecto de la concentración de glutaraldehído, variándose ésta de 0.3 M de acuerdo a Bajpail, (1988) y que es la concentración que se estableció en el diseño experimental, se modificó a 0.1 y 0.2 M, y se probó el efecto que presentaban las células inmóviles sin glutaraldehído únicamente como control. Se obtuvo que a los 10 minutos se tienen diferencias entre los valores, esto sucede por el fenómeno de difusión, mientras que de los 20 a los 60 minutos se observan muy pocas diferencias, lo que indica que el sistema entra en equilibrio. Se concluye que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de glutaraldehído.

Aunque el glutaraldehído presenta cierto efecto sobre las células, además que este polímero se inserta en los espacios entre el material de soporte y las células en las esferas llevándose un cruzamiento permanente, por ello su importancia de emplearlo en los sistemas de inmovilización.

#### 4.3.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL GLUTARALDEHÍDO EN CÉLULAS INMÓVILES CON GLUTARALDEHÍDO Y SIN GLUTARALDEHÍDO CON RESPECTO AL DIÁMETRO.

En el siguiente cuadro se muestran los datos correspondientes a la productividad entre la concentración del glutaraldehído para células inmóviles con glutaraldehído, así como células inmóviles sin glutaraldehído.

Cuadro 5.

##### EFECTO DE LA PRODUCTIVIDAD.

Tamaño	[ ] 0.1 M	[ ] 0.2 M	S/G
2.4 mm	5.04 g/l · h	5.61 g/l · h	5.23 g/l · h
2.8 mm	5.80 g/l · h	5.65 g/l · h	5.35 g/l · h

S/G = Sin Glutaraldehído.  
g/l · h = gramos / litro por hora.

En el cuadro 5 se muestra la productividad total, determinada en un tiempo de 60 minutos, para el tamaño de 2.4 mm y 2.8 mm con una concentración de masa celular de 178.5 mg/ml, claramente se observa que no existen diferencias significativas entre estos valores. La concentración de glutaraldehído tiene cierto efecto en las células inmóviles, por que además de darle consistencia a la esfera, forma un enlace covalente mostrándose un incremento de la actividad sobre la esfera, la concentración celular y el diámetro de la esfera, no siendo como única barrera el alginato sino que también el glutaraldehído puede ser una barrera para llevarse a cabo una adecuada difusión.

Se muestra que entre los valores obtenidos para la concentración de glutaraldehído de 0.1 M, 0.2 M y las células sin glutaraldehído con respecto a los diámetros de 2.4 y 2.8 mm no existe diferencia entre cada una de las condiciones que se tienen, es decir, para el tamaño de 2.4 mm en las concentraciones de 0.1 y 0.2 M la diferencia es de 0.57 g/l · h, mientras que la diferencia es entre la concentración de glutaraldehído de 0.1 M con respecto a las células sin glutaraldehído sólo se tiene una diferencia de 0.19 g/l · h, y para la concentración de 0.2 M comparado con el control la diferencia es de 0.38 g/l · h y para los resultados obtenidos para el tamaño de 2.8 mm para la concentración de 0.1M tienen una diferencia de 0.76, 0.25 y 0.12 g/l · h, por lo que se concluye que no hay variación entre la concentración de glutaraldehído 0.1 y 0.2 M con respecto a las células sin glutaraldehído.



**4.3.2. EFECTO DE DOS TAMAÑOS DE ESFERAS CON UNA CONCENTRACIÓN CELULAR DE 178.5 mg/ml CONTRA EL EFECTO EN AUSENCIA Y DE DOS CONCENTRACIONES DE GLUTARDEHÍDO.**

En el cuadro 6 se encuentran los valores obtenidos para la determinación de la efectividad en el efecto de dos diferentes concentraciones de glutaraldehído con los dos tamaños de esferas que se tienen a una concentración de 178.5 mg/ml, así como el efecto que presentaron las células inmóviles a la ausencia del glutaraldehído.

**Cuadro 6.**

**DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUTARALDEHÍDO.**

Tamaño	t	0.1 M	0.2 M	S/G
2.4 mm	10	0.045	0.12	0.15
	20	0.37	0.42	0.53
	30	0.54	0.61	0.61
	45	0.67	0.72	0.65
	60	0.57	0.66	0.65
2.8 mm	10	0.12	0.076	0.20
	20	0.53	0.48	0.53
	30	0.66	0.60	0.63
	45	0.76	0.78	0.75
	60	0.68	0.65	0.65

S/G = Sin Glutaraldehído.  
t = tiempo en minutos.

En este cuadro se muestran los resultados obtenidos para la efectividad notándose grandes diferencias. La efectividad se determinó con 2 diámetros diferentes de 2.4 y 2.8 mm respectivamente con una concentración celular de 178.5 mg/ml comparando los resultados obtenidos a dos concentraciones de glutaraldehído 0.1 y 0.2 M, así como el efecto que tendrían las esferas sin la presencia del glutaraldehído como agente endurecedor. Se observa que a los 10 minutos existen diferencias entre la concentración de glutaraldehído de 0.1 y 0.2 M así como las esferas en ausencia de glutaraldehído para el tamaño de 2.4 mm y 2.8 mm, a partir de los 20 minutos se obtuvieron valores que no representan diferencia entre las dos concentraciones de glutaraldehído y el control para ambos casos.

Se observa que no existe diferencia significativa entre la concentración de glutaraldehído de 0.1 M y 0.2 M para los dos tamaños de esferas que se tienen, aunque existe diferencia entre los valores obtenidos para las esferas sin glutaraldehído sobre todo en los primeros 10 minutos posteriormente los valores tienen menor diferencia, la concentración del glutaraldehído es tan baja, que no presenta variación sobre la actividad de las esferas.

4.4. CINÉTICA DE AZÚCARES REDUCTORES PARA UN TAMAÑO DE 2.8 mm Y UNA CONCENTRACIÓN CELULAR DE 178.5 mg/ml Y GLUTARALDEHÍDO 0.1 M DURANTE 3 HORAS.

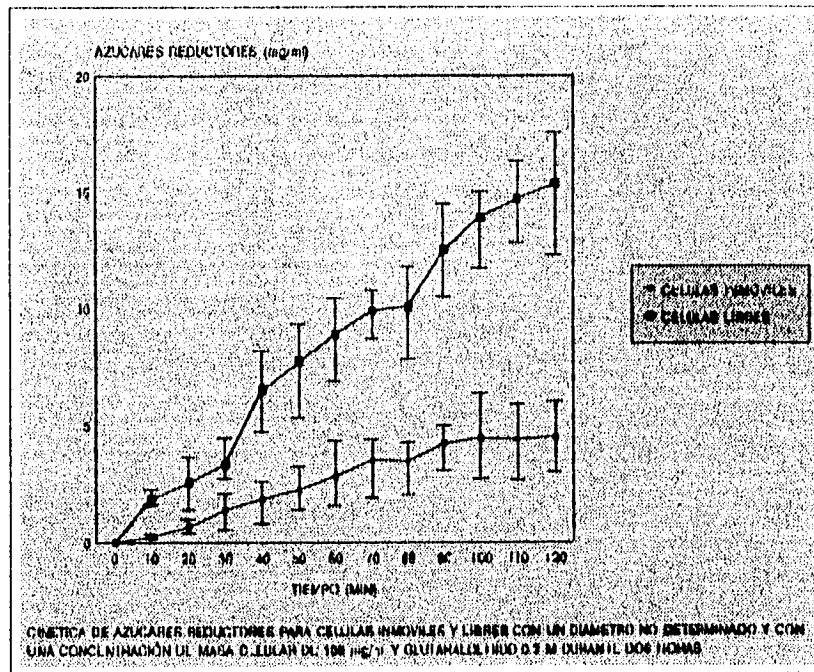
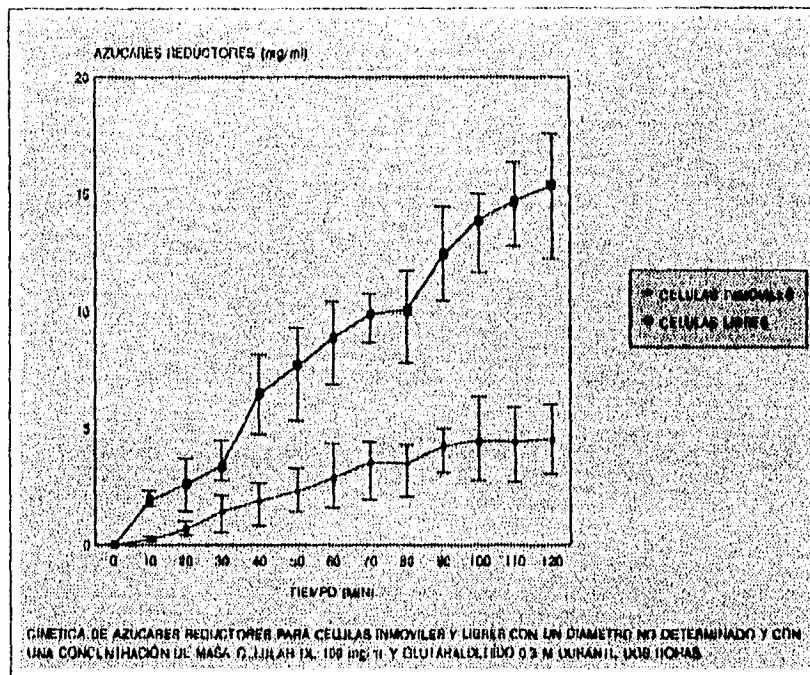


Figura 4. En la siguiente figura se muestran los valores obtenidos para la cinética enzimática en la producción de azúcares reductores en células libres e inmóviles con un tamaño de esfera de 2.8 mm, con una concentración celular de 178.5 mg/ml y glutaraldehído al 0.1 M durante 3 horas.

A través de esta gráfica podemos observar como el perfil que siguen las células inmóviles es muy similar al de células libres, éstas alcanzan su producción a los 40 minutos con aproximadamente 6 mg/ml de azúcares reductores, las células inmóviles tienen una producción de azúcares reductores de 3.5 mg/ml también a los 40 minutos.

Después de determinar el efecto que se tenía en la carga celular y el diámetro, se eligió el mejor tamaño para hacer una comparación con las células libres, para mostrar que un sistema de inmovilización se mejoró empleando, un tamaño y concentración de carga celular.

4.4.1. En la siguiente figura se muestran los valores obtenidos en la hidrólisis de inulinasa para la determinación de actividad enzimática en células libres e Inmóviles con un tamaño de 2.8 mm con una concentración celular de 178.5 mg/ml y glutaraldehído 0.1 M durante 3 horas.



Como podemos observar que para las células libres se obtuvo una actividad enzimática de 0.055 U.E. a los 10 minutos, mientras que para las células Inmóviles se obtuvieron valores de 0.15 U.E. a los 20 minutos, posteriormente se mantiene un perfil para ambas curvas muy semejante en cuanto a comportamiento.

A través de esta figura se muestra que el sistema de inmovilización es mejorado con respecto a las dos primeras figuras (1 y 2), ya sea para las células libres se nota un descenso en las actividades después de los 60 minutos debido a que hay una desnaturalización de la enzima, mientras que las células inmóviles se mantienen en una fase constante.

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES**

- 1.- Se diseñó y se demostró que en el sistema de inmovilización se obtuvo una concentración de masa celular conocida y un tamaño de esfera definido.**
- 2.- Se mejoró y optimizó el sistema de inmovilización empleando un diámetro de esfera de 2.8 mm con una concentración de masa celular de 178.5 mg/ ml de alginato y una concentración de glutaraldehído de 0.1 M, obteniendo así mejores rendimientos en cuanto a la producción de azúcares reductores y actividad enzimática.**
- 3.- Se comprobó que existe diferencia entre el efecto de las tres concentraciones de masa celular y los tres diámetros de esfera que se establecieron.**
- 4.- La variación de la concentración de glutaraldehído ya sea 0.1 ó 0.2 M no presenta diferencia con respecto a las células sin glutaraldehído.**

## BIBLIOGRAFÍA.

- 1.-Azhari R., Szlak. A.M Ilan E.S., 1989. Purification and characterization of endo and exo-inulinase. *Biotech and Appli. Biochem*, 11:105-117.
- 2.-Bajpai P. , Margaritis, A. 1985, Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymes properties. *Enzyme Microb. Technol*, 7: 373-376.
- 3.-Barford, H. C. 1981. Production of enzymes by fermentation. *Essays in Appl. Microbiol*, 1:25.
- 4.-Bekum, H.V., 1996. Synthesis of inulin with potential non food applications, E-mail D.L. Verraest @ stm.tudelft.nl. tel.:+31-15-278-2693.
- 5.-Bernal. M. A., 1994. Efecto del jugo de girasol (*Helianthus annuus*), sobre la actividad de inulinasa de *Kluyveromyces fragilis*. Tesis que para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 6.-Byun, M.S., Nahm, H., B. 1978, Production of fructosa from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *Journal of food Science*, vol 48, 1871-1873.
- 7.- Conable, D.B., 1996. High fructose corn syrup update. Sugar, AGR Number Mx5067, Número de código de reporte Mx95-19v.
- 8.- Dervakkos, G.A. y Colín W., 1991. Immobilized Cell. *Journal of Biotechnology*, 12 (5):210-214.
- 9.-Edelman J. and Bancon, J.S.D., 1950. The action of hydrolitic enzyme system from *H. tuberosus L.* on carbohydrates present in the tubers. *Biochem.* 49:446-453.
- 10.-Espinoza.P., Bárzana. E., García.G.M., y Gómez. R.L., 1992. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneous osly to pectinase of inulinase. *Biotechnology Letters*. 14(11): 1053-1058.
- 11.-Gelardi. R., Dekkev. M., 1991. Alternative sweeteners, second edition., Revised and Expande edited by Lyn O'Brien Nabors ., New York. 219-247.

- 12.-Guiraud, J.P., Demeulle, S., Galzy, P. 1981, Inulin hidrolisis by the *Debaryomyces phaffii* inulinase immobilized on deade cellulose. *Biotechnology letters* 3(12): 683-688.
- 13.- Lehninger, A.L. 1982. Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular, segunda edición, editorial Omega., Barcelona.
- 14.- Lehninger, A.L. 1988. Principios de Bioquímica, cuarta edición, editorial Omega., Barcelona.
- 15.-Manzoni, M., Cavazzoni, V., 1988, Extracellular inulinase from fuor yeasts. 271-274.
- 16.-Miller, L.G., 1959, Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3) : 426-428.
- 17.-Núñez, M.J., Lema, J.M. 1987, Cell immobilization : Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol*, 9 : 642-651.
- 18.-Rhee S.K. y Kim. G.H., 1985., Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin., *Biotechnology Letters*., 11(3):201-206.
- 19.-Rouwnhorst. J.R., Ritmeester .W., Van Dijken. P. J., Scheffers. A.W.,1990, Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces species*., *Applied and Enviromental Microbiology*., 3329-3336.
- 20.-Scriban, 1985. Biotecnología. El manual Moderno. 4ta. edición., México,D.,F.
- 21.-Snyder. E.D, 1992. FDA-SPEAKS.,Intherpharm Press, Inc. All Rights., Buffalo grove., USA.
- 22.- Snyder H.E. and Phaff H.J., 1960, Studies on A  $\beta$ -fructosidasa produced by *Sacchaaromyces fragiis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 26:433.
- 23.-Snyder H.E. and Phaff. H.J., 1962. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* and applications. *Adv. in Appl. Microb*. 29: 139-176.



24.- Steven F.K., Shari B. L. y Channing R.R., 1989. The immobilization of whole cells: Engineering principles . 1321-1354

25.-Tampion. J. y Tampion.M.D., Immobilized cells: Principies and applications., Editorial Cambrigde university Press., New York., 1989.

26.-Tanaka H. Matsumura, M. and Veliky I.A., 1984. Diffuson characteristics of substrates in Ca - alginate gel beads. Biotechnology an Bioengineering 26:53-58.

27.- Tyler, S. H., 1996. The food lover's comparation 2nd. edition, Barron's eaucationaly servicies. Epicurious dictionary.

28.-Wayne,W.D. Bioestadística., Editorial Limusa., octava reimpresión., México, D.F., 1993. 306-307.

29.-Wesley E. W. and Day. D.F., 1983. Purification and propietles of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Febs letters 160 (1,2):16-20.