

2ej
19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ DESARROLLO DE UN SISTEMA DE
INMOVILIZACION DE CELULAS COMPLETAS DE
LEVADURA CON ACTIVIDAD DE

B - GALACTOSIDASA ”



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A
EDMUNDO CASTILLO ROSALES

MEXICO D. F.

OCTUBRE, 1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**'Desarrollo de un sistema de inmovilización de células
enteras de levadura con actividad de β -galactosidasa'**

CAPITULOS

I.- INTRODUCCION ;	5
1.-OBJETIVOS GENERALES	
2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS	
II.- GENERALIDADES.....	12
1.-CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS	
2.- ENZIMAS INMOVILIZADAS	
3.- GENERALIDADES DE LACTOSA Y LACTASA	
III.- ANTECEDENTES	51
1.-β-GALACTOSIDASA INMOVILIZADA	
IV.- MATERIALES Y METODOS.....	65

V.- RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS 80

VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 145

VII.- BIBLIOGRAFIA 150

I.- INTRODUCCION

A través de la historia de la humanidad el uso de las enzimas ha sido bastante extenso. La aplicación de estos catalizadores biológicos de naturaleza proteica, ha constituido una parte muy importante en la elaboración de diferentes productos, dentro de los cuales se encuentran una gran variedad de derivados alimenticios, farmacéuticos, plastificantes etc. En la antigüedad, su uso fue un tanto al azar y empírico, ya que se usaban indirectamente en la elaboración del pan, vinos, cerveza (Antigua Europa, Italia, Grecia, etc.) vinagre, encurtidos, leches acidificadas, etc. En la elaboración de dichos productos se utilizaban microorganismos (Levaduras, bacterias, hongos, etc.) que contenían los sistemas enzimáticos, sin que se tuviera un control estricto sobre los métodos de su utilización. Por ejemplo se tiene que en la antigüedad se almacenaba leche en el estómago de los animales, resultando un precipitado de caseína, cuyo tiempo de vida era mayor que el de la leche (Messing, R., 1975; Morr C.V., 1974), siendo esta una de las aplicaciones más antiguas de las enzimas de que se tenga conocimiento; en este caso la enzima renina coagula la leche, dando como resultado quesos de características muy variadas, pero no se elaboraban bajo ningún tipo de control.

La conceptualización de la enzimología (estudio de las enzimas) nace a fines del siglo XIX, cuando se empezaron a estudiar a fondo las características fisiológicas de los microorganismos utilizados en las fermentaciones. Pasteur descubre así que las reacciones

involucradas en las fermentaciones se catalizaban por enzimas y que estaban relacionadas con la estructura y vida de las células de levadura. Uno de los acontecimientos que contribuyeron grandemente al desarrollo de la investigación en enzimología fue la extracción de las enzimas que catalizaban la fermentación alcohólica de las células de levadura por E. Buchner. Este descubrimiento demostró la importancia de las enzimas como catalizadores de alta efectividad, y que podían funcionar independientemente de la estructura celular. Sin embargo el desarrollo de la enzimología no es franco sino hasta los últimos 60 años, a partir de que J.B. Sumner en 1926 cristaliza la enzima ureasa que cataliza la reacción de urea hacia la producción de amoníaco y bióxido de carbono (fig. 1).



Fig. 1. Reacción catalizada por la enzima ureasa.

Sumner concluyó que las enzimas eran de naturaleza proteica, contrario a la opinión general. Esta conclusión no fue aceptada inmediatamente, sino hasta 1930-1936, cuando Northrop aisló cristales de pepsina, tripsina, y quimotripsina y estableció firmemente la naturaleza proteica de las enzimas. A partir de estos descubrimientos se ha dado lugar a un gran número de investigaciones y adelantos sobre las enzimas, como son el control genético de la síntesis de enzimas, regulación de sistemas enzimáticos, su caracterización cinética y su utilización en procesos industriales tanto en forma libre como inmovilizada.

Una de las áreas de la enzimología que ha tenido gran desarrollo

ha sido el de las enzimas inmovilizadas; aunque se tienen reportes y datos desde 1916 en los que se hacen intentos por inmovilizar enzimas, no fue sino 40 años después que se inician los estudios en forma para el desarrollo de nuevas metodologías y técnicas de inmovilización (E. Katchalski, 1979). Mediante estos estudios se pretende resolver un problema relacionado con la utilización de la lactosa de la leche y de sus subproductos, ya sea desde el punto de vista nutricional, así como desde el punto de vista tecnológico, como veremos a continuación.

La B-Galactosidasa o lactasa, se ha venido utilizando desde hace varios años en forma soluble en algunos procesos de la industria láctea. La lactasa hidroliza a la lactosa, principal carbohidrato de la leche, en glucosa y galactosa, trayendo como consecuencia algunas ventajas tanto tecnológicas como nutricionales en la elaboración de productos lácteos. Estas ventajas se refieren a que hacen accesible la leche y sus derivados a personas que sufren intolerancia a la lactosa. Existe una mayor solubilidad de los productos de la hidrólisis, aunado a una disminución de los problemas de cristalización asociados con la solubilidad de la lactosa. Por otro lado al tener monosacáridos libres después de la reacción, se aceleran los procesos fermentativos y además se aumenta el poder edulcorante con los productos de hidrólisis, dándonos una alternativa de utilización del suero de leche, ya que se podrían preparar jarabes deslactosados de suero sin que existieran problemas de cristalización.

Dentro de la población adulta, se presenta una marcada deficiencia a la asimilación de la lactosa por carencia de lactasa en

su aparato digestivo, dando como resultado diversos trastornos gastrointestinales, que se conocen como intolerancia a la lactosa. Según datos estadísticos (Rosado J., 1985) se dice que en México un 75% de la población mayor de 6 años presenta o ha presentado problemas de intolerancia a la lactosa. Es por esta razón que en muchos países se han hecho grandes esfuerzos para la fabricación de productos lácteos con bajo contenido de lactosa.

Desde el punto de vista tecnológico, el hecho de que la lactosa hidrolizada sea más soluble, evita problemas de cristalización en derivados tales como helados, leches condensadas, cajetas etc (Coughlin R., 1980; Nijpels H., 1981). Dado el mayor poder edulcorante que presentan la glucosa y la galactosa con respecto a la lactosa (aprox tres veces), se puede disminuir la cantidad de sacarosa a utilizar en productos lácteos endulzados cuando la leche ha sido deslactosada.

La lactasa ha abierto amplias posibilidades para la utilización de suero de leche, subproducto que normalmente se desperdicia. En México se producen alrededor de un millón de toneladas de suero al año, prácticamente la totalidad del cual es suero dulce (con pH de 5.5-6.5), que al verterse en la canería provoca graves problemas de contaminación, dada su alta DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno). Cuando se hidroliza la lactosa del suero y el hidrolizado se concentra a un 60-75% de sólidos, se pueden obtener lo que se conocen como jarabes de suero. Estos jarabes son menos viscosos que el suero normal concentrado y por lo tanto de más fácil manejo, pero sobre todo, tienen un poder edulcorante considerable y una cantidad importante de proteínas. Así a partir de estos jarabes se pueden elaborar helados, productos de confitería, productos lácteos

endulzados, aderezos, productos de panadería y bebidas refrescantes de alto valor nutritivo. (Coughlin, 1980; Kosarik, 1982; Morris, 1980; Nijples, 1981).

Todos estos procesos de hidrólisis se han estudiado con enzima libre, sin embargo existe la limitación de que la lactasa es una enzima cara para su utilización en forma libre a grandes escalas. El uso de lactasa inmovilizada reduciría considerablemente el costo, y por ello, esta tecnología representaría un elevado potencial de implementación de proceso y aplicación a nivel industrial. En México la empresa paraestatal Leche Industrializada Conasupo (LICONSA), tiene implementado el proceso de mayor volumen en México de utilización de la lactasa en forma libre, para la hidrólisis de lactosa en leche. Sin embargo dado que la enzima no se produce en el país es necesario importarla, lo que representa gastos excesivos y en ocasiones se ve limitada su disponibilidad.

Por las razones antes mencionadas es que el presente trabajo pretende desarrollar un sistema de inmovilización de células enteras de levadura con actividad de B-galactosidasa. Se pretende utilizar células enteras de levadura en lugar de la enzima purificada, debido a las ventajas que ofrece la inmovilización de microorganismos, pues la mayoría de los sistemas de inmovilización que se reportan en la literatura mencionan una baja estabilidad operacional al inmovilizar enzima libre (Chibata, 1979; Giekas, 1985; Linko, 1980). Esta baja estabilidad probablemente se deba a que la enzima es demasiado sensible a cambios de temperatura, de pH, a diversos cationes etc. Este trabajo pretende minimizar estos problemas al no separar a la enzima de su microambiente natural que es la célula, inmovilizando las

células completas.

Podríamos resumir los objetivos de este trabajo en los siguientes puntos:

I.-OBJETIVO GENERAL: Desarrollar un sistema de inmovilización de enzimas, capaz de retener células enteras de levadura Kluyve-romyces fragilis, manteniendo la máxima actividad de B-Galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche

II.-OBJETIVOS ESPECIFICOS:

-Evaluar los resultados que se obtienen para un sistema base de fibras de triacetato de celulosa y B-Galactosidasa purificada, de tal manera que se puedan establecer las modificaciones necesarias para obtener un sistema de inmovilización de células enteras de levadura con actividad B-galactosídica.

-Variar los componentes de la formulación base de fibras de triacetato de celulosa, de tal manera que se tenga una formulación modificada para células de levadura, utilizando como soporte acetato de celulosa.

-Evaluar la utilización de diferentes agentes entre cruzantes dentro de la formulación, para establecer un método de inmovilización de atrapamiento-entrecruzamiento.

-Optimizar la utilización del agente entrecruzante e -

legido.

-Evaluar la influencia de cada uno de los componentes del sistema de inmovilización en la actividad enzimática del mismo.

II.-GENERALIDADES

1.-CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS

2.-ENZIMAS INMOVILIZADAS

3.-GENERALIDADES DE LACTOSA Y LACTASA

1.-CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS

A continuación se presenta una revisión breve de ciertos aspectos teóricos relacionados con la enzimología, como son:

- A. Definición de enzima y sistema enzimático**
- B. Clasificación de las enzimas**
- C. Parámetros cinéticos de las enzimas**
- D. Parámetros fisicoquímicos relacionados con las enzimas**
- E. Definición de inmovilización**

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica, con actividad muy específica. Catalizan reacciones en sistemas biológicos de alta especificidad (Wang, 1979).

Sistema enzimático: Un sistema enzimático está formado por la holoenzima, el o los sustratos, un grupo proteico y sustancias activadoras.

Holoenzima.- Esta integrado por la coenzima y la apoenzima (fig. 2)

HOLOENZIMA = COENZIMA + APOENZIMA

Fig. 2-La holoenzima dentro de un sistema enzimático

Coenzima: Estructura no protéica que puede ser algún metal o ión, o alguna molécula orgánica compleja que algunas enzimas requieren para activarse.

Apoenzima: Molécula de naturaleza protéica que en presencia de su coenzima (algunas enzimas no requieren de coenzimas o cofactores) forman a la holoenzima que es la enzima propiamente dicha.

Grupo prostético.- Estructura adherida fuertemente a la molécula de la enzima y que contribuye a la actividad enzimática. Si la unión es muy débil se le conoce como coenzima.

Sustrato.- Sustancia o grupo de sustancias sobre la cual actuará la enzima dependiendo el grado de especificidad de esta misma.

Centro activo de la enzima.- Parte estructural de la enzima capaz de reconocer a su sustrato y transformarlo, y que confiere las propiedades catalíticas de la enzima.

Sustancia activadora.- Son los elementos que coadyuvan a la mayor actividad de la enzima, ya sea, haciendo más afín el sustrato, facilitando la liberación de producto, etc.

Sustancias inhibidoras.- Todas aquellas sustancias que de alguna

manera interfieren en el buen funcionamiento de las enzimas o finalmente impidiendo que estas actúen totalmente.

B. Clasificación de las enzimas.

Muchas enzimas han sido nombradas solamente por adición del sufijo -asa al nombre del sustrato o molécula sobre la cual la enzima actúa catalíticamente. Por ejemplo la ureasa cataliza, la hidrólisis de urea hacia amoníaco y dióxido de carbono (fig. 1) y la fosfatasa que cataliza la reacción de hidrólisis de esteres de fosfato. Sin embargo esta nomenclatura no es práctica. En otros casos los nombres triviales no aportan ninguna información como es el de tripsina, quimotripsina, etc. Por estas razones es conveniente adoptar una nomenclatura y clasificación como la que recomienda la Comisión Internacional de Enzimas.

El sistema divide a las enzimas en 6 clases principales, las cuales se dividen en subclases y sub-subclases. Cada enzima tiene un número de identificación dentro de la clasificación (Tabla 1).

La nomenclatura es informativa desde el punto de vista químico, se basa en la naturaleza de la reacción química catalizada por la enzima. Estos nombres sistemáticos, son de gran aplicación en casos donde se necesita una información importante, como son revistas internacionales, congresos, resúmenes, etc. Aunque aun en algunos casos por comodidad se sigan utilizando los nombres triviales. Un ejemplo de la nomenclatura sistemática se presenta en la figura 3.

Tabla(1) Clasificación de las enzimas según la Comisión
Internacional de Enzimas

1. Oxido-reductasas
(reacciones de oxidación reducción)
 - 1.1 Actúan en CH-OH
 - 1.2 Actúan en -C-O
 - 1.3 Actúan en -CH-CH
 - 1.4 Actúan en -CH-NH₂
 - 1.5 Actúan en -CH-NH-
 - 1.6 Actúan en NADH;NADPH
2. Transferasas
(transfieren grupos funcionales)
 - 2.1 grupos de un carbón
 - 2.2 grupos aldehídos o cetonas
 - 2.3 grupos acil
 - 2.4 grupos glicosil
 - 2.7 grupos fosfato
 - 2.8 grupos tiol
3. Hidrolasas
(Reacciones de hidrólisis)
 - 3.1 Estéras
 - 3.2 Enlaces glicosídicos
 - 3.4 Enlaces peptídicos
 - 3.5 Otros enlaces C-N
 - 3.6 ácidos anhídridos
4. Liasas
(Adición a doble enlace)
 - 4.1-C-C-
 - 4.2-C-O
 - 4.3-C-N-
5. Isomerasas
(reacciones de isomerización)
 - 5.1 Racemasas

Tabla(1)Continuación

6. Ligasas

(Formación de enlaces con rompimiento de ATP)

6.1 C-C

6.2 C-S

6.3 C-N

6.4 C-C

<u>NOMBRE TRIVIAL</u>	<u>NOMBRE SISTEMÁTICO</u>	<u>REACCIÓN CATALIZADA</u>
Transaminasa	glutamato: piruvato amino transferasa	Glutamato + piruvato ↓ cetoglutarato+alanina

FIGURA(3).-Nomenclatura para la reacción catalizada por transaminasa.

C. Parámetros fisicoquímicos relacionados con la actividad catalítica de las enzimas.

Los parámetros fisicoquímicos que afectan la actividad de las enzimas son el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. Es decir en general son todos aquellos factores fisicoquímicos que afectan la naturaleza proteica de las enzimas.

D. Parámetros cinéticos de las enzimas.

La conversión de un sustrato [S] a un producto [P] por medio de una enzima [E] se puede representar por:



En donde k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} son las constantes individuales de velocidad de reacción. Si la concentración de sustrato [S] es mucho más grande que la concentración de enzima [E] y k_{-2} es despreciable entonces la velocidad total de su reacción de [S] hasta [P] estará

descrita por la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente manera:

$$v = \frac{ds}{dt} = \frac{k_2[ES]}{[S] + K_m} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \text{ ---- (1)}$$

en donde la constante K_m contiene a las 3 constantes, y está dada por:

$$K_m = \frac{k_2 + k_1}{k_3}$$

El K_m puede estar definido también como la concentración de sustrato $[S]$ a la cual la velocidad de reacción es igual a $\frac{1}{2}$ de V_{max} . Cuando se tiene una concentración de sustrato muy alta la concentración de enzima total $[E]$ estará en forma del complejo $[ES]$, y se tendrá entonces:

$$v = V_{max} = k_2[ES] = k_2[E_{total}]$$

Los valores de K_m y V_{max} los podremos determinar por diferentes métodos, establecidos por diferentes autores. En la figura 4 se pueden observar los más comunes. De entre ellos el más frecuente es el método de Lineweaver-Burk que grafica el inverso de v contra el inverso de $[S]$ (figura 4). Para obtener los parámetros cinéticos gráficamente, normalmente la ecuación (1) se puede reordenar de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} \text{ ---- (2)}$$

que es la ecuación de una línea recta en los ejes $1/v$ y $1/s$, y cuya pendiente será K_m/V_{max} , y su intersección con $1/v$ será $1/V_{max}$. La

ecuación (2) se conoce como ecuación de Lineeweaver-Burk (figura 4b).

Otra alternativa será graficar v contra v/s que pone un gran énfasis en todos los puntos y da un valor confiable de K_m ; pero requiere valores muy altos de $[S]$ para dar una buena medición de V_{max} (fig. 4C). La gráfica S/V contra S da menos variación en la precisión sobre valores prácticos del $[S]$ (fig. 4).

E. Inmovilización de Enzimas.

Una enzima inmovilizada es aquella cuyo libre movimiento en el espacio ha sido restringido a una pequeña y limitada región o se ha restringido completamente.

Esta técnica resulta de gran importancia, ya que las enzimas se recuperan más fácilmente de la mezcla de reacción, pudiendo reutilizarse, lo que tiene una gran repercusión desde el punto de vista económico. Por otro lado, las condiciones de operación se controlan mejor bajo un sistema constante a lo largo del proceso.

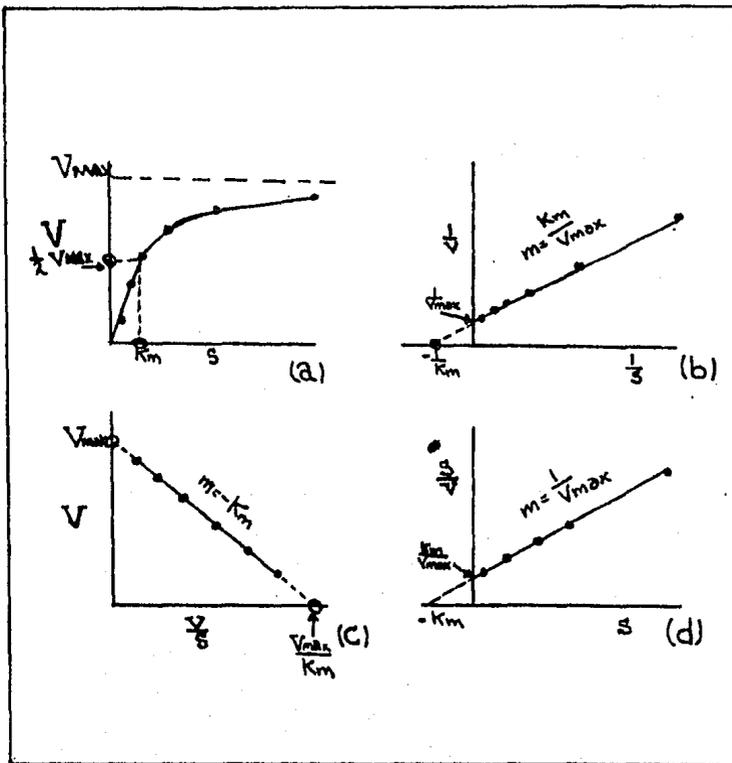


FIGURA (4).-Diferentes representaciones gráficas de la ecuación de Michaelis-Menten.

2.-METODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Los métodos de inmovilización se pueden clasificar en 4 grandes grupos (Wang et al, 1979) que son:

- i) Atrapamiento y microencapsulación
- ii) Adsorción
- iii) Enlace covalente

y que se ilustran en la figura (5).

El primer grupo de enzimas son aquellas en donde la enzima ha sido atrapada en un espacio limitado o unida a un soporte. Así tenemos que, la inmovilización por atrapamiento se subdivide de acuerdo a la estructura del sistema utilizado, es decir, si se encuentra dentro de un espacio sencillo se denomina atrapamiento por encapsulación; o si se trata de varios espacios, generalmente entrelazados, el método se conoce como atrapamiento en una matriz polimérica. Por otro lado, enzimas que se encuentran unidas o enlazadas directamente al material de soporte, se subdividen en enzimas unidas por adsorción, o unidas por enlace covalente. Las enzimas unidas por enlace covalente, pueden ser todavía subdivididas en enzimas enlazadas directamente al soporte o enzimas enlazadas entre sí.

Estos son los métodos de inmovilización más usados a la fecha, no obstante existen variaciones dentro de estos métodos, siendo los más comunes la utilización de 2 o más métodos a la vez (Pastore, 1972); por ejemplo puede utilizarse un método de atrapamiento y entrecruzamiento, utilizado como soporte. Los métodos antes mencionados también pueden ser utilizados para inmovilizar

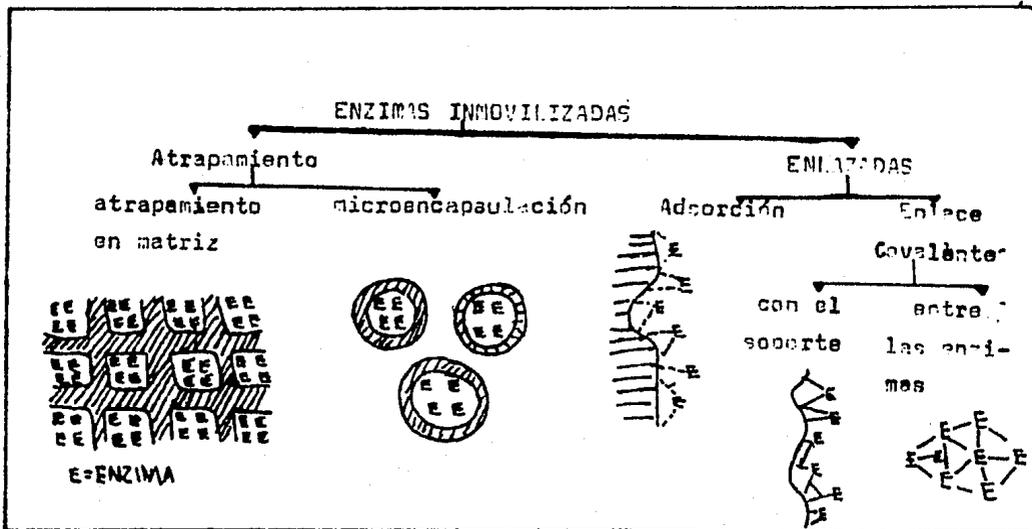


Figura (5).-Metodos mas comunes de innovilización de enzimas, y su clasificación(Wang, 1979).

células enteras.

El inmovilizar células completas presenta el atractivo de que abate los costos de manufactura del catalizador, ya que se elimina la purificación de las enzimas. Por otro lado, ofrece un microambiente más adecuado para la estabilidad de las enzimas (Venkatasubramanian, 1976; Chibata, 1980). De los métodos de inmovilización mencionados, el más utilizado en la inmovilización de células es el método por atrapamiento en una matriz polimérica.

1) Atrapamiento y encapsulación.

Se han estudiado diversas técnicas de inmovilización por atrapamiento, en matriz polimérica, siendo las más utilizadas aquellas donde la matriz es un gel. Igualmente, un gran número de materiales han sido probados, donde los geles de poliacrilamida han sido los más exitosos (Dahlquist, 1973; Ohmiya, 1977). Otros geles utilizados son K-carragenina, alginatos, etc.

En lo que respecta a la encapsulación, los materiales más utilizados son polímeros sintéticos, como son el colodión, resinas de silicón, nylon, poliurea, etc. La inmovilización por encapsulación ha tenido buena aceptación para uso médico (Chang, 1976).

Chang et al, 1976, reporta su uso directo en lesiones orales en ratones, con deficiencia hereditaria de catalasa y así reemplazar la deficiencia de la enzima localmente. Otros usos fueron al suministrar oralmente en animales ureasa, para su acción directa en el tracto intestinal.

En general las enzimas atrapadas tienen aceptación y aplicación,

pero su uso se limita por ciertas desventajas que son:

- Las enzimas tienden a salirse del soporte,
- Cuando el atrapamiento es en gels no se pueden utilizar enzimas hidrolíticas que degraden al soporte, por ejemplo, no se pueden inmovilizar amilasas en almidón.
- En general, las enzimas hidrolíticas no pueden ser inmovilizadas por atrapamiento, por ejemplo, amilasas, proteasas, dextrinasas, pectinasas y en general todas aquellas que degradan polímeros, porque los sustratos sobre los que actúan son de pesos moleculares elevados, y esto no permite su fácil difusión a través del gel.

11) Adsorción

Las enzimas pueden ser adsorbidas en muchos materiales con superficies cargadas o neutras, para este objetivo muchos adsorbentes usados en la separación de proteínas pueden ser utilizados también para inmovilizar, como son el Sephadex, amberlita, sílica gel, etc.

Sin embargo, el principal problema de este método de inmovilización, es el tener un medio bastante controlado, ya que la enzima tiende a la desorción con cambios muy pequeños en el pH y la concentración de sales.

Los adsorbentes en los cuales se adhiere con un mínimo de desnaturalización la enzima, serán en este caso los más adecuados. Finochiaro et al (1980), inmovilizaron lactasa (Maxilact) en alúmina como material adsorbente reportando rendimiento de 35% de actividad con respecto a enzima soluble. Linko et al (1980), inmovilizan también a la lactasa pero en resinas de adsorción como es el

fenolformaldehido.

Los materiales adsorbentes más importantes en inmovilización de enzimas se mencionan en el cuadro (1).

Tosa et al (1967), inmovilizan amino acilasa para su utilización en la resolución óptica de aminoácidos, utilizando DEAE celulosa y DEAE Sefadex empacados en columnas. La figura 6 nos muestra esquemáticamente la inmovilización por adsorción.

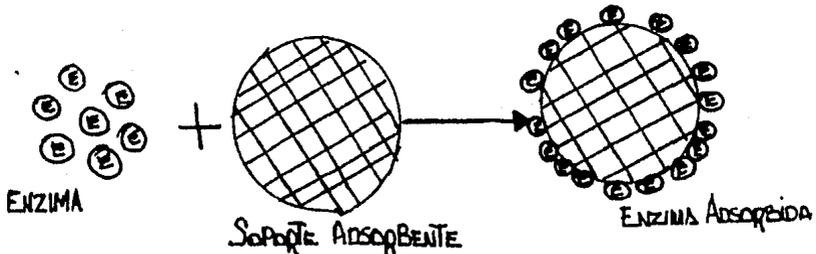


FIGURA 6.-Inmovilización por adsorción.

iii) Enlace covalente Existen formas de inmovilizar enzimas en las que las moléculas de enzima se unen covalentemente a un soporte, o entre sí, mediante la utilización de agentes entrecruzantes (figura 7).

Las formas más utilizadas para el entrecruzamiento son:

-entrecruzamiento de las enzimas con glutaraldehido para formar un agregado insoluble, por ejemplo papafina (Fansen y Olson 1969).

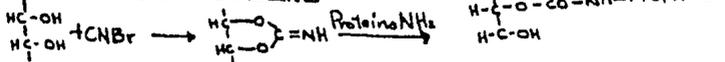
- adsorción de enzimas dentro de una superficie seguida de un entrecruzamiento. Finochiaro, et al (1980), reportan la inmovilización de lactasa por adsorción en alúmina y seguida de un entrecruzamiento por glutaraldehido. Otro método es inmovilizar en alúmina porosa y

Cuadro (1).-SOPORTES MAS COMUNMENTE UTILIZADOS PARA INTOMO-
VILIZAR ENZIMAS POR ADSORCION.

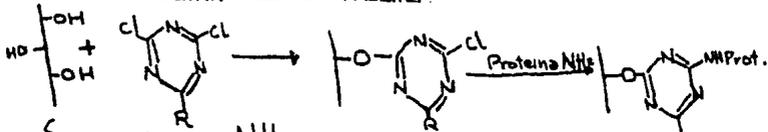
ALUMINA	COLAGENA
ADBERLITA CG-50	DEAE-CELULOSA
DENTONITA	DEAE-SEPHADEX
CM-CELULOSA	VIDRIO POROSO
CM-SEPHADEX	GEL DE SILICA

- SOPORTES CON OH

a) USANDO Bromuro de Cianógeno

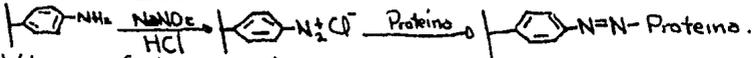


b) USANDO Derivado de 5-Triazina

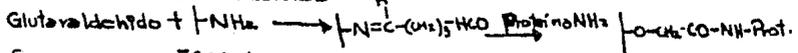


- SOPORTES CON -NH₂

a) Por diazotización

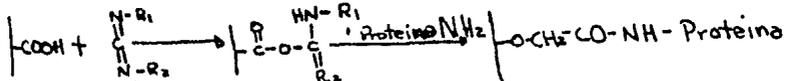


b) Usando Glutaral dehidro



- SOPORTES CON COH

a) Usando Carbodimida.



- SOPORTES QUE CONTIENEN ANHIDRIDOS.

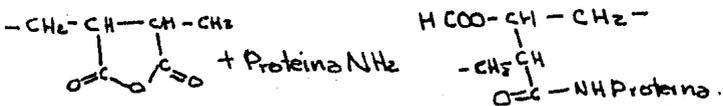


FIGURA (7) .-Reacciones involucradas en los métodos de inmovilización por enlace covalente.

glutaraldehído (Coughlin, 1980).

- Impregnación en un material poroso seguido de entrecruzamiento. Para la inmovilización de β -galactosidasa, existen otros métodos probados, pero existen más estudios en los que utilizan vidrio poroso (Wiersbicki, 1974; Uetall, 1974; Linko, 1980; Okos, 1980;).

Como se mencionó, es posible la utilización de estos métodos no solo para enzimas purificadas, sino también para células enteras con la actividad enzimática deseada (cuadro 2).

El uso de células enteras inmovilizadas como fuente enzimática, es una alternativa que podrá eliminar la necesidad de poner en libertad las enzimas intracelulares y su subsecuente etapa de purificación (Kuhnio Ohmiya, 1977).

El uso de las células enteras inmovilizadas cobra relevancia ya que en algunos casos las enzimas son más estables al no ser separadas de su microambiente natural, la célula. Estos beneficios han llevado a algunos investigadores a profundizar sus estudios en la inmovilización de células microbianas. Corinebacterium glutamicum, fué atrapado en geles de poliacrilamida para producir ácido glutámico. Chibata et al (1979), inmovilizan células enteras de E. coli y otras bacterias conteniendo actividad de amidasa, por varios métodos. Recientemente se inmovilizó Gluconobacter melanogenus, con la capacidad de convertir L-sorbose en L-sorbozona, utilizando como soporte geles de poliacrilamida.

En resumen la alternativa que presenta la inmovilización de células enteras de microorganismos es bastante atractiva tomando en cuenta las ventajas prácticas y técnicas que nos presenta.

Cuadro (2).-Comparación de las diferentes técnicas de inmovilización.

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Adsorción	<p>(1) Método simple y barato</p> <p>(2) No se necesitan agentes químicos por lo que se puede aplicar alimentos</p> <p>(3) Se denaturaliza poco la enzima</p>	<p>(1) Desorción debida al debil enlace formado</p> <p>(2) La matriz tiende a adherir otras proteínas como en el caso de leche y queso de leche</p>
Adsorción entre-cruzamiento	<p>(1) Se evitan las desventajas de la simple adsorción</p>	<p>(1) No tan simple, como la simple adsorción</p> <p>(2) Se utilizan agentes químicos.</p>
Enlace Covalente	<p>(1) Enlace muy fuerte no se separa la enzima del soporte</p>	<p>(1) Utiliza agentes químicos que no se permiten en los procesos de alimentos</p> <p>(2) Soportes Caros</p>
Atrampamiento en Gel	<p>(1) Poca alteración de las propiedades catalíticas</p> <p>(2) Se puede aplicar a células</p> <p>(3) No se necesitan agentes químicos</p>	<p>(1) Limitaciones Difusionales</p> <p>(2) Limitado a sustratos de bajo peso molecular</p>
Atrampamiento en Fibras	<p>(1) Enzima muy estable</p>	<p>(1) Bajo rendimiento en la inmovilización</p> <p>(2) La actividad depende de la difusión en los poros</p>

Cuadro (2) Continuación

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Retención por Membranas	(1) La enzima mantiene sus características originales.	(1) Salida del concepto, liberación de enzima. (2) Liberación en la superficie de la membrana (sustrato)

Sin embargo el uso de estas técnicas no ha sido desarrollado ampliamente por lo que se considera un campo en donde se puede contribuir al estudio y descubrimiento de otras alternativas. Destaca entre las más recientes, el dejar de utilizar un soporte para la inmovilización de células, y solo formar un conglomerado de células con la actividad enzimática deseada, con la simple utilización de agentes entrecruzantes.

Chibata et al (1979), utiliza poliazetidina como agente entrecruzante, para inmovilizar células de E. coli con actividad aspartasa, obteniendo muy buenos resultados; 97% de retención de actividad y una vida media de 611 días.

EFFECTOS DE LA INMOVILIZACION EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

A continuación se enlistan los principales efectos que tiene la inmovilización sobre las enzimas o su actividad:

A) Retención de actividad

B) Efectos difusionales

a) resistencia a la transferencia de masa en soportes no porosos

b) distribución de la enzima dentro de soportes

C) Efectos estéricos

D) Efectos del microambiente

E) Efectos de la técnica o naturaleza de la inmovilización

F) Efectos de estabilidad

A) Retención de actividad

Cuando las enzimas son inmovilizadas por atrapamiento algunas se pueden inactivar o desnaturar por efecto de los reactivos o sustancias involucradas en la formación de la matriz de atrapamiento. Cuando una enzima se enlaza a un soporte, la actividad enzimática puede perderse por varias formas:

- a) Algunas moléculas de la enzima se inmovilizan en el soporte de tal manera que se impide el acceso del sustrato al sitio activo.
- b) Un grupo reactivo puede atacar el sitio activo dentro de la etapa de unión al soporte; así, una forma que ha funcionado para proteger al sitio activo es la adición de un inhibidor reversible del sitio activo en la etapa de enlace, de tal manera que después sea posible retirarlo y conservar así la actividad enzimática.
- c) Que la enzima al ser enlazada al soporte quede de tal manera colocada que afecte su estructura y por lo consiguiente su actividad.
- d) Que la naturaleza de la inmovilización o del enlace provoque desnaturación o inactivación.

Wang et al (1979), presentan en la tabla(3) la inmovilización de quimotripsina en varios soportes y los efectos que tiene sobre la retención de actividad.

Tabla (3) METODOS DE INMOVILIZACION POR ENLACE COVALENTE DE LA QUIMOTRIPSINA A VARIOS SOPORTES.

SOPORTE	METODO DE ENLACE	RETENCION DE ACTIVIDAD(%)
Sepharosa 4B	CNBr	50
Sephadex G200	Isothiocianato	14-25
CM Sephadex C50	Isocianuro	20
CM-celulosa	Azida, Triazina	8
Vidrio Poroso	Glutaraldehido	26
Copolimero del anhídrido Etilen/maleico	Anhídrido	35
Enzacril AA	Isocianuro	25

B) Efectos difusionales.

a) Cuando una enzima ha sido inmovilizada, el sustrato tiene que difundir de la mezcla de reacción a través de la película de líquido que rodea al soporte, y si el soporte es poroso se hará a través de los poros del soporte. Cuando existe resistencia a la transferencia de masa del exterior (sustrato) a la superficie del catalizador, esta limita la velocidad de reacción; las condiciones de flujo a través de la enzima inmovilizada serán determinantes en la velocidad de reacción.

b) Distribución uniforme de la enzima en soportes esféricos. Es de gran importancia este factor debido a que, una distribución no uniforme o inadecuada de la enzima en el soporte contribuiría a los problemas de transferencia de masa y por lo consiguiente a una disminución de la velocidad de reacción. Por ejemplo, cuando la enzima se encuentra en el centro del soporte, alejado de la superficie, el sustrato encontrará mayor número de barreras difusionales para ser transformado.

C) Efectos estéricos.

Hay muchas ocasiones en las que la actividad de la enzima con sustratos de un alto peso molecular se ve reducida como resultado de un impedimento estérico en el soporte, de tal manera que dificulta la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima. Algunos sustratos como caseína ó almidón tienen pesos moleculares comparables con las

enzimas que los degradan, por lo que se hace más difícil obtener altas actividades para estas enzimas en forma inmovilizada.

D)Efecto del microambiente.

Cuando una enzima esta inmovilizada se encontrará en un ambiente diferente al natural, especialmente cuando el soporte tiene una carga neta; esto hace que se provoquen cambios en las propiedades fisicoquímicas de la enzima, los factores que mas afectan son: pH óptimo, temp. óptima, interacciones iónicas, etc., dando como resultado una caída de la actividad inicial de la enzima libre, aunque esto sucede casi siempre en los procesos de inmovilización. El objetivo sera entonces minimizar estos efectos, para poder establecer un sistema óptimo de inmovilización.

E)Efectos del proceso de inmovilización.-

Se encuentran muchos reportes en la literatura, en donde se muestran cambios en la estabilidad térmica de la enzima durante la inmovilización. Aunque la mayoría indica un incremento en la estabilidad térmica, hay suficientes ejemplos, en donde la estabilidad térmica disminuye, lo que indica que la inmovilización no necesariamente confiere incremento en la estabilidad. Un ejemplo de estabilidad por inmovilización lo constituyen las enzimas proteolíticas; que se autodigieren cuando están en solución, por lo que con el proceso de inmovilización, reduce considerablemente este efecto.

F)Efectos de estabilidad.- Es poco lo que se conoce acerca del efecto que tienen las diferentes técnicas de inmovilización sobre la

estabilidad térmica de las enzimas. Wang et al (1979), reporta que la cantidad de agente entrecruzante utilizado para inmovilizar B-galactosidasa en DEAE celulosa influye en la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada. Finalmente podemos decir que son más las ventajas que las desventajas de utilizar enzimas inmovilizadas, siempre y cuando esto sea posible, es decir, que la enzima se pueda inmovilizar.

2.-GENERALIDADES SOBRE LACTOSA Y LACTASA.

- a) La leche
- b) Componentes de la leche
- c) Lactosa
- d) Asimilación de la lactosa y problemas de intolerancia
- e) Lactasa (B-galactosidasa) y sus aplicaciones

a) La leche. La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría (Alais, 1971). Es un líquido de composición compleja blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad.

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos. La gran complejidad de la composición de la leche responde a esta necesidad.

La leche es un producto que se altera muy fácilmente, especialmente, bajo la acción del calor. Numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, en especial aquellas que degradan lactosa

con producción de ácido láctico, ocasionando como consecuencia, la floculación de una parte de las proteínas.

La leche no posee más que una débil y efímera protección natural. Su uso para el consumo y para las transformaciones industriales exige medidas higiénicas contra la invasión de los microorganismos y contra la actividad de las enzimas.

Las especies lecheras varían según las regiones, pero la especie bovina es, con mucho, la más extendida y su área de difusión aumenta cada día. La leche de vaca es por lo tanto, la más importante y la única que se utiliza de múltiples maneras. En determinadas regiones de algunos países mediterráneos se produce también leche de cabra y oveja, que se emplean sobre todo, para la fabricación de quesos.

b) Componentes de la leche.

La propiedad fundamental de la leche es la de ser una emulsión. Es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseínas, albúminas, sales y proteínas solubles.

Desde el punto de vista físico, coexisten varios estados, emulsión, suspensión y solución. Esta heterogeneidad de la leche es ampliamente conocida por todos. Como se sabe, la leche abandonada a la temperatura ambiente se separa progresivamente en tres partes: la crema, la cuajada y el suero.

Existe por lo tanto un estado de equilibrio en la leche que puede romperse por diferentes acciones. Normalmente se trata de cambios previsibles en sus cualidades físicas, organolépticas y

nutritivas, etc.

Si recordamos que se llama fase, en un medio heterogéneo, a cualquier parte del medio que constituya un medio homogéneo, sea cual sea su estado de división, en la leche se pueden distinguir tres:

1) la emulsión 2) la suspensión 3) la solución

La leche puede tener gases disueltos, pero en realidad no constituyen una fase gaseosa diferenciada.

1) La emulsión

La fase de emulsión de la leche, se forma en su mayoría por casi toda la materia grasa, constituida fundamentalmente por:

i) Triglicéridos. Constituyen aproximadamente un 98% del conjunto total.

ii) Los fosfolípidos (grasas fosforadas): Que constituyen del 0.5% al 1%.

iii) Otras sustancias insaponificables, diferentes de las anteriores desde el punto de vista químico, pero insolubles en el agua y solubles en las grasas: alrededor del 1%.

2) La suspensión.

Formada básicamente por las caseínas, ligadas a las sales minerales. El conjunto de caseínas o caseína entera es un complejo de proteínas fosforadas y constituye la parte nitrogenada más característica de la leche; no existe ninguna sustancia parecida ni

en la sangre ni en los tejidos vivos. La caseína precipita solo cuando se acidifica la leche hasta pH 4.6 ó cuando se encuentra bajo la acción de una enzima proteolítica específica. La caseína constituye la fracción nitrogenada más abundante en la leche, sobre todo en la de los rumiantes.

En general estas sustancias se caracterizan por un elevado peso molecular comprendido entre 15,000 y 20,000. Es por lo que debido a su estructura proteica y a su elevado peso molecular, que las caseínas no atraviesan membranas dializables y se precipitan facilmente de su suspensión por diversos reactivos, así como por sales minerales en concentración elevada.

3) La solución. La fase en solución de la leche está formada por el conjunto de sustancias disueltas en el agua, cualquiera que sea el tamaño de sus moléculas (incluidas las proteínas solubles), o unicamente por las sustancias de bajo peso molecular, principalmente la lactosa, las vitaminas y las sales que constituirían la solución verdadera. Esta fase está representada en mayor proporción por los lactómeros que pueden obtenerse de diversas formas (filtración con membranas, calor, centrifugación, precipitación con sales, etc). La fase en solución de la leche, reducida a la solución de moléculas pequeñas, tiene una propiedad importante: la constancia de su composición molecular. La cantidad total de moléculas no disociadas y de iones, por unidad de volumen, varía muy poco. Esto es la consecuencia de un hecho fisiológico, y es que la presión osmótica de la leche, que en la mama debe ser bastante semejante a la del suero sanguíneo, tiene que ser constante, y depende casi exclusivamente de la concentración de las moléculas pequeñas disueltas. Se dice que el

lactosuero es isotónico con el suero sanguíneo. c) Lactosa. Ahora bien, ya que la lactosa es el componente de la leche que nos interesa en particular, por la naturaleza de nuestro trabajo, la veremos con un poco de mas detalle en la siguiente sección.

1. Lactosa. Aspectos biológicos.

La lactosa es el glúcido de la leche que se encuentra en mayor proporción, y en forma libre, además es el glúcido más simple y el más constante en proporción.

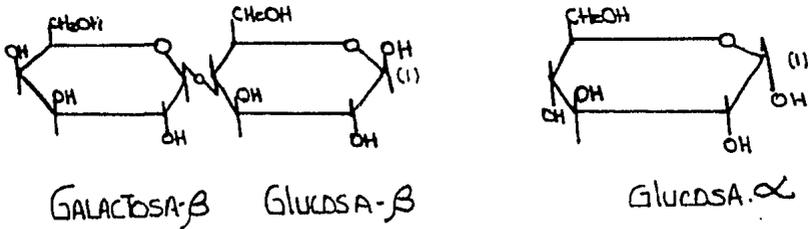
En la leche humana predomina ampliamente, siendo en esta en donde la encontramos en mayor proporción (65g/l) es decir más de la mitad del extracto seco. En la leche de cabra y vaca es también el componente más importante, exceptuando la lactosa presente en la leche, éste azúcar es muy raro en la naturaleza. La lactosa al ser ingerida es hidrolizada en sus dos monosacáridos glucosa y galactosa.

Desde el punto de vista biológico, la lactosa se distingue de los azúcares comunes por su gran estabilidad en el tracto digestivo y porque no solo se considera un glúcido energético, sino como la única fuente de galactosa para humanos y numerosos animales, necesaria para la síntesis de cerebrósidos.

Debido a la importancia de mantener constante la presión osmótica, el contenido de lactosa en la leche es aproximadamente inversamente proporcional al contenido en sales.

En cuanto a la estructura y propiedades físicas de la lactosa podemos decir que se trata de una hexobiosa (galactósido-1-4-glucosa)

$C_{12}H_{22}O_{11}$, con peso molecular 342. Existe bajo 2 formas isoméricas: α y β que se diferencian únicamente en la posición de un OH en el carbono 1 de la glucosa



En la leche humana se dice que se encuentra únicamente la lactosa β , que se considera mas soluble. La solubilidad de la lactosa a $15^{\circ}C$ es de 7.3 g/100 ml de agua, sin embargo se puede elevar hasta 17 g/100 ml de agua, tras una agitación prolongada. Debe destacarse que la lactosa es un azúcar poco soluble, ya que su solubilidad es 10 veces menor que el azúcar común (sacarosa).

Como todo sólido en agua la solubilidad de la lactosa aumenta en caliente, por lo tanto al enfriar sus soluciones concentradas, ésta cristaliza. En este principio se basa el método habitual de preparación del azúcar de leche a partir del lactosuero (el suero se separa de la albúmina por ebullición, luego se concentra al vacío y se enfría). Con la lactosa no se pueden obtener jarabes espesos, ni confituras estables a la temperatura ordinaria.

En cuanto al poder edulcorante, la lactosa tiene un débil sabor dulce, su poder edulcorante es seis veces menor que el de la sacarosa. Además de que en la leche este sabor esta enmascarado por la caseína.

Algunas propiedades físicas de la lactosa tienen importancia en

cuanto a su aplicación práctica en:

- i) leches concentradas
- ii) leches en polvo

i) leches concentradas. En las leches concentradas, en donde se reduce su volumen a un tercio, la lactosa se encuentra próxima a su grado de saturación a temperatura ambiente, así, la refrigeración o la adición de sustancias extrañas muy solubles, como la sacarosa, provoca la cristalización como cristales gruesos y muy duros, dando la sensación de "arenosidad" al producto. Una alternativa para este proceso sería el uso de leches deslactosadas por hidrólisis que además contribuirían al poder edulcorante, ya que la mezcla glucosa galactosa eleva el poder edulcorante.

ii) leches en polvo. Un comportamiento similar al de las leches concentradas se presenta en las leches evaporadas o en polvo, en donde las condiciones de secado, provocan la formación de cristales de lactosa en estado amorfo, en donde se tienen las 2 formas de la lactosa α y β y con alto poder higroscópico.

Estos problemas dentro de la industria láctea son de gran importancia y sobre todo de gran peso económico, por lo que urge encontrar alternativas técnicas para contrarrestarlos.

d) Asimilación de la lactosa y problemas de intolerancia.

Indiscutiblemente, la leche es el alimento ideal para lactantes y además un excelente alimento para niños de edad entre los 0 y 11 años. Sin embargo conforme la gente crece, va perdiendo la capacidad para poder digerirla completamente. Esto sucede porque la producción intestinal de la enzima lactasa disminuye conforme la edad aumenta,

exceptuando una pequeña parte de la población mundial.

La enzima lactasa (B-galactosidasa 3.2.1.23) es necesaria para obtener los dos componentes de la lactosa, que son glucosa y galactosa y que de esta manera puedan ser absorbidos por la pared intestinal.

La leche contiene muchos de los nutrientes requeridos por los lactantes, como son vitaminas y minerales, además de la importante fuente proteica de buena calidad para esta primera etapa de su vida. Se considera que la lactasa esta presente en cantidades adecuadas en niños con buena salud, considerando normal que empiece a disminuir alrededor de los 4-5 años, siendo mínima la cantidad de enzima entre los 10-20 años.

En ciertos grupos étnicos y algunas zonas geográficas, la actividad lactásica puede perderse, se considera que alrededor de las 3/4 partes de la población mundial tienen problemas de intolerancia a la lactosa, es decir, tienen muy poca o nula actividad lactásica. Cuando esta población ingiere alimentos que contengan lactosa aparecen problemas gastrointestinales que van desde dolores abdominales, hasta graves diarreas.

La deficiencia de lactosa es muy común en adultos, tanto que se puede considerar normal. Al parecer en el mundo solo individuos de raza caucásica (Noreuropeos) y 2 tribus de Africa y sus descendientes tienen la capacidad de retener la actividad lactásica aun siendo adultos. La causa principal de los problemas de la intolerancia es que, cuando un individuo con deficiencia de lactasa consume grandes cantidades de lactosa, una gran proporción de este azúcar que no se

digiere pasa directamente al colon donde se convierte en sustrato para las bacterias del intestino, produciendo gases y ácidos que son los responsables de la flatulencia, dolor abdominal y excesivo movimiento peristáltico. Además se provoca diarrea, debido a la diferencia de presión osmótica en el intestino por la lactosa presente

Todos estos problemas causados por la deficiencia de lactasa, no siempre son permanentes, debido a que la deficiencia de la lactosa tampoco puede ser permanente, es decir, a excepción de la deficiencia debida a problemas congénitos, puede deberse a:

1. Gastroenteritis bacteriana o viral, o úlcera gastrointestinal
2. Desnutrición o parasitosis intestinal
3. Intestino irritable o alcoholismo
4. Edad avanzada
5. Cirugía gástrica (puede ser deficiencia permanente)
6. Drogas, medicamentos o antibióticos
7. Terapia con radiaciones

Existen muchas formas para diagnosticar la intolerancia a la lactosa. Uno de ellos y el más fácil, es ver que los síntomas desaparecen cuando se suprime todo alimento que pueda contener lactosa y que estos vuelven cuando la lactosa es reincorporada a la dieta. Existen métodos muy complicados como son biopsias de intestino, pero la más utilizada es el medir la cantidad de glucosa en sangre después de ingerir lactosa.

Uno de los métodos que se sugieren para contrarrestar este tipo de problemas es la ingestión de alimentos derivados de leche con bajo

contenido de lactosa, lo cual se lograría tratando este tipo de productos con la enzima lactasa (β -galactosidasa 3.2.1.23) .

e) Lactasa (β -galactosidasa (3.2.1.23)) y sus aplicaciones.

La lactasa: β -galactosidasa E.C. (3.2.1.23) es la enzima que hidroliza la lactosa de la leche o derivados lácteos en sus dos componentes, que son glucosa y galactosa. Las fuentes más importantes de la enzima son: intestino delgado de mamíferos, bacterias, hongos y levaduras, aunque se tiene conocimiento de que algunas plantas la contienen en pequeñas proporciones. Algunas de estas fuentes son utilizadas para preparaciones comerciales de enzima (cuadros 3 y 4).

No todas las fuentes de lactasa se pueden considerar dentro de las legislaciones sanitarias para su utilización en alimentos. Preparaciones de lactasa a partir de A. niger, A. oryzae y de Saccharomyces (lactis o fragilis), se consideran adecuadas para su aplicación en alimentos, ya que estos microorganismos se han utilizado como fuentes de enzimas a través de la historia, además de haber sido sujetas a diversas pruebas. Últimamente se aceptó el uso de A. niger, K. fragilis y A. oryzae, quedando pendientes de aceptarse por algunas legislaciones las de Candida pseudotropicalis y K. lactis.

La β -galactosidasa, de E. coli, aunque ha sido una de las más estudiadas en detalle, no es usada en procesos alimenticios, debido a los problemas de toxicidad que desencadenan los extractos de coliformes.

**Cuadro(3).-PREPARACIONES COMERCIALES DE LAC-
TASA REPORTADAS EN LA LITERATURA(Giekas et al)1985.**

Aspergillus niger

Baxter Laboratories, Chicago Il, USA.
Dairyland Food Labs, Waukesha, Wi, USA
Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan
Societé Rapidase, Seclin, France.
Wallerstein Co, Morton Grove, Il, USA.
GB Fermentation Industries, Inc., Il, USA.

Kluyveromyces lactis

Gist-Brocades, Holland (Maxilact).
Nutritional Biochemicals Co., Cleveland, USA.
Tokio Tanabe Co. Ltd, Japan.

Kluyveromyces fragilis

Kyowa Hakko Kogyo Co, Japan.
Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.
Novo A/S, Denmark (Lactozym).

Escherichia coli

CF Boeringer GmbH, Mannheim, RFA.
Worthington Biochemical Corp., Freehold, USA.

Preparaciones de levadura son proporcionadas por:

British Drug House Ltd, London, England.
DEBI, Cassina de Pechi, Milan, Italy.
Sturge Ezymes Ltd, England (Hydrolact).
Miles Laboratories, USA (Godo).

Preparaciones fungales

Miles Laboratories, USA (Takamine).

**Cuadro (4).-FUENTES DE B-GALACTOSIDASA REPORTADAS
EN LA LITERATURA.(Giekas et al.)1985.**

PLANTAS

Durazno
Chabacano
Almendro
Semilla de alfalfa
Tallos de rosaseas
Fruto entero del café

ORGANOS DE ANIMALES

Cerebro y epidermis
Intestino

LEVADURAS

Kluyveromyces lactis
Kluyveromyces fragilis
Candida pseudotropicalis
Brettanomyces anomalus
Wingea roberstsi

BACTERIAS

Escherichia coli
Bacillus megaterium
Thermus acuaticus
Streptococcus lactis
Streptococcus thermophilus
Lactobacillus bulgaricus
Bacillus sp
Bacillus circulans
Bacillus stearothermophilus
Lactobacillus sporogenes

HONGOS

Neurospor crassa
Aspergillus foetidus
Aspergillus niger
Aspergillus flavus
Aspergillus oryzae
Mucor pucillus
Mucor miehei
Fusarium moniliforme
Alternatia alternara

Los aspectos sanitarios son los que más se toman en cuenta, para preparar a partir de estos microorganismos, extractos enzimáticos o en su defecto enzimas inmovilizadas. Estos factores son más importantes en la inmovilización que sobre el material acarreador o agentes químicos involucrados en esta.

Las propiedades de las diferentes B-galactosidasas, dependerán fundamentalmente de la fuente de donde se hayan obtenido. Así el mayor tamaño de esta enzima corresponde a E. coli con 520-850 mil daltones, mientras que para S. fragilis y A. oryzae el peso molecular de la enzima es 201,000 y 90,000 daltones respectivamente. El pH óptimo también será un parámetro que variará de acuerdo a la fuente enzimática. Para las lactasas provenientes de hongos el pH óptimo, tenderá a la acidez (2.5 - 4.5) y para las levaduras el pH óptimo se encuentra en la neutralidad (6-7) así como también para las bacterias (6.5 - 7.5). Esta propiedad del pH óptimo para cada lactasa será el parámetro de selección, ya que la leche y el suero dulce presentan valores específicos que no pueden ser modificados. Entonces las lactasas de hongos serán usadas para hidrólisis de suero ácido, mientras que las de levadura y bacterias estarán destinadas a hidrólisis de suero dulce y leche.

La inhibición por producto (galactosa), es otra propiedad importante que varía de acuerdo a la fuente de lactasa. Así por ejemplo la enzima de A. niger será más fuertemente inhibida por producto que la de A. oryzae. Un preparado enzimático a partir de Bacillus s.p. muestra una inhibición menor, que un preparado similar a partir de K. fragilis.

En el cuadro (5)se muestra un resumen de estas propiedades.

Existe gran interes por incrementar, la producción a gran escala de los productos con bajo contenido de lactosa(Giekas et al, 1985).

En la actualidad el Jarabe preparado a partir de suero de leche, mediante la hidrólisis de lactosa puede ser utilizado como fuente de azúcar y en algunos casos como fuente de protefna a la vez, por ejemplo, en productos de panaderfa, en confiterfa, en refrescos, en helados, en forrajerfa para ganado y en una gran variedad de productos de uso diario, así como en medios de fermentación para la producción de alcohol o biomasa simplemente.

Existe de esta manera la posibilidad de tener varios grados de concentración de los Jarabes y así poder mezclarlos en diferentes proporciones con otros productos, para cada proceso deseado. Un Jarabe concentrado con 80% de sólidos totales fue preparado a partir de suero de desecho de la elaboración de queso "cottage", por una desproteínización, hidrólisis, decoloración y concentración. El jarabe tenfa: un agradable sabor dulce, un color amarillo ligero y una viscosidad de 2050 cp. Este jarabe sirvió para elaborar un helado de vainilla que tuvo características bastante buenas, comparado con el preparado a partir de jarabe de maíz(Giekas,1985).

Un Jarabe demineralizado de lactosa hidrolizada fue producido por Valio Process en Finlandia, el cual contenfa 10% de glucosa, 20% de galactosa, lactosa 10% y con un 10% de protefnas. Este jarabe se usó en una proporción de 12.3% en una mezcla de helado para sustituir el contenido normal de sacarosa y leche, sin deterioro de sus propiedades organolépticas.

Cuadro (5).--PROPIEDADES DE DIFERENTES LACTASAS DE MICROORGANISMOS Y SU VARIACION DE pH POR EFECTO DE LA INMOVILIZACION(V. Giekas,1975).

microorganismo	pH óptm.	Temp. óptm. (°C)	unsc Mlcr. (%)	Cambin de pH
<i>A.niger</i>	3.5	57	124	-1.5
<i>A.oryzae</i>	5.0	53	00	—
<i>K.fragilis</i>	6.6	37	201	-0.5
<i>K.lactis</i>	6.9	35	175	-0.6
<i>E.coli</i>	7.2	40	540	—
<i>L. thermophilus</i>	6.5	55	530	—
<i>C. inaequalis</i>	3.9	42	—	—
<i>B. circulans</i>	6.0	67	—	—
<i>F. miniliforme</i>	4.2	55	—	—
<i>L. bulgaricus</i>	7.0	43	—	-0.5
<i>Leuconostoc sp.</i>	6.5	60	—	—
<i>Scopulariopsis sp.</i>	4.3	58	—	—
<i>B. stearotermophi.</i>	6.2	65	215	—
<i>Mucor pucillus</i>	5.3	60	—	—
<i>Alternaria sp.</i>	4.9	60	—	—
<i>Thermus aquatic.</i>	4.9	80	570	—

Varias formulaciones se han probado durante la manufactura de los helados, a partir de lactosa hidrolizada, obteniéndose importantes resultados favorables, sin que finalmente esto se vea reflejado en las propiedades organolépticas finales, que permanecen constantes para aquellos productos preparados con leche sin hidrolizar o con Jarabes de maíz. Económicamente podemos asegurar que se obtienen mejores rendimientos, ya que se ve disminuida la cantidad de edulcorante necesario para elaborar dichos productos.

Si se evalúa el aspecto económico del uso de jarabes a partir de lactosa, sería aun más interesante contemplar la alternativa del uso de enzima inmovilizada, para su elaboración. En dos casos se ha utilizado, leche hidrolizada para acelerar los procesos de maduración y son en el queso gruyere y en el queso roquefort.

En USA se prepara un refresco de naranja a partir de suero de leche hidrolizado y desproteínizado, el cual es ampliamente recomendado para atletas (Giekas et al, 1985).

Una nueva compañía (Nutrisearch Company, Kentucky, USA) usa el suero hidrolizado para elaborar productos de panificación. Por otro lado el suero hidrolizado se puede utilizar con gran efectividad como medio de cultivo para levaduras tales como S. cerevisiae, para la producción de biomasa o alcohol.

III.- ANTECEDENTES

1.- B-GALACTOSIDASA INMOVILIZADA.

El problema de la lactosa en la leche es bien conocido y como se

mencionó antes, se trata de un problema que afecta a un amplio sector de la población nacional y mundial, por lo que resulta de gran importancia el establecer un proceso que nos disminuya este problema, pero que resulte al mismo tiempo económico y accesible. Este proceso nos lo puede ofrecer, el tratamiento de la lactosa en leche o suero de leche, mediante su hidrólisis con un sistema de B-galactosidasa inmovilizada, ya que de esta manera sería posible la reutilización de la enzima a bajo costo en comparación con el uso de enzima libre, además de las ventajas que los métodos de utilización ofrecen por sí mismos.

Para la inmovilización de B-galactosidasa, en especial, se han utilizado una gran variedad de soportes, sin embargo, se ha tenido una cierta preferencia sobre ciertos agentes y métodos de inmovilización. Por ejemplo, adsorción y entrecruzamiento con glutaraldehído. El glutaraldehído es un agente entrecruzante bifuncional cuyo uso se acepta en la industria alimentaria ya que además presenta propiedades desinfectantes.

Por otro lado las resinas formaldehídicas, también son ampliamente utilizadas para este tipo de inmovilización generalmente utilizada en reactores de lecho fluidizado.

Otro soporte comunmente utilizado son las perlas de vidrio poroso, en donde se inmoviliza por el método de enlace covalente, a través de la formación de grupos amino. Una técnica similar es utilizada con alúmina que es un acarreador inorgánico. También es muy común el uso de soportes orgánicos para una inmovilización por enlace covalente, tales como los derivados de la célula en donde se aprovecha la gran cantidad de grupos hidróxilo, o los poliacrílicos

en donde se aprovechan los grupos amino, estos últimos a menudo utilizan como activadores el oxirano.

Los geles de varios polímeros como la poliacrilamida P.V.A., agar, etc. se utilizan para inmovilizar por el método de atrapamiento.

Giekas et al (1985), presentan las diferentes técnicas de inmovilización que son utilizadas para β -galactosidasa de diferente fuente, así como sus resultados óptimos y el nivel al que han sido probados (cuadro 6).

En el cuadro (6), se presenta con más detalle una revisión de las técnicas de inmovilización más relevantes que son utilizadas para lactasa de levadura, así como algunos casos donde se inmoviliza células enteras, esto de acuerdo con los objetivos que persigue este trabajo.

Un ejemplo de los sistemas con mayor disponibilidad comercialmente es el que reportan Sprossler y Plainer (1985), en donde presentan un sistema de β -galactosidasa inmovilizada para la hidrólisis de lactasa en suero ácido de leche (pH 3.5). Estos autores hacen bastante incapié en el uso de las lactasas de origen fungal, aduciendo un mayor rango de pH de operación, a diferencia de las lactasas de levadura, cuyo rango de pH es bastante estrecho; otra razón por la cual estos autores recomiendan el uso de la enzima fungal es que no se requiere la presencia de iones inorgánicos como activadores.

El sistema de inmovilización que utilizan es por enlace covalente en vidrio poroso. Las principales ventajas que presenta

Cuadro (6).-SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN DE LECTAS DE LEVADURA. (Giokas, V. 1985)

FUENTE DE LA ENZIMA	SOPORTE ACRREADOR	METODO DE INMOVILIZACION	RESULTADOS DE ACTIVIDAD
Lactobacillus bulgaricus	Albumina de huevo	Adsorción/entrecruzamiento con glutaraldehído	25% rend actividad
S.lactis	Enlace covalente por diazotización	Celulosa p-amino carbonatada	700NPG/n
S.lactis	Gel de poli acrilamida	Adsorción y formación de enlaces hidrofóbicos	70 U/L/c
Celulas completas de lactobacillus stearothermophylus	DEAE Celulosa	Enlace covalente con glutaraldehído	
S.lactis	Amino etil Sefarosa	Enlace covalente por diazotización	No disponible
S.lactis y S. fragilis.	Gel de poli acrilamida	Enlace covalente con oxiranos	11% rend
S.fragilis	Amicon P-10	membranas de ultrafiltración	50U/c

Cuadro (6).-Continuación

FUENTE DE LA ENZIMA	SOPORTE ACARREADOR	METODO DE INMOVILIZACION	RESULTADOS DE ACTIVIDAD
K.lactis	Triacetato de celulosa	Fibras por atrapamiento.	22UL/g fibra
S.lactis	Gel de alcohol polivinílico	Atrapamiento	
K.fragilis	Fibras de co- lageno	Atrapamiento de celulas enteras	16°C 01/g
K.fragilis	Fibras huecas de ANICON	Atrapamiento en membrana	

este material es su alta resistencia a la compresión, que es similar al de las resinas de intercambio iónico. Este parámetro es muy importante de considerar cuando el catalizador con el que se trabaja se escala a niveles superiores. Las principales características del catalizador es una alta actividad específica (150 ul/g de cat), reportan que 2lb de el catalizador hidrolizan 240 gal de suero ácido en 24 horas, llegando a un 80% de hidrólisis, bajo estas condiciones de trabajo, la estabilidad operacional es de 100 días, con pérdida de solo 20% de actividad inicial. Además tienen pocos problemas de contaminación por los pHs que se manejan. El proceso en sí es bastante prometedor desde el punto de vista tecnológico, como puede verse, además reportan los autores bajo costo de hidrólisis. Sin embargo, el principal problema encontrado es la disponibilidad de sustrato, ya que el suero ácido no es disponible como tal, hay que pagar por la acidificación habiendo pocas compañías dedicadas específicamente a acidificar suero. Una opción sería la utilización de la lactasa de levadura (pH neutro). Ya existen comercialmente varios procesos que utilizan la lactasa de hongos, como es el caso de Microporus Product Division USA, que utilizan un reactor con enzimas de hongos inmovilizada en (Microporus plastic sheet MPS) placas de plástico microporosas. Se tiende a la utilización de lactasas de levadura, por la disponibilidad del sustrato (en México no se produce suero ácido).

Weetall et al, 1974, reportan la inmovilización de la enzima B-galactosidas de hongos y levaduras en partículas de vidrio poroso de zirconia. Las enzimas inmovilizadas fueron caracterizadas y se les determinó su vida media, obteniéndose así parámetros para su escalamiento. Una aportación importante es que proponen que la vida

media de los catalizadores dependerá de la temperatura de trabajo, teniendo de esta manera una vida media mayor la lactasa de levadura, ya que su temperatura óptima es 10 grados menor que la fungal, pero el inconveniente es que disminuye también su productividad.

Wierzbicki, 1974, logra inmovilizar diferentes lactasas semipurificadas, como son las de Aspergillus niger, Lactobacillus helveticus, Saccharomyces lactis, en un soporte de partículas de vidrio poroso diafolizado, éstas partículas tienen un diámetro de poro promedio de 86.3 μm , siendo el tamaño del poro de 75-125 μm . Este catalizador fue probado en suero ácido, con un 4.5% de lactosa; la mayor actividad se obtuvo lógicamente para la lactasa de Aspergillus niger (89 ul/g vidrio) a 55° C. Para la lactasa de Saccharomyces lactis el resultado fue de 4.5 ul/g vidrio, pese a trabajar a pH del suero ajustado a 6.7 con KOH. Este reporte, marca la dificultad de trabajar con enzima libre, más aún si se trata de enzima de levadura, ya que aparentemente es más inestable a las condiciones de inmovilización. El método de inmovilización lo reporta Wierzbicki et al, 1974.

El mismo autor, posteriormente publica un artículo en donde prueba un reactor enzimático, con el sistema de inmovilización para A. niger y compara con métodos publicados anteriormente, en donde obtienen una mayor actividad (120 ul/g vidrio) para el mismo soporte, pero a 37° C, y entrecruzando con glutaraldehído, aunque a bajas velocidades de reacción.

Otro trabajo con el que es comparado el trabajo de Wierzbicki (1974) es con el de Kondo et al, 1973, quienes obtienen una actividad de la enzima de 200 ul/g a pH=4.5 y 55° C, las partículas

usadas eran de malla 10-40, la desventaja de ellos fue que en 16 hs. ya habían perdido 18% de la actividad inicial.

Los datos obtenidos por Wierzbicki fueron de 95 ul/g cat a 55°C, un pH de 4.5 y un tiempo de vida media de 50 días, teniendo 80% de actividad retenida.

Una gran variedad de técnicas de inmovilización conocidas, se han probado para B-Galactosidasa, encontrando reportes en la literatura como el de los finlandeses Linko et al (1980), en donde prueban B-galactosidasa de Aspergillus niger inmovilizada en resina fenolformaldehídica por medio de adsorción-entrecruzamiento. Este biocatalizador es probado en columnas de 50 ml (empacadas) con suero ácido de leche (pH > 3.5 para evitar contaminaciones).

La compañía francesa CORNING desarrolló un sistema de inmovilización en vidrio poroso, por enlace covalente con glutaraldehído, y con enzima de Aspergillus niger; este sistema trabaja a pHs de 3.5 y temperaturas de 50°C, la compañía reporta una actividad enzimática de 500 u lactasa/g catalizador.

Con respecto a este catalizador H.A. Dohan et al (1976), publican un artículo en donde presentan una experiencia semindustrial. Ellos utilizan suero ácido de leche con un reactor de columna empacada; los resultados más importantes son una vida del catalizador de dos años bajo condiciones de laboratorio, procesa 30,000 l de suero a la semana, resultando 1.7 toneladas de jarabe después de la evaporación. Así se considera que la planta opera a 360 l/h con un 80% de hidrólisis.

Hasta el momento solo se han presentado trabajos enfocados hacia la inmovilización de enzima de A. niger o de aquellas que trabajan a pHs ácidos, siendo estos los reportes de la literatura. Desafortunadamente en México como se mencionó anteriormente no serían muy aplicables, ya que la mayor parte de suero que se produce es dulce, por el tipo de quesos que se elaboran (frescos). Pero la razón más importante es que no son aplicables a leche, puesto que los pHs a los que trabajan estos catalizadores son ácidos (4 - 4.5).

Por estas razones mencionaremos ahora aquellos reportes de la literatura en donde se mencionan catalizadores capaces de ser utilizados en leche, siendo esto en su mayoría aquellos que utilizan enzima procedente de levaduras.

Uno de estos reportes es el que presentan Martyn y Ostergaard (1981), en donde inmovilizan B-galactosidasa Worthington Biochem Corp, en microcápsulas insolubles en agua, resultando éstas con un pH óptimo de actividad de 7.2, por lo que se considera posible de ser aplicado en leche, aunque, esto solo haya sido probado a nivel laboratorio.

Otro trabajo importante es el que desarrollaron Finochiaro y Richardson (1980), en donde inmovilizan lactasa de Kluyveromyces lactis en alúmina activada con un dicianato. El pH óptimo fue de 7.5 en la inmovilización y el óptimo para la actividad fue de 6.5. Mencionan que tiene un rango muy corto de variación de pH, además determinaron una estabilidad operacional bastante aceptable de 68 a 104 días. En cuanto a su estabilidad operacional se hicieron pruebas para un ultrafiltrado de suero obtenido en la elaboración de

queso cheddar; las pruebas se realizaron en un reactor de lecho fluidizado, indicando estos experimentos que la actividad catalítica disminuye en un 46% en las primeras 22 hs, siendo esta caída de actividad bastante drástica, no obstante que las siguientes 26 hs la caída de actividad fue mínima.

Los autores reportan una eficiencia de 25% en la inmovilización referida a actividad enfrentada en la inmovilización, contra actividad expresada en el soporte. Esto se ve reflejado claramente en la actividad que presenta el catalizador y que es de 35 UL/g de soporte.

Arne Dohlquist and Bo Mattiason (1973), reportan un biocatalizador con la enzima Comercial Maxilact y que la inmovilizada en gel de poliacrilamida por entrecruzamiento en cápsulas. Las cápsulas que obtienen fueron utilizadas para la hidrólisis de lactosa en leche. Lograron una inmovilización del 75% de enzima con un 60% de actividad retenida durante el proceso de inmovilización. No obstante los buenos rendimientos que obtienen en la inmovilización, estos no se ven reflejados en la actividad del soporte, ya que se tienen actividades que van desde 0.4ul/g catalizador hasta 3.5 ul/g de c. siendo estos resultados los óptimos.

Finalmente, y para terminar lo que corresponde a lactasa inmovilizada, hablaremos del trabajo realizado por Dinelli, (1974); Marconi (1974, 1979); Morisi (1972) y Pastore (1972, 1974); para la compañía italiana Snamprogetti consistente en el atrapamiento de enzimas dentro de microcavidades de fibras porosas. Vale la pena mencionar que se hace incapie en estos autores, ya que en la actualidad, la compañía Snam Progetti es la única que ha desarrollado un proceso que

ha llegado a nivel industrial. El proceso se basa en lograr el atrapamiento de la siguiente manera:

- 1) Disolver un polímero capaz de formar fibras en un solvente inmiscible con el agua.
- 2) Emulsificar esta solución con la solución acuosa de la enzima.
- 3) Extrudir la emulsión a través de finos orificios dentro de un líquido coagulante con la consiguiente precipitación del polímero en forma de finos filamentos.

Al final del proceso se obtiene un conjunto de largos filamentos cada uno de los cuales se compone de una dispersión de pequeñísimas gotas donde se encuentra atrapada la enzima en solución acuosa. Las características del polímero son tales que permiten la libre difusión de compuestos de bajo peso molecular (0-800 g/mol), pero no permiten la salida de la enzima por su relativamente alto peso molecular.

La fabricación de este soporte es muy similar a la técnica que se sigue en la fabricación de hilos sintéticos en la industria textil.

La compañía Snam Progetti ha probado este tipo de soportes para diferentes clases de extractos enzimáticos, utilizando como polímero triacetato de celulosa, como son: aminoacilasa, fumarasa,

glucoamilasa, glucosa isomerasa, invertasa, lactasa, sistemas multienzimáticos, penicilino amidasa, triptofano sintetasa, etc. Reportan un rendimiento de inmovilización de 300 mg de protefna por gramo de polímero. Para este nivel de enzima inmovilizada reportan eficiencias cercanas a la unidad. Por otro lado obtienen un máximo de protefna inmovilizada después del cual a medida que se aumenta la protefna inmovilizada empieza a disminuir la eficiencia del catalizador, de lo que ellos deducen que es por problemas de transferencia de masa. La actividad por lo tanto depende de la porosidad de las fibras, calculando por microfotografía un diámetro de poro de aproximadamente 0.4 μm .

Una de las ventajas que presenta el triacetato de celulosa es que es un polímero neutro, es decir que sus moléculas no presentaron cargas que puedan afectar a los sustratos o productos, o el valor de pH al que se trabaja.

Hablando específicamente de lactasa (β -galactosidasa) diremos que los primeros en comercializar leches deslactosadas con el uso de β -galactosidasa inmovilizada fue la compañía italiana Centrale de Latte de Milan utilizando la tecnología desarrollada por Snam Progetti. Esto se llevó a cabo en una planta industrial con una capacidad de 10 toneladas por día de leche tratada. La enzima es la lactasa de levadura inmovilizada en fibras de triacetato de celulosa, y se lleva en reactivos por lote a bajas temperaturas. La leche procesada, después de haber obtenido el grado de hidrólisis deseado es distribuida al consumidor.

Las lactasas de diferentes fuentes (E. coli y K. lactis) fueron utilizadas para evaluar el sistema de triacetato de

celulosa (Morisi, 1972). Encontraron graves problemas sobre todo en el aspecto pérdida de actividad ya que se encontró que la actividad se perdía considerablemente a medida que se aumentaba la temperatura de trabajo, esto para aumentar la eficiencia del catalizador, razón por la cual finalmente la compañía Central du Laité dejó el proceso. El máximo de lotes obtenidos sin una pérdida considerable de actividad (aprox 10%) fueron de 50 lotes a 7°C finalmente la compañía optó por trabajar con la B-galactosidasa de A. niger para el tratamiento de sueros ácidos (pH=4.5) ya que esta enzima es mucho más estable. El mismo artículo de Morisi y Pastore (1972), hacen un especial énfasis en la pérdida de actividad de la enzima por temperatura, ya que finalmente, es la causa de la baja estabilidad y el problema principal de los catalizadores de lactasa.

Por estas razones la alternativa a seguir sería inmovilizar a la enzima estabilizada, alternativa que toman en la Universidad de Nagoya en Japón al introducir células completas de microorganismos. Estos inmovilizan 3 diferentes especies de microorganismos que son E. coli, Lactobacillus bulgaris y Klyveromyces lactis.

Los resultados en resumen son una mejor estabilidad de la enzima y de levadura a la temperatura (trabajan hasta 30°C) siendo estable el catalizador, con una estabilidad operacional de 80 lotes continuos de trabajo a 30°C y una pérdida de actividad de 10% en relación a la inicial. La máxima actividad la obtienen para K. lactis.

El problema principal que encuentran son los inherentes al soporte, y que principalmente es el problema de la transferencia de masa.

El soporte utilizado es geles de poliacrilamida en forma de pequeñas esferas.

El desarrollo de los soportes con células inmovilizadas ha tenido gran auge, sobre todo para aquellas enzimas con graves problemas de estabilidad, como se mencionó en apartados anteriores.

Lo que finalmente se puede concluir de estos antecedentes y revisión bibliográfica es que los soportes y catalizadores desarrollados, han sido enfocados casi todos a una gran expresión de actividad enzimática, pero que no se ha logrado mantener una estabilidad operacional adecuada para uso industrial.

Por otro lado, se ve que trabajos como son el de I. Chibata para células inmovilizadas y los de la compañía Snamprogetti nos abren la alternativa de el uso de soportes inertes en la hidrólisis de lactosa y el uso de las enzimas en su medio natural, como son las células para lograr una mayor estabilidad del soporte.

Además en lo referente al uso de la enzima de levadura, nos brinda una mayor opción de aplicación, debido a que se trata de una enzima con un rango de pH que se puede aplicar, no solo a sueros dulces sino a leche como tal, ofreciendo un mayor interés en la industria, sobre todo, por el hecho de que se abriría un gran mercado para el aprovechamiento de leches deslactosadas.

IV.-MATERIALES Y METODOS

- 1.-Preparación de medio de cultivo líquido.
- 2.-Preparación de medio de cultivo inclinado.
- 3.-Crecimiento celular y recolección de células.
- 4.-Determinación de crecimiento celular.
- 5.-Determinación de la actividad enzimática B-Galactosídica, para enzima, células permeabilizadas, y fibras de acetato de celulosa.
- 6.-Elaboración de las fibras de acetato de celulosa, con y sin células de levadura (metodología base).
- 7.-Reactivos, soluciones, soluciones amortiguadoras utilizados en cada una de las metodologías.
- 8.-Equipo y material utilizado.

MEDIO DE CULTIVO Y CRECIMIENTO CELULAR (FUNDAMENTO).

La preparación del medio de cultivo así como el crecimiento celular, se basan en el método de producción de B-Galactosidasa en células de levadura Kluyveromyces fragilis, descrito por Mahoney et al (1977). Los autores diseñan un medio de cultivo con lactosa como fuente de carbono, enriquecido con sales de fosfato y amonio, además enriquecen el medio con extracto de levadura como fuente de vitaminas. Así las fuentes de nitrógeno serán el amonio (NH_4) y el extracto de levadura. El medio de cultivo según Mahoney et al (1977), se esteriliza previamente a la inoculación. La inoculación se lleva a cabo con una relación de 20% v/v de inóculo, con una concentración de 6-7 g/l de células; en el caso de cultivo inicial se lleva a cabo por azada (3 azadas), y se detiene el crecimiento hasta lograr la concentración antes mencionada. El tiempo de crecimiento se fija de acuerdo a estudios realizados por J. Torres et al (en edición), siendo este de 14-16 hs, que es donde se obtiene la máxima producción de enzima B-Galactosidasa de acuerdo a una curva de producción enzimática dentro de una cinética de crecimiento celular (Torres et al en edición).

1.- Preparación de medio de cultivo líquido.

Descripción de la técnica.- La preparación de medio líquido de lactosa consiste de 2 etapas que son, la disolución de las sales y la lactosa, y su esterilización.

a)Disolución de sales y lactosa. Se pesan las siguientes sales y nutrientes para un litro de medio de cultivo:

	% (p/v)	g/l
Fosfato de potasio (dibásico)	0.3	3.0
Extracto de levadura	0.5	5.0
Sulfato de amonio	0.56	5.6

se disuelven en un volumen de 400 ml, y se ajusta el pH a 5.5 con ácido clorhídrico diluido 1:2.

Por otro lado se pesan 50 g de lactosa y se disuelven en 600 ml de agua destilada, ajustando el pH a 5.5 de la misma manera que para las sales; esta cantidad de lactosa nos dará una concentración final, al mezclarla con la solución de las sales, de 5% p/v. Cuando se utiliza lactosa grado reactivo y que no ha sido hidratada en exceso (grandes cristales), no existe ningún problema en la disolución, sin embargo si no se disuelve a la temperatura ambiente y con agitación, se tendrá que calentar ligeramente para favorecer la disolución (aproximadamente 50-60 grados centígrados).

c) Esterilización

Teniendo los dos matraces de las soluciones anteriores se meten en el autoclave para esterilizarlos a 121°C y 1.5 kg/cm² (PSI) de presión durante 20 minutos. el objetivo de mantener separadas las sales de la lactosa, es evitar la caramelización de este azúcar por acción de las sales, así como las reacciones de oscurecimiento enzimático o de Maillard. Al finalizar el tiempo de esterilización se procede a mezclar los dos matraces bajo condiciones de esterilización, con la ayuda de un mechero Fisher, la mezcla se lleva a cabo en un matraz fernbach de 3.5 litros de volumen nominal, teniendo así un volumen de medio de un litro por cada matraz fernbach que se prepare.

2.-Preparación de medio sólido.

Descripción de la técnica

La preparación de el medio solido de lactosa o medio agar-lactosa tiene el mismo fundamento del medio líquido, sin embargo existe una disminución del porcentaje de lactosa utilizado, ya que se debe prevenir un crecimiento excesivo del microorganismo, y así perder estabilidad y viabilidad en la cepa. La composición del medio es la siguiente:

	%	g/l
Sulfato de amonio	0.56	5.6
Extracto de levadura	0.50	5.0
Sulfato de Potasio	0.30	3.0
Sulfato de Magnesio	0.05	0.5
Lactosa	2.00	20.0
Agar	2.00	20.0

Las sales se disuelven en agua destilada menos el agar, y se ajusta el pH a 5.5 calentando esta mezcla a ebullición, en este momento se agrega el agar, agitando a completa disolución. El medio se esteriliza bajo las mismas condiciones que el medio líquido en tubos de ensayo de 16x150 a media capacidad, transcurrido el tiempo de esterilización se retiran del autoclave y se colocan en un plano inclinado sin dejarlos enfriar, de tal manera que tomen la inclinación del plano al gelificar.

3.-Crecimiento celular

Descripción de la técnica.- Se parte de una cepa de levadura Kluyveromyces fragilis NRRL-5561 obtenida a través de la Universidad de Davis California se siembra por azada en los tubos de medio inclinado y se incuba a 29°C durante 48 hrs, transcurrido este tiempo se almacenan a 4°C para su utilización posterior como inóculos de medio líquido. Estos tubos con medio de agar-lactosa se resiembran cada 30 días para garantizar la viabilidad y estabilidad de la cepa. Teniendo estos inóculos se preparan por otro lado matraces de 250 ml con 50 ml de medio líquido, y después de esterilizar se inoculan con 3 azadas de la cepa preparada. Se incuban a 29°C durante 15 hrs. con agitación rotatoria de 160 rpm, o se detiene el cultivo cuando se tengan 6-7 g/l de células.

Partiendo de estos matraces se inoculan los matraces fernbach de 3.5 de volumen nominal conteniendo 1 litro de medio líquido, el inóculo será de 20% v/v y se incubarán los matraces a 29°C durante 15 horas, y con agitación de 160 rpm.

Al término del cultivo se recolectan las células por centrifugación del medio de cultivo, a 7000 rpm durante 20 min. Las células se recogen del frasco de centrifuga de 250 ml (centrifuga Beckman), y se secan por filtración al vacío en kitasato de 500 ml, hasta tener una humedad de 60 % aproximadamente. Las células una vez recolectadas y secadas se guardan a 4° grados centígrados.

a) Determinación del crecimiento celular.

El crecimiento celular en el medio de cultivo será determinado por densidad óptica leída bajo una curva donde se grafica peso seco de células de levadura contra D.O. a 650 nm en un espectrofotómetro

Beckman de la siguiente manera:

- 1.-Se toman muestras de una suspensión de células de levadura K.fragilis, y se colocan en una estufa a 105° C hasta total sequedad
- 2.-A partir de este polvo se preparan disoluciones de diferentes concentraciones desde 0 hasta 5 mg/ml
- 3.-De cada disolución se realiza una dilución de 1:50, de tal manera que las lecturas de las disoluciones entren dentro del rango del aparato.
- 4.-Se realiza la lectura de las diluciones a 650 nm, y a partir de los datos obtenidos se construye una curva con ecuación $y = mx + b$.

Posteriormente se realizaron lecturas de soluciones de concentración desconocida, después de diluir 1:50, y mediante estas y la ecuación de la recta se calculó la concentración celular de la siguiente manera:

$$x = \text{conc celular} = \frac{y - b}{m} = (\text{mg/ml})$$

en donde $y = \text{lectura de D.O}$
 $m = 0.084$ (pendiente de la recta)
 $b = \text{intercepción de la recta} = 0.006$

5.-Determinación de la actividad B-Galactosídica en células libres, biocatalizador y enzima purificada por el método del ONPG.

La determinación se basa en la hidrólisis del cromógeno ONPG por la enzima B-galactosidasa (3.2.1.23) de levadura que efectúa la

hidrólisis de la lactosa, de tal manera que se utiliza al ONPG como sustrato de prueba en el ensayo de la determinación de actividad enzimática, para dicha enzima (Lederberg et al, 1950., Kuby et al, 1953). El método elegido para esta determinación fue elaborado por Lederberg y posteriormente lo modificó Kuby, adaptándose en el departamento de Biotecnología del CEINGEBI-UNAH para células de levadura K. fragilis así como para biocatalizadores.

El glicósido ONPG (o-nitrofenil-D galactopiranosido) que permanece inerte a un pH=7 o cercano a este dando soluciones incoloras; cuando soluciones de este tipo se ponen en contacto con la enzima, se lleva a cabo la reacción de hidrólisis del compuesto, liberándose una molécula de galactosa y una de ONP (o-nitrofenol) por cada molécula de ONPG hidrolizado. El ONP liberado se detecta colorimétricamente, debido a que en solución produce una coloración amarilla.

La determinación cuantitativa se realiza de acuerdo a que la coloración será proporcional a la actividad enzimática y al tiempo de hidrólisis. La determinación se realiza en un espectrofotómetro a 410 nm de longitud de onda, en la cual se obtiene la máxima absorbancia del compuesto colorido ONP (Kuby et al 1953).

Descripción de la técnica para enzima inmovilizada. En una celda de espectrofotómetro mezclar las siguientes soluciones:

2.6 ml de Buffer de fosfatos 0.10, pH=6.6

0.1 ml de 8-mercaptoetanol 3.36M

0.1 ml de cloruro de magnesio 0.03M

0.1 ml de enzima (1 ul/ml)*

*1 ul=unidad de lactosa=cantidad de enzima que libera

un micromol de o-nitrofenol en un minuto a 37°C, pH=6.6

La mezcla se incuba durante 3 minutos a 37°C en el espectrofotómetro. Posteriormente se adicionan 0.1 ml de solución de ONPG 0.065M y se registran las lecturas del aparato, previamente ajustado a 410 nm, cada 30 seg. durante 3 min.

Con las lecturas obtenidas se realizan los cálculos de actividad enzimática de acuerdo a los cálculos del final de este inciso.

Descripción de la técnica para células permeabilizadas.

Teniendo un paquete celular permeabilizado se procede al siguiente tratamiento de determinación de actividad B-galactosidasa:

Se mezclan 18.2 ml de buffer de fosfatos pH 6.6 0.1 M

0.7 ml de solución de B-mercaptoetano, 3.36

0.7 ml de solución de cloruro de magnesio 0.03

0.7 ml de suspensión celular de D.O. (conocida)

La mezcla se incuba durante 3-5 minutos a 37°C en un baño de agua caliente. Transcurrido este período se adiciona la solución de ONPG (0.7 ml) de molaridad 0.068M. Se toma una alícuota en este instante y se detiene la reacción al pasar la alícuota en baño a ebullición durante 5 minutos, esta muestra nos servirá como blanco de ajuste de nuestras determinaciones. Se continúan las determinaciones durante aproximadamente 6 minutos, tomando alícuotas cada minuto, y deteniendo la reacción en estas alícuotas también en un baño de ebullición. Se centrifugan las muestras a 3000 rpm durante 15 min. Se leen las muestras de sobrenadante a 410 nm en D.O. y se realizan los siguientes cálculos:

Se calcula la concentración de ONP liberado por ml para cada tiempo de alfcuota, por medio de una curva tipo que tiene los siguientes parámetros:

$$m = 0.5447$$

$$h = 0.039 \quad (\text{valores de la ecuación de la curva tipo})$$

$$r = 0.99989$$

por medio de la ecuación $y = mx + b$, donde:

x es la concentración de ONP

m es la pendiente de la recta

b intercepto en el eje de las y.

y absorbancia

asi:

Con los datos obtenidos se construye una gráfica de concentración contra tiempo de donde se obtiene una recta cuya pendiente será igual a: UONPG o velocidad, que al multiplicarse por el volumen de reacción se obtendrá una actividad total para el volumen de reacción manejado, en $UONPG = UONPG \text{ totales}$.

El resultado obtenido se divide entre los gramos de células que se manejaron en la reacción, para así obtener una actividad específica de las células utilizadas en $UONPG/g \text{ de enzima} = UONPG \text{ específicas}$.

Determinación de actividad B-galactosídica en Biocatalizador (fibras de acetato de celulosa) por el método del ONPG, así como evaluación de la inmovilización por el mismo método enzimático.

Descripción de la técnica para el biocatalizador.

Mezclar 37.8 ml de buffer de fosfatos pH= 6.6

1.4 ml de cloruro de magnesio

1.4 ml de solución de 8-mercaptoetanol

0.065g de fibras de acetato de celulosa con células de levadura
inmovilizadas.

La mezcla se incuba durante 3-5 minutos a 37°C en baño de agua. Transcurrido este período se adiciona la solución de ONPG (1.4 ml) de molaridad 0.068M. Se toma una alícuota de 3 ml al tiempo cero min. de la reacción y se continúa la determinación durante 12 min. tomando alícuotas cada 3 min.

La evaluación de la inmovilización se determina en este paso de la técnica, ya que de cada alícuota se coloca 1.5 ml en 2 tubos y en uno se detiene la reacción por baño a ebullición durante 5 minutos y en el otro no se detiene la reacción ya que se supone que al separar el sustrato de la fuente enzimática que está contenida en las fibras, no habrá enzimas que continúe la reacción y por lo tanto no habrá más producción del compuesto de color amarillo ONP. Finalmente esto es comprobado al comparar las lecturas a 410 nm de los dos tubos de muestra del mismo tiempo, de donde se tendrán las siguientes opciones:

-Si la lectura es la misma para los dos tubos entonces se considera una buena inmovilización.

-Si la lectura es mayor para el tubo en donde no se detuvo la reacción por temperatura entonces se considera una mala inmovilización, ya que la reacción continuó produciendo el compuesto colorido ONP, y por lo tanto

produciendo una mayor lectura.

De esta manera, cuando se tiene una perfecta inmovilización, es decir cuando no existe salida de actividad enzimática del soporte hacia la mezcla de reacción, se procede a calcular la actividad enzimática del soporte del mismo modo que para células permeabilizadas, por supuesto, teniendo en cuenta que el volumen de reacción será ahora de 42 ml, y que el peso de la fuente enzimática es diferente.

6.-Metodología estandar para la inmovilización de células enteras de levadura con actividad de B-galactosidasa en fibras de acetato de celulosa como soporte.

FUNDAMENTO.- La técnica se basa principalmente en el atrapamiento de las células enteras permeabilizadas de levadura, dentro de una matriz polimérica inerte, que en este caso es el acetato de celulosa y asegurar la inmovilización por medio de una reacción de entrecruzamiento, entre las proteínas de las células y una proteína adicionada dentro del soporte, utilizando como puente un agente entrecruzante como es el caso de la carbodimida.

La reacción que se lleva a cabo, es primero una reacción entre los grupos carboxilo (COOH) de cualquiera de las proteínas, y el grupo carbodimida dando como resultado una acilisourea. Posteriormente se llevará a cabo una acomplamiento entre el grupo activado acilisourea y grupos nucleofílico de las otras proteínas; en este caso la reacción se lleva principalmente con grupos amino.

El mecanismo de reacción que se lleva a cabo es el que se describe en la figura(7), bajo las condiciones anotadas.

La carbodimida utilizada para la reacción es la 1-etil-3,3-dimetilamono propil carbodimida, y la proteína adicionada al soporte es albúmina sérica bovina.

DESCRIPCION DE LA TECNICA

A partir de un paquete de células de levadura permeabilizadas, que son suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos de pH6.6 y 0.1 M se prepara una mezcla con una solución de albúmina 250mg/ml y 0.5 ml de glicerol. Por otro lado se disuelven 500 mg de cristales de acetato de celulosa en 5 ml de acetona y se homogeniza con 0.5 ml de emulsificante con un HLB=9

La suspensión celular es colocada dentro de una Jeringa de plástico de 5 ml, y se gotea a la solución de acetato de celulosa con constante agitación dentro de un Vortex, hasta formar una emulsión estable.

Cuando se tiene una emulsión estable, se procede a la reacción de entrecruzamiento, al agregar 0.5 ml de solución de carbodimida 100 mg/ml y continuar la agitación durante 15 minutos para favorecer el entrecruzamiento.

Transcurrido este tiempo, se coloca la emulsión en el émbolo de una Jeringa de 5 ml y se extrude a través de una aguja de insulina, cuyo diámetro es 3 mm, en un baño de tolueno para inducir la precipitación del acetato de celulosa. El polímero obtenido en forma de fibra se separa del tolueno, se evapora el tolueno residual a temperatura ambiente y se almacena a 4°C en cajas de petri, selladas con papel parafilm.

7.-Reactivos y soluciones amortiguadoras utilizadas en las metodologías experimentales.

1. Solución amortiguadora de fosfatos de potasio pH= 6.6 0.1 M
2. Solución de β -mercaptoetanol 3.36 M
3. Solución de cloruro de magnesio 0.03 M
4. Solución enzimática
5. Solución de sustrato de ONPG (o-nitrofenil β -galactopiranosido) 0.048 M
6. Solución de ácido (HCl) para ajuste de pH
7. Solución de base (NaOH) para ajuste de pH
8. Acetato de celulosa disuelto en acetona
9. Emulsificante HLB= 9
10. Solución de albúmina sérica bovina.

B. Equipo y material utilizado.

- Balanza analítica capacidad 100 g (5200) Bosch
- Baño de agua con agitación rotatoria (modelo 676) New Brunswick Scientific Co.
- Centrífuga clínica 5000 rpm (sol-bal) Aparatos Científicos.
- Centrífuga de alta velocidad con refrigeración (Sorvall RC-5B) Du pont Instruments
- Colorímetro (spectronic 20) Bausch Lomb
- Spectrofotómetro (modelo 35) Beckman.
- Potenciómetro (pH meter 125) Corning
- Super Mixer (vortex) de velocidad variable.
Lab line Instruments Inc
- Bomba de vacío doble sello Feli Welch.
- Jeringa hipodérmica 5 ml Becton Dickinson
- Aguja hipodérmica para insulina Becton Dickinson
- Tubos de ensayo de 22 x 150 mm
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Matríz erlenmeyer 250 ml
- Matríz erlenmeyer 25 ml
- Matríz erlenmeyer 50 ml
- Matríz Fernbach 2.8 l
- Probeta graduada 100 ml
- Matríz aforado 10, 50, 100, 1000, 2000 ml
- Pisseta
- Matríz kitasato de 500 ml
- Buchner con alargadera
- Trampa con condensados en bomba de vacío

- Propipeta de 10 ml Corning
- Pipetor Macro Set 5 ml Oxford Laboratories.
- Parrilla con placa agitadora Corning.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

1.-METODOS DE INNOVILIZACION EVALUADOS

- a) Carragenina
- b) Alumina
- c) Fibras de heneken
- d) Acetato de celulosa

2.-ELECCION DE LA CEPA A UTILIZAR

- a) Kluyveromyces fragilis L-278
- b) Kluyveromyces fragilis NRRL-Y1109
- c) Kluyveromyces fragilis NRRL-Y5561
- e) Kluyveromyces lactis CEPICE-UNAH

3.-DESARROLLO DE UN SISTEMA ESPECIFICO DE INNOVILIZACION PARA CELULAS DE LEVADURA K. fragilis, UTILIZANDO COMO SOPORTE ACETATO DE CELULOSA.

- a) Proporción de las fases
- b) Emulsificante utilizado
- c) Concentración óptima del acetato de celulosa
- d) Elaboración de la fibra

i) sistema de extrusión

ii) sistema de precipitación

4.-OPTIMIZACION DEL ATRAPAMIENTO CELULAR

- a) Concentración celular utilizada

i) como suspensión

ii) como paquete celular

- b) Eleccion del nivel óptimo de permeabilización con fines de inmovilización.

5.-ELECCION Y OPTIMIZACION DEL AGENTE ENTRECruzANTE

a) Adición de un agente protector

i) albúmina

ii) glicerol

b) Elección del curtiente

i) glutaraldehido

ii) carbodínida

c) Optimización en la utilización del curtiente

i) concentración

ii) tiempo de enfrentamiento

1.-METODOS DE INMOVILIZACION EVALUADOS.

- a) Carragenina
- b) Alúmina
- c) Fibras de heneken
- d) Alginatos
- e) Acetato de celulosa

La elección de un sistema de inmovilización para la enzima B-Galactosidasa, ha sido motivo de diversos estudios realizados dentro del grupo de trabajo del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM (CEINGEBI-UNAM). Los intentos realizados para el establecimiento del sistema adecuado se podrían resumir en la tabla (4) en donde se analizan los trabajos realizados dentro del grupo para inmovilizar la enzima semipurificada de Kluyveromyces fragilis Maxilact L-2000(H).

TABLA (4). -DIFERENTES METODOS DE INMOVILIZACION EVALUADOS EN EL CEINGEBI-UNAM PARA ENZIMA MAXILACT L-2000.

SOPORTE	ACT. ESPECIFICA (probada)	REFERENCIA
GEL DE CARRAGENINA	0.54 UONPG	CHIBATA, I., 1979.
FIBRAS DE HENEKEN	0.31 UONPG	-----
GEL DE ALGINATO	0.00 UONPG	-----
FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA	1.54 UONPG	MORISI, F., 1972.

De esta tabla se puede observar que la máxima actividad específica, lo presentan las fibras de acetato de celulosa. Sin embargo las actividades específicas que se presentan son muy bajas, pese a que se está utilizando enzima libre para su inmovilización.

Las bajas actividades que se presentan en dicha tabla, pueden ser consecuencia de las condiciones de inmovilización que están afectando la estabilidad de la enzima. Así tenemos por ejemplo que las temperaturas de 40°C o superiores, necesarias en la inmovilización por atrapamiento en geles de carragenina desnaturalizan a la enzima (Whitaker, 1977). Por otro lado las reacciones que se llevan a cabo entre los diferentes grupos utilizados en la inmovilización por enlace covalente (Fibras de heneken) afectan a los sitios activos de la enzima de tal manera que se pierde la mayor parte de actividad enzimática. Así factores como pH o cationes divalentes que puedan participar en dichas reacciones de enlace covalente, estarán afectando la expresión de actividad de la enzima.

El caso de los alginatos es un caso especial, ya que pese a que se trata de una inmovilización por atrapamiento, en este caso no se utiliza temperatura para inducir la inmovilización, sino que se utilizan iones Calcio⁺⁺, sin embargo con la adición de estos iones se afecta la actividad enzimática, puesto que producen un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima β -Galactosidasa de K. fragilis (Mahoney, 1979).

En lo que respecta a las fibras de acetato de celulosa profundizaremos en la discusión, dado que en primera instancia es el soporte que nos ofrece mayores ventajas, destacando entre estas:

1.- Presenta, según reportes de la literatura y los resultados logrados en el grupo de trabajo, las más altas actividades enzimáticas (Morisi y Pastore, 1973)

2.-Se trata de un soporte que se elabora con materias primas de fácil adquisición(Giekas,1985)

3.-Se trata de un soporte con grandes posibilidades de manufactura y utilización a nivel piloto o escalas superiores(Giekas,1985)

4.-Se trata de un sistemacon dificultad de atqáques microbianos y que ademá esta aprobado por legislaciones sanitarias para su utilización en la industria alimentaria.

Para nuestros objetivos en particular,pretendemos partir de este sistema como base y modificarlo de tal manera que se puedan utilizar células de levadura con actividad B-Galactosídica,ya que se pretende establecer un sistema de inmovilización tal,que no se afecte tan críticamente la actividad de la enzima.Se espera obtener mejores resultados en la inmovilización de células de levadura al proteger a la enzima de las condiciones agresivas del proceso de inmovilización y/o que se mejore la estabilidad operacional del proceso(Linko,1980).

La inmovilización de células enteras presenta una alternativa interesante,como se discutió en el capítulo de antecedentes,y esto es porque desde el punto de vista económico se ahorran las etapas de purificación de la enzima(Chibata,1979).Podrian existir restricciones sanitarias en el uso de células enteras, sin embargo,las células de levadura están aprobades por las legislaciones sanitarias para su utilización en alimentos. Específicamente hablando del sistema que se pretende manejar, las células de K.fragilis han sido utilizadas dentro de la industria alimentaria para la hidrólisis de lactosa en

leche y suero dulce de leche, ya que su rango de pH óptimo es de 6-7(Mahoney,1977).

De las consideraciones anteriores se decidió trabajar el sistema de fibras de acetato de celulosa-celulas de levadura,por un método de atrapamiento-entrecruzamiento ,para garantizar la inmovilización de las células,ya que no se trabajo con triacetato de celulosa como lo reportan en la literatura (Morisi 1972.,Linko,1980), sino que se trabajo con acetato de celulosa, polímero menos ramificado,y que resulta en un tamaño de poro mayor en la fibra que el triacetato de celulosa. La utilización de fibras de triacetato de celulosa como soporte en la inmovilización de enzimas,ha sido ampliamente descrito por Morisi y Pastore (1972),siendo en la actualidad el único método por el cual se ha inmovilizado enzima purificada de levadura y utilizado a nivel piloto o semindustrial en la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce de leche(10000 litros/día). Sin embargo el problema de este catalizador y de todos aquellos catalizadores que utilizan enzima purificada es la baja actividad enzimática así como su baja estabilidad operacional(Linko 1980.,Morisi y Pastore;1972).

A continuación se presentan en detalle los resultados obtenidos para fibras de acetato de celulosa obtenidos para la inmovilización de Maxilact L-2000(Mx).

Inmovilización de enzima .- Se prepararon fibras de acetato de celulosa mediante la formulación base que se presenta en el capítulo de metodologías,obteniendose los siguientes resultados:

1174 uONPG
Actividad específica del Mx -----
ml de Mx

Actividad ofrecida de enzima
Mx para la inmovilización =104.49uONPG

Actividad específica de las 5.16 uONPG
fibras(uONPG/g de fibra) =-----
g de fibra

gramos de fibra obtenidos =0.4482 g

Con el fin de detectar si la enzima se inmovilizaba dentro del soporte, en la determinación de actividad enzimática de las fibras se dividieron las muestras deteniendo la reacción como se muestra en el capítulo de metodologías, para la determinación en fibras de acetato de celulosa. En cada uno de los tubos leídos se encontro salida de actividad enzimática hacia la mezcla de reacción. Posterior a la determinación se lavaron las fibras en solución amortiguadora de fosfatos con pH=6.6, y se volvió a realizar la determinación, no detectandose actividad por lo que se realizó la prueba en el buffer de lavado encontrandose reacción colorida.

Se realizó también una prueba de inmovilización de células permeabilizadas de levadura de la siguiente manera: Se prepararon fibras de acetato de celulosa de acuerdo a la formulación base, solo que se adicionó en lugar de enzima Mx un volumen igual de suspensión celular de K.fragilis permeabilizadas al 20% con tolueno.

Los resultados obtenidos para la determinación de actividad enzimática de las fibras con células inmovilizadas son los siguientes:

Actividad enzimática de las células =-----
588 uONPG
g de cels.

Actividad enzimática ofrecida para la inmovilización	=117.6 uONPG
Actividad específica de la fibra	6.4 uONPG ----- g de fibra
gramos de fibra obtenidos	=0.1561 g de f.

También se detectó salida de la actividad hacia el sobrenadante y se observó una pérdida de actividad enzimática de las fibras posterior al lavado después de la determinación, pues se tienen 1.33 uONPG/g de fibra además de reacción colorida en las aguas de lavado.

Como se observa este método de inmovilización es el que nos ofrece una mayor actividad comparado con los demás métodos probados, sin embargo presenta la gran desventaja de que no retiene totalmente a la enzima como se reporta en la literatura (Morisi, 1972), aun cuando se inmovilizan células. Como se dijo antes puede ser debido a que no se está trabajando con el triacetato de celulosa si no que con el acetato monosustituido, dando como resultado un tamaño de poro en la fibra mayor. El valor de actividad enzimática que se obtiene para células inmovilizadas también es bajo, pero cabe mencionar que el sistema de inmovilización está diseñado para enzima purificada, así que para una real comparación de las células inmovilizadas se tendría que optimizar el sistema.

Contando ya con un sistema base de inmovilización, que con las ventajas que ofrece la inmovilización de células, podría ser mejorado, ya que como se ve en los resultados en el sistema de células inmovilizadas, la inmovilización parece ser más eficiente, al retardarse más la salida de la actividad enzimática hacia la mezcla

de reacción después de los lavados de las fibras. En las siguientes etapas del trabajo se modificó el sistema base de enzima inmovilizada y se optimizó para células de levadura K. fragilis.

2.-ELECCION DE LA CEPA A UTILIZAR

Para la elección de la cepa a utilizar para la inmovilización, se tomaron en cuenta varios factores para su evaluación, de tal manera que de las cepas disponibles se escogiera aquella con las mejores propiedades para la inmovilización. Dentro de las características deseadas para nuestra cepa se están las siguientes:

- alta actividad B-Galactosídica
- fácil de propagación
- rango de pH de trabajo de 6-7 (óptimo para leche y suero dulce de leche)
- estable genéticamente y fisiológicamente
- aprobada por las normas sanitarias vigentes para su utilización en alimentos

De acuerdo a las consideraciones anteriores se decidió trabajar con levaduras ya que reúnen las siguientes características:

-Una de las mas importantes es que estan aprobadas por las legislaciones sanitarias para su utilización en alimentos, así de esta manera se descartan cepas bacterianas con actividad de B-Galactosidasa tales como las de E.coli.

-El rango de pH en el que se encuentran sus valores óptimos de actividad B-Galactosídica van desde 6.3 hasta 7.5 (Mahoney, 1977), por lo que cepas de hongos se descartaron puesto que su rango de pH de trabajo esta al rededor de 4.5

-Ademas existen cepas y variedades de levaduras que nos ofrecen altas actividades enzimáticas, son de fácil propagación y genéticamente y fisiologicamente estables (Whitaker, 1977., Morisi, 1972).

Dentro del grupo de trabajo se conto con las siguientes cepas de levadura:

CEPA	PROCEDENCIA
<u>Kluyveromyces lactis</u>	Centro de Fisiología Celular UNAM
<u>Kluyveromyces fragilis</u> L-278	CINVESTAV-IPN
<u>Kluyveromyces fragilis</u> C-351	U. de California, Davis
<u>K. fragilis</u> NRRL-Y1109	U. de California, Davis

Estas cepas se propagaron de acuerdo a lo descrito en el capítulo de metodologías en matraces fernbach, para su posterior cosecha por centrifugación. El paquete celular obtenido es sometido a un tratamiento de permeabilización bajo dos niveles de concentración de tolueno:

Nivel bajo=1.5 ml de tolueno por cada dos gramos de cel.

nivel alto=3.0 ml de tolueno por cada dos gramos de cel.

El volumen de permeabilización se lleva a 15 ml con solución amortiguadora de fosfatos en un tubo con agitación continua. Terminado el tiempo de permeabilización se determina actividad enzimática a cada una de las cepas permeabilizadas. Los resultados se muestran en la tabla(5).

Como se puede ver en la tabla(5), es claro que la cepa de K.fragilis NRRL-Y1109 muestra un nivel de actividad muy superior al de las demás cepas de colección. También se observa que el tratamiento con tolueno no afecta considerablemente la actividad enzimática, claro esta, es necesaria una optimización del tratamiento de permeabilización para las necesidades del trabajo, de tal manera que no se extraiga la enzima, y que se mantenga una considerable actividad enzimática dentro de las células. El tener actividades enzimáticas altas permitiera en el futuro utilizar la menor cantidad de fuente enzimática(células) en el proceso de inmovilización, dándonos la posibilidad de tener un catalizador con alta actividad específica(uONPG/g cat) y de esta manera poder hidrolizar mayor cantidad de sustrato en menos tiempo. De esta manera se decidió trabajar con la cepa que presenta las mejores características: Kluyveromyces fragilis NRRL-Y1109.

Tabla(5).- COMPARACION DE LAS DIFERENTES CEPAS DE LEVADURA ENSAYADAS PARA ACTIVIDAD B-GALACTOSIDICA A DOS DIFERENTES NIVELES DE PERMEABILIZACION.

	K.f. L-278	K.f.C-351	K.f.NRRL-Y1109	K.1 CFC-UNAH
Nivel bajo	3.8	0.36	30.6	0.16
Nivel alto	18.25	88.4	436.0	0.26

Actividad enzimática en unidades de ONPG/g de células

3.-DESARROLLO DE UN SISTEMA ESPECIFICO DE INMOVILIZACION PARA CELULAS DE LEVADURA K. fragilis UTILIZANDO COMO SOPORTE ACETATO DE CELULOSA.

La elaboración del soporte para la inmovilización de células de levadura con actividad B-Galactosídica en fibras de acetato de celulosa,utilizando como sistema base el propuesto por Dinelli y Pastore(1972),y modificado para la inmovilización de células consta de 2 etapas principales:

1.-Emulsión

2.-Extrusión

Considerando estas dos etapas como críticas para la elaboración y propiedades de las fibras, se modificó y optimizó el sistema para la inmovilización de células de levadura de la siguiente manera:

a)Proporción de las fases.-Determinación de la proporción óptima de las fases que constituyen el sistema

b)Emulsificante utilizado.-Utilización y optimización del agente emulsificante

c)Concentración óptima del acetato de celulosa.-Variación de la concentración.

d)Elaboración de la fibra.- i-diseño del sistema de extrusión
ii-diseño del sistema de precipitación

a) Proporción de las fases. - Determinación de proporción óptima de las fases que constituyen el sistema.

De acuerdo a la formulación base se fijó una concentración de acetato de celulosa de 300mg de acetato/5 ml de acetona (60mg/ml) y se adicionó una mezcla de emulsificantes con un HLB=6. y se utilizó una concentración celular en suspensión de 0.1 g/l. La composición de las fases que constituyeron el sistema fué:

FASE ORGANICA

- solución de acetato de celulosa en acetona

- emulsificante

FASE ACUOSA

- suspensión celular

- soln. amortiguadora pH=6.6

Se homogenizaron las fases, se elaboró la emulsión y se extrudieron en baño de tolueno (metodología elaboración de la fibra). Las variaciones se realizaron en función de los volúmenes utilizados de cada una de las fases. Los parámetros evaluados en las diferentes emulsiones y en las diferentes fibras obtenidas fueron los siguientes:

Emulsión: - observación visual

- observación al microscopio

Fibras: - comportamiento en la extrusión

- características físicas de las fibras

* elasticidad y resistencia a la deformación

** peso de fibras (rendimiento)

La evaluación se realizó de la siguiente manera: Para la emulsión se consideró la separación de las fases después de realizada la emulsión, determinando el tiempo en el que las fases se separan. La medición se llevó a cabo en el tubo en donde se llevó a cabo la emulsión y con reposo del tubo a temperatura constante. El tiempo que se consideró aceptable para la estabilidad de la emulsión fue de 10 minutos, tiempo durante el cual se manipula la emulsión en reposo previa a la extrusión. En lo que a la observación al microscopio se refiere, transcurrido el tiempo de observación visual de la emulsión se procedió a una observación de las diferentes emulsiones preparadas, colocando una gota de la emulsión a observar en un portaobjetos con el objetivo de 60x, en el microscopio de campo luminoso Zeiss. En emulsiones estables después del reposo de 10 min. se veía una distribución homogénea de los glóbulos de las dos fases, y en las emulsiones en las que aparecían separación de fases se observó un crecimiento paulatino de los glóbulos de la fase acuosa. Además se comprobó que se trataba de una emulsión agua en aceite.

También se observó el comportamiento de la emulsión durante la extrusión, al tiempo que se extruyó la emulsión se observó la manufactura de la fibra evaluando lo siguiente:

- Fibra homogénea: se evaluó el diámetro homogéneo de la fibra después de la extrusión
- Fibra no homogénea: diámetro variable de la fibra después de la extrusión
- Continuidad de la fibra: se observó la continuidad de la fibra en la salida del extrusor
- Discontinuidad de la fibra: se observan rupturas de

la fibra y aglomerados de acetato de celulosa en la salida del extrusor

-Dispersión: dispersión de la emulsión en el extrusor sin la formación de la fibra

Fibra-características físicas: las características físicas que se evaluaron en las fibras fueron las siguientes:

-Elasticidad y resistencia a la compresión: después de eliminar los disolventes de la precipitación de la fibra, se doblaron las fibras en diferentes formas para evaluar cualitativamente la flexibilidad sin que las fibras se fracturasen

-Peso de la fibra en función del acetato de celulosa presente en la emulsión: se calculó el rendimiento de la fibra en relación al acetato de celulosa que se adicionó en la emulsión de la siguiente manera:

$$\frac{\text{gramos de fibra formados}}{\text{g de acetato de celulosa}} = \text{rendimiento}$$

por ejemplo:

se obtuvieron .5783 g de fibra al extrudir el total de la emulsión que contenía 0.30 g de acetato de celulosa, entonces:

0.5783 g

$$\text{rendimiento} = \frac{0.5783 \text{ g}}{0.300 \text{ g}} = 1.89$$

Cabe mencionar que este rendimiento no se relaciona a un %, ya que el peso de fibra no se debe exclusivamente al peso del acetato de celulosa, sino que también al peso de los demás componentes, lo que se evaluó fue la capacidad de formación de fibra relacionado a la cantidad de acetato de celulosa presente en la emulsión.

Los resultados de las evaluaciones se resumen en las tablas (6) y

(7).

TABLA(6).-PROPORCIONES ENSAYADAS PARA LA FORMULACION DE LAS FIBRAS .LOS COMPONENTES DE CADA UNA DE LAS FASES SON LOS PROPUESTOS EN "Metodologías".

F O R M U L A C I O N (Los valores estan en %)				
COMPONENTES FASE ORGANICA	I	II	III	IV
Soln. de acetato de celulosa	64.1	78.1	70.4	68.5
Emulsificantes	5.1	3.1	4.2	5.5
Fase orgánica(total)	69.2	81.2	74.6	74.0
COMPONENTES FASE ACUOSA				
guspensión de células	25.7	15.7	21.2	20.5
Soln.amortiguadora pH=6.6	5.1	3.1	4.2	5.5
Fase acuosa(total)	30.8	18.8	25.4	26.0

TABLA(7).-EVALUACION DE LAS FORMULACIONES ENSAYADAS PARA LA VARIACION DE LA PROPORCION DE LAS FASES EN LA ELABORACION DE FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA.

FORMULACION	E M U L S I O N		F I B R A S		
	obs.visual	obs.microscop.	elast. y resist.	rend.	gdef.
I	separación de fases 2 min.	Glóbulos grandes de fase acuosa	no se forman las fibras	0	0
II	sep de fases 6 min.	glóbulos grandes de fase acuosa	formación de fibras quebradizas y no homogeneas	0	0
III	sin sep.de fases en 15 min.	Emulsión homogénea	fibras elásticas, homogeneas y cont.	1.89	0.57
IV	sin sep.de fases en 15 min.	emulsión homogénea	fibras elasticas, homog.y continuas	1.95	0.58

Como se observa en las tablas(6)y(7), las formulaciones que nos ofrecen los mejores resultados con respecto a las propiedades de las fibras y su rendimiento, fueron las formulaciones III y IV. Esto es porque se obtienen fibras elásticas, con resistencia a la deformación, los mejores rendimientos en gramos de fibra formada y se tienen emulsiones estables para los tiempos de manejo.

Cabe hacer notar que los métodos de evaluación de la estabilidad de las emulsiones esta hecha en función de los intereses específicos de nuestras metodologías, ya que el tiempo mínimo que nosotros fijamos, que fueron 10 min, es un tiempo adecuado para poder manejar el sistema de las emulsiones en la formación de las fibras. De aquí que cabe la consideración de que el objetivo final de esta evaluación no es la obtención de una emulsión a través de un largo período de tiempo, sino que la emulsión forma parte del proceso, por lo que solo nos interesa su estabilidad dentro de esta etapa y a la escala de laboratorio que se esta trabajando. Sin embargo es pertinente mencionar que a otro nivel superior de elaboración, seria conveniente el establecimiento de otro tipo de metodología para la evaluación de estas emulsiones, sobre todo por el hecho de que el tiempo del proceso de elaboración en cada una de sus etapas aumentaría en forma proporcional al tamaño del lote de fibras que se elabore. En la literatura se menciona a la velocidad de coalescencia como uno de los mejores métodos para la evaluación de la estabilidad de las emulsiones, sin embargo esto involucra el uso de aparatos muy costosos, por lo que se mencionan métodos alternos, aunque de menor precisión en las determinaciones, como son el de la fase de inversión de la temperatura o PIT(Krog, N., 1976).

La estabilidad de una emulsión depende de diversos factores tales como (Krog and Laurdsen, 1976):

- la viscosidad de la fase continua
- cargas eléctricas en el sistema
- adsorción de partículas solidas en la superficie de la fase emulsificadas como son coloides, lipoproteínas etc.
- proporción específica de las fases a emulsificar
- formación de películas multimoleculares en la interfase de la fase dispersa y la fase continua, la cual se debe a la adición de agentes emulsificantes

Por esta razón podría afirmarse entonces que en nuestro sistema los factores que más contribuyen a la inestabilidad de nuestra emulsión son la viscosidad del sistema, la proporción de las fases y la adición de agentes emulsificantes adecuados, de aquí la importancia de la variación y optimización de estos factores. En esta etapa del trabajo al variar y escoger una proporción específica de fases a manejar, pudimos observar como ligeras modificaciones en la proporción de estas fases son determinantes en la estabilidad de las emulsiones. Los resultados obtenidos se consideran satisfactorios ya que nos sirven de punto de partida de posteriores cambios en el desarrollo del sistema de inmovilización. Así el siguiente objetivo será entonces la elección del agente emulsificante, para mejorar los efectos que presenta la presencia de partículas en la interfase de nuestra emulsión. Posteriormente se modificara la viscosidad de la fase continua, al variar la concentración de acetatos en la fase orgánica.

La proporción final de las fases elegida para la elaboración de la fibra fué la que se muestra en la tabla(8).

TABLA(8).-PROPORCION Y COMPONENTES DE LAS FASES DE LA EMULSION, PARA LA ELABORACION DE LAS FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA.

COMPONENTE	VOL.EN CADA FASE	FUNCION	CONCENTRACION
Acetato de celulosa	5.0 ml	sopote de la fibra	50 mg/ml
Suspensión celular	1.5 ml	act.enzimática	0.1g/ml
Soin. amortiguadora	0.4 ml	aforo y dilución de la fase acuosa	0.1N pH=6.6
Emulsificantes	0.4 ml	estabilidad de la emulsión	HLB=6

b) Elección del emulsificante a utilizar de acuerdo al HLB y a la proporción adecuada.-HLB óptimo.

En el experimento anterior se fijó una proporción específica de las fases a utilizar, en función de la obtención de una emulsión estable y por consiguiente, fibras de calidad aceptable, por lo que en esta etapa se seleccionan los emulsificantes a utilizar, y su proporción en la mezcla .

Se siguió la siguiente metodología para optimizar la utilización de emulsificantes:

bi) utilización de diferentes emulsificantes en las emulsiones a preparar

bii) evaluación de las emulsiones efectuadas y de las fibras obtenidas

bi) Utilización de diferentes emulsificantes en las emulsiones a preparar.

De acuerdo a las metodologías reportadas en la literatura, se realizó el cálculo de las proporciones necesarias de emulsificante para los siguientes valores de HLB:6,7,8,9,10 y 11, estos valores se probaron para la determinación de HLB óptimo en nuestra emulsión(Krog, 1976). Se fijó la concentración de acetato de celulosa en 60mg/ml.con 74% de fase orgánica y 26% de fase acuosa,se adicionó suspensión celular con una concentración de 0.1g/ml. La elaboración de la fibra se realizó en forma convencional. Los emulsificantes se prepararon a partir de la mezcla de span80 y de tween 20.

bii)Evaluación de las emulsiones efectuadas y de las fibras obtenidas.

La evaluación se llevo a cabo de acuerdo a los parámetros establecidos en la sección de optimización de las fases de la emulsión,para cada valor de HLB.

Los resultados obtenidos para la optimización en la utilización del agente emulsificante se resumen en las tablas(9) y (10).

TABLA (9).EVALUACION DE LOS AGENTES EMULSIFICANTES PROBADOS A DIFERENTES VALORES DE HLB, PREPARADOS APARTIR DE SPAN 80 Y TWEEN 20, EN LA EMULSION.

H L B	OBS.VISUAL	OBS.MICROSCOPIOM
6	Separación de fases 17 min.	Glóbulos de agua grandes y aislados
7	Separación de fases 18 min.	Glóbulos de agua grandes pero aislados
8	Separación de fases 22 min.	Glóbulos de agua pequeños y aislados
9	Separación de fases 29 min.	Glóbulos homogéneos de las dos fases
10	Separación de fases 23 min.	Glóbulos de agua pequeños y aislados
11	Separación de fases 18 min.	Glóbulos de agua grandes pero aislados
12	Separación de fases 15 min	Glóbulos de agua grandes y dispersos

*observación a los 15 min. de formada la emulsión.

TABLA (10) EVALUACION DE LOS AGENTES EMULSIFICANTES PROBADOS A DIFERENTES VALORES DE HLB, PREPARADOS A PARTIR DE SPAN 80 Y TWEEN 20, EN LAS FIBRAS.

H L B	APARIENCIA*	RENDIMIENTO	g DE FIBRA
6	fibras quebradizas homogéneas	1.86	0.5691
7	fibras quebradizas homogéneas	1.91	0.5844
8	zonas quebradizas y zonas homogéneas	1.96	0.5997
9	fibras elasticas y homogéneas	2.01	0.6089
10	zonas homogéneas casi totalmente	1.97	0.6028
11	fibras quebradizas homogéneas	1.93	0.5902
12	fibras#quebradizas no homogéneas	1.91	0.5863

*observación despues de haber evaporado el tolueno.

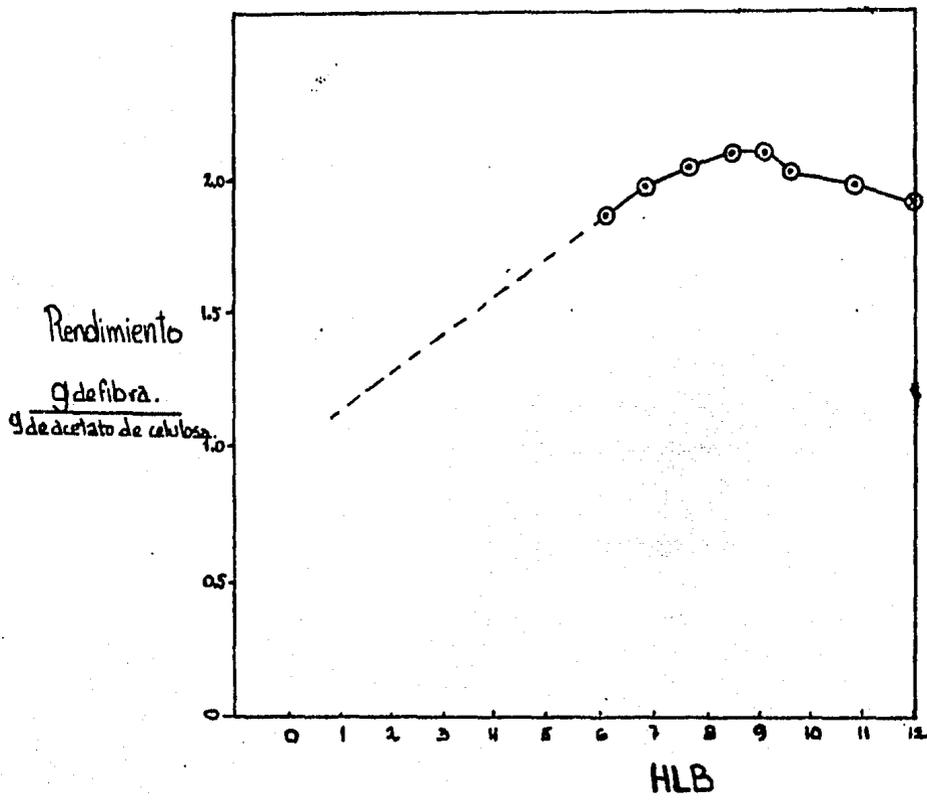


FIGURA (8).-La figura muestra el rendimiento de fibras, en función de la variación del valor de HLB utilizado en la emulsión. La mezcla de emulsificantes utilizada fué de TWEEN 20 y SPAN 80.

En las tablas (9) y (10) se observa un mejor rendimiento de fibras así como una mayor estabilidad de la emulsión en valores medios dentro de la escala de HLB (ICI Co. División plásticos, catálogo 1983). La utilización de esta escala de valores es ampliamente utilizada en las industrias que manejan emulsiones y fue establecida por la compañía ICI International Co. Según ICI Co., establecieron que valores de HLB bajos corresponden a emulsiones con componentes preponderantemente lipofílicos y valores de HLB altos corresponden a emulsiones con componentes preponderantemente hidrofílicos. En este caso particular, el hecho de que se maneje una emulsión agua en aceite cuyos componentes sean acetona y suspensión de células en solución amortiguadora nos indica que no se estén utilizando componentes con alguna tendencia a un comportamiento hidrofílico o lipofílico. La utilización de agua como vehículo en la suspensión celular provoca probablemente la ligera tendencia hacia el lado hidrofílico, ya que un valor medio estricto sería de 8. El HLB de 9 que se encontró como óptimo se evaluó en función de los parámetros presentados en las tablas (9) y (10), en donde se observan las mejores propiedades de la emulsión y de la fibra así como el mejor rendimiento de la fibra (de 1.99g fibra/g de acetato). Las propiedades que se observan en este valor son:

- mayor tiempo de separación de fases en la emulsión
- mejor estabilidad de emulsión
- mejor aspecto general de las fibras

De acuerdo a estas consideraciones se eligió el valor de 9 como el valor óptimo de HLB para trabajar dentro de nuestro sistema.

c.- Concentración óptima del acetato de celulosa.

Bajo la formulación estandar descrita anteriormente se varió la concentración de acetato de celulosa desde 50mg/ml hasta 180 mg /ml con intervalos de variación de cada 10 mg, y así determinar la concentración óptima para la cual se tienen las mejores características de las fibras ,y que son alta capacidad de inmovilización y alta expresión de actividad enzimática.

Los parámetros a evaluar en este caso fueron el incremento de salida,expresión de actividad enzimática y características macroscópicas de las fibras.

Se obtuvieron diferentes lotes de fibras ,según la concentración de acetato de celulosa utilizado ,resumiendose dichos resultados en la tabla(II)

En dicha tabla se observa que a concentraciones bajas de acetato de celulosa existen altos incrementos de salida de actividad enzimática,aunque con una expresión de actividad alta relativa(ya que se esta evaluando la suma de actividades dentro y fuera de la fibra).A medida que la concentración de acetato se incrementa, se observa una disminución de los parámetros mencionados anteriormente y una mejor apariencia de las fibras.Sin embargo a concentraciones por arriba de los 120mg/ml, se observan dificultades en la extrusión y empieza a disminuir considerablemente la actividad enzimática.A concentraciones superiores a los 180mg/ml la elaboración de las fibras se hace imposible en las condiciones de la metodología utilizada,ya que ademas de tenerse una solución demasiado viscosa y no poder manipularse con facilidad,las agujas de extrusión se bloquean

TABLA(II).- EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE ACETATO DE CELULOSA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FIBRA,ASI COMO DE SU INCREMENTO EN LA SALIDA DE ACTIVIDAD

conc.de acetato mg/ml	salida de act.enz.*	act. enzimática	observ.
50	0.220	8.97	----
60	0.200	6.81	----
70	0.181	4.59	----
80	0.084	4.30	----
90	0.077	4.26	----
100	0.073	3.95	----
120	0.070	3.61	fibras gruesas
140	0.069	3.36	fibras quebradizas
160	0.067	3.02	fibras quebradizas
180	----	----	----

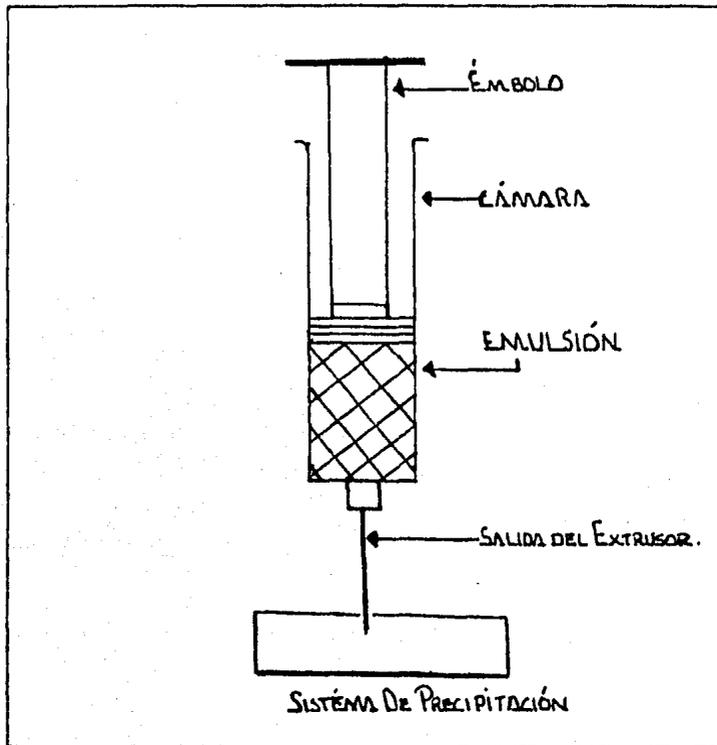
*incremento en la lectura de densidad óptica

Al evaluar este parámetro se detectó salida de actividad enzimática, de tal manera que al evaluar las características óptimas de nuestro sistema, nos encontramos con que la concentración de acetatos de celulosa en nuestras fibras juega un papel muy importante, ya que a mayor concentración de este se tiene una mayor densidad de partículas en la fibra lo que hace disminuir el tamaño de los poros y por lo consiguiente una menor salida de actividad enzimática de la fibra. Sin embargo esto retribuye en una disminución de la expresión de la actividad enzimática ya que se aumentarían los problemas difusionales de nuestro sistema. Aún más, se llega a concentraciones de acetato de celulosa tan altas, que no se puedan manejar las emulsiones, como se observa en los resultados para 180mg de acetato/ml de acetona (Marconi y Morisi, 1979; Bucholz, 1983). Para las concentraciones probadas se escogió la concentración de 450mg de acetato/ml de acetona ya que a esta concentración se tienen las siguientes características:

- fácil manejo de la emulsión
- bajo incremento en la salida del soporte
- posibilidad de aumento de actividad enzimática si se aumenta la concentración de células.
- posibilidad de mejorar la eficiencia de la inmovilización al adicionar un agente entrecruzante.

De esta manera en los experimentos posteriores se emplea esta concentración de acetato de celulosa.

d).-Elaboración de la fibra



FIGURA(9).-Sistema de extrusión utilizado para la elaboración de las fibras de acetato de celulosa.

di) sistema de extrusión

dii) sistema de precipitación

di) Sistema de extrusión.-Se probaron diferentes diámetros de extrusión tales como: Jeringa con aguja de 21x32mm(1) y Jeringa con aguja de 25x16(2), siendo el sistema una Jeringa clínica como se muestra en la figura (9)

Una vez preparada la emulsión en el tubo de ensaye mezclando la emulsión en un vortex, se separa el émbolo de la Jeringa y se deposita la emulsión en la cámara, cuidando de obstruir la salida para evitar pérdidas de emulsión. Posteriormente se introduce el émbolo y se elimina el aire atrapado invirtiendo la Jeringa y presionando el émbolo hasta la total expulsión. Realizada esta operación se introduce la punta del extrusor en el baño de precipitación y se presiona el émbolo para hacer pasar la emulsión a través del extrusor y que la fibra se extruya dentro del baño de precipitación .

Los resultados que se obtuvieron se evaluaron en función de la actividad enzimática expresada y de la actividad que se detecta fuera del soporte, y son los que se muestran en la tabla (12).

En dicha tabla se observa una clara diferencia entre los resultados que se obtienen con las dos agujas ya que para la aguja (2) se obtienen actividades enzimáticas mayores, además de una menor salida de actividad enzimática hacia la mezcla de reacción. La formulación de la fibra es la que se concluyó en la parte de optimización del agente emulsificante.

TABLA (2) INFLUENCIA DEL DIAMETRO DEL EXTRUSOR EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EXPRESADA, ASI COMO LA RETENCION DE ACTIVIDAD DENTRO DEL SOPORTE.

AGUJA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	SALIDA DE ACT.ENZ.*
(1)21X32mm	1.97 uONPG/g de f	0.351
(2)25x16mm	2.16 uONPG/g de f	0.176

*Incremento de la lectura de densidad óptica. Para cada muestra se toma la D.O. de la muestra no inactivada por calor y se le resta la D.O. de la muestra inactivada por calor y se saca un promedio de estos valores aumentando así la salida de actividad enzimática a medida que aumentan estos valores.

De lo anterior se puede observar que el diámetro de la fibra es de gran importancia en la expresión de la actividad de la enzima, pero además se observa que juega un papel determinante en la retención de actividad enzimática dentro de la fibra. En la tabla (12) se advierte que existe una mejor retención de actividad enzimática dentro de la fibra elaborada con la aguja (2).

El tamaño del biocatalizador o diámetro de partícula, es de gran importancia en un sistema de enzimas inmovilizadas, pues influye en parámetros tales como la efectividad, la caída de presión dentro de un reactor enzimático, la suspensión de partículas etc. (Klaus Bucholz, 1982). El diámetro de la fibra se definió solo por el diámetro del extrusor y no por técnicas directas como son la observación al microscopio o el tamizado (Bucholz, 1982). En general el diámetro de partícula se relaciona con el diámetro equivalente para una partícula de forma esférica, en nuestro caso se observó la influencia que tiene este diámetro en la capacidad de inmovilización de nuestro sistema, así como de su expresión de actividad enzimática. En estos resultados se observa que un diámetro de fibra menor ofrece una mejor inmovilización de las células y además una mayor expresión de actividad enzimática. Se asume que la utilización de un extrusor de diámetro mayor, provoca un mayor volumen interno y además una mayor porosidad de la misma, al provocar una mayor libertad de la emulsión en la salida del extrusor al baño de precipitación. En el caso de la aguja de diámetro menor, se provoca una mayor compresión de la emulsión a la salida en el baño de precipitación y por lo consiguiente una inmediata precipitación del acetato, elaborándose una fibra homogénea y con una menor porosidad (Marconi y Morisi, 1979). En lo que se refiere a expresión de la actividad de la enzima se tienen

dos tipos de fibra para una misma emulsión con la misma concentración celular, sin embargo diferente actividad enzimática, lo que hace suponer que las fibras de menor diámetro tienen una mayor superficie de contacto células-sustrato de tal manera que su actividad enzimática es mayor. El caso contrario sucede con las fibras de mayor diámetro, en donde el contacto del sustrato con las células que están totalmente dentro de la fibra se hace más difícil (Linko, 1980)

dii) Sistema de precipitación.- Dentro del proceso de inmovilización de células en fibras de acetato de celulosa, la etapa de precipitación es una parte muy importante, ya que la velocidad de precipitación de la fibra contribuirá en gran parte a la porosidad de las fibras, así como el número y diámetro de las microcavidades (Marconi, 1979)

La metodología seguida para evaluar los diferentes sistemas de precipitación, es la metodología estándar con las modificaciones realizadas a través de el proceso de optimización que se ha seguido. En esta etapa la variación que se realizará es la variación del sistema de precipitación en el que el fluido donde se extruyen las fibras puede ser tolueno o agua, de tal manera que estos serán nuestros sistemas de precipitación, según lo reportado por Celanese de México.

Los resultados se resumen en la tabla (13), y permiten concluir que existe una mayor actividad enzimática para las fibras precipitadas en tolueno. Adicionalmente se advierte una clara diferencia en la actividad enzimática retenida dentro del soporte, de aproximadamente 0.7 unidades de D.O. con las fibras precipitadas en el sistema de agua. Por otro lado la apariencia macroscópica de la

fibra cambia, ya que para las fibras precipitadas en agua se obtiene una fibra de consistencia gelatinosa, con poca homogeneidad en la misma y una precipitación muy lenta.

TABLA(73).-VARIACION DEL SISTEMA DE PRECIPITACION DE LAS FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA, UTILIZANDO COMO SISTEMAS DE PRECIPITACION AGUA Y TOLUENO.

SISTEMA DE PRECIPITACION	ACTIVIDAD ENZIMATICA	SALIDA DE ACT. ENZ.*
T O L U E N O	2.23uONPG/g de f	0.161
A G U A	2.47uONPG/g de f	0.833

*incremento en la lectura de densidad óptica.

Debido a la importancia que tiene el control de la porosidad del sistema de inmovilización, así como de las características macroscópicas del soporte en función de su resistencia a diferentes factores, se considera relevante la evaluación de un sistema de precipitación que nos brinde las mejores características (Marconi, 1979).

El sistema más adecuado es el tolueno, ya que no obstante que en los dos sistemas se logra una precipitación, las características finales de las fibras son diferentes, como se observa en la tabla (13). Además el tolueno es fácil de eliminar de la fibra, por la simple exposición de ésta a una corriente de aire a la temperatura ambiente. En el otro sistema, el agua resulta difícil de eliminar ya que el sistema tiende a retenerla. Por otro lado la actividad enzimática reportada para ambos sistemas es relativa, ya que se evalúan tanto las unidades que están dentro del soporte como aquellas que están fuera. Por esta razón se tomó al tolueno como sistema para la extrusión.

4.-OPTIMIZACION DEL ATRAPAMIENTO CELULAR

a).-Adición de células como paquete celular o como suspensión celular

De acuerdo al sistema de inmovilización establecido en los incisos anteriores se procedió a fijar la concentración celular, de tal manera que se tuviera la máxima actividad enzimática sin alterar las propiedades de la emulsión y por lo tanto de las fibras. Se varió la concentración celular en la emulsión en un rango de 0.1 a 0.3 g peso seco. Esta primera adición se llevó a cabo con células en

suspensión, posteriormente las células se adicionaron a partir de un paquete celular de 40% de humedad de tal manera que se tuvieran de 0.3 g hasta 1.2 g de células secas en la emulsión. Se mantienen las condiciones antes establecidas de proporción de las fases y otros componentes , además de las condiciones de elaboración de la fibra. Los parámetros que se evaluaron fueron algunos de los ya presentados en secciones anteriores como son :

- Estabilidad de la emulsión
- propiedades macroscópicas de las fibras
- actividad enzimática

En la tabla (44) se reportan los resultados obtenidos en función de la estabilidad de la emulsión , propiedades de las fibras y actividad de la enzima.

TABLA (14).-OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION CELULAR PARA LA PREPARACION DE FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA, EN FUNCION DE SU ACTIVIDAD ENZIMATICA, ESTABILIDAD DE LA EMULSION Y PROPIEDADES DE LAS FIBRAS OBTENIDAS

CONC. CELULAR	ACTIV.ENZIMATICA	ESTAB.DE LA EMULSION	SALIDA DE ACT.ENZ
0.1	0.82 uONPG/g de f	20 min	0.079
0.15	0.95 "	20 min	0.110
0.20	1.03 "	21 min	0.196
0.30	1.53 "	21 min	0.233
0.40	2.36 "	20 min	0.351
0.50	4.18 "	20 min	0.573
0.60	7.56 "	20 min	0.831
0.70	7.83 "	17 min	0.957
0.90	7.25 "	16 min	0.963
1.00	7.41 "	13 min	1.031
1.15	7.39 "	10 min	1.051
1.20	7.03 "	10 min	1.030

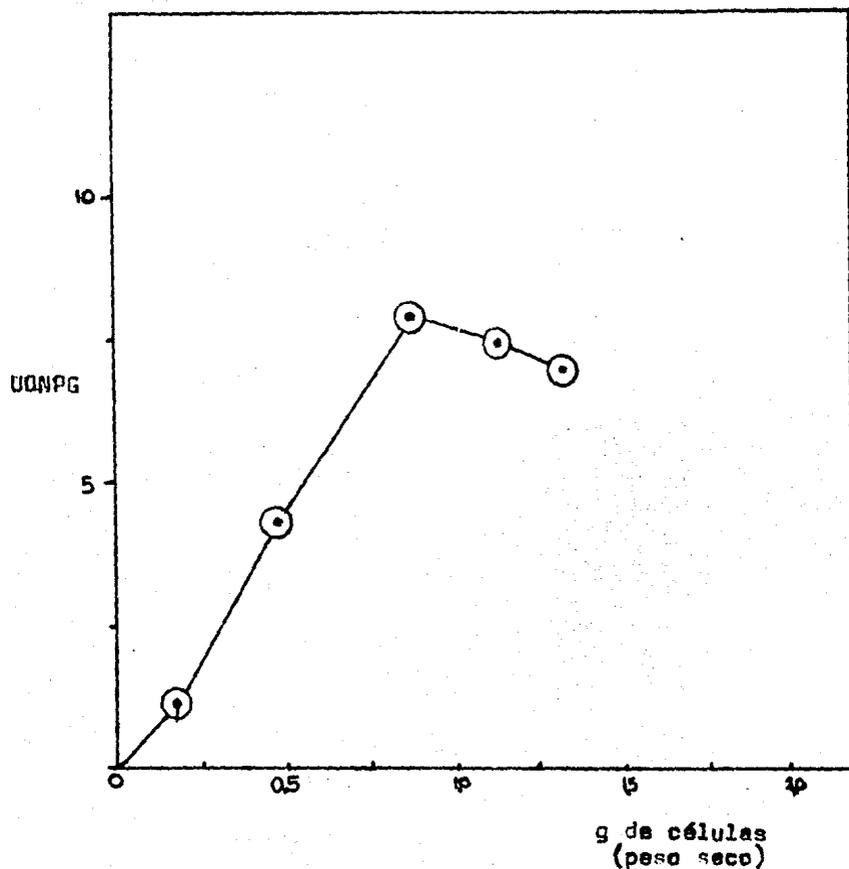


FIGURA (10).-Comportamiento de la actividad enzimática total, expresada por las fibras de acetato de celulosa, al variar la concentración celular presente en la emulsión. Las fibras se preparan bajo la formulación estándar, variando desde 0.1 hasta 1.2 gramos de células.

Se observa que al aumentar la cantidad de células se incrementa la actividad específica de las fibras hasta un límite de 7.8uONPG/g de fibra, este límite corresponde a emplear 0.7 g de células en la emulsión. A partir de esta cantidad de células la actividad enzimática se mantiene constante independiente de posteriores incrementos en la masa celular. La figura(0) nos muestra el comportamiento de los resultados anteriores.

Estos resultados pueden ser debidos a que para cantidades de células mayores de 0.7 g peso seco en la emulsión, se presentan problemas de difusión de sustrato y /o producto dentro de la fibra(Dinelli, 1976). Teniendo en cuenta que a partir de estos valores de concentración celular la estabilidad de la emulsión empieza a disminuir considerablemente se tomo este límite como el óptimo para la inmovilización y así se empleo en los experimentos posteriores, cuyo objetivo se centralizó en la obtención de una alta actividad retenida dentro de las fibras

b).-Elección del nivel de permeabilización celular con fines de inmovilización.

Debido a que el método de inmovilización que se desarrolló, se basa principalmente en el atrapamiento de células de levadura dentro de fibras porosas, y que para expresar la actividad enzimática de las células es necesaria una permeabilización de su pared y principalmente de su membrana, fué necesario establecer el nivel de permeabilización útil, de tal manera que no se llegue a una lisis total de las células, ya que entonces no se trataría de inmovilización de células sino de la enzima. Se emplearon 4 concentraciones de tolueno para la permeabilización y se evaluó la

actividad enzimática en paquete celular permeabilizado y lavado con solución amortiguadora después del tratamiento. Los diferentes niveles de permeabilización fueron de 5, 10, 15, 20% vol. de tolueno/vol. de la suspensión, ya que el nivel optimizado para la determinación de actividad enzimática en células es de 20%. Sin embargo a esta concentración se realiza una lisis casi total de las células, de tal manera que la enzima queda libre y aumenta su salida del soporte.

Los resultados de los tratamientos de permeabilización evaluados y se presentan en la tabla (15). Además se realizó una prueba para evaluar el grado de lisis de las células, consistente en determinar actividad enzimática a los sobrenadantes de células centrifugadas después de un lavado posterior a la permeabilización. De esta forma se determina la máxima actividad enzimática dentro de las células y no en los sobrenadantes. Las actividades reportadas se refieren a suspensión celular, a células lavadas y al sobrenadante de lavado.

TABLA(5).-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TOLUENO EN EL NIVEL DE PERMEABILIZACION DE CELULAS DE LEVADURA CON FINES DE INMOVILIZACION.

NIVEL DE PERMEABILIZACION	ACT.ENZ.SUSPENSION	CELULAS	SOBRENADANTE
5 %	402.5 uONPG/ML	386uONPG	11.26uONPG
10 %	743.3 uONPG/ML	698uONPG	13.51uONPG
15 %	976.9 uONPG/ML	126uONPG	807.40uONPG
20 %	1025.6 uONPG/ML	10uONPG	997.70uONPG

De los experimentos anteriores se pueden observar marcadas diferencias en los tratamientos ,es decir, la actividad enzimática presente fue diferente para cada una de las fases medidas. Así tenemos que el 10% es el nivel en el que se obtiene la máxima actividad enzimática en el paquete celular y no en su sobrenadante, cosa que no sucede con los demás tratamientos donde la proporción mayor de actividad enzimática se encuentra en los sobrenadantes, esto indica que se liza totalmente la estructura de la membrana celular y por lo tanto se libera la enzima. Por esta razón se decidió trabajar con el nivel de permeabilización del 10%

Varios autores reportan el uso de disolventes como una alternativa para vencer la barrera que presentan las levaduras con su membrana a la utilización de enzimas intracelulares, (Barbosa, 1985). Sin embargo existe bastante información que se refiere a la extracción de enzimas por tratamientos enzimáticos de la pared celular, específicamente mediante el uso de proteasas, por lo que sería de interés un estudio más profundo de este tipo de tratamientos. No obstante estas limitaciones se decide trabajar con el nivel de permeabilización del 10%. Sin embargo cabe mencionar que aunque se da un tratamiento de lavado a las células después de permeabilizadas, es difícil eliminar totalmente al tolueno, por lo que la permeabilización en menor grado puede continuar. La recomendación es efectuar la inmovilización lo mas pronto posible después de la permeabilización.

3.-ELECCION DEL AGENTE ENTRECruzANTE Y ELECCION DE SU NIVEL OPTIMO DE UTILIZACION.

Dentro del grupo de trabajo se habían manejado diversos soportes y sistemas de inmovilización, dentro de los cuales la utilización de un agente entrecruzante o curtiante juega un papel importante sobre todos en aquellos sistemas en los que se pretendía un enlace entre la enzima y el soporte, ó simplemente cuando se pretendía un entrecruzamiento dentro del soporte. Este tipo de entrecruzamiento se lograba por medio de la adición de una proteína inerte (enzimáticamente), como son la albúmina, caseína, proteínas de suero, etc. y un agente entrecruzante que reaccionara con esta. Estos agentes pueden ser la Dietilendiamina, glutaraldehído, carbodimidas, ditilenimina, etc. Lo que se pretendía con este método era lograr una asociación proteína-curtiante, de tal manera que evitara la difusión de moléculas grandes de la enzima del soporte hacia el exterior, pero que permitiera la entrada y salida de sustratos y productos. Además de que la reacción de la proteína con el curtiante protege a la enzima de la agresividad de este.

Basandonos en estas experiencias nos avocamos a establecer un método de curtido que nos permitiera una mas eficiente inmovilización de células de levadura con actividad de β -galactosidasa en el soporte de fibras de acetato de celulosa. Los resultados se presentan a continuación, para los curtiantes elegidos, que son glutaraldehído y carbodimida.

Los curtiantes se escogieron en base a su disponibilidad , así como en la experiencia de utilización dentro del grupo de trabajo.

a) Elección del curtiente

a1) adición de un agente protector (albúmina)

A la formulación previamente reportada como óptima se le agregó una proteína como agente protector para la enzima y como ayuda para el entrecruzamiento. Se evaluó el efecto de antes de adicionar los curtientes en términos de las características del soporte desarrollado. La forma de adición fue la siguiente:

Se pesaron 150 mg de albúmina y se disolvieron en 1 ml. de solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1 M con pH=6.6 y de esta solución se agregaron 0.5 ml a la fase acuosa en sustitución del buffer que se utilizó para la suspensión de las células. Se llevó a cabo la emulsión, bajo las condiciones establecidas y se extruyeron las fibras.

Las fibras obtenidas se evaluaron bajo los parámetros establecidos y los resultados se pueden ver en la tabla (16) en donde se presenta el resultado de 3 lotes diferentes para cada concentración y un testigo sin albúmina. En esta tabla se evalúa: estabilidad de la emulsión, actividad enzimática, salida de act. enz., características macroscópicas de la fibra

TABLA (6) .- EFECTO DE LA ALBUMINA EN LAS PROPIEDADES DE LAS FIBRAS.

C. albúmina	Act. total	Act. espec.	salida	est. emulsión	Caract. OBS
150 mg/ml	0.306 u	5.12u/g	1.351	19 min	fibras estables sin problemas de extrusión
250 mg/ml	0.321 u	5.56u/g	.306	9 min	dificultad de extrusión
0 mg/ml	0.310 u	5.29u/g	0.381	21 min	fibras estables, sin problemas de extrusión.

La adición de un agente protector en este caso la albúmina, no resultó perjudicial en el proceso de inmóvilización de células de levadura lo que se puede observar claramente en los resultados de la tabla (16). En este se muestra que se expresa actividad enzimática, lo que hace suponer que no se ve afectada por problemas difusionales al aumento de sólido en el soporte. Se adicionaron 0.75 mg y 125 mg de sólidos para cada caso dando los resultados que se mencionan (Marconi et al. 1974) además la cantidad de sólidos no afecta la expresión de actividad enzimática puesto que se observa semejante en los 3 lotes, aún en aquel que no lleva albúmina.

En lo que se refiere al incremento de salida de actividad enzimática se ve una ligera disminución, a medida que se aumenta la cantidad de sólidos, sin embargo este parámetro se evaluará con más profundidad cuando se hayan probado los diferentes agentes entrecruzantes (Dahlquist et al, 1973).

Se observa clara disminución de la estabilidad de la emulsión proporcional al aumento de sólidos en el soporte, al adicionar 150 mg albúmina la disminución es solamente de 2 minutos siendo la estabilidad de 21 minutos en el testigo sin albúmina, posteriormente disminuye hasta 19 minutos en 75 mg. Sin embargo al usar la solución de 250 mg. de albúmina/ml (125 mg en la emulsión). La disminución es muy crítica puesto que va desde 21 minutos en el testigo y 19 minutos en 750 mg. hasta 9 minutos que es un tiempo bastante crítico para manejar la emulsión, en la posterior extrusión de esta (Marconi et al. 1979).

Finalmente en lo que se refiere a las características macroscópicas de las fibras, es decir facilidad de extrusión,

resistencia de las fibras al lacto, homogeneidad etc, se observa un comportamiento similar, ya que aumenta la dificultad de extrusión de las fibras al aumentar la albúmina. Por esta razón su homogeneidad disminuye ya que se forman glóbulos de acetato de celulosa a la salida del extrusor.

Por la discusión anterior, se concluye un efecto negativo de la adición de albúmina, pese a que se mencionó como "agente protector". Sin embargo su real evaluación como "agente protector" se verá al probar los agentes entrecruzantes.

La concentración de albúmina elegida para trabajar en las siguientes etapas será 150 mg/ml dada la estabilidad de la emulsión, y las características de la fibra obtenida.

Pruebas con glutaraldehído.

Tomando un sistema de inmovilización con células de levadura y un agente protector de albúmina sérica bovina, se procedió a la adición del agente entrecruzante, para reaccionar con la albúmina principalmente bajo la reacción que se ilustra en la figura (//), de tal manera que se forme una red albúmina-glutaraldehído, que impida la salida de células. Es conveniente señalar que una reacción con las células es también probable.

enzimática a medida que se aumenta el tiempo de enfrentamiento para las concentraciones de glutaraldehído utilizadas.

No se observó ningún cambio macroscópico en las fibras después de los lavados, solo se observa una ligera turbidez en la primer agua de lavado, con lecturas de 0.01 a 650 nm, por lo que se presume que la turbidez sea causada por células.

En los siguientes lotes de lavado no se observa turbidez. Cabe mencionar que esta turbidez solo la presentan los lotes de lavado de 5 y 10 minutos de curtido para la concentración de 0.5% de glutaraldehído, por lo que estas observaciones no se incluyen en las tablas de resultados, pero si se mencionan, además de discutirse con más profundidad posteriormente

TABLA (77) TIEMPO DE ENFRENTAMIENTO SOPORTE -CURTIENTE A UNA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO DE 0.5%.

Tiempo de enfrentamiento	Actividad total	act. específica	salida
0 min	0.306	5.12 u/g	.326
5 min	0.196	2.16 u/g	.230
10 min	-----	-----	-----
15 min	-----	-----	-----
30 min	-----	-----	-----
60 min	-----	-----	-----

TABLA (18).- TIEMPO DE ENFRENTAMIENTO SOPORTE-CURTIENTE A UNA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO DE 1.0%.

Tiempo de enfrentamiento	Actividad total	act. específica	salida
0 min	0.306	5.12 u/g	.326
5 min	0.102	1.86 u/g	.199
10 min	-----	-----	----
15 min	-----	-----	----
20 min	-----	-----	----
30 min	-----	-----	----
60 min	-----	-----	----

El enfrentamiento entre el soporte y el glutaraldehido resulta de manera muy agresiva ya que aún a tiempos cortos como son 5 minutos, la pérdida de actividad es muy crítica como se muestra en las figuras (12) y (13), siendo aún más crítica para el caso de la concentración de 1%. Se supone que la reacción de enfrentamiento se lleva a cabo entre el glutaraldehido y el agente protector, sin embargo por la pérdida de actividad, no se descarta la reacción entre la enzima y el curtiante. Una opción sería disminuir la concentración de glutaraldehido, pero en esta parte del trabajo no se está realizando una optimización sino simplemente una elección entre los curtiantes de que se dispone. Se observa además una disminución en el incremento de salida, proporcional a la pérdida de actividad, de tal manera que no se está logrando una inmovilización total y si se está disminuyendo la actividad enzimática.

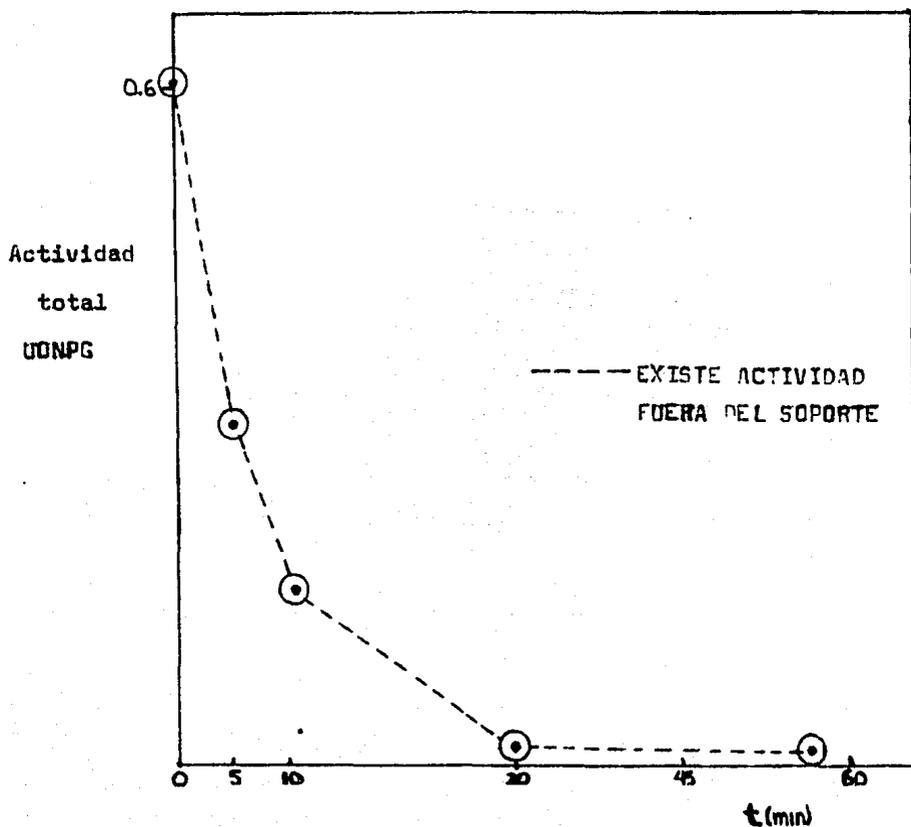


FIGURA (12).-Tiempo de enfrentamiento soporte-curtiente contra actividad enzimática, a una concentración fija de glutaraldehido de 0.5%. Para formulación estándar de catalizador.

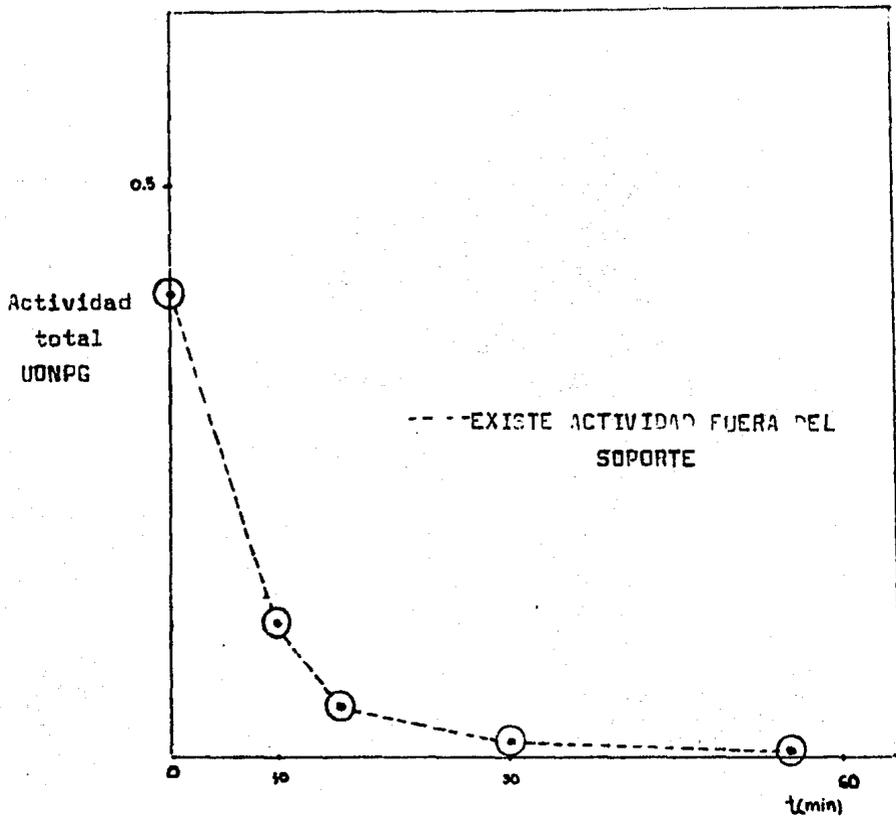


FIGURA (13).-Tiempo de enfrentamiento soporte-curtiente contra actividad enzimática, a una concentración fija de glutaraldehído de 1.0%. Para formulación estándar de catalizador.

La reacción entre el glutaraldehído y la enzima probablemente, en los casos en que se pierde actividad enzimática, se lleva a cabo en los grupos amino del sitio activo (figura 14).

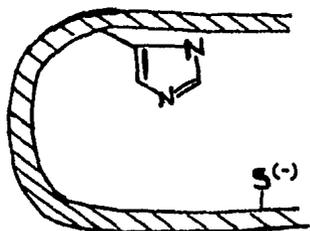


Figura (14) Centro activo propuesto para la B-galactosidasa y para los centros de reacción con glutaraldehído (Nijples, 1981).

De los resultados anteriores se concluye que el glutaraldehído resulta agresivo, sobre todo para grupos amino por lo que cabe la utilización de un curtiente como es la carbodiimida que dentro de su mecanismo de reacción utiliza inicialmente grupos carboxilo, este mecanismo y su utilización se discutirán posteriormente.

Pruebas realizadas con carbodiimida.

De igual forma que para el glutaraldehído, se probaron diferentes concentraciones de curtiente utilizándose en este caso 1-etil 3(3-dimetil aminopropil) carbodiimida.

De pruebas realizadas en el grupo de trabajo para la inmovilización de enzimas se eligió una concentración de 25% p/v de carbodiimida y se realizó el curtido de manera semejante que con glutaraldehído. Se variaron los tiempos de curtido en 5 minutos, 20 minutos, 35 minutos y 60 minutos. Los parámetros que se evaluaron

fueron actividad total, actividad específica e incremento de salida

Los resultados que arrojaron estos experimento se ilustran en la tabla (19) en donde el incremento de salida se continúa evaluando en incremento de D.O. a 410 nm de longitud de onda en los tubos en los que se detiene la reacción y en los que no se detiene por temperatura (Ver metodologías de la determinación de la actividad enzimática en fibras).

TABLA 19 TIEMPO DE ENFRENTAMIENTO SOPORTE-CURTIENTE A UNA CONCENTRACION DE CARBODIIMIDA DE 25% p/v.

Tiempo de enfrentamiento	Actividad total	act. específica	salida
5 min	2.092	4.17	.104
20 min	0.9320	2.37	.001
35 min	0.7726	1.54	.000
60 min	0.7431	1.48	.000

Observamos un resultado muy favorable al utilizar carbodiimida como curtiante ya que no se detecta salida de la enzima del soporte hacia el medio de reacción. En este caso pese a la concentración utilizada de curtiante (25% p/v) no se detecta salida y se obtienen valores de actividad enzimática de 2.37 ul/g de fibra.

El mecanismo de reacción propuesto para la reacción con carbodiimida se ilustra en la figura (7) En dicho mecanismo se observa

claramente la reacción en una etapa de activación, entre los grupos carboxilo de las proteínas y las carbodímidas. Posteriormente vendría el acoplamiento con los grupos aminos. Se esperaría una agresividad semejante a la del glutaraldehído y por lo consiguiente una pérdida de actividad demasiado drástica, sin embargo esto no sucede, por lo que se supone que al reaccionar los grupos carboxilo, se arreglan las proteínas de tal manera que impiden el acceso del grupo activo de las carbodímidas al centro activo de la enzima ya sea que reaccione con la enzima o con su "agente protector" que en este caso sería la albúmina sérica bovina. De esta manera la pérdida de actividad no llega a ser total (Uetali et al, 1975).

Por otro lado se puede observar que los incrementos de salida llegan a un valor de cero lo que nos demuestra que realmente se está inmovilizando la totalidad de las células, pese a que se están utilizando tiempos de enfrentamiento y concentraciones de curtiembre sin optimizar.

En la tabla (M) se observa que a tiempos de 20 minutos en adelante la pérdida de actividad se torna casi constante, lo que hace superior una total reacción del curtiembre.

Cuando se realiza una comparación entre los agentes currientes utilizados, se deben tomar en cuenta los parámetros sobre los cuales se están evaluado dichos currientes.

De la experimentación anterior se opta por la utilización de la carbodímida como agente curtiembre, sobre el glutaraldehído, restando en este caso su optimización en función de su concentración, el

tiempo de enfrentamiento y la manera de utilizarla. Esta descripción se basa en que se logra detener a las células dentro de las fibras aunque la actividad sea baja, situación que no sucede cuando se emplea glutaraldehído, en donde la actividad medida es una combinación de la actividad del catalizador y la actividad de la enzima que ha pasado al sobrenadante.

Optimización de la utilización de un agente entrecruzante en función de su concentración y del tiempo de enfrentamiento.

En esta etapa del proceso se realiza la optimización de la utilización del agente entrecruzante; 1-etil-3(dimetil aminopropil) carbodimida (EDAC) ya reportado en sistemas de inmovilización de células en un soporte de carboximetil celulosa (CMC) (Jack, 1977). Se optimizó tanto el tiempo de enfrentamiento, así como la concentración del curtiende

Optimización de la concentración de EDAC a utilizar.

Previa a la optimización de la concentración de EDAC se realizó una prueba para evaluar el efecto de la adición de EDAC en la emulsión obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla (20)

Tabla(20) EFECTO DE LA EDAC EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSA.

	Actividad total	Act. específica	Observaciones
Fibra con 0.5 ml de solución 250mg/ml de EDAC adicionada en la emulsión.	1.476 ul	1.62 ul/g	Fibras homogéneas con estabilidad de emulsión-19min

Posteriormente se realizó un barrido de concentraciones de EDAC adicionada en la emulsión desde 5% hasta 25% ,evaluando la actividad total, la actividad específica y de salida. Estos resultados se representan en la tabla (2). En la fase acuosa la adición se llevo a cabo junto con el buffer de suspensión del paquete celular y se enfrentó en la emulsión (ver metodologías):

En la figura (15) se muestra la concentración de EDAC contra la actividad específica señalándose en dicha gráfica, la zona de concentración en la cual no existe salida de actividad enzimática al medio de reacción y la zona donde si existe.

Tabla (2) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE EDAC EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS FIBRAS Y EN SU SALIDA DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

CONC. EDAC	ACT. ESPEC.	ACT. TOTAL	salida
25% p/v	0.01284	0.4281	0
20% p/v	0.6831	2.5199	0
20% p/v	0.6831	2.5199	0
10% p/v	0.1414	4.87	0
5% p/v	0.713	13.76	.111

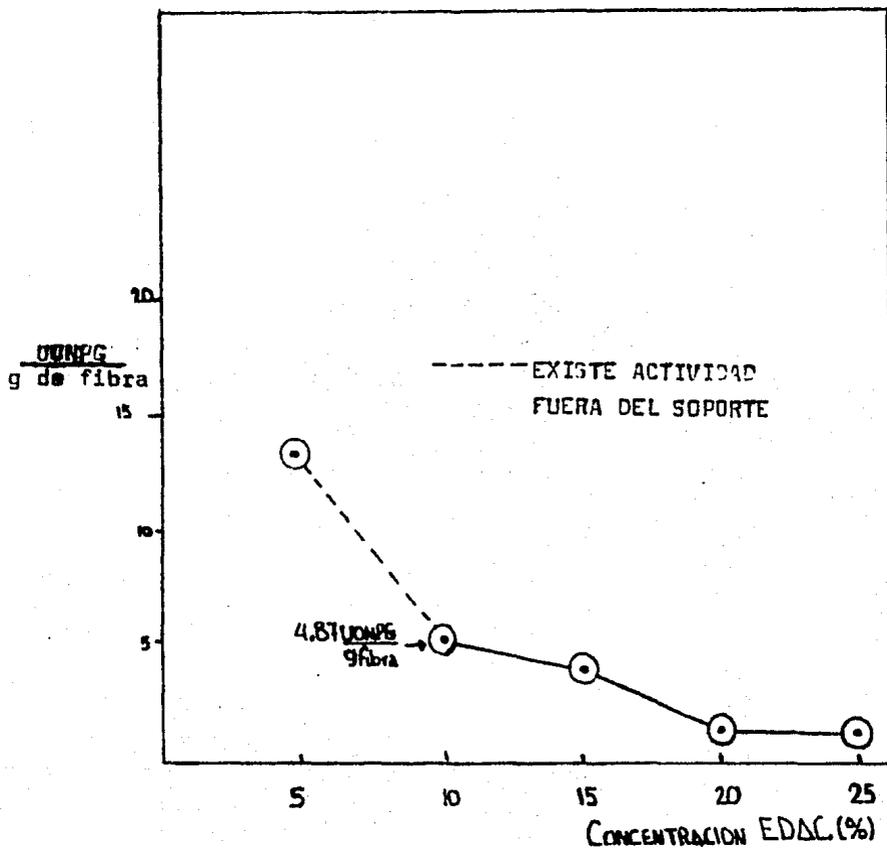


FIGURA (15).-Perfil de concentración de EDAC en % contra actividad específica en unidades de CMPPG/g de fibras. A un tiempo de enfrentamiento de 15 minutos, adicionando el agente curtiente a la emulsión.

En los resultados efectuados en primera instancia, se muestra que la adición de el agente entrecruzante en la emulsión no afecta las propiedades de la misma, ya que se obtienen fibras homogéneas, es decir, sin que se formen aglomerados a la salida del extrusor, debido a que no se altera la estabilidad de la emulsión (alrededor de 19 minutos).

De esta manera la modificación, en el curtido o entrecruzamiento reditua en un ahorro considerable de agente curtiende, ya que en las etapas anteriores el gasto de reactivo era de alrededor de 50 veces superior, sin lograr el atrapamiento y la actividad deseadas.

De esta forma, se concluyó que la forma de enfrentamiento del agente curtiende con el sistema enzimático debe ser en la emulsión. Posteriormente se procedió a optimizar la concentración de EDAC con las variaciones que se han mencionado. Se obtuvo un aumento de actividad enzimática a medida que se disminuyó la concentración de EDAC, de tal forma que podemos asegurar que la influencia de EDAC en la actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración.

Se logra una actividad enzimática elevada, si se considera que fue de 4,97uONPG/g, ya que esta actividad se detecta totalmente en las fibras a una concentración de EDAC de 10% p/v, es decir sin salida de enzima la mezcla de reacción.

Podemos asegurar que se ha desarrollado un sistema de inmovilización para células de levadura con actividad B-galactosidasa, y que este sistema retiene efectivamente a las levaduras.

La EDAC es un agente entrecruzante comunmente utilizado para un entrecruzamiento entre grupos amino y carboxilo activados (Jack, 1977). Así suponemos que las reacciones de entrecruzamiento en nuestro sistema se llevan a cabo entre: células-albúmina, células-células y albúmina-albúmina, mas no con el soporte de acetato de celulosa Por lo que la principal función de las reacciones de entrecruzamiento es la de aumentar el tamaño de las moléculas de proteína de tal manera que la salida a través de los poros de soporte se elimina. Esto se observa a concentraciones por arriba de un 10% de EDAC.

Optimización del tiempo de enfrentamiento del Sistema de inmovilización contra EDAC.

Se realizó la optimización del tiempo de enfrentamiento de la siguiente manera: Primero se prepararon las diferentes fases del soporte y se emulsificaron de la manera convencional. Posteriormente se adicionó el EDAC a una concentración de 10% p/v (tiempo cero), a partir de la adición se mantuvo la agitación durante 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min pasados los cuales se detuvo el tiempo de enfrentamiento al extrudir la emulsión con el tolueno.

A las fibras obtenidas para cada tiempo de enfrentamiento se les determinó actividad enzimática y además se evaluó la actividad total, la actividad específica y el incremento de salida, obteniéndose los resultados que se anotan en la tabla (22).

Por otro lado la figura (16) muestra el tiempo de enfrentamiento contra la actividad específica.

Tabla(22) Efecto del tiempo de enfrentamiento
 cortiente-soporte a una concentración fija de carbónida
 de 10%.

TIEMPO DE ENFRENTAMIENTO	Act.TOTAL	Act.ESPECIFICA	SE LIDA
5	1.2456	41.52	0.178
10	0.6990	23.30	0
15	0.1437	4.79	0
20	0.1209	4.03	0
30	0.1053	3.51	0
45	0.0890	2.99	0
60	0.0720	2.40	0

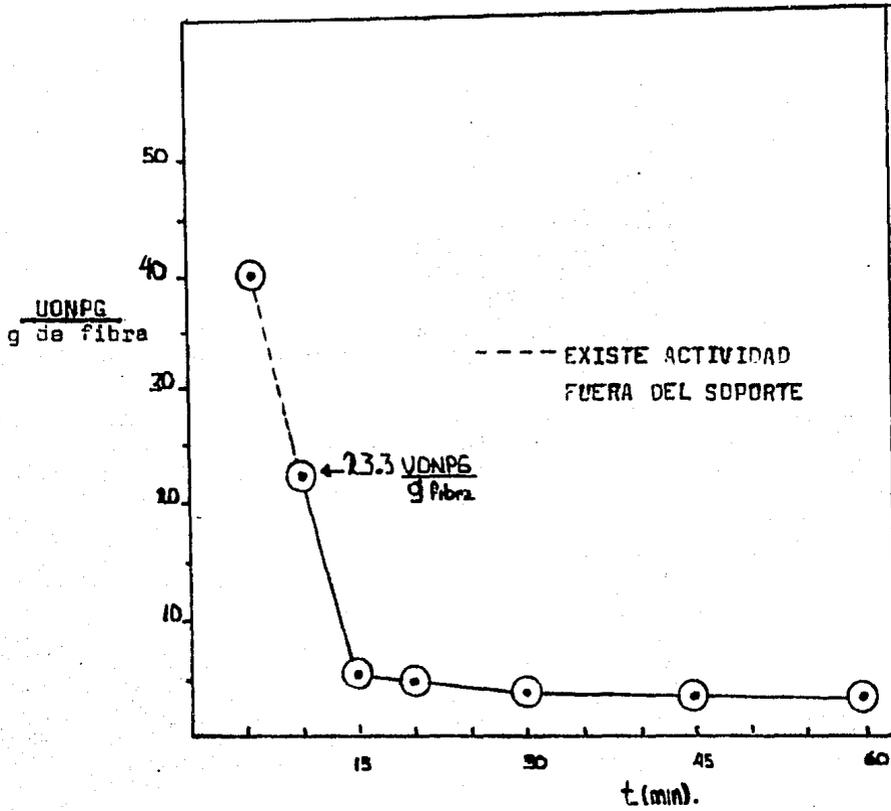


FIGURA (16).-Efecto del tiempo de enfrentamiento soporte-curtiente, a una concentración fija de EDAC de 10%. Las fibras se preparan bajo formulación estándar, el enfrentamiento se lleva a cabo en la emulsión.

De la tabla(22)se nota una clara influencia del tiempo de enfrentamiento, tanto en la actividad enzimática del soporte, como en su incremento de salida, ya que a mayor tiempo de enfrentamiento la actividad enzimática disminuye. Para los lapsos más cortos de enfrentamiento, el incremento de salida existe hasta llegar a, 10 minutos despues de los cuales no hay incremento de salida ,mejorandose la actividad enzimática alrededor de 5 veces, con respecto a lo antes reportado

En el cuadro(6), solo se muestran aquellos trabajos con lactasa inmovilizada comercialmente disponible, de los cuales a nivel industrial solo existe trabajo realizado en fibras de triacetato de celulosa. El valor de la actividad enzimática reportada es de 22 uONPG/g de fibra, que es semejante al valor obtenido en este trabajo (23.3 uONPG/g de fibra). Sin embargo no se ha probado la utilización de nuestro sistema en lactosa. No obstante, se abre el panorama para un estudio más profundo del sistema, pues se requiere de caracterizar parámetros tan importantes como serían el tiempo de vida media del catalizador, la estabilidad operacional, la estabilidad de almacenamiento, un estudio cinético y difusional, y la propuesta de un reactor enzimático. De esta manera se conocería a profundidad el sistema y no solo se manejaría para un sistema enzimático exclusivamente, como es B-galactosidasa, sino tener el conocimiento suficiente de este, de tal manera que se obtenga el criterio suficiente para su aplicación en otros sistemas enzimáticos.

VI.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones y recomendaciones de este trabajo se realizarán de acuerdo con los objetivos generales y particulares planteados inicialmente, y también de acuerdo a los resultados obtenidos a través del trabajo experimental. Las recomendaciones que se plantean son con el fin de que se pueda mejorar el trabajo o que se pueda profundizar más en él. Las conclusiones y recomendaciones que se proponen son las siguientes:

1.-Se desarrolló el sistema de inmovilización de células de levadura con actividad de B-galactosidasa en un soporte inerte de acetato de celulosa. Dicha inmovilización se basa en la técnica de atrapamiento entrecruzamiento.

Debido a la técnica que se utilizó se cree que se está afectando una porción de actividad enzimática, lo cual se detallará en los siguientes incisos.

2.-De los métodos que se evaluaron, solo el de acetato de celulosa se probó experimentalmente, pues de los demás métodos utilizados en el departamento de Biotecnología del CEINGEBI-UNAH, se tenían malos resultados. Siendo el soporte de acetatos el que mejores resultados presentó, se procedió a su optimización a través de este trabajo. Sin embargo esto no cierra la opción de la utilización de los demás métodos, puesto que podrían modificarse y optimizarse

también. No obstante cabe hacer notar que se deben tener cuidado en las desventajas que se presentaron en la discusión para c/u de los métodos.

3.-La cepa que se utilizó fue la de Kluyveromyces fragilis NRRL-Y5561. De las cepas que se probaron esta fue la que resultó tener la mayor actividad específica y que cumplió con las condiciones que anteriormente se expusieron, además cabe la observación de que la cepa puede ser motivo de diversos trabajos con el objeto de mejorarla. Tal es el caso de la utilización de las técnicas de la Ingeniería Bioquímica, para la optimización de la producción de la enzima a través del cultivo; además existen las técnicas de la Genética Clásica y de la Ingeniería Genética para el mejoramiento de la cepa.

4.-Dentro del desarrollo del sistema de inmovilización para células se puede concluir que :

a)La determinación de la proporción de las fases juega un papel muy importante en las propiedades finales de la fibra.

b)La elección del emulsificante adecuado facilita la manipulación de la emulsión.

c)La concentración del acetato de celulosa determina en gran medida la expresión de actividad enzimática, pero también limitará la liberación de enzima del soporte.

d)El sistema de extrusión-precipitación resultó adecuado para la escala de trabajo de este proyecto (nivel laboratorio).

Para este inciso podemos recomendar lo siguiente:

a) Mantener constante la proporción de las fases que se utilizan, y que cada modificación que se realice se haga dentro de los límites que establecen estas proporciones.

b) La utilización de acetato de celulosa obedeció a la facilidad de obtención de este material, sin embargo existe la posibilidad de la utilización de triacetato de celulosa, que podría redituarse en un mejor atrapamiento, y por lo consiguiente en un menor tratamiento de entrecruzamiento.

c) Se debe diseñar un sistema de extrusión-precipitación, si el proceso se va a llevar a una escala superior. Esto resultaría indispensable, puesto que el sistema aquí utilizado no resultaría adecuado para el manejo de volúmenes de emulsión mayores de 100ml.

5.- Dentro de la optimización del atrapamiento celular, la utilización de células como paquete y no como suspensión facilita el proceso, puesto que nos ayuda al aumento de actividad enzimática, así como a mantener la proporción de nuestras fases en la emulsión.

6.- En lo que se refiere a la permeabilización celular parece haber un campo bastante grande de trabajo, ya que como se dijo, el control de esta etapa del proceso es muy crítico. El método de permeabilización que se utilizó fue el de disolventes, siendo muy efectivo para la expresión de actividad de las células pero muy difícil de controlar en forma precisa. Esto se debe a que es complicado eliminar totalmente el disolvente de la pasta celular. Una posibilidad interesante es la permeabilización por medio de enzimas que degraden pared y/o membrana celular, aunque esto sería tema para

estudios posteriores. Pese a las desventajas mencionadas, la utilización de disolventes no se descarta totalmente, puesto que quedaría probar una mayor gama de estos.

7.-La adición de agentes protectores antes del tratamiento de entrecruzamiento resultó muy efectivo en la retención de actividad enzimática, ya que cuando no se adicionaban estos agentes, la actividad enzimática se perdía totalmente. Aquí cabe la recomendación de utilizar una proteína mas barata que la albúmina sérica bovina, siendo este el caso de la caseína o de la albúmina de huevo.

8.-De los curtientes elegidos, la utilización de la carbodimida resultó muy eficiente. Sin embargo debido a su costo se podría sustituir la EDAC por una carbodimida mas barata. Debe hacerse notar que para cada una de las carbodimidias sería necesaria una optimización de su uso, en función de su concentración y de su tiempo de enfrentamiento.

9.-La utilización de este sistema a una escala superior, deberá realizarse cuando el sistema hubiera incrementado su actividad por lo menos 4 veces. Esto se puede lograr mejorando las condiciones de permeabilización y de entrecruzamiento. Teniendo mejoría en tales tratamientos, no se tendría a la enzima tan expuesta a condiciones agresivas. Resolviendo estos problemas sería necesario un estudio mas profundo de el proceso, esto a traves de una caracterización del sistema. De esta manera se establecerían las políticas adecuadas para el diseño de un reactor enzimático.

10.-El biocatalizador se puede utilizar en leche y suero dulce de leche, debido a que se esta utilizando enzima de levadura cuyo pH

Óptimo es de 6.6-6.8. Sin embargo esto queda supeditado a la caracterización del sistema, utilizando como sustrato lactosa, ya que en este trabajo se utilizó ONPG como sustrato.

VII.- BIBLIOGRAFIA:

- 1.-Alais,Ch.,(1971)."Ciencia de la Leche".CECSA Ed. 1a.ed.,Mexico.
- 2.-Badui,S.,(1981)."Química de Alimentos".Alhambra Ed. 1a.ed.,Mexico
- 3.-Barbosa,H.,Silva,D.,Pinheiro,A.,(1985).Production of β -galactosidase from *K.fragilis* Grown in Chese Whey Culture Medium. J. Dairy Sci. 68(7):1616.
- 4.-Bayless,T.,Rosenberg,I.,Walker,W.,(1980).When you suspect lactose intolerance.Patient Care Magazine. Ct. USA
- 5.-Barndt,L.,Leeder,J.,Klein,D.,(1975)Sanitation of Biocatalytic Reactor Used for Hidrolisis of Acid Whey. J. Food Sci. 40(3):291.
- 6.-Canales,A.,Casas,L.,(1985)."Hidrólisis de lactosa por células de *E.coli* atrapadas en geles de carragenina" Tesis Fac. de Química UNAM.
- 7.-Coughlin,R.,Charles,M.,(1980)"Immobilized Enzymes for Food Processing".Pitcher,W. Ed. Florida USA
- 8.-Chang,T.M.,(1976)"Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins".Plenum Press Ed. N.York USA.
- 9.-Chen Chen,K.,Houng,J.,Ling,A.,(1985).Production Inhibition of Enzymatic Hidrolisis of Lactose. Enzyme Microbial Technol. 7(9):510.
- 10.-Chibata,I.,Tosa,T.,Sato,T.,(1979).Use of Immobilized Cell Systems to Prepare Fine Chemicals in "Microbial Technology". New York USA
- 11.-Chibata,I.,(1980)"Development of Enzyme Engineering in Food Processing". Applied Publishers. LTD London.
- 12.-Bahiquist,A.,Mattiason,B.,Mosbach,K.,(1973).Hidrolisis of β -galactosidase Using Polymer Entrapped Lactase. Biotech. Bioeng. 15,395.
- 13.-Dinelli,D.,Morisi,F.,(1974).Fiber Entrapped Enzymes in "Enzyme Engineering". Vol.2 Plenum Press Ed. 19th.ed. N.York USA.
- 14.-Bohan,L.A.,Baret,J.L.,Pain,S.,(1976).Lactose Hidrolisis by Immobilized Lactase in "Enzyme engineering for Food Processing". Vol.2 Appl. Sci. Pub. London.
- 15.-Fansen,C.,Olson,A.C.,(1969).Lactose and Other Enzymes Bound to a Phenol Formaldehyde Resin with Glutaraldehyde. J. Agric. Food. Chem. 21,440-445.
- 16.-Finochiaro,T.,Richardson,T.,Olson,H.,(1980).Lactase Immobilized on Alumina. J. Dairy. Sci. 63(2):215.
- 17.-Giekas,V.,Lopez-leiva,M.,(1985).Hidrolisis of Lactose.A Literature Review. Process Biochem. 20(2):2.
- 18.-Greenberg,W.,Mahoney,R.,(1981).J. Food Sci.47,1824.mencion en

Giekas (1985).

19.-Halling, P., Dunhill, P., (1979). *Biotech. Bioeng.* 21,393. mención en Giekas (1985).

20.-Harju, M., Heikonen, M., (1976). Optimization of an Immobilized B-galactosidase System in "Enzyme Engineering for Food Processing" Vol.2 Appl. Sci. Pub. London.

21.-Hernandez, J., Asenjo, J., (1982). *J. Food Sci.* 47,1985. mención en Giekas (1985).

22.-Holceberg, I.B., Morgallth, P., (1981). Alcoholic Fermentation by Immobilized Yeasts at High Sugar Concentrations. *J. Appl. Microbiol.* 13,133.

23.-Van Huynh, M., Dedeir, M., (1985). In Situ Activation of B-galactosidase of Resting Cells by Sodium and Potassium Phosphates and Chlorides. *Appl. Microbial Technol.* 21,390.

24.-ICI Co. S.A. Catalogo (1981).

25.-Jack, T.R., Zajic, J.E., (1977). The Enzymatic Conversion of L-Histidine by Cells Immobilized on Carbodiimide Activated CMC. *Biotech. Bioeng.* 19,361.

26.-Katchalski, M., Wingard, L.M., (1979) "Applied Biochemistry and Bioengineering" Vol.12 Academic Press Ed. N.York USA

27.-Kolarik, M., Chen, B., (1974). Glucose Isomerase Cells Entrapped in Cellulose Acetates in "Immobilized Enzymes in Food and Microbial Process. Plenum Press Ed. 1a.ed. N.York USA

28.-Kondo, T., Koishi, M., (1973). The Immobilization of B-galactosidase through Encapsulation in Microcapsules. *Biotech. Bioeng.* 15,561.

29.-Kosarik, N., (1982). Cheese Whey and its Utilization. Conservation and Recycling 5(1):23-32.

30.-Krog, N., Lauridsen, J.B., (1976). Food Emulsifiers and their Associations with Water in "Food Emulsions". S.Friberg Ed. Marcel Decker. N.Y. USA.

31.-Kuby, S.A., Lardy, H.A., (1953). Purification and Kinetics of B-galactosidase *Amer. Chem. Soc.* 75,890-96.

32.-Linko, M., Larinkari, J., (1980) "Enzyme Engineering for Food Processing". Appl. Sci. Pub. LTD London.

33.-Mahoney, R.R., Whitaker, J.R., (1977). Stability and Enzymatic Properties of B-galactosidase from K.fragilis. *J. food Biochem.* 1,327

34.-Mahoney, R.R., Whitaker, J.R., (1978). Purification and Physicochemical Properties of B-galactosidase from K.fragilis *J. Food Sci.* 43,584.

- 35.-Marconi,U.,Guinelli,S.,Morisi,F.,(1974).Fiber Entrapped Enzymes in "Immobilized Enzymes" Raven press Ed. 1a.ed. N.York. USA.
- 36.-Marconi,U.,Morisi,F.,(1979).Industrial Applications of Fiber Entrapped Enzymes in "Applied Biochemistry and Bioengineering" Vol.2 Academic Press Ed. N.york. USA.
- 37.-Morisi,F.,Pastore,M.,Viglia,A.,(1972).Reduction of Lactose Content of Milk by Entrapped B-galactosidase from Yeast and E.coli. J. Dairy Sci. 56(9):1123.
- 38.-Morr,C.,(1974).Chemistry of Milk Proteins in Food Processing. J. Dairy Sci. 58,977.
- 39.-Morris,C.,(1980).Sweet Protein Syrups.Food Engineerig 57(7):34-36.
- 40.-Nijples,H.H.,(1981).Lactases and their Applications in "Enzyme and Food Processing". G.G. Birch Ed. London.
- 41.-Ohmiya,K.,Ohashi,H.,Kobayashi,T.,(1977).Hidrolisis of Lactose by Immobilized Microorganisms. Appl. Envirom. Microbiol. 33,137.
- 42.-Okos,E.S.,Harper,W.J.,(1974).Activity and Stability of B-galactosidase Immobilized on Porus Glass. J. Food Sci. 39,88.
- 43.-Okos,H.R.,(1978).Hidrolisis of Lactose in Acid Whey Using B-galactosidase Adsorbed to a Phenol-formaldehyde Resin. J. Food Sci. 43,566.
- 44.-Pastore,M.,Morisi,F.,Viglia,A.,(1972).Reduction of Lactose of Milk by Entrapped B-galactosidase II. J. Dairy Sci. 57(3):269.
- 45.-Pastore,M.,Morisi,F.,Zacardelli,D.,(1974).Reduction of Lactose Content of Milk Using B-galactosidase III. In "Insolubilized Enzymes" Raven Press Ed. N.York USA
- 46.-Potre,D.,Noel,C.,Thomas,D.,(1978).A New Method for Cell Immobilization. Biotech. Bioeng. 20,127.
- 47.-Prenosil,J.E.,Stucker,E(1984).Enzymatic Whey Hidrolisis in the pilot plant Lactohyd. Bitechology 5,441.
- 48.-Rajnikaul,S.,D'Sousa,S.,(1984).Hidrolisis of Milk Lactose by Immobilized B-galactosidase in Hen Egg White Powder. Biotech. Bioeng. 26,901.
- 49.-Reed,A.,(1975).Carbohidrases in "Enzyme and Food Processing". Academic Press Ed. Milhwakee, Wiss. USA.
- 50.-Robert,D.,(1978).Use of Lactases in Dairy Industries. Symposium UTT. Bioconversion in Food Technology.Helsinki February, pg 96-101.
- 51.-Rosado,J.,(1985).Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Comunicación Personal.

- 52.-Sprossler,B.,Plainer,H.,(1983).Food Technology 10,93.mención en Giekas (1985).
- 53.-Sweigart,R.,(1978)."Enzyme Engineering" Brown G.B. Plenum Press Ed. N.York.
- 54.-Torres,J.,Casas,L.,(1985)"Producción de células de levadura K.fragilis" Tesis Fac. de Química UNAM (en edición).
- 55.-Tosa,T.,Mori,T.,Chibata,I.,(1967). Biotech. Bioeng. 9,603-615.mención en Giekas (1985).
- 56.-Venkatasubramanian.K.,Vieth,W.R.,(1976).Design and Analysis of Immobilized Enzyme Reactors In "Inzolibilized Enzyme Principles" Academic Press Ed. N.York USA.
- 57.-Wang,D.C.,Cooney,Ch.L.,(1979)."Fermentation and Enzyme Technology". Jhon Wiley and Sons Ed. N.York USA.
- 58.-Weetall,H.,Haverwalla,N.,Pitcher,W.,(1974).The Preparation of Immobilized Lactase and its use in the Enzymatic Hidrolisis of Acid Whey. Biotech. Bioeng. 16,295.
- 59.-Whittaker,J.R.,(1972)"Principles of Enzymology for the Food Science". Marcel Decker Ed. 1a.ed. N.York USA.
- 60.-Wierzbicki,L.E.,Edward,V.H.,(1973).Immobilization of Microbial Lactases by Covalent Attachment to Porus Glass. J. Food Sci. 38,1070.
- 61.-Wierzbicki,L.E.,Edward,V.H.,(1974a).Hidrolisis of Lactose in Acid Whey,Using B-galactosidase Immobilized in Porus Glass. Biotech. Bioeng. 16,397.
- 62.-Wierzbicki,L.H.,Edward,V.H.,(1974b).Hidrolisis of Lactose in Acid Whey by Lactase Bound to Porus Glass Particles in Tubular Reactors. J. Food Sci. 39,374.