

79  
2/8/85



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO DE UN METODO DE INMOVILIZACION POR  
ATRAPAMIENTO DE CELULAS COMPLETAS DE E.coli ATCC  
9637 CON ACTIVIDAD DE PENICILINO AMIDASA, EMPLEANDO  
COMO SOPORTE AGAR".

## T E S I S

Que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a

MA. PATRICIA C. PADILLA CORTES



México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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.

## I N D I C E

Capítulo	página
I     INTRODUCCION .....	1
II    ANTECEDENTES .....	4
2.1. Perspectiva histórica .....	4
2.2. Enzimas y células inmovilizadas .....	6
2.2.1. Introducción	
2.2.2. Características de las enzimas y células libres.	
2.2.3. Características de las enzimas y células inmovilizadas.	
2.2.4. Limitaciones en la inmovilización de enzimas y células microbianas.	
2.2.5. Aplicaciones de las enzimas y células microbianas inmovilizadas.	
2.3. Métodos de inmovilización .....	20
2.3.1. Introducción	
2.3.2. Descripción de los métodos de inmovilización.	
2.4. Soportes .....	29
2.4.1. Introducción	
2.4.2. Clasificación de los soportes en base a su naturaleza.	
2.4.3. Morfología y configuración de los soportes.	
2.5. Generalidades de la enzima penicilino amidasa.	35
2.5.1. Introducción	
2.5.2. Propiedades de la enzima penicilino amidasa	
2.5.3. Características fisicoquímicas de la enzima penicilino amidasa.	
2.6. Generalidades sobre el Agar .....	40
III   OBJETIVOS .....	43
3.1. Objetivo general .....	43
3.2. Objetivos parciales .....	44

IV	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	45
	4.1. Estrategia de investigación .....	45
	4.2. Aspectos del sistema enzimático a inmovilizar .....	46
	4.2.1. Producción de <u>E.coli</u> ATCC 9637, con actividad de penicilino amidasa	
	4.2.2. Medición de la actividad enzimática.	
	4.3. Aspectos del soporte .....	48
	4.3.1. Introducción.	
	4.3.2. Metodología para la evaluación de la fuerza del gel.	
	4.3.3. Influencia de la concentración del agar respecto a la fuerza del gel.	
	4.3.4. Influencia de la presencia de ciertos iones como; fosfato, cloruro y acetato, en la fuerza del gel.	
	4.3.5. Influencia del pH en la fuerza del gel.	
	4.4. Aspectos de la técnica de inmovilización..	53
	4.4.1. Introducción	
	4.4.2. Efecto de la concentración de las células inmovilizadas, en las propiedades de fuerza del gel y estabilidad a la agitación.	
	4.4.3. Efecto del uso de un agente curtierte en la estabilidad a la agitación del gel.	
	4.5. Aspectos del biocatalizador desarrollado ..	56
	4.5.1. Medición de la actividad enzimática.	
	4.5.2. Efecto de la inmovilización sobre la actividad enzimática presente en las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637.	
	4.5.3. Caracterización cinética del sistema inmovilizado.	

	4.5.3.1. Perfil de pH	
	4.5.3.2. Temperatura óptima del sistema inmovilizado.	
	4.5.3.3. Constantes cinéticas del biocatalizador.	
V	RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
	5.1. Aspectos del sistema enzimático a inmovilizar .....	57
	5.2. Aspectos del soporte .....	61
	5.3. Aspectos de la técnica de inmovilización.	63
	5.4. Aspectos del biocatalizador desarrollado	75
VI	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FUTURAS .....	87
VII	BIBLIOGRAFIA .....	90
VIII	APENDICES .....	94
	Apéndice A .....	94
	A.1. Materiales.	
	A.1.1. Reactivos.	
	A.1.2. Equipo.	
	Apéndice B .....	98
	B.1. Técnicas analíticas	
	B.1.1. Cuantificación de proteína (Método de Lowry).	
	B.1.2. Cuantificación de 6-APA, por el método del p-dimetil-amino-benzaldehído.	
	B.1.3. Determinación de peso seco.	
	B.2. Procedimiento para curtir soportes constituidos por polisacáridos.	

## INDICE DE TABLAS

Tabla.	página
2.1 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas en procesos químicos .....	16
2.2 Ejemplos de electrodos enzimáticos .....	17
2.3. Producción de compuestos orgánicos por células microbianas inmovilizadas .....	18
2.4. Ejemplos de biocatalizadores inmovilizados empleados con fines comerciales.....	19
2.5. Técnicas de inmovilización para células microbianas .	23
2.6. Polímeros que forman su estructura por precipitación.	24
2.7. Comparación de las diferentes técnicas de inmovilización .....	28
2.8. Clasificación de los soportes de acuerdo a su naturaleza .....	32
2.9. Microorganismos productores de bencilpenicilino-amidasa .....	39
5.1. Estabilidad de las células inmovilizadas en Agar ....	70
5.2. Efecto de la concentración del glutaraldehído en la actividad enzimática de penicilino amidasa unida a las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637 inmovilizadas en Agar	73
5.3. Temperatura y pH óptimos para la actividad de penicilino amidasa .....	79
5.4. Comparación del Km obtenido experimentalmente en el sistema inmovilizado, con los encontrados en la literatura .....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura	página
2.1. Representación esquemática de las diferentes técnicas de inmovilización .....	21
2.2. Esquema sobre el proceso para atrapar células completas por formación de enrejados iónicos ...	25
2.3. Reacción de hidrólisis de la Penicilina G por la enzima penicilino amidasa .....	36
2.4. Diagrama del proceso de fabricación del Agar ...	41
2.5. Esquema de la estructura química del Agar.....	42
4.1. Diagrama para la medición de actividad enzimática de la enzima penicilino amidasa .....	49
4.2. Esquema del aparato para la medición de la fuerza del gel .....	52
5.1. Cultivo de células de <u>E.coli</u> ATCC 9637, en medio mínimo empleando como fuente de carbono e inductor el ácido fenil acético.	
5.2. Efecto de la concentración de Agar sobre la resistencia a la ruptura del gel .....	62
5.3. Influencia del pH sobre la fuerza del gel.....	64
5.4. Efecto de algunos iones sobre la resistencia a la ruptura del gel .....	65
5.5. Efecto de la relación de atrapamiento (células-agar) sobre la fuerza del gel.....	67
5.6. Efecto de la agitación sobre la estabilidad del gel.....	69
5.7. Estabilidad de la actividad de la enzima penicilino amidasa unida a las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637, inmovilizadas en Agar.....	71
5.8. Efecto del glutaraldehído sobre la actividad de la enzima penicilino amidasa en células de <u>E.coli</u> ATCC 9637, inmovilizadas en Agar.....	74

5.9.	Aspecto que presentan los biocatalizadores obtenidos a las diferentes concentraciones de glutaraldehído probadas.....	76
5.10.	Perfil de pH de las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa inmovilizadas en Agar.....	78
5.11.	Perfil de temperatura de las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa inmovilizadas en Agar.....	81
5.12.	Energía de activación para la reacción de hidrólisis de la Penicilina G-K.....	82
5.13.	Efecto de la concentración de Penicilina G-potásica en la actividad de la enzima penicilino - amidasa presente en las células de <u>E.coli</u> ATCC 9637 inmovilizadas en Agar.....	84
B.1.	Curva patrón de albumina bovina.....	100
B.2.	Curva patrón del ácido 6-aminopenicilánico .....	103
B.3.	Curva patrón de Peso seco de <u>E.coli</u> ATCC 9637.....	105



## I. INTRODUCCION

La utilización de enzimas con fines comerciales se ha venido extendiendo en una gran variedad de campos tales como; la industria cervecera, producción de quesos, industria textil, en la de curtido, en alimentos y en medicina. Sin embargo las enzimas no siempre han resultado ser catalizadores ideales de aplicación industrial, puesto que generalmente son inestables, además de que no pueden ser usados a temperaturas elevadas.

Tradicionalmente las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo en procesos por lote, lo cual permite que sean empleadas solo una vez, y que sus restos sean desechados sin tratar de recuperarlos. En relación a ésto se trató de darles un uso más económico y eficiente, por lo que a fines de los años sesenta, las técnicas de inmovilización de enzimas empezaron a ser objeto de un creciente interés. Muchos artículos y revisiones sobre el tema comenzaron a ser publicados. Es conveniente mencionar que las enzimas inmovilizadas en sus primeros años de estudio fueron consideradas como simples curiosidades de laboratorio.

Dentro de las diversas fuentes de obtención de enzimas, las provenientes de microorganismos resultan ser las más convenientes para emplearse industrialmente. Estas pueden ser obtenidas extracelularmente o tienen que ser extraídas de las células microbianas. Para omitir este proceso se ha contemplado la potencialidad que envuelve el inmovilizar directamente la célula microbiana, técnica que se ha venido desarrollando desde los inicios de los años setenta.

Así desde hace 20 años las enzimas inmovilizadas y más recientemente las células microbianas inmovilizadas han provocado un gran interés dentro del campo de la ingeniería enzimática.

Existen numerosos ejemplos en los que se han usado tanto enzimas como células microbianas inmovilizadas con fines industriales entre

ellos encontramos que la primera aplicación fue la resolución de mezclas racémicas para la separación de L-aminoácidos, utilizando una aminoacilasa inmovilizada, este proceso fue iniciado por la compañía Tanabe Seiyaku de Japón en 1969.

Respecto a otros procesos industriales que utilizan enzimas o células microbianas inmovilizadas con éxito, podemos mencionar algunos como es la producción de jarabe de fructosa empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada, este proceso es realizado por las compañías Novo; CAR-Mi, INC.; Clinton Corn Processing, entre otras. Así mismo podemos mencionar la conversión de esteroides (usando la enzima dehidrogenasa) realizado por la compañía Squibb. Otro caso es la producción del L-ácido málico (usando la enzima fumarasa) efectuado por la compañía Tanabe Seiyaku, en esta ocasión la enzima se encuentra dentro de el microorganismo productor el cual es inmovilizado. De esta misma manera se produce el ácido L-aspártico, que es producido por Tanabe Seiyaku y por Kyowa Hakko desde 1976.

En cuanto a otros productos obtenidos por sistemas inmovilizados de aplicación industrial tenemos la producción del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que es obtenido por la hidrólisis de la cadena lateral de la molécula de penicilina G, empleando la enzima penicilinoamidasa inmovilizada. Este producto es de gran interés farmacéutico debido a que se emplea como insumo para la síntesis de las penicilinas semisintéticas. Existen varias compañías que utilizan dicho proceso, entre ellas están; Tanabe Seiyaku, Beecham, A. B. Astra entre otras.

En este trabajo se presenta un panorama sobre el curso que ha tomado en la actualidad la tecnología de las enzimas inmovilizadas, así como sus aplicaciones con fines industriales o comerciales en algunos procesos. Además de indicar las ventajas y desventajas que presentan los sistemas inmovilizados en cuanto a su uso.

Por otra parte se da una estrategia en cuanto al desarrollo de un biocatalizador a base de una enzima de aplicación industrial, siendo en este caso la enzima penicilino amidasa, la cual se emplea dentro del microorganismo productor que será inmovilizado en un soporte tipo gel como es el agar. El estudio comprende la caracterización físico química del soporte y del soporte-microorganismo inmovilizado.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Perspectiva histórica.

La inmovilización de enzimas se inició desde 1916, año en que Nelson y Griffin (44) encontraron que un extracto de invertasa era absorbido sobre carbón activado y que la enzima absorbida mostraba la misma actividad que la enzima nativa.

En 1949 Summer (50) encontró que la ureasa contenida en un 30% de alcohol y cloruro de sodio, permanecía activa durante uno o dos días, sin embargo todos los conocimientos que se siguieron desarrollando sobre enzimas inmovilizadas no fueron tomados en cuenta para una aplicación en particular sino hasta 1953 cuando Grubhofer y Shleith (22) inmovilizaron enzimas tales como; carboxipeptidasa, diastasa, pepsina y ribonucleasa utilizando como soporte una resina de poliamino-poliestireno, mediante unión covalente.

Durante los años de 1954 a 1961 Mc. Laren (41) y Sittle (58) se preocuparon por la absorción de las enzimas empleando soportes inorgánicos; mientras que Katchalski (30) se interesa por la inmovilización de enzimas mediante uniones covalentes a copolímeros orgánicos; a su vez Mitz (30) se dedica a unir covalentemente las enzimas a soportes de tipo celulósico.

En la década de los setenta se encuentran publicaciones de Mosbach y Mattiason (40) en donde realizan estudios en los que observan que diferentes enzimas presentan mayor eficiencia en su forma inmovilizada que en su forma libre para un proceso en particular.

En general se puede decir que se cuenta con un considerable número de métodos reportados para la inmovilización de enzimas, y que esto se debe en gran parte a que las preparaciones enzimáticas en su forma soluble, presentan una serie de limitaciones en cuanto a su baja estabilidad operacional y a su capacidad de regeneración.

lo cual da un aumento en los costos de producción de tales preparaciones. En base a estos inconvenientes es que se considera la utilización de las enzimas inmovilizadas, ya que este estado les permite aumentar su estabilidad en cuanto a su capacidad de operación, lo que a su vez permite considerar su aplicación en los procesos de bio conversión a nivel industrial.

Recientemente se ha venido considerando la inmovilización de células completas, en relación a que ésto evita los procesos de extracción y purificación de las enzimas, lo cual resulta muy costoso, es decir se contempla la proposición de usar las células completas e in tactas de los microorganismos productores, ya que ésto ofrece una se rie de ventajas que serán mencionadas a lo largo del presente trabajo.

Dentro de la naturaleza existen algunos microorganismos que presentan una cierta afinidad natural para crecer sobre superficies for mando finas capas o películas sobre una amplia variedad de materiales de tipo natural y no naturales como; granos de arena, tubos de clor uro de polivinil, en superficies de metales y minerales, etc. En muchos de los anteriores ejemplos la formación de estas películas se debe a fenómenos físicos de absorción permitiendo que los microorganismos son colocados a propósito sobre superficies inertes con el fin de mejorar su crecimiento; estos ejemplos de ninguna manera pueden ser considerados como una forma de inmovilización hablando en términos estrictos, pero si nos indica la importancia que tiene el uso de un soporte inerte. (27)

De la extensa literatura relacionada con la inmovilización de en zimas o de células microbianas, se puede observar que existen pocas publicaciones en las que se mencione la importancia de seleccionar un soporte, así como el de caracterizar el sistema que será inmovili zado antes y después de que ésto se efectue.

## 2.2. Enzimas y células inmovilizadas.

### 2.2.1 Introducción.

Se conoce una gran cantidad de catalizadores químicos que poseen una gran importancia debido a su poder y versatilidad en su uso, lo cual puede ilustrarse con el hecho de que el 70% de todos los procesos industriales emplean la catálisis química. En relación a esto podemos hacer la siguiente pregunta, ¿por qué la necesidad de utilizar a las enzimas como catalizadores industriales?. La respuesta a esto, es que las enzimas presentan características muy notables, que no se encuentran presentes en los catalizadores hechos por el hombre, y que son; su alta actividad catalítica, que en muchas ocasiones resulta ser superior en comparación a la actividad de los catalizadores no biológicos; así como su alta especificidad, y finalmente al hecho de que pueden funcionar bajo diferentes condiciones, incluyendo condiciones normales de presión y temperatura. Sin embargo a pesar de tan notables propiedades, las enzimas no han sido ampliamente usadas debido a que presentan algunas desventajas; como es que son poco estables en condiciones de operación, así como que son moléculas solubles en agua dificultando su separación de los sustratos y productos por lo que no pueden ser usadas repetidamente. Es por ello que intentando superar estos inconvenientes se ha seguido avanzando dentro de la tecnología enzimática, específicamente impulsando la aplicación de las enzimas inmovilizadas, así como en la inmovilización de las células completas microbianas.

### 2.2.2. Características fisicoquímicas de las enzimas y células libres.

La aplicación de las enzimas dentro de los procesos industriales

se fundamenta en la evaluación de las siguientes propiedades:

1. especificidad
2. estabilidad
3. actividad
4. disponibilidad

1. Uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas es su especificidad, ya que solo ciertos sustratos experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales. Su grado de especificidad puede ser muy variado algunas poseen una especificidad casi absoluta respecto a un sustrato determinado, y no actuarán sobre moléculas aunque estén muy relacionadas; mientras que otras atacarán toda una clase de moléculas que poseen un común denominador estructural, aunque lo hagan a velocidades diferentes.

2. La estabilidad de las enzimas ya sea durante su almacenamiento o en uso, es esencial para su aplicación industrial. Las enzimas en solución acuosa son generalmente inestables y pueden perder actividad durante la reacción, además de que su recuperación resulta costosa, así como que los métodos usualmente empleados pueden causar su desnaturalización, dando como consecuencia que las enzimas no sean reutilizadas en los procesos por lote o en los continuos.

3. La actividad que presenta una enzima, se encuentra determinada por la concentración de ella misma, por la concentración del sustrato así como por la disponibilidad del mismo, concentración de cofactores, efectos alostéricos, la presencia y concentración de sustancias inhibitorias, fuerza iónica, pH, temperatura y el tiempo de reacción. (21)

Todos estos parámetros que afectan la actividad enzimática, son estudiados por la cinética enzimática. El conocimiento de este estudio es necesario en relación a los siguientes puntos:

- 1.- Poder seguir la producción y aislamiento de las enzimas.
  - 2.- Estandarizar y determinar las propiedades de las preparaciones comerciales.
  - 3.- Determinar la cantidad correcta de enzima para ser adicionada en un proceso comercial.
4. La disponibilidad depende de varios factores; a pesar de que las enzimas son producidas por todos los organismos vivos, las provenientes de fuentes microbianas resultan ser las más prácticas para ser usadas con fines industriales. Su obtención resulta más económico ya que no está sujeta a factores de localización de la fuente ó a cambios de las condiciones climatológicas, sino que su producción se encuentra concentrada en un solo sitio, además de que su tiempo de producción es más corto.

Dentro de la producción de enzimas a través de microorganismos encontramos dos grupos; enzimas extracelulares que son secretadas al caldo de cultivo y las enzimas intracelulares que se encuentran en el interior de la célula microbiana. Las primeras generalmente son más empleadas como biocatalizadores comerciales, ya que resultan ser relativamente más estables, fáciles de aislar y no requieren de cofactores. Las enzimas intracelulares, resultan ser más prácticas al emplearse dentro de las células microbianas; ya que de esta forma se evita su extracción y purificación, disminuyendo su inestabilidad, debido a que se preserva su ambiente natural. Tal aplicación es lo que hasta la actualidad se ha venido empleando dentro de los procesos tradicionales de las bioconversiones.

#### 2.2.3. Características físicoquímicas de las enzimas y células inmovilizadas.



Las propiedades tanto físicas como químicas de las enzimas y células en su forma libre, sufren apreciables cambios al ser inmovilizadas. Estos cambios se observan principalmente en su estabilidad en sus constantes cinéticas, todo ésto debido al nuevo microambiente al cual se encuentran sometidas y a sus propios productos de reacción. Las ventajas generales que ofrecen los biocatalizadores inmovilizados se enumeran a continuación:

- 1° Permiten ser usados en procesos en continuo, así como repetidamente en los procesos por lote, reduciendo significativamente los costos.
- 2° Los procesos pueden ser automatizados.
- 3° Se tiene un control más preciso de las reacciones catalizadas
- 4° Se previene que los productos finales no se encuentren contaminados por sustancias proteicas, esto es importante debido a que pueden causar reacciones inmunológicas.
- 5° Se incrementa la estabilidad intrínseca de las enzimas.

El término de "biocatalizador inmovilizado", puede ser empleado para denominar tanto sistemas simples como complejos. En el primer caso corresponde a los sistemas formados por enzimas aisladas o bien por células microbianas no viables donde se requiere catalizar una o dos reacciones. En el caso de los sistemas complejos tenemos a las células microbianas viables, en donde se emplea todo su sistema multienzimático. Sin embargo en el caso de los sistemas simples surge la pregunta de ¿cuando inmovilizar enzimas aisladas o células microbianas no viables?, la respuesta a ésto sería en relación a las siguientes consideraciones en donde se justifica el empleo de las células microbianas no viables:

1. Cuando son enzimas intracelulares, ya que no se requiere de los procesos de extracción y purificación.
2. Cuando los extractos enzimáticos de las células son inestables durante y después de la inmovilización.
3. Si el microorganismo productor no contiene enzimas que puedan interferir con la enzima deseada, y en el caso de que ésto suceda, ver la posibilidad de inactivarlas o removerlas del microorganismo.

4. Los sustratos y productos deberán ser compuestos de pesos moleculares bajos.

Las reacciones catalizadas por células microbianas inmovilizadas ofrecen una serie de ventajas: como es que dan un alto rendimiento en la actividad enzimática inmovilizada; una alta estabilidad operacional, los costos de obtención de la enzima son bajos: Pueden ser empleadas en sistemas de reacciones multienzimáticas, además de que tienen una retención íntegra de la estructura y conformación de la enzima y se aumenta la resistencia a las perturbaciones del ambiente.

#### 2.2.4. Inconvenientes en la inmovilización de enzimas y células microbianas.

Una de las desventajas más importantes en la inmovilización de enzimas, corresponde a los cambios en sus propiedades cinéticas. A continuación se menciona algunos de los efectos más importantes que ocurren:

- a) Cambios conformacionales causados por modificaciones de las enzimas durante la inmovilización.
- b) Efectos estéricos, debido a la orientación de las enzimas después de la inmovilización.
- c) Repartición del sustrato, productos o de los iones entre el volumen de la solución y el soporte empleado en la inmovilización, debido a las interacciones hidrofílicas y electrostáticas que se originan en el medio de reacción.
- d) Efectos microambientales, esto se refleja principalmente entre la interacción de la enzima y el sustrato, ya que ésta se encuentra en un ambiente modificado en el que prevalece en gran parte las propiedades físicas y químicas del material empleado como soporte.

- e) Restricciones difusionales externas en la transferencia de el sustrato o de los productos alrededor de las capas circundantes que envuelven a las partículas de las enzimas.
- f) Restricciones difusionales internas en la transferencia del sustrato o del producto dentro del material usado como soporte.

Los tres primeros incisos permiten explicar el decremento que se observa en la actividad específica de las enzimas inmovilizadas en comparación con las enzimas que se encuentran en solución. En el caso de las células microbianas inmovilizadas encontramos que las enzimas no se encuentran directamente interaccionando con el material empleado como soporte, ni con un nuevo microambiente; por lo que los efectos conformacionales y estéricos se encuentran más alejados de poder alterar a las enzimas. Sin embargo pueden presentarse alteraciones debidas a las mismas células ya que éstas pueden presentar cargas negativas en su periferia, que provocan modificaciones en el pH óptimo de la enzima o en las interacciones con el sustrato.

Los efectos difusionales, son los inconvenientes más importantes dentro de las propiedades cinéticas de las enzimas o de las células inmovilizadas, especialmente cuando las reacciones deben efectuarse con gran rapidez debido a que las concentraciones del sustrato son muy bajas; ésto implica la necesidad de emplear partículas altamente porosas como soportes. En el caso de las células inmovilizadas se tiene que las restricciones difusionales son más pronunciadas que en el caso de las enzimas, ya que éstas cuentan con una barrera adicional constituida por la pared celular, así como por la membrana citoplasmática.

El uso de las enzimas inmovilizadas en cuanto a sus costos de producción resultan ser más elevados en comparación con las células microbianas inmovilizadas; ya que todo el proceso que se necesita para poder emplearse como biocatalizadores involucra desde su obtención, purificación, inmovilización hasta su aplicación dentro de un bioreactor. Mientras que las células sólo se tiene su obtención, inmovilización y aplicación en el bioreactor. Sin embargo las células

microbianas pueden dar productos menos puros, ya que además de el producto deseado, se pueden tener presentes otros metabolitos propios de la célula, así como materiales producidos por la lisis celular, que puede observarse frecuentemente cuando las células han sido usadas durante prolongados períodos de operación. En algunos casos, se pueden encontrar células libres, ésto ocurre generalmente en los procesos que requieren de células viables. Una desventaja más es que la actividad y estabilidad de dichas preparaciones, se ve afectada adversamente por la acción de proteasas intracelulares, implicando el uso de agentes inhibidores de dichas enzimas, que también puede afectar la actividad de la enzima deseada.

#### 2.2.5. Aplicaciones de las enzimas y células microbianas inmovilizadas.

Las aplicaciones más representativas de los biocatalizadores inmovilizados serán señaladas dentro de esta sección, principalmente en forma de ejemplos, en los cuales se tratará de indicar el alcance que puede tener la tecnología de las enzimas y células microbianas inmovilizadas, así como sus posibilidades y limitaciones. (25)

Como ya se ha mencionado los biocatalizadores más probados son los correspondientes a producir los L-aminoácidos, ya que éstos presentan una importante utilización como aditivos en alimentos o como complemento alimenticio para animales y también en medicina, debido a su alto valor nutritivo. Tradicionalmente se producían por medio de fermentación, después se sintetizaron químicamente, dando un proceso fácil, rápido y barato en comparación con las fermentaciones; sin embargo presentaba un inconveniente y era que daba mezclas racémicas, por lo cual al emplearse una enzima como la aminoacilasa inmovilizada, este problema se resolvió ya que se contaba con una hidrólisis muy selectiva del acyl-L-aminoácido que liberaba el L-aminoácido, y éste podía ser posteriormente separado del acyl-D-aminoácido por simple diferencia de solubilidades. (25)

Otras transformaciones que incluyen la utilización ya sea de enzimas o de células inmovilizadas son la conversión del fumarato de amonio a el ácido L-aspártico; así como la síntesis de L-triptofano a partir de indol, o empleando ácido acético y amonio ó DL-serina. Otro caso es la síntesis de L-tirosina a partir de fenol, ácido acético y amonio; así como la conversión de L-arginina a L-citrulina ó a L-ornitina y finalmente la síntesis del ácido L-glutámico a partir de glucosa. (9)

Dentro de la industria de alimentos, tenemos que tecnológicamente, ésta se encuentra en un gran subdesarrollo en comparación con la industria farmacéutica y química. Pero aún así los competidores de las enzimas, los catalizadores químicos, no han podido jugar un papel muy importante en este caso debido principalmente a que son incompatibles con los alimentos. Mientras que las enzimas a su vez han sido ampliamente usadas por la tecnología de alimentos en procesos tan tradicionales como es la producción de quesos, en panificación, etc.

Un ejemplo de importancia comercial para la tecnología de los biocatalizadores inmovilizados corresponde a la producción del jarabe de maíz rico en fructuosa. Este proceso consiste en convertir la glucosa (que es obtenida por hidrólisis enzimática del almidón) en una mezcla aproximadamente equimolecular de fructosa y glucosa empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada. Debido a que la fructosa es más dulce que la glucosa, el jarabe de maíz rico en fructosa resulta ser tan dulce como el jarabe a partir de sacarosa y con el mismo contenido de sólidos; por lo que es utilizado en la preparación de bebidas no alcohólicas como los refrescos embotellados. Otro proceso recientemente comercializado corresponde a la hidrólisis de la lactosa del suero de la leche, dando como productos una mezcla de glucosa más galactosa. El jarabe obtenido del suero de la leche es empleado como edulcorante (con un elevado contenido de proteínas) en productos como helados, dulces, pasteles y en la elaboración de cajetas. (25)

Muchas enzimas exhiben una alta especificidad para un determinado

sustrato, lo cual asegura que solo podrá reaccionar con el sustrato al que es afin, evitandose posibles interferencias por la presencia de otros compuestos: Esta característica (ausente en la mayoría de los catalizadores químicos) es muy valiosa en los trabajos analíticos, ya que en ellos es muy común querer medir la concentración de algún componente que se encuentra presente entre muchos otros. Este hecho es un claro potencial para los biocatalizadores inmovilizados, ya que puede emplearse esta propiedad en la construcción de los denominados electrodos enzimáticos con aplicación en el campo de los análisis clínicos como químicos.

Desafortunadamente en la actualidad sólo se cuenta con electrodos que pueden detectar muy pocas especies como es el caso de los siguientes iones;  $H^+$ ,  $NH_4^+$ , y de algunos elementos, como  $O_2$  y  $CO_2$ , pero no pueden detectar moléculas más complejas como aminoácidos. En relación a esto es que surge una revolucionaria idea, que consiste en tratar de acoplar a un electrodo de este tipo una enzima inmovilizada. Es decir el electrodo es cubierto por una fina película polimérica, que contiene la enzima, de manera que ésta pueda transformar un determinado compuesto a una especie que pueda ser directamente medida por el electrodo. Un ejemplo es el uso de la enzima L-aminoácido oxidasa, que produce un ión amonio por cada molécula que oxide de un L-aminoácido. Esta enzima fue acoplada a un electrodo enzimático, que puede ser probado directamente en muestras que contengan moléculas de L-aminoácidos. Este principio puede ser generalizado con el fin de aplicarse en la identificación de otros compuestos como glucosa y otros azúcares, fenoles, organofosfatos, urea, colesterol, penicilina, etc.

Las enzimas inmovilizadas también presentan aplicabilidad en el campo de la medicina, principalmente en la remoción de compuestos indeseables contenidos en la sangre. Esto puede lograrse ya sea administrando enzimas inmovilizadas dentro del cuerpo humano o usando varios dispositivos extracorporales. En el primer caso tenemos la utilización de la asparginasa inmovilizada por microencapsulación (con el fin de prevenir degradaciones proteolíticas así como reacciones inmunológicas) ésta es inyectada intraperitonealmente para el trata-

miento de la leucemia. Tal tratamiento se basa en la habilidad de la enzima para degradar la aspargina, ya que este aminoácido es más requerido por las células cancerosas que por las células normales.

Un ejemplo muy prometedor para el uso de enzimas inmovilizadas es en los tratamientos terapéuticos extracorporales. Específicamente en el caso de pacientes que necesitan pasar su sangre a través de un riñón artificial o por una bomba oxigenadora; en donde se tiene que heparinizar la sangre con el fin de evitar que ésta se coagule dentro del equipo. Posteriormente se debe quitar la heparina, antes de que sea reincorporada la sangre al organismo, ya que de no hacerlo se tendrían complicaciones de tipo hemorrágico. Este problema puede resolverse con el uso de un filtro de sangre conteniendo la enzima heparinasa inmovilizada, la cual puede degradar en un 99% la actividad anticoagulante de la heparina.

A continuación se presentan algunas tablas con el fin de dar un panorama más concreto de las aplicaciones de las enzimas y células microbianas inmovilizadas. Además se presenta un breve resumen en la tabla 2.4. de biocatalizadores que han sido empleados con fines comerciales.

Tabla 2.1 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas en procesos químicos.

Reacción catalítica	Enzima inmovilizada	Proceso químico
Oxido-reducción	L-aminoácido oxidasa	producción de D-aminoácidos
	$\beta$ -tirosinasa	producción de L-tirosina
	Flavoproteínas	oxidación de drogas que contengan grupos amino
Transferencia de grupos	Dextran sacarasa	producción de fructosa rica en dextranas
	Polinucleótido-fosforilasa	producción de polinucleótidos
Hidrólisis	$\alpha$ -amilasa	producción de glucosa
	glucoamilasa	producción de glucosa
	celulasa	producción de glucosa
	invertasa	producción de azúcar invertida
	aminoacilasa	resolución óptica de DL-aminoácidos
	papaina	hidrólisis de caseína
	penicilino-amidasa	producción del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).
Isomerización	glucosa isomerasa	producción de fructosa.
Referencia (9)		



Tabla 2.2. Ejemplos de electrodos enzimáticos.

Enzima inmovilizada	Substancia detectada	Electrodo empleado
Método de gel de poliacrilamida		
L-aminoácido oxidasa	L-fenilalanina	electrodo de amonio
Glucosa oxidasa	glucosa	electrodo de oxígeno
Ureasa	urea	electrodo catiónico monovalente.
Penicilinasas	penicilina	electrodo de vidrio
Método de membrana de colágena		
Catalasa	$H_2O_2$	electrodo de oxígeno
Alcohol dehidrogenasa	etanol	electrodo de platino
Lactato dehidrogenasa	ácido láctico	electrodo de platino
Colesterol oxidasa	colecsterol	electrodo de oxígeno
Invertasa-glucosa oxidasa	sacarosa	electrodo de oxígeno

Referencia (9)

Tabla 2.3. Producción de compuestos orgánicos por células microbianas inmovilizadas.

Reacción catalítica	Sistema enzimático	Microorganismo inmovilizado	Producto
Hidrólisis	$\beta$ -galactosidasa	<u>Lactobacillus bulgaricus</u>	D-glucosa y D-galactosa
	invertasa	<u>Saccharomyces pastorianus</u>	D-glucosa y D-fructosa
	penicilino-amidasa	<u>Escherichia coli</u>	6-APA
	esteroide - hidrolasa	<u>Curvularia lunata</u>	cortisol
	aminoacilasa	<u>Aspergillus ochraceus</u>	L-metionina
Síntesis	penicilino-amidasa	<u>Bacillus megaterium</u>	penicilina
	cefalosporina-amidasa	<u>Achromobacter sp.</u>	cefalosporina
	triptofano sintetasa	<u>Escherichia coli</u>	L-triptofano
Reacciones liasa	fumarasa	<u>Brevibacterium Ammoniaenes</u>	ácido L-málico
	aspartasa	<u>Escherichia coli</u>	ácido L-aspártico
	L-histidina amonia liasa	<u>Achromobacter liquidum</u>	ácido urocónico
Isomerización	glucosa-isomerasa	<u>Bacillus coagulans</u>	D-fructosa
		<u>Streptomyces griseus</u>	
		<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>	
		<u>Actinomyces sp.</u>	
Sistemas multienzimáticos		<u>Brevibacterium ammoniaenes</u>	coenzima A
		<u>Corynebacterium glutamicum</u>	ácido L-glutámico
		<u>Arthrobacter oxydans</u>	ácido láctico

Tabla 2.4. Ejemplos de biocatalizadores inmovilizados empleados con fines comerciales.

Enzima	Métodos de inmovilización	Tipo de reactor	Modo de operación	Compañía	Fecha de inicio
Aminoacilasa	adsorción	lecho empacado	continuo	Tanabe Seiyaku	1969
Aspartasa*	atrapamiento	lecho empacado	continuo	Tanabe Seiyaku	1973
Fumarasa*	atrapamiento	lecho empacado	continuo	Tanabe Seiyaku	1974
Glucosa-isomerasa	adsorción	lecho empacado	continuo	Clinton Corn	1972
	unión covalente	tanque agitado	lote	Novo	1974
Lactasa	unión covalente	lecho empacado	continuo	Novo	1975
		tanque agitado	lote	Snam Progetti	1977
Penicilino-amidasa	adsorción	tanque agitado	lote	Squibb	1966
	unión covalente	tanque agitado	lote	Astra	1973
	unión covalente	tanque agitado	lote	Beecham	1974
Esteroides-dehidrogenasa*	tratamiento con calor	lecho empacado	continuo	Snam Progetti	1975
		_____	_____	Squibb	1964

\*células inmovilizadas.

Referencia (37).

## 2.3. Métodos de inmovilización.

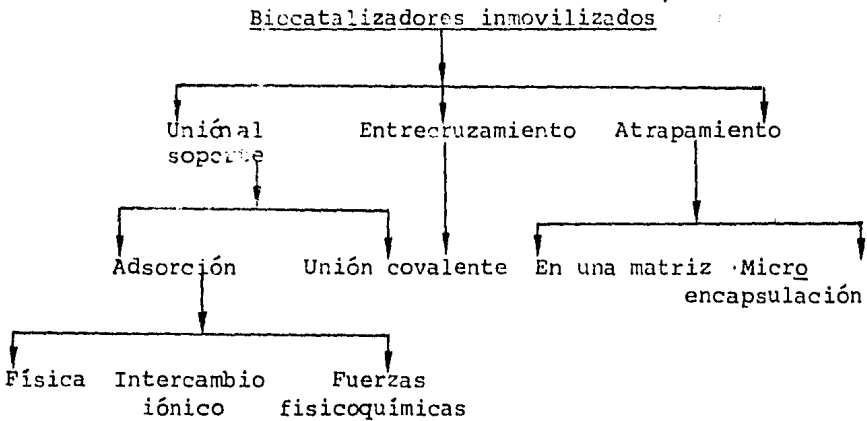
### 2.3.1. Introducción.

La inmovilización de enzimas así como de células microbianas puede definirse como "enzimas ó células físicamente confinadas ó localizadas en una cierta región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y que pueden ser usadas repetidamente ó continuamente" ( 9 ).

De acuerdo a la clasificación dada por Chibata (9) encontramos a los diferentes métodos de inmovilización agrupados dentro de tres categorías:

- 1) Unión al soporte
- 2) Entrecruzamiento
- 3) Atrapamiento

Que a su vez pueden ser subdivididas en la siguiente forma:



Cada uno de los anteriores casos se ejemplifica en la figura No. 2.1.

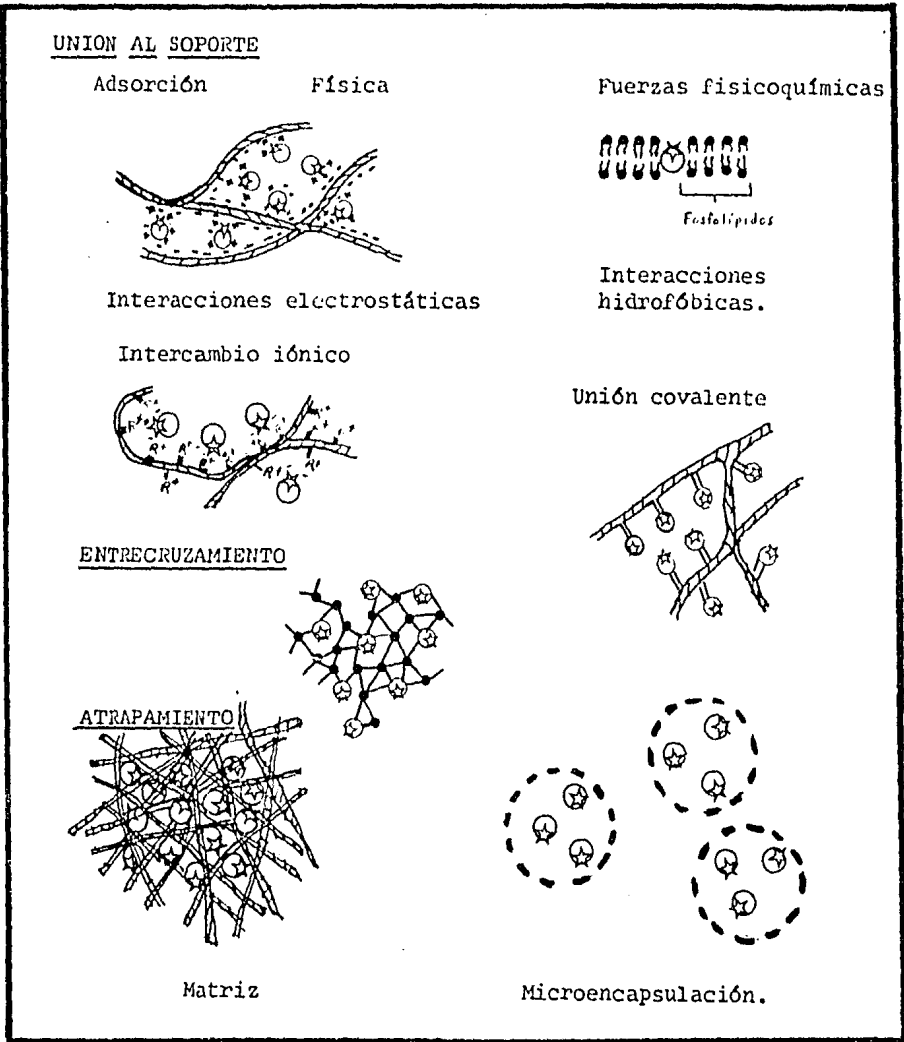


Figura 2.1. Representación esquemática de las diferentes técnicas de inmovilización.

### 2.3.2. Descripción de los métodos de inmovilización.

Tres son las técnicas más comúnmente empleadas para la inmovilización de células microbianas: 1) adsorción, 2) atrapamiento y 3) unión covalente. Los mecanismos de cada una de las anteriores técnicas son bastante diferentes entre sí, aunque se pueden citar de manera general los siguientes mecanismos responsables de cada caso:

1. Interacciones electrostáticas entre células con carga y soportes cargados.
2. Formación de uniones iónicas entre grupos amino ( $\text{NH}_2^+$ ) y carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) presentes en la superficie de la célula y grupos reactivos de la superficie del soporte.
3. Formación de uniones covalentes parciales entre los grupos amino presentes en la superficie de las células y grupos hidroxilo (silinoles disociados) en la superficie del soporte. Esto sucede cuando se emplean soportes de vidrio o cerámica.
4. Atrapamiento físico, donde los poros del soporte son demasiado pequeños en comparación con el tamaño de las células microbianas, impidiendo que éstas se liberen ya que quedan retenidas en el interior del soporte.
5. Formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos presentes en la superficie de las células y los grupos específicos que son colocados sobre la superficie del soporte.

En la tabla 2.5., se resumen las técnicas de inmovilización, señalando los factores que afectan en la inmovilización, el tipo de soporte empleado, el agente químico empleado para efectuar la unión, el tipo de mecanismo que le corresponde, así como las ventajas y limitaciones de la técnica.

La reacción básica en la técnica de adsorción, es la interacción electrostática entre las cargas del soporte y las células. Esta es la técnica más simple de todas, ya que consiste en poner en contacto al mismo tiempo el adsorbente y la solución que contiene las células del microorganismo que se desea inmovilizar, teniendo presente que la edad de las células es importante ya que conforme cambia ésta, se tienen cambios en la carga superficial de la célula, además que la

adsorción depende también del pH en que se efectuó el proceso.

Tabla 2.5. Técnicas de inmovilización para células microbianas.

Técnica de inmovilización	Factores que afectan la inmovilización, soporte, agente químico enlazante	Mecanismo	Ventajas y limitaciones
ADSORCION	Propiedades de la célula	Interacciones electrostáticas entre el soporte y la superficie celular.	simple/ depende del pH
	Comp. pared celular Carga Edad		
ATRAPAMIENTO	Propiedades de el soporte	Atrapamiento /difusión del sustrato. /disgregación del gel por la presencia de iones fosfato. /toxicidad	
	Composición Carga superficial Area superficial pH		
UNION COVALENTE	Agar Alginato Carragenina Polímeros sintéticos	Polimerización por radicales libres. Formación de uniones covalentes.	/toxicidad
	Acrilamida		
	Isocianato Amino silano Glutaraldehído Carbodiimida		

Referencia (34).

El atrapamiento es una de las técnicas más extensamente investigada en la inmovilización de células.

El principio de esta forma de inmovilización, es la inclusión de las células microbianas dentro de una red polimérica, con el fin de impedir la salida de las células al medio de reacción.

Existen diferentes formas para conseguir la construcción de los enrejados o entrecruzamientos poliméricos y son: 1) uniones secundarias no específicas, 2) uniones iónicas, 3) uniones covalentes heteropolares y 4) uniones covalentes homopolares. A su vez estos mecanismos para formar las redes poliméricas pueden clasificarse en:

- \* precipitación
- \* gelación por intercambio iónico
- \* policondensación
- \* polimerización

Atrapamiento por precipitación.

La precipitación del material que será empleado como soporte, se logra mediante cambios en las condiciones en que el polímero se encuentra en forma soluble. Tales condiciones pueden ser; temperatura, salinidad, pH y el disolvente. Algunos ejemplos se dan a continuación en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Polímeros que forman su estructura reticulada por precipitación.

Parámetros que se modifican para obtener la precipitación	Ejemplos
Temperatura	Carragenina Colágena Agar
Salinidad	Carragenina Alginatos
pH	Eudragit <sup>R</sup>
Disolvente	Triacetato de celulosa

R= marca comercial



En el caso de Eudragit<sup>R</sup> consiste en un polímero sintético, que presenta características polielectrolíticas, por lo que su formación de gel se debe a cambios en el pH y al disolvente.

La precipitación permite la construcción del enrejado debido a que las cadenas lineales del polímero se entrecruzan, además que las redes formadas están constituidas por fuerzas secundarias que permiten que la reticulación sea reversible.

Atrapamiento por la formación de un enrejado iónico.

La formación de tales redes, se debe a que el entrecruzamiento del polímero, se establece por medio de enlaces iónicos entre los polielectrolitos lineales y especies multivalentes. Las propiedades del enrejado pueden ser notablemente mejoradas cuando el gel formado se somete a una etapa de secado. El diagrama del proceso se indica en la figura 2.2.

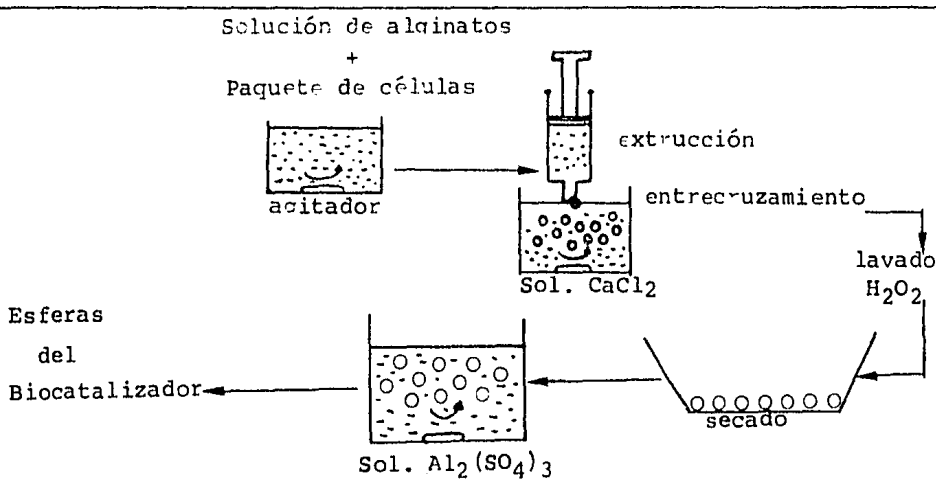


Fig. 2.2. Esquema sobre el proceso para atrapar células completas por formación de enrejados iónicos.

Este procedimiento también es de carácter reversible, la limitante del proceso es que el biocatalizador obtenido no puede ser usado en sistemas que contengan iones en disolución, especialmente fosfatos ya que originan la disgregación del biocatalizador.

#### Atrapamiento por policondensación.

Las reacciones de policondensación fueron principalmente usadas para la obtención de polímeros sintéticos, sin embargo en la inmovilización de especies biológicas dicho procedimiento se había evitado ya que resultaba tóxico para la célula. Sin embargo con la información dada por Klein (32) se tiene que presenta la alternativa de trabajar con una resina epoxy la cual puede ser condensada con un agente polifuncional, lo cual no afecta las condiciones fisiológicas de las células en estado viable al inmovilizarlas. En su trabajo describe la obtención de partículas fuertes, elásticas, porosas y con una buena capacidad de atrapamiento. La reticulación es irreversible y además el soporte resulta ser inerte. Todo esto indica que este tratamiento puede ser prometedor en el caso de sistemas que requieren de células viables.

#### Atrapamiento por polimerización.

En este caso el material más empleado para tal fin es la acrilamida. El procedimiento consiste en colocar las células microbianas en una solución salina, junto con pequeñas proporciones del monómero de acrilamida y bismetilacrilamida. El mecanismo de la reacción es por radicales libres. La polimerización se efectúa en 15 minutos a 25°C. El inconveniente de esto, es que son agentes tóxicos para la célula y pueden dañar severamente la actividad catalítica. De ahí la importancia de seguir realizando investigaciones que permitan reducir los efectos adversos.

Como ya se indicó, existe una amplia variedad de técnicas para inmovilizar por atrapamiento células microbianas, por lo que es conveniente tener presente las propiedades de cada una, con el fin de seleccionar la más conveniente en relación a nuestras necesidades.

Las propiedades que deben considerarse en la selección de una técnica de inmovilización pueden ser resumidas como ha continuación se indica:

	Propiedades mecánicas	Propiedades químicas
a) Preparación	control de la geometría	toxicidad
b) Estabilidad	compresión agitación	pH composición iónica
c) Funcionamiento	modo de operación del reactor.	permeabilidad

Observando las propiedades mecánicas se puede decir que la mayoría de los sistemas descritos cumplen con el control de la geometría y de la forma; ya que se pueden obtener biocatalizadores en forma esférica, en película, en fibras, etc. En cuanto a las propiedades químicas si es relevante tener presente la toxicidad de los reactivos que intervienen en la formación del entrecruzamiento, así como los parámetros que pueden alterar la estabilidad del biocatalizador como el pH, la presencia de ciertos iones o la misma fuerza iónica, como en el caso de los enrejados constituidos por interacciones iónicas.

La técnica de unión covalente es bastante diferente a las técnicas de absorción y atrapamiento; ya que se basa en la formación de un enlace covalente entre un soporte previamente activado y las células microbianas. Dentro de los agentes químicos más utilizados en la activación de los soportes tenemos: aminosilano, isocianato, carbodimida y el glutaraldehído; los cuales permiten colocar un grupo específico sobre la superficie del soporte que posteriormente reacciona con los grupos reactivos presentes en la célula. Esta técnica no es muy utilizada en la inmovilización de células, debido a que los agentes químicos empleados causan daños severos en la actividad catalítica.

En la tabla 2.7., se da una comparación de las diferentes técnicas de inmovilización que pueden emplearse tanto para enzimas como para células microbianas.

Tabla 2.7. Comparación de las diferentes técnicas de inmovilización.

Característica	Adsorción física	Enlace iónico	Unión covalente	Entrecruzamiento	Atrapamiento
Preparación	fácil	fácil	difícil	difícil	difícil
Actividad enzimática	baja	alta	alta	moderada	alta
Especificidad al sustrato	no cambia	no cambia	cambia	cambia	no cambia
Fuerza de unión	débil	moderada	fuerte	fuerte	fuerte
Regeneración del soporte	posible	posible	imposible	imposible	imposible
Aplicabilidad en general en diferentes enzimas	baja	moderada	moderada	baja	alta
Costo de la inmovilización	bajo	bajo	alto	moderado	bajo

Referencia (9)

## 2.4. Soportes.

### 2.4.1. Introducción.

Desde hace más de 15 años, se han reportado una gran cantidad de soportes que se han utilizado en las técnicas de inmovilización. Sin embargo es necesario preguntarnos, de toda esa riqueza de materiales ¿cuáles son los materiales apropiados para ser utilizados como soportes? además ¿sí efectivamente dichos materiales estudiados corresponden a un soporte "ideal"? Es por ello que el presente capítulo tiene por objetivo dar una serie de criterios, que nos permitan efectuar una adecuada elección o en última instancia utilizar aquel material que cumpla con las necesidades más críticas para obtener un buen biocatalizador. (42)

En primer lugar un soporte deberá ser durable bajo las condiciones en que se use. En otras palabras, la solubilidad del soporte tendrá que ser muy baja en relación al medio ambiente en que se operará. Esto no implica que el soporte tenga que ser insoluble bajo todas las condiciones en las que se pueda emplear, sino sólo en aquellas que sean dictadas por el tipo de reacción enzimática en el que interactuará, es decir; pH, fuerza iónica, temperatura, etc.

En forma general, un soporte deberá cumplir con los siguientes puntos:

- a) Buena capacidad de atrapamiento, o una elevada disponibilidad de área superficial, que permita una considerable retención ó unión de las células inmovilizadas.
- b) Durabilidad química respecto a las condiciones ambientales en donde se efectuará la reacción enzimática (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.)
- c) Estabilidad dimensional y fuerza mecánica, con el fin de prevenir la compactación del soporte, así como que permita mantener su configuración.
- d) Resistencia a la degradación microbiológica, los soportes ricos en fuentes de carbono como el almidón, ó ricos en fuentes de nitrógeno como las proteínas son potencialmente buenos nutrientes para los microorganismos.

- e) Estabilidad térmica, ya que los materiales que poseen grandes coeficientes de expansión presentan problemas, debido a que al expandirse o contraerse por cambios de temperatura permiten la liberación de las enzimas o de las células. Esto puede ocurrir durante la misma inmovilización o durante las condiciones de operación del bioreactor.
- f) Forma y tamaño de partícula, estas dos características tienen su máxima importancia con respecto a la operación de los reactores. Ya que en el caso de partículas muy grandes se tienen problemas de difusión, por lo que la actividad enzimática se ve disminuida en comparación a la que se obtiene en los sistemas libres, sin embargo se disminuye considerablemente las caídas de presión, lo que se ve favorecido al emplearse partículas pequeñas.
- g) Regeneración del soporte, los soportes que son más fácilmente regenerables son los inorgánicos, ya que pueden ser sometidos a un simple proceso de pirólisis, siendo fácil y económico de realizarse. Los soportes orgánicos principalmente los de origen natural, no son regenerables y en el caso de encontrar un proceso que lo permita, resulta económicamente incosteable.
- h) Fácil adquisición del material.

#### 2.4.2. Clasificación de los soportes en base a su naturaleza.

Los soportes pueden ser divididos dentro de dos categorías orgánicos e inorgánicos (42). Los orgánicos a su vez pueden ser subdivididos en: polisacáridos, proteínas y polímeros sintéticos. Los polisacáridos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de subunidad que constituye su cadena. Es decir los de tipo celulósico, los formados por dextranas y los formados por unidades de agarosa. Los polímeros sintéticos se subdividen en polímeros de acrilamida, copolímeros del fenol, y formaldehído (resinas fenólicas) y finalmente copolímeros del estireno y del divinilbenceno.

Los materiales inorgánicos comprenden varios óxidos y sus combinaciones exhiben una alta termoestabilidad y buenas propiedades de fluido. En solución su superficie se hidroliza, y forma grupos hidro

xilo que pueden reaccionar directamente con los grupos carboxilo ó amino presentes en la superficie de las células. Esta reacción ocurre sobre todas las superficies de los materiales inorgánicos y se les denomina soportes no mezclados. Los soportes inorgánicos mezclados, son combinaciones con agentes químicos, que les proporcionan grupos de enlace covalente. Esta primera clasificación en base a la naturaleza del soporte se resume en la tabla 2.8.

#### 2.4.3. Morfología y configuración de los soportes.

En la clasificación anterior no se hace gran referencia sobre la morfología de los materiales. Siendo un parámetro de importancia en relación a que está asociado a el área superficial y al tamaño de poro, ya que de ellos depende la cantidad o carga de las células que pueden ser inmovilizadas. A continuación se da un reclasificación de los soportes:

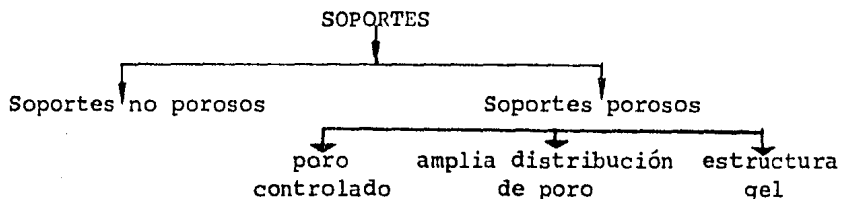
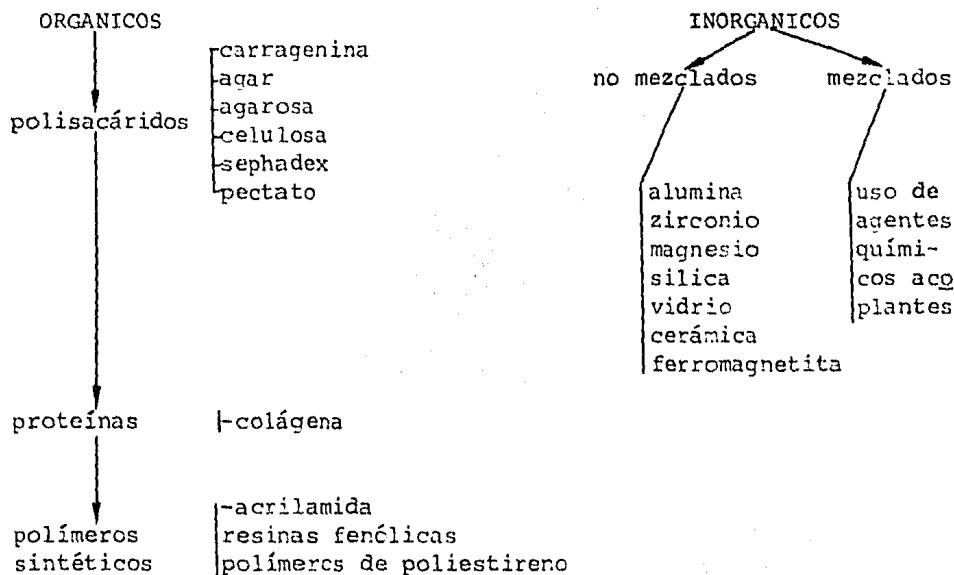


Tabla 2.8. Clasificación de los soportes de acuerdo a su naturaleza.

## SOPORTES



Referencia (35)



Los soportes no porosos presentan una gran desventaja en su uso, debido a que su área superficial es extramadamente baja, dando lugar a que la superficie disponible para la unión con las células sea muy limitada. Los materiales pertenecientes a este grupo son partículas muy finas o fibras. Esto dificulta su separación en las mezclas de reacción, además que no pueden ser empleados en reactores continuos ya que provocan altas caídas de presión y limitan la velocidad de fluido.

Dentro de los materiales no porosos, que ofrecen ventajas en su utilización se encuentra el nylon, que es utilizado en medicina ya que no causa respuestas inmunológicas, y en éste caso solo se han inmovilizado enzimas, dando buenos resultados ya que la enzima queda superficialmente unida, lo que permite un contacto inmediato con la solución evitando los problemas difusionales.

En el grupo de los soportes porosos encontramos materiales de naturaleza orgánica e inorgánica, así como naturales y sintéticos. Los soportes de poro controlado son adquiridos en el mercado, ya que son materiales macroreticulados de poliestireno, fabricados principalmente por Rhom and Hass Company. En el caso de soportes inorgánicos de poro controlado se tiene el vidrio, titanio y alumina.

Existen muchos soportes de amplia distribución de poro; frecuentemente son empleados como catalizadores pero de reacciones químicas no biológicas, un ejemplo de esto es el aluminio.

Los soportes porosos presentan una alta área superficial interna por lo que en muchas ocasiones la unión deberá realizarse dentro de la estructura del soporte. Esto es un inconveniente en el caso de emplear sustratos más grandes que las células mismas, impidiendo de esta forma el paso de las moléculas del sustrato, o solo tendrán acceso por aquellos poros que presenten un mayor tamaño, de ahí que no todas las células inmovilizadas puedan reaccionar. Otro punto es el microambiente, ya que si el poro se encuentra cargado negativamente y el sustrato también, éste origina que el sustrato sea repelido.

Las ventajas de los materiales porosos son:

- 1° Presentan una alta área superficial.
- 2° Las uniones en la parte interna del soporte, están más protegidas de los medios ambientes turbulentos.
- 3° Si el soporte presenta cargas opuestas a las moléculas del sustrato, se favorece que la reacción se lleve a cabo más rápidamente, ya que se tiene una alta atracción por el sustrato.

Los soportes clasificados como estructura gel son empleados por la técnica de atrapamiento, la cual se explicó anteriormente y en donde se expuso detalladamente los mecanismos para conseguir formar la matriz del gel.

Estos soportes permiten inmovilizar grandes cantidades de células sin que se vean limitados por el área superficial. Su desventaja son los problemas difusionales, además de que solo se podrán emplear sustratos de pesos moleculares bajos.

## 2.5. Generalidades de la enzima penicilino amidasa.

### 2.5.1. Introducción.

La importancia de la enzima penicilino amidasa se debe a que puede hidrolizar la molécula de la bencilpenicilina ó penicilina G, para dar como productos el ácido 6-aminopenicilánico y el ácido fenilacético (Fig. 2.3.)

El ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), es un sistema de anillos lactama-tiazolidina, y su importancia se debe a que puede ser empleado como materia prima para la producción de las "penicilinas semi-sintéticas". Este ácido era anteriormente obtenido por procesos fermentativos, sin embargo dada la dificultad en su separación y purificación, y a que se obtenían bajos rendimientos, el proceso resultó incosteable siendo sustituido por la hidrólisis vía química o enzimática de las penicilinas naturales.

La conversión de las penicilinas naturales a ácido 6-aminopenicilánico por vía enzimática, se ha probado usando células completas de bacterias, hongos levaduras, extractos libres de células, enzimas purificadas, enzimas inmovilizadas, células microbianas inmovilizadas, sobrenadantes de organismos que producen la enzima extracelularmente (49).

Existen numerosos trabajos en los que se ha estudiado la posibilidad de emplear algunas de las modalidades anteriores; pero en este caso se emplearán las células completas del microorganismo productor que corresponden a las células de Escherichia coli ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa, ya que se cuenta con estudios previos sobre esta bacteria en su forma libre e inmovilizada, realizados por el grupo de investigación en donde se efectuó el presente trabajo.

### 2.5.2. Propiedades de la enzima penicilino amidasa.

Esta enzima ha sido denominada de diferentes formas por varios investigadores; penicilino amidasa, penicilino acilasa, aminohidrolasa.

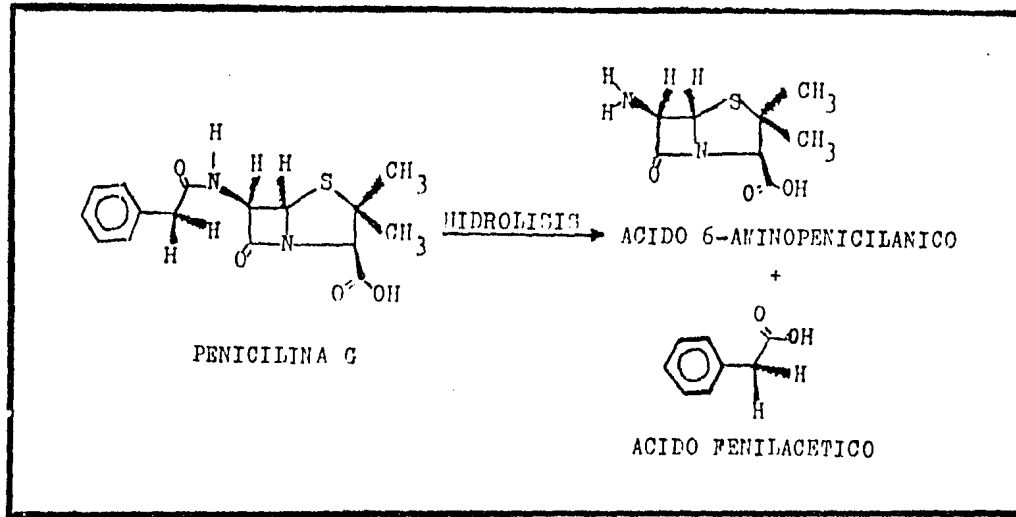


Figura.2.3. Reacción de hidrólisis de la penicilina G por la enzima penicilino amidasa.

acetiltransferasa y deacilasa. Dependiendo de las condiciones experimentales particulares y de los resultados corresponde la forma en que se le denomina. Sin embargo la comisión internacional de enzimas la denominó penicilino amidasa (E.C. 3.5.1.11.)

La enzima penicilino amidasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, ya que muchos microorganismos incluyendo tanto bacterias como hongos pueden producirla y en algunos casos actinomicetos y tejidos vegetales. Su localización es indistinta de su origen ya que se puede encontrar intra ó extracelularmente. Existen dos tipos diferentes de la enzima penicilino amidasa; las provenientes de hongos en donde se observa una gran afinidad por la fenoximetilpenicilina, mientras que las provenientes de bacterias presentan una mayor afinidad por la bencilpenicilina.

Las especies de hongos productores de la enzima son; Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Cryptococcus, Emericellopsis, Epicoccum, Epidermophyton, Fusarium, Mucor, Penicillium, Phoma, Trichoderma, Trichophyton y Trichosporon. Las especies productoras de las bacterias corresponden a: Aerobacter, Alcaligenes, Bordetella, Cellulomonas, Corynebacterium, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus, Nocardia, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Sarcina, y Xanthomonas. En la tabla 2.9., se muestran los microorganismos productores, indicando la afinidad que presentan y la localización de la enzima en la célula. Gran parte de las investigaciones realizadas sobre la enzima penicilino amidasa las efectuó Hamilton-Miller (23) y sobre los microorganismos productores las realizó Cole (11).

### 2.5.3. Características fisicoquímicas de la enzima penicilino amidasa.

De acuerdo a diferentes trabajos realizados sobre purificación y cristalización de la enzima penicilino amidasa, se puede decir que ésta tiene un peso molecular que oscila entre 50,000 y 70,000 daltones, para diferentes métodos de purificación y determinación del peso molecular (36).

La penicilino amidasa proveniente de *E. coli* ATCC 11105, fue purificada y cristalizada por Kutzbach y Rausenbusch (36), presenta un peso molecular de aproximadamente 70,000 daltones; pero si se encuentra en una solución al 1% de dodecil sulfato de sodio ésta se disocia reversiblemente en unidades de peso molecular de 20,500 daltones.

Se ha encontrado que la enzima purificada de *E. coli* tiene varias especies activas, que se distinguen por su comportamiento electroforético presentando dos puntos isoeléctricos de 6.7 a 6.8 y de 6.3 a 6.4 (49).

La energía de activación del rompimiento hidrolítico de la benzilpenicilina por la penicilino amidasa procedente de *E. coli* es de 11.4 Kcal/mol (48). El pH donde presenta una actividad enzimática máxima es entre 8.0 y 8.2 (36). La temperatura óptima depende del origen de la enzima, por lo que se puede esperar variaciones de temperatura que oscilen entre los 20°C a 55°C (48). La temperatura óptima puede sufrir variaciones dependiendo del estado en que se encuentre la enzima, como sería el caso de utilizar la enzima penicilino amidasa dentro de las células completas de *E. coli* ó como la enzima extraída y purificada, ya sea empleando ambos sistemas en su forma libre ó inmovilizada.

Tabla 2.9. Microorganismos productores de bencilpenicilino amidasa.

Microorganismo	Tipo de penicilina que hidroliza o sintetiza	Observaciones
<u>E. coli</u> ATCC 9637 (O-NCIB 3666)	Penicilina G-2-hidroxi penicilina G (síntesis)	Reacción reversible, enzima unida a la pared celular.
<u>E. coli</u> ATCC 11105 (O-NCIB 6878)	Penicilina G-2-hidroxi penicilina G (síntesis)	Enzima unida a la célula.
<u>E. coli</u> x G3A9455	Penicilina G, V, Ampicilina	Uso de las bacterias completas
<u>E. coli</u> aislada en clínica NCIB-7641 8742 y 8744	Penicilina G y Ampicilina	
<u>Alcaligenes faecalis</u>	Penicilina G, V, K, fenacitilina, ampicilina	Enzima intracelular
<u>Protéus rettgeri</u> FD 13424, ATCC 9919 ATCC 9250	Penicilina G, V, K, y otras penicilinas	Enzima intracelular
<u>Nocardia</u> FD 469, ATCC 13635	Penicilina G, X, Y y otras incluyendo amidas de penicilinas	
<u>Bacillus megaterium</u> ATCC 14945	Penicilina G n-fenilacetilamino ácidos	Enzima extracelular
<u>Micrococcus luteus</u> AHV 1427	Penicilina G	Enzima intracelular
<u>Micrococcus roseus</u>	Penicilina G	Enzima intracelular
<u>Kluyvera-citrophila</u>	Penicilina G	Enzima intracelular

---

 Ref. (Cole 11).

## 2.6. Generalidades sobre el Agar.

El agar es una sustancia de naturaleza coloidal que se obtiene a partir de algas del género Gelidium y de otras agarofitas, pertenecientes todas ellas a las Rhodophytas (algas rojas). La obtención de dicha sustancia consiste en la recolección de las algas durante el verano, donde son sometidas a un proceso de blanqueo y posteriormente son tratadas durante el invierno de acuerdo al proceso ilustrado en la figura 2.4.

El agar es una mezcla de dos polisacáridos lineales, agarosa y agaro-pectina. Químicamente su composición consta principalmente de moléculas de galactosa, unidas en los carbonos C-1 y -3, y contiene de 0.3 a 3.7% de azufre en forma de sulfato (1 sulfato por 8 a 50 unidades de galactosa). Habitualmente, los iones sulfato están combinados con iones sodio, potasio, calcio y magnesio. Estas sales se cree son necesarias para la gelación, ya que el agar, cuando es transformado en su forma ácida a pH 2.0, no puede solidificar (46). La gelación depende, en parte, en la formación de los puentes de calcio entre los grupos sulfato y parte en la unión por medio de puentes de hidrógeno. La agaro-pectina contiene los grupos sulfato (y carboxilo) del agar, mientras que la agarosa es un polisacárido neutro (fig. 2.5). Aproximadamente el 90% de las moléculas de galactosa se encuentran en la forma D y el 10% en la forma L, estableciéndose una unión entre las moléculas que impide que los microorganismos lo degraden.

El agar es considerado como un gel hidrofílico, ya que permite contener hasta un 99.8% de agua por un 0.2% de agar manteniendo su consistencia. Su punto de solidificación es a los 42°C, pero en general se presenta a los 38°C. A una temperatura de 45°C mantiene un grado de fluidez que permite su entremezclamiento total y homogéneo con otras sustancias.



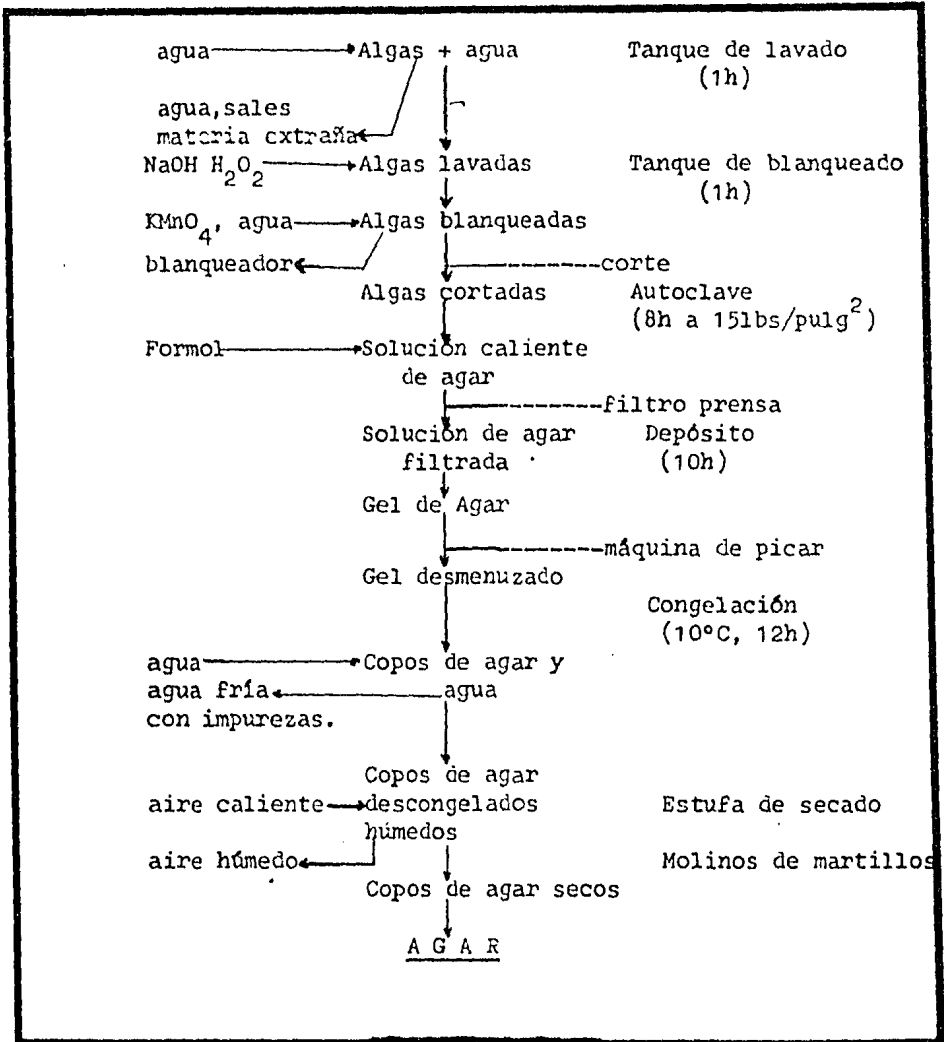


Figura 2.4. Diagrama del proceso de fabricación del Agar.

ESTRUCTURA QUIMICA DEL AGAR.

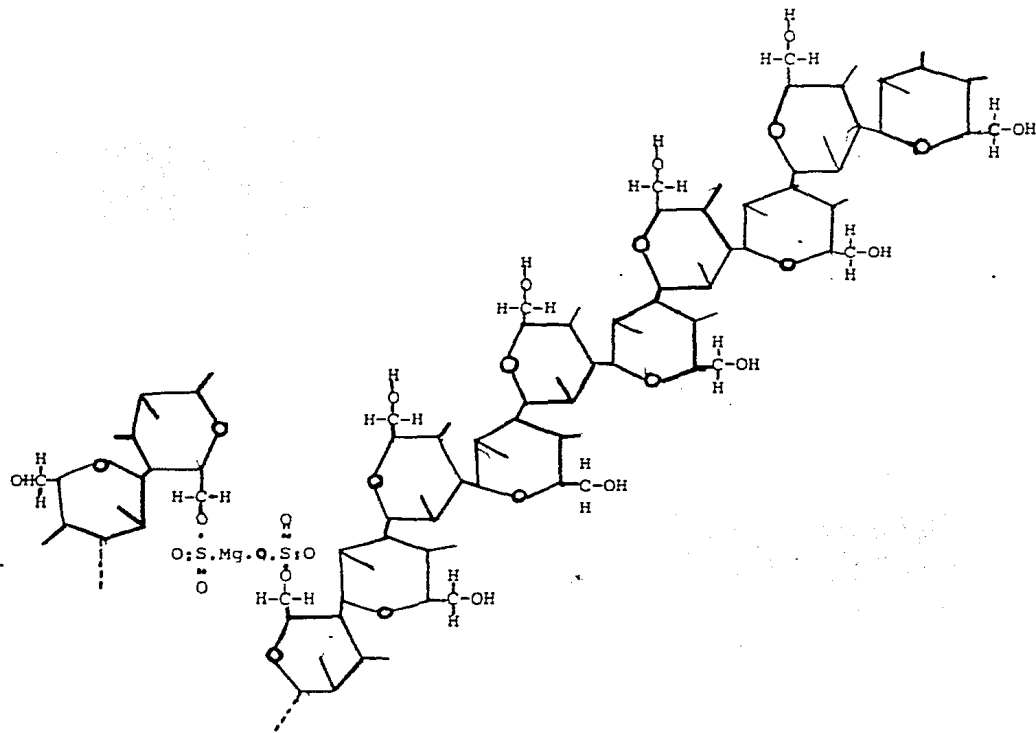


Figura 2.5. Esquema de la estructura química del Agar.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general.

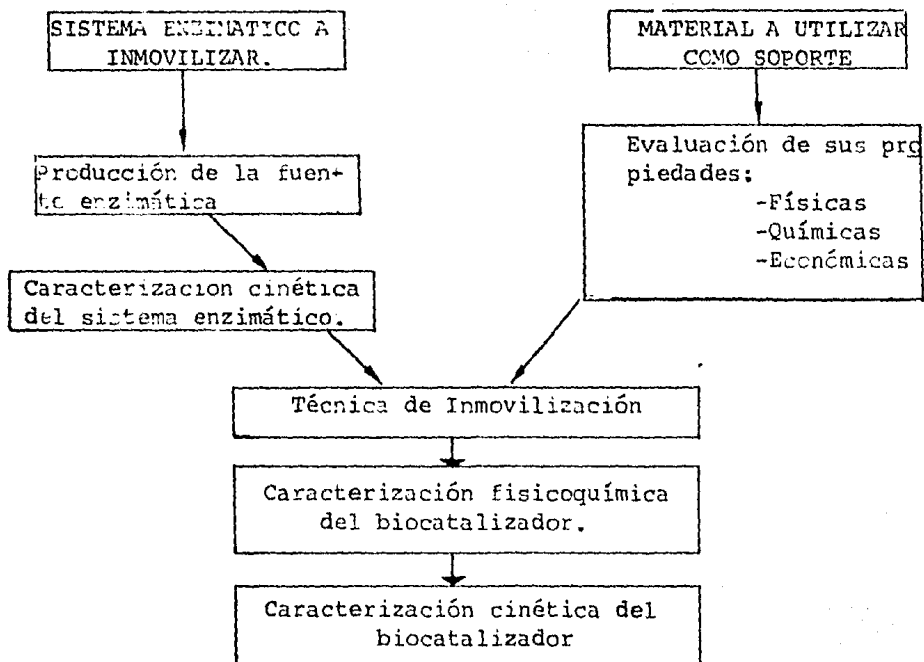
Desarrollar una metodología para la inmovilización por atrapamiento de células completas de Escherichia coli ATCC 9637, con actividad enzimática de penicilino amidasa, empleando como soporte Agar.

Objetivos parciales:

- Presentar el avance que ha tenido la tecnología enzimática en cuanto a su desarrollo en la inmovilización de enzimas y células microbianas.
- Producir células de Escherichia coli ATCC 9637, con actividad de penicilino amidasa.
- Caracterizar fisicoquímicamente el material propuesto como soporte.
- Establecer la técnica de inmovilización para atrapar las células de E. coli en la matriz polimérica del agar.
- Evaluación del perfil de pH y de temperatura de el sistema inmovilizado.
- Determinación de las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ .) del biocatalizador desarrollado.

## IV. Procedimiento experimental.

## 4.1. Estrategia de investigación.



Cada uno de los puntos indicados en el diagrama se tratarán por separado en la presente sección.

## 4.2. Aspectos del sistema enzimático a inmovilizar.

### 4.2.1. Producción de Escherichia coli ATCC 9637, con actividad enzimática de penicilino amidasa.

La producción de células de E. coli, dependiendo de la cantidad que se necesitara, se efectuó en matraces Fernbach de 2,500 ml de capacidad con la tercera parte de su volumen, o en un fermentador de 14 lts., New Brunswick Scientific Co. El medio de cultivo empleado para el crecimiento y producción de la enzima presenta la siguiente formulación:

Fuente de carbono .....	Acido fenilacético	2.0 g
Fuente de nitrógeno .....	NH <sub>4</sub> Cl	0.8 "
Sales requeridas .....	CaCl <sub>2</sub>	0.01 "
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.36 "
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.60 "
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 "
	FeSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.005 "
H <sub>2</sub> O destilada .....		1,000 ml

La formulación del medio y las condiciones de cultivo fueron establecidas por Casas ( 7 ).

El pH del medio de cultivo es ajustado a 7.4 antes de esterilizarlo, usando NaOH 0.1N. El medio se esteriliza a 15 lb/plg<sup>2</sup> de presión y a una temperatura de 121°C, durante 15 a 20 minutos.

#### a) Condiciones de fermentación:

Temperatura	29°C
tiempo	20-24 hrs.
pH (después de esterilizar)	7.2
agitación rotatoria	200 rpm

b) El inóculo corresponde a un 10% en volumen, de un cultivo crecido previamente durante 24 hrs., en el mismo medio de producción.

- c) Cosecha: Transcurrido el tiempo de crecimiento, las células fueron cosechadas empleando una centrífuga Sorvall Rc-5 refrigerada, utilizando un rotor GSA con seis compartimientos para botellas de 250 ml, a una velocidad de 10,000 rpm., durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante recolectando el paquete celular, éste es almacenado a 4°C.
- d) Control de la producción: A las 20 y 24 horas de crecimiento se toma una alícuota, con el fin de determinarle; D.O. (densidad óptica) a 560 nm, proteína y actividad enzimática.

#### 4.2.2. Medición de la actividad enzimática.

A continuación se definen algunos términos en los que se expresan generalmente la actividad de las enzimas, y que está relacionada con la velocidad de reacción que presentan ante una cantidad definida de sustrato. Las dos definiciones que se dan, están basadas en la idea de Unidad estandar de enzima, dada por la Comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (18).

Unidad (U).- Se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas.

Actividad específica.- Se expresa como unidades de enzima por miligramo de proteína.

La metodología para evaluar la actividad enzimática de la enzima penicilino amidasa consiste: en tomar 5 ml del medio de cultivo con células, que son centrifugadas a 3,000 rpm durante 30 minutos, decantando el sobrenadante. El paquete celular se resuspende en 1 ml de solución amortiguadora de fosfato 0.03M, pH8.0. De esta suspensión se toman 0.9 ml que se colocan en un tubo de ensaye, adicionando 0.1 ml de el sustrato que consiste en una solución de Penicilina G-potásica, a una concentración tal, que la mezcla de reacción presente una concentración final de 25 mM. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 30 minutos a una temperatura de 40°C. Transcu-

rrido este tiempo se toman 0.2 ml de la mezcla y se depositan en 4.8 ml de alcohol etílico absoluto, una vez parada la reacción, se adicionan 2.5 ml del reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído, centrifugándose toda la anterior mezcla a 3,000 rpm durante 10 minutos. Se separa el sobrenadante, dejándolo reposar 5 minutos más, de manera que se cumplan 15 minutos exactos desde la adición del reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído, hasta el momento en que se empiecen a realizar las mediciones colorimétricas del sobrenadante, a una longitud de onda de 415 nm. El equipo es calibrado a 0 de absorbancia ó 100% de transmitancia con un blanco de reactivos. (Fig. 4.1.)

La cuantificación del producto de la reacción, se efectúa por el método del p-dimetilaminobenzaldehído, en donde se tiene una reacción entre el p-dimetilaminobenzaldehído y el grupo amino del producto de hidrólisis (ácido 6-aminopenicilánico); ésto da lugar a la formación de una base de Schiff colorida, que se puede estimar cuantitativamente empleando un espectrofotómetro o un colorímetro a una longitud de onda de 415 nm, (ver técnicas analíticas Apéndice B).

La determinación de la actividad específica será igual; a la actividad enzimática cuantificada como micromoles de 6-APA producidos en 30 minutos a 40°C, pH 8.0, entre los miligramos de proteína cuantificados por la técnica colorimétrica de Lowry (Apéndice B).

#### 4.3. Aspectos del soporte.

##### 4.3.1. Introducción.

La metodología que se da para el estudio del material que será empleado como soporte, va encaminada a la evaluación de sus propiedades tanto físicas como químicas, además de considerar su aspecto económico.

Dentro de las propiedades físicas que deben tomarse en cuenta, en la evaluación de cualquier material que se quiera usar como soporte están: a) propiedades mecánicas (rigidez, dureza, durabilidad) b) estabilidad mecánica (compresión, agitación, fraccionamiento), c) estabilidad térmica y d) control de su geometría.



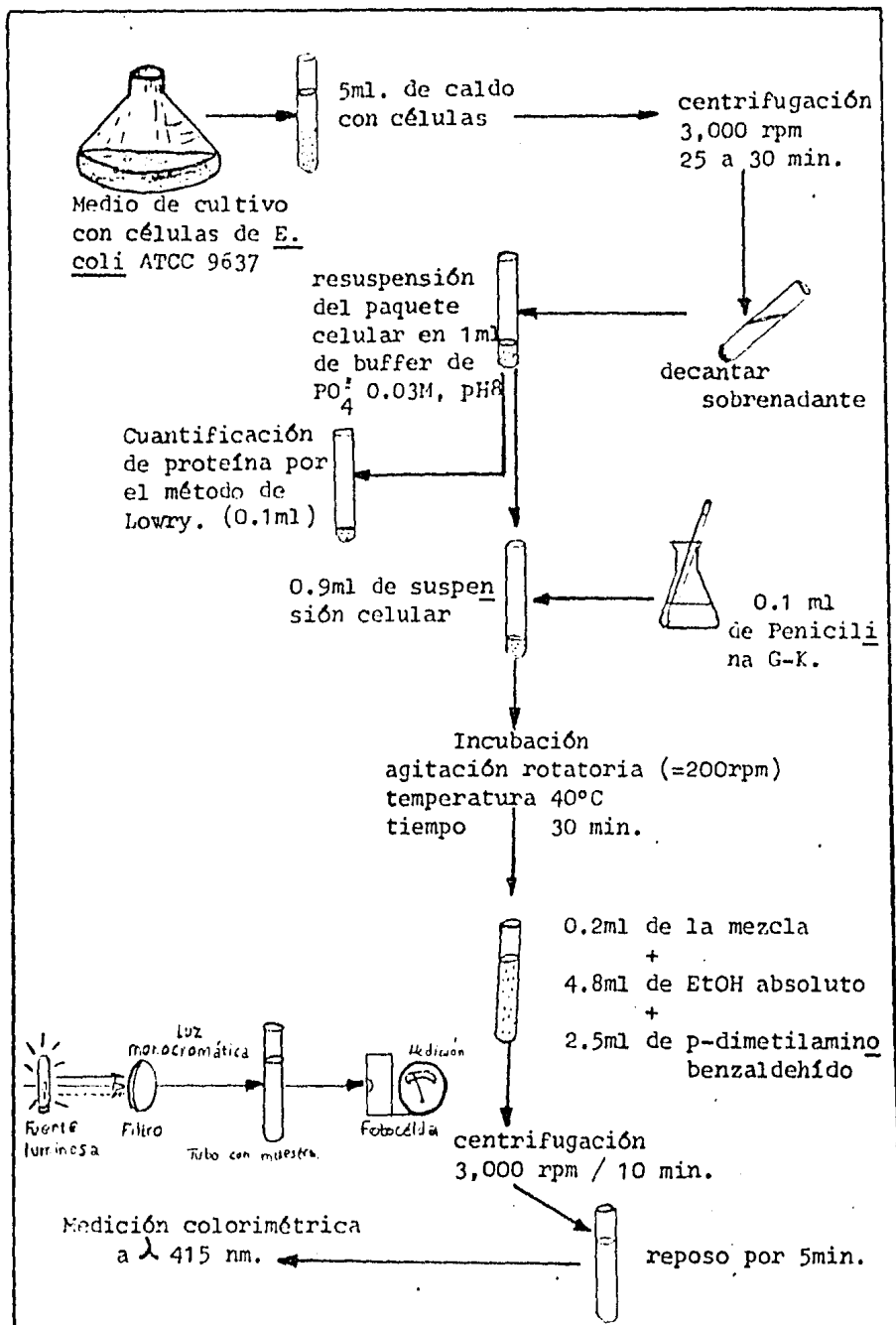


Fig.4.1. Diagrama para la medición de actividad enzimática de la enzima penicilino amidasa.

En las propiedades químicas tenemos: que el material no afecte la actividad enzimática durante la preparación del biocatalizador, así como que no altere su naturaleza durante y después de la inmovilización. Se pide que sea estable bajo las condiciones de reacción (fuerza iónica, pH, presencia de ciertos iones, en la presencia del sustrato y de los productos, etc.) Además que sea resistente al ataque de microorganismos.

En su aspecto económico su estudio se relaciona a el costo y disponibilidad en su adquisición.

En el estudio particular del agar tenemos que es un gel de armazón metaestable, ya que, presenta una elevada fase líquida; por lo que se le conoce como hidrogel. La formación de su enrejado polimérico se debe en gran parte a uniones de fuerzas secundarias como son los puentes de hidrógeno y algunas otras fuerzas de cohesión. De ahí la necesidad de evaluar sus propiedades mecánicas que en este caso solo será la fuerza del gel, es decir la resistencia del gel a la ruptura por la aplicación de una fuerza sobre su superficie.

#### 4.3.2. Metodología para la evaluación de la fuerza de gel.

La prueba de la resistencia a la ruptura del gel consiste en aplicar una determinada fuerza en su superficie, por medio de una barra de aluminio con las siguientes dimensiones;  $1\text{cm}^2$  de base por una longitud de 31 cm, ésta se encuentra sostenida por una pinza, que a su vez está sujeta a un soporte universal. En la parte superior de la barra se colocó una caja Petri de 8cm de diámetro con el fin de usarla como soporte para colocar pesas, las cuales actuarán como la fuerza que permitirá la fracturación o deformación del gel. La determinación deberá efectuarse a una misma temperatura, para evitar modificaciones. (Fig. 4.2.)

Una vez colocado el dispositivo la prueba consiste en poner el gel (que deberá tener una altura de 0.5 cm) en la parte inferior del émbolo. Estando la muestra en dicha posición se baja el émbolo, en el cual se ha depositado un determinado peso, en el momento en que

el émbolo hace contacto con el gel, se deja transcurrir un tiempo de 15 segundos: tiempo en el cual se observará detenidamente si el gel sufre algún deterioro, ya que empiece a frecuentarse o se rompa. En el caso de que el peso al cual se ha sometido la muestra no sea el suficiente para dañarlo, se procederá a aumentar el peso. De manera que la ruptura suceda dentro de los 15 segundos dados como marco de referencia.

La fuerza del gel se define como la resistencia del gel a su ruptura cuando se aplica una presión ( $\text{Kg/m}^2$ ) a temperatura constante (10). Esta propiedad puede verse afectada por factores como: concentración del agar para formar el gel, la presencia de algunos iones durante la formación de su enrejado polimérico, el pH al que se efectúa la preparación del gel.

#### 4.3.3. Influencia de la concentración del agar respecto a la fuerza del gel.

Se probaron diferentes concentraciones de agar, además de usarse dos diferentes marcas comerciales de agar, con el fin de establecer una comparación en cuanto así en un momento dado puede influir la procedencia de las materias primas en el comportamiento de gel.

Las concentraciones que se probaron fueron: 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0% (p/v).

Los geles se prepararon disolviendo la cantidad necesaria para cada concentración a evaluar, en 25ml de agua destilada; los cuales se calentaron a una temperatura de  $85^\circ\text{C}$  durante 1 minuto, tiempo en el que se disuelve el agar. Se debe tener cuidado de que no se forme espuma, por lo que es conveniente agitar la solución constantemente, además esto evitará que el agar se pegue al recipiente. El agar disuelto da una solución clara transparente, esta solución se vierte en una caja Petri de 8cm de diámetro y se deja gelificar a temperatura ambiente durante 12 a 18 horas. La temperatura a la que empieza a gelificar el agar es de  $40^\circ\text{C}$ . Una vez preparados se sometieron a la prueba de resistencia a la ruptura del gel, como ya se explicó la sección 4.3.2.

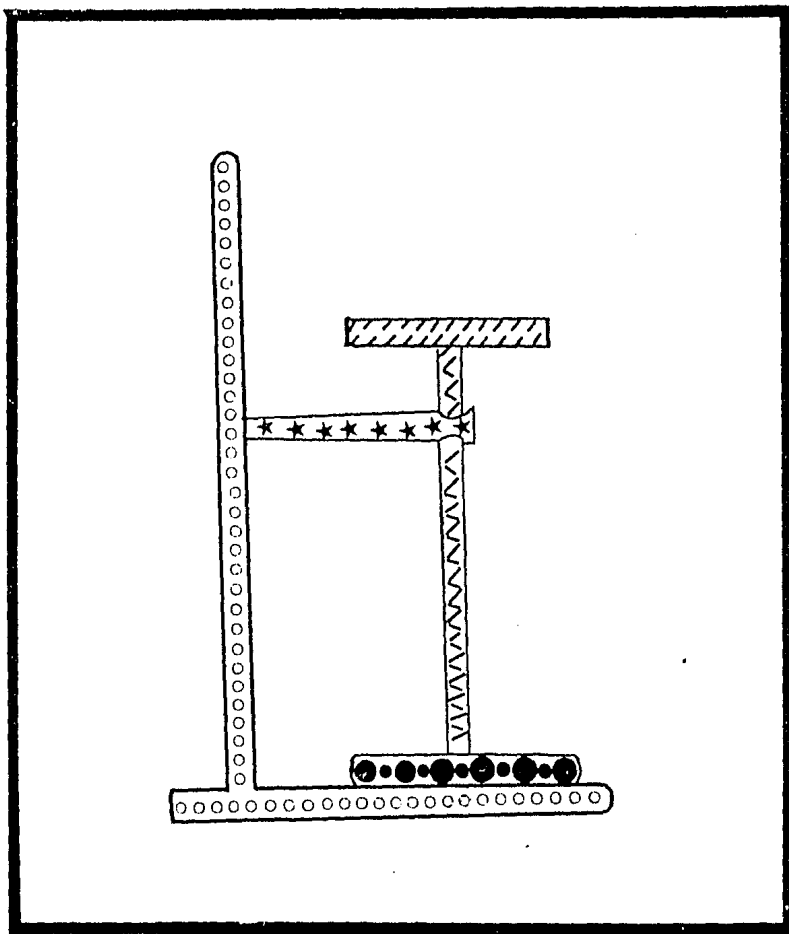


Fig.4.2. Esquema del aparato para la medición de la fuerza del gel. ○ soporte universal, ★ pinzas, △ émbolo (longitud 31cm-diámetro 1cm), // soporte para pesas (caja petri - de 8cm de diámetro) ●● muestra (gel).

#### 4.3.4. Influencia de la presencia de ciertos iones como; fosfato, cloruro y acetato, en la fuerza del gel.

La formación del enrejado polimérico que permite la construcción del gel de agar, se debe fundamentalmente a una precipitación por cambio en la temperatura, y no por la presencia de un ión determinado. Sin embargo la presencia de algunos iones en ocasiones si pueden influir en las propiedades físicas del gel; ya que de acuerdo a la literatura, se tiene que en la presencia de iones cloruro el gel presenta una disminución en su consistencia, mientras que en la presencia de iones acetato se mejora notablemente ésta (46).

El experimento consistió en preparar el gel de agar en diferentes soluciones, es decir, se disolvió el agar en una solución de cloruro de sodio al 0.9% (concentración fisiológica). De igual manera se disolvió en soluciones de acetato y fosfato de sodio, todas ellas preparadas a sus respectivas concentraciones fisiológicas.

Una vez preparados los respectivos geles, éstos fueron sometidos a la prueba de la resistencia a la ruptura del gel (sección 4.3.2.).

#### 4.3.5. Influencia del pH en la fuerza del gel.

Otro parámetro que puede influir en las propiedades mecánicas del gel es el pH en el cual se lleva a cabo la formación del enrejado polimérico.

En este aspecto se probaron los geles que fueron preparados a diferentes valores de pH, el intervalo empleado fue; 2,4,6,7,8,9 y 10. Una vez preparados se sometieron a la prueba de resistencia a la ruptura del gel.

### 4.4. Aspectos de la técnica de inmovilización.

#### 4.4.1. Introducción.

Es necesario establecer cual es el comportamiento del soporte ante las células microbianas que serán inmovilizadas, para poder establecer las condiciones óptimas de la inmovilización. Por lo que se deberá estudiar cual es la capacidad de atrapamiento del soporte, además de comprobar si la presencia de las células atrapadas no afecta la fuerza del gel y la estabilidad a la agitación del mismo. Ya que esto puede permitir la liberación de las células, por lo que también se considera la posibilidad de aumentar dicha estabilidad empleando agentes químicos bifuncionales, conocidos como curtientes. Los cuales son empleados para crear un entrecruzamiento superficial entre las células que quedan en la parte externa del biocatalizador. Esto ayuda a que las células inmovilizadas no se salgan del biocatalizador, aumentando su estabilidad a la agitación.

#### 4.4.2. Efecto de la concentración de las células inmovilizadas, en las propiedades de fuerza del gel y estabilidad a la agitación.

En este caso se prepararon diferentes geles de agar, que presentaban como variable la relación en concentración entre el polisacárido y las células a inmovilizar. Las relaciones probadas fueron las siguientes: 5:1, 4:1, 3:1 y 1:1, manteniendo constante la concentración de células y variando la cantidad de agar.

De aquí se determinará la concentración óptima de células para ser inmovilizadas, de manera que se tenga el menor grado de variación en las propiedades de la fuerza del gel, estabilidad a la agitación, así como una adecuada expresión de la actividad enzimática. Las pruebas de fuerza del gel y medición de la actividad enzimática se dan en las secciones 4.3.2 y 4.5.1, respectivamente.

La prueba de estabilidad a la agitación tiene como finalidad poder observar la liberación de las células atrapadas debido al contacto entre sí de las partículas del biocatalizador al ponerlas en agitación y bajo las condiciones ambientales en que operará.

La prueba consiste en fraccionar en pequeños cubos de 0.5cm por

lado, éstos son colocados en matraces Erlenmeyer de 125ml de capacidad, con un volumen de 20ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.03M, pH 8.0 a una temperatura de 40°C; que es controlada en un baño de temperatura controlable con agitación rotatoria, empleando una agitación de 200rpm. La prueba duró una semana, durante este tiempo se hicieron recambios de la solución amortiguadora, y a ésta se le cuantificó la presencia de proteína, lo cual se asocio con la liberación de las células del gel. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry, (ver apéndice B).

#### 4.4.3. Efecto del uso de un agente curtierte en la estabilidad a la agitación del gel.

Una vez establecida la relación de atrapamiento del gel, es necesario comprobar si el uso de un agente químico bifuncional mejora las propiedades del biocatalizador, en este caso se utilizó glutaraldehído. El uso de este agente químico se debe fundamentalmente a la experiencia de haberlo utilizado en otro polisacárido del tipo del agar, k-carragenina. El estudio fue realizado por Casa (7), además de que el proceso general para inmovilizar células usando como matriz carragenina se fundamentó en el trabajo reportado por Tosqet. al., (53). En estos trabajos se establece las condiciones para lograr la polimerización del glutaraldehído, de manera que se tenga una mejor estabilidad en el catalizador (células-soporte). La efectividad del tratamiento depende de la concentración del agente químico, pH, temperatura y tiempo de contacto con el biocatalizador.

Se preparó un gel de agar usando la relación de atrapamiento que se consideró como la óptima, se fraccionó el gel en pequeños cubos, éstos fueron colocados en la solución curtidora (las condiciones se dan en el Apéndice B). En este experimento se probaron cuatro diferentes concentraciones de glutaraldehído; 1, 2, 3 y 4% (v/v). Los geles una vez tratados son lavados con agua destilada para quitar el exceso de curtientes y posteriormente con solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 a una molaridad de 0.03. Finalmente fueron sometidos a la prueba de estabilidad a la agitación descrita en la sección 4.4.2.

#### 4.5. Aspectos del biocatalizador.

##### 4.5.1. Medición de la actividad enzimática.

El fundamento para la determinación de la actividad en el biocatalizador, es el mismo que para las células libres, solo que en este caso es necesario pesar una cantidad de biocatalizador que puede ser de 0.4 a 0.5g; se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125ml de capacidad, conteniendo 20ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.03M, pH 8.0, y se adicionan 5ml del sustrato (Penicilina G-K). Se utilizaron las mismas condiciones dadas para la medición de actividad en el sistema soluble; así como el mismo procedimiento colorimétrico para la cuantificación de 6-APA presente en la reacción (Apéndice B).

##### 4.5.2. Efecto de la inmovilización sobre la actividad enzimática presente en las células de E. coli ATCC 9637.

Sobre este aspecto es necesario establecer cual es el efecto que sufre la actividad enzimática, por lo que para tal fin es necesario establecer un factor que nos indique la efectividad de la expresión de la actividad enzimática. Tal objetivo puede realizarse disolviendo nuevamente el biocatalizador, y determinado la actividad de los restos de manera que se pueda comparar con la actividad del biocatalizador íntegro.

En esta sección también se consideró el efecto del curtido sobre la expresión de la actividad del biocatalizador; por lo que se hace una comparación entre el biocatalizador sin curtir y el biocatalizador tratado con la solución de curtido. Además se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de glutaraldehído probadas en relación a determinar cual es la que ofrece una mejor estabilidad a la agitación y que no altere considerablemente la actividad catalítica.

En este caso fue necesario fraccionar cada biocatalizador obtenido, a las diferentes concentraciones del agente bifuncional, y compararlos con el biocatalizador sin curtir también fraccionado.



#### 4.5.3. Caracterización cinética del sistema inmovilizado.

##### 4.5.3.1. Perfil de pH.

La caracterización cinética del biocatalizador se inició con el perfil de pH; el estudio consistió en probar diferentes valores de pH (6, 7, 8 y 9). En este experimento se mantiene constantes las condiciones de temperatura (40°C) y la fuerza iónica de la solución amortiguadora de fosfatos (0.03M).

##### 4.5.3.2. Temperatura óptima del sistema inmovilizado.

El siguiente estudio fue determinar la temperatura óptima del biocatalizador, además de calcular la energía de activación con los resultados obtenidos con esta prueba.

El intervalo de temperatura probado fue de 30° a 60°C. La determinación de la energía aparente de activación se obtiene graficando los resultados del perfil de temperatura-actividad en una relación dada por la ecuación de Arrhenius ( $\log V_i$  vs  $1/T$ ;  $V_i$ = velocidad inicial,  $T$ = temperatura en °K).

##### 4.5.3.3. Constantes cinéticas del biocatalizador.

La determinación de las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ , parámetros que corresponden al modelo de Michaelis-Menten) tienen como finalidad indicarnos el grado de afinidad que presenta la enzima por el sustrato, y que puede sufrir modificaciones cuando el sistema enzimático se encuentra inmovilizado. Por ello la importancia de su determinación, ya que ella nos permitirá observar el comportamiento de la enzima en su nuevo microambiente.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1. Aspectos del sistema enzimático a inmovilizar.

#### 5.1.1 Producción de células de Escherichia coli ATCC 9637 con activi

### dad enzimática de penicilino amidasa.

Dentro de la estrategia general de investigación del presente trabajo uno de los primeros puntos que se consideró, fue la producción de las células de E. coli ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa. Esta cepa fue obtenida del American Type Culture Collection, y produce intracelularmente la enzima, además de ser de naturaleza inductiva. En este caso el agente inductor es el ácido fenilacético que también es utilizado como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo. El medio de cultivo utilizado corresponde a un medio mínimo cuya formulación fue establecida por Casas (7).

En la figura 5.1., se muestra la cinética de crecimiento del microorganismo y el comportamiento de la actividad enzimática. Se puede observar que la actividad de la enzima presenta una serie de altas y bajas durante las primeras horas de cultivo, así como que en la fase exponencial el microorganismo presenta una velocidad específica de crecimiento de  $0.077 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 9.06 h. Después de las doce horas de cultivo se puede apreciar que la actividad enzimática tiende a asociarse al comportamiento de la cinética de crecimiento; ya que conforme el crecimiento se aproxima a la fase de desaceleración, la actividad enzimática tiende a bajar.

El conocer el comportamiento que presenta la cinética de crecimiento y la actividad enzimática, nos ayuda a establecer el tiempo en que serán recolectadas las células del microorganismo productor. De manera que se obtengan lotes de células que presenten características similares en cuanto a actividad específica y concentración de biomasa.

Las condiciones que se establecieron para cosechar las células fue que presentarán una actividad específica de 1.7 a 2.0  $\mu\text{Mol}$  6-APA / mg proteína en 30 minutos. Una densidad óptica a 560 nm de 1.1 a 1.2 en un tiempo de 20 a 22 horas de cultivo en medio mínimo, el cual da un rendimiento de 0.8 a 0.9 mg/ml de células peso seco.

Las células obtenidas fueron recolectadas por centrifugación,

usando un centrifuga Sorvall RC-5B Du Pont Instruments, a 10,000rpm durante 15 minutos. Los paquetes celulares se resuspendieron en solución fisiológica de cloruro de sodio y se almacenaron a una temperatura de 4°C durante una semana como máximo, antes de inmovilizarlas.

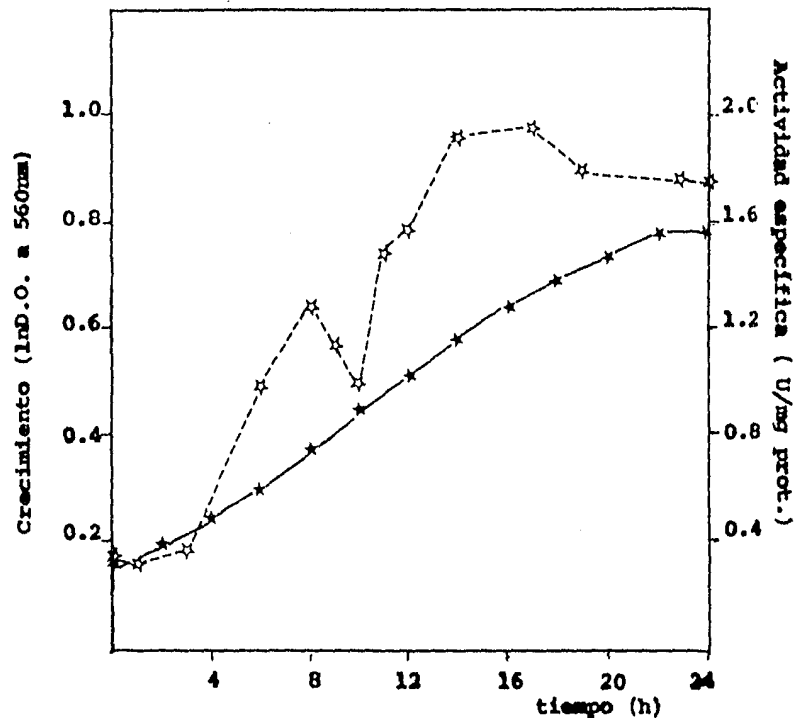


Figura 5.1. Cultivo de células de *E.coli* ATCC 9637, en medio mínimo empleando como inductor ácido fenilacético y como fuente de carbono en una concentración del 0.2%; T 29°C; agitación rotatoria de 200 rpm. Crecimiento (lnD.O.) (\*). Actividad específica (☆). Velocidad específica de crecimiento  $0.077h^{-1}$ . Act. específica del inóculo 1.05 U/mg proteína. Volumen de inóculo 100 ml.

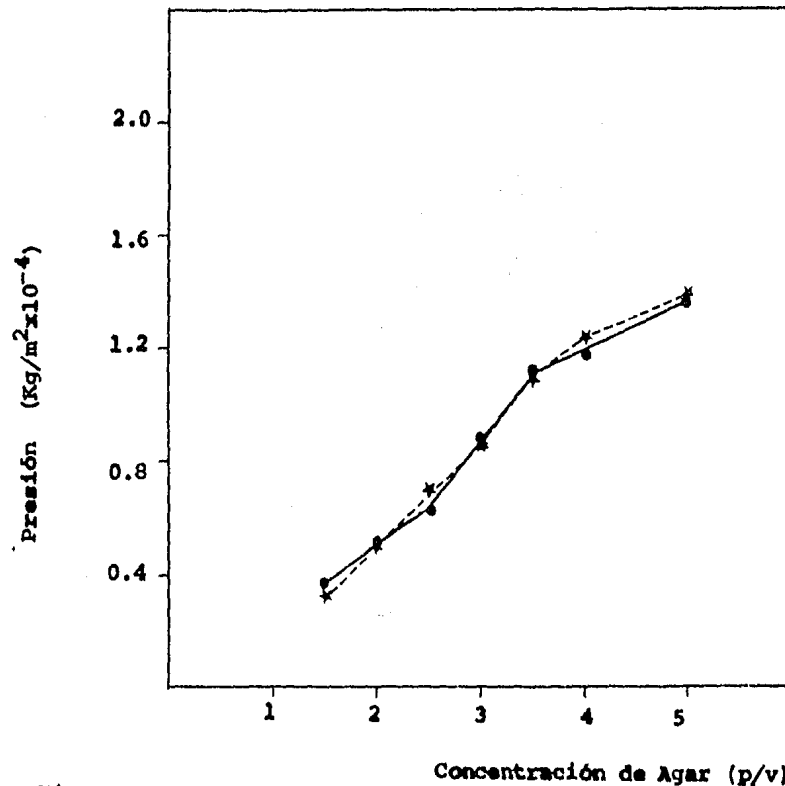
## 5.2. Aspectos del soporte.

### 5.2.1. Factores que influyen en la resistencia del gel.

En esta sección se presenta en forma general los efectos que ejercen los siguientes parámetros sobre la resistencia a la ruptura del gel; concentración del polisacárido, pH al cual se efectuará la disolución del agar, así como la presencia de algunos iones como cloruro, fosfato y acetato.

El primer parámetro que se evaluó fue la concentración del polisacárido, además de hacer una comparación entre dos marcas comerciales (Difco y Bioxón). Los resultados obtenidos se dan en la figura 5.2. Se puede apreciar que no hay notables diferencias en cuanto al uso de una u otra marca comercial, ya que la tendencia para ambos casos es la misma, además de que presentan un comportamiento similar dentro del intervalo comprendido de 1.5 a 3.5%. Puede observarse que se establece una relación directamente proporcional entre la concentración del agar y la presión que soporta el gel; ya que conforme aumenta la concentración del polisacárido se observa un aumento en la resistencia a la ruptura del gel. Sin embargo esta tendencia lineal sufre un ligero cambio en la pendiente, esto puede deberse a que conforme se va aumentando la cantidad de agar las diferencias en la presión entre cada caso probado a altas concentraciones, no son tan significativas como las registradas en los primeros casos, lo cual origina una inclinación en la pendiente. En base a esto se decidió utilizar la concentración que queda como punto intermedio entre las concentraciones que presenta una débil resistencia a la ruptura y las concentraciones altas que sufren pequeñas diferencias entre ellas mismas al ser sometidas a la prueba de resistencia del gel. La concentración elegida corresponde al valor de 3.5%(p/v) de agar, para ambas marcas comerciales probadas.

Una vez establecida la concentración para elaborar los geles de agar, se prosiguió a comprobar la influencia que ejerce el pH al cual se disuelve el polisacárido. Para este fin fue necesario preparar diferentes soluciones de agar a distintos valores de pH. Los resultados de esta prueba se dan en la figura 5.3. Se puede observar que el



Concentración de Agar (p/v)

Figura 5.2. Efecto de la concentración de Agar sobre la resistencia a la ruptura del gel. Comparación de dicha propiedad entre dos marcas comerciales de Agar (\*) DIFCO y (•) BIOXON.

comportamiento para las dos marcas estudiadas es muy semejante, la única diferencia que se encontró fue una discrepancia de 0.5 unidades en los valores de pH que presentan al disolverse en agua destilada. El agar es bastante estable a los diferentes valores de pH probados especialmente dentro del intervalo de 6.5 a 8.5. Es necesario indicar que a pH 3.0 el gel no sufre graves alteraciones en su resistencia al gel además que su gelificación no se altera. Mientras que a pH 2.0 sufre importantes alteraciones como lo es que su matriz se hidroliza impidiendo la gelificación de la sustancia. En el lado básico sufre ligeras modificaciones hasta valores de 10, ya que posteriormente de este valor si se ve afectada la resistencia del gel.

Otro de los estudios fue el observar la posible influencia de algunos iones en la resistencia del gel. En este caso se probaron dos iones de tipo inorgánico ( $Cl^-$  y  $PO_4$ ) y uno orgánico ( $CH_3COO^-$ ).

Los resultados se dan en la figura 5.4., no se establecieron grandes diferencias en el uso de cada uno de ellos, pero si se puede percibir que existe un aumento en la resistencia del gel cuando se emplean iones acetato en comparación con los fosfato y cloruro.

Del análisis de estos resultados se concluyo que la preparación del soporte sería empleando una concentración del 3.5% de agar así como que se disolverá a un pH de 7.0 usando una solución de acetatos a una concentración fisiológica de 0.062. M.

### 5.3. Aspectos de la técnica de inmovilización.

#### 5.3.1. Establecer la capacidad de atrapamiento del soporte.

En este punto se dan los resultados obtenidos en las siguientes pruebas: a) efecto de la concentración de las células inmovilizadas sobre las propiedades de la fuerza del gel y su estabilidad a la agitación, b) evaluar el efecto que ejerce la inmovilización sobre la expresión de la actividad enzimática a las diferentes relaciones empleadas de células-agar.

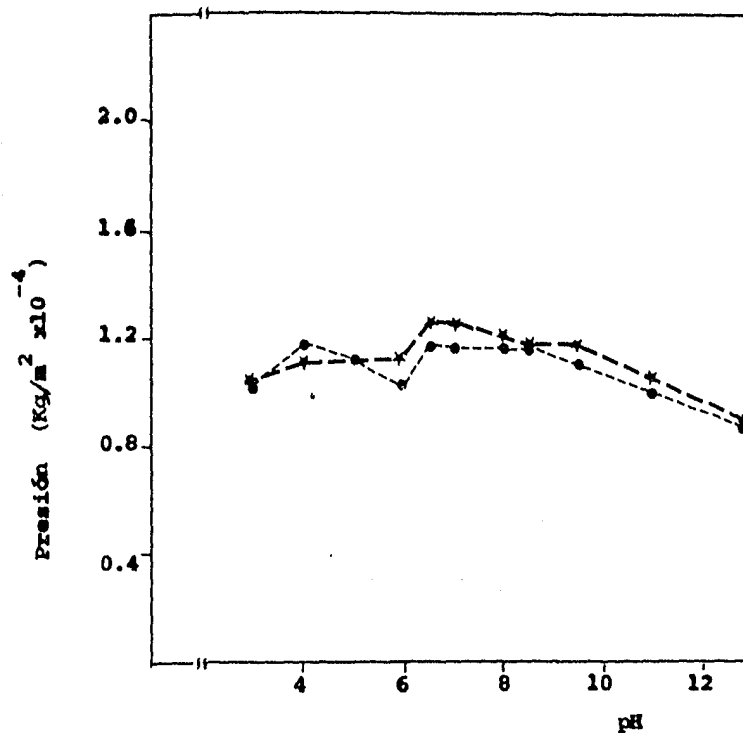


Figura 5.3. Influencia del pH sobre la fuerza del gel. Estudio realizado para las dos marcas comerciales (x) DIFCO y (●) BIONON.



Presión (Kg/m<sup>2</sup> x 10<sup>-4</sup>)

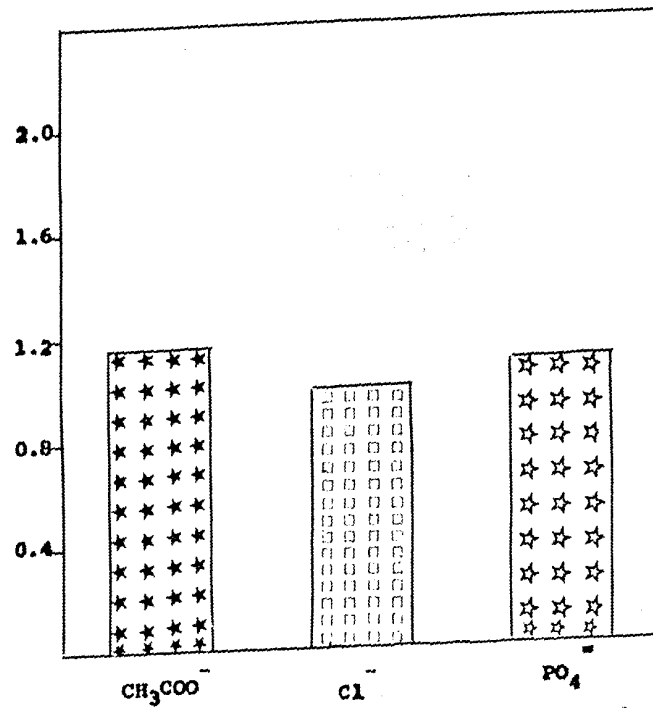


Figura 5.4. Efecto de algunos iones sobre la resistencia a la ruptura del gel.

En la figura 5.5., se puede observar el comportamiento que presenta el gel respecto a su resistencia a la ruptura cuando interactúa con las células inmovilizadas. Se puede apreciar que presenta una tendencia a formar un punto óptimo, el cual corresponde a la relación de 1:2, o sea 1 porción de células por 2 porciones de agar. Recordando que anteriormente se había establecido la concentración a la cual se debía preparar el gel; que es del 3.5%. Por lo que las cantidades a emplearse para la formación del biocatalizador son; 3.5 g de células peso seco por 7.0g de agar, para un volumen de 100ml de solución de acetatos 0.062M, pH 7.0.

En esta prueba se observó que la fuerza del gel disminuyó a 1.5 veces del valor que presentaba éste sin la presencia de las células. Indicándonos en gran efecto que éstas ejercen sobre la formación del enrejado polimérico.

Otro aspecto que se consideró fue observar la estabilidad del biocatalizador a la agitación, ya que puede originar la liberación de las células inmovilizadas. La prueba se realizó para todas las relaciones de atrapamiento propuestas, de manera que puedan compararse posteriormente los resultados.

En la figura 5.6 se muestra la tendencia que siguió cada una de las relaciones, graficándose el tiempo en el cual se efectuó la prueba contra la cantidad de proteína determinada en el sobrenadante. Se observó que en las primeras 24 horas la liberación de células (cuantificadas como proteína por el método de Lowry) es bastante elevada para la relación (1:1) aunque en todos los casos se tiene la liberación de células.

El siguiente paso fue evaluar los resultados de expresión de la actividad enzimática para cada relación (células-agar) propuesta; así como el comportamiento de la actividad durante la prueba de estabilidad a la agitación, los resultados se dan en la tabla 5.1. De estos resultados se determinó la relación que será probada con el agente bifuncional; siendo la relación 1:1, ya que presenta el valor más alto de actividad específica (23.2 u/g de biocatalizador peso húme-

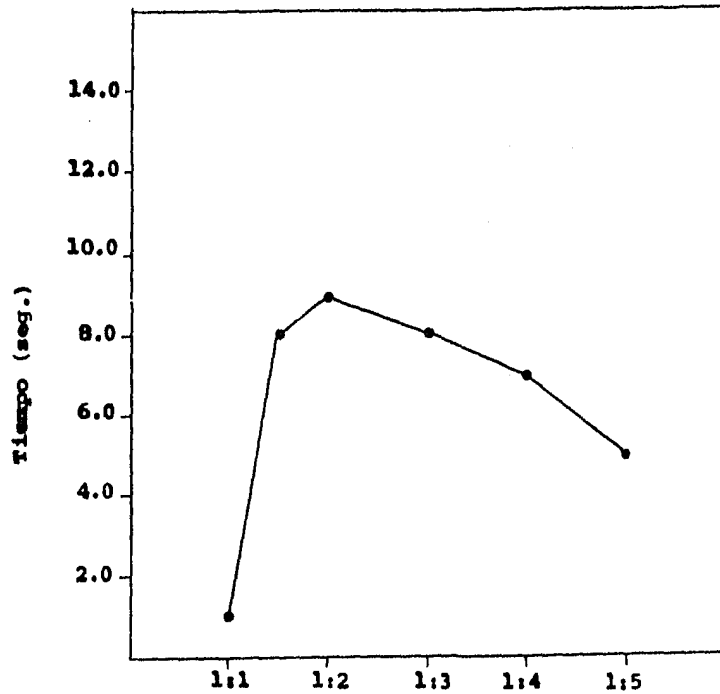


Figura 5.5 Efecto de la relación de atrapamiento (células-agar) sobre la fuerza del gel. Se determinó en base al tiempo que el material necesita para deformarse cuando se somete a una presión constante, en este caso es de  $0.788 \text{ Kg/m}^2 \times 10^{-4}$ .

do) así como el mejor porcentaje de actividad retenida (33.2%) aunque no tiene una buena fuerza de gel, (Fig. 5.7.)

### 5.3.2. Efecto del glutaraldehído sobre la estabilidad a la agitación del biocatalizador y en la actividad enzimática.

De acuerdo al tratamiento de curtido señalado por Casas (7) se tiene que la efectividad del mismo, depende de los siguientes factores: concentración del glutaraldehído, pH, temperatura, tiempo de contacto con el biocatalizador, etc.

En nuestro estudio solamente se evaluó la concentración del agente químico bifuncional, de tal manera que proporcione una buena estabilidad a la agitación, y que no cause grandes efectos sobre la actividad enzimática.

Se observó que la actividad se conserva en un 100%, cuando el biocatalizador es sometido a una agitación rotatoria, sin embargo en su apariencia física se observó un ligero desgaste en las aristas del biocatalizador, especialmente en aquellos que fueron.

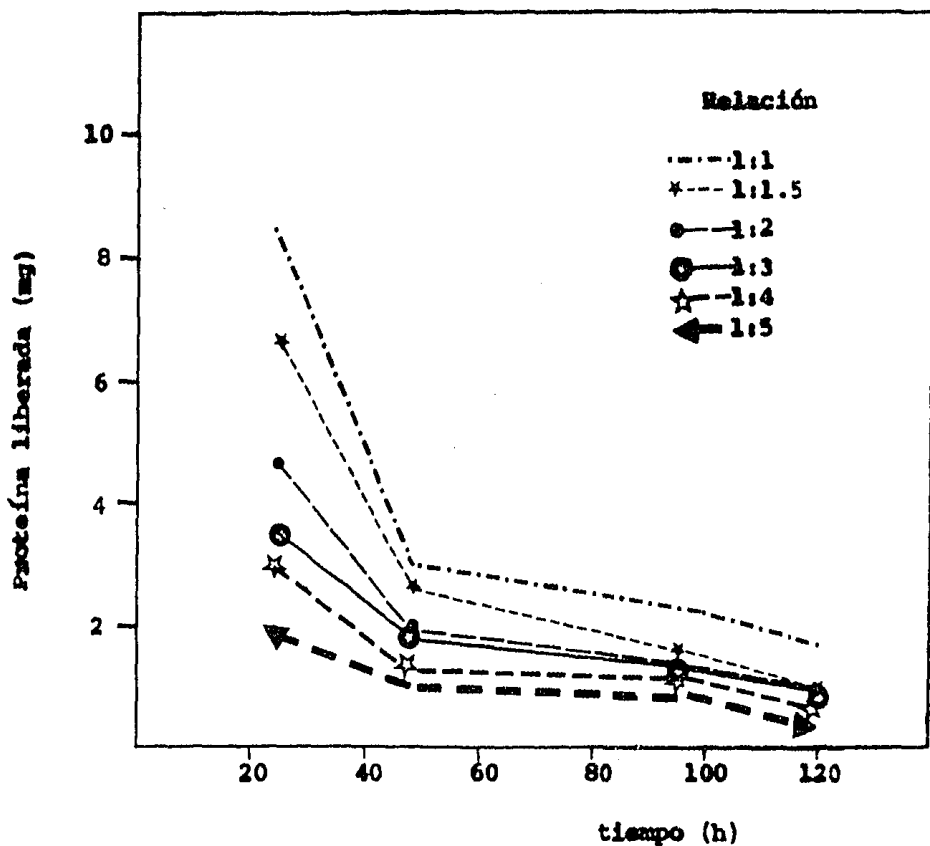


Figura 5.6. Efecto de la agitación sobre la estabilidad del gel. Se probó cada una de las relaciones de atrapamiento (células-agar) y la estabilidad se evaluó en relación a la liberación de células al medio en donde se efectuó la prueba; cuantificándose las células como proteína empleando el método de Lowry.

TABLA 5.1. ESTABILIDAD DE LAS CELULAS INMOVILIZADAS EN AGAR DURANTE AGITACION ROTATORIA A UNA TEMPERATURA DE 40°C.

Tiempo de agitación (días)	A C T I V I D A D											
	Biocatalizador'											
	1		2		3		4		5		6	
	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %	(U/g)* %
0	6.8	100	7.4	100	9.2	100	13.2	100	14.8	100	23.2	100
2	3.0	44	3.7	50	4.6	50	5.8	44	8.5	57	17.0	73
3	3.0	44	3.6	49	2.4	26	2.9	22	2.7	19	7.1	31
5	1.2	18	1.5	20	1.0	11	0.8	6	0.97	7	7.7	33

\* (U/g) =  $\mu$ Mol 6-APA/g de biocatalizador. 30 min. (peso húmedo)

Biocatalizador'	Relación (células-agar)
1	1 : 5
2	1 : 4
3	1 : 3
4	1 : 2
5	1 : 1.5
6	1 : 1

Actividad específica de las células inmovilizadas = 1.2 U/mg proteína

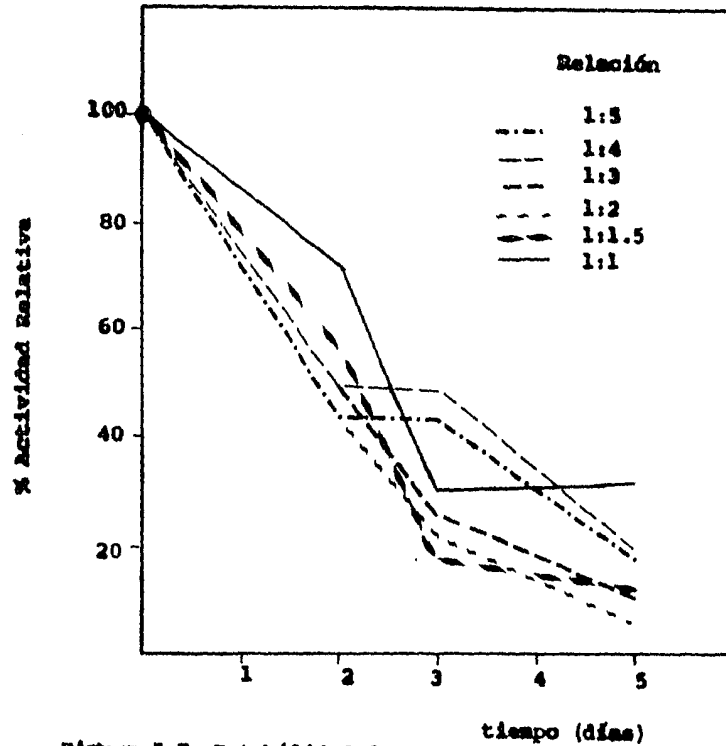


Figura 5.7. Estabilidad de la actividad de la enzima penicilino amidasa unida a las células de *Escheri* ATCC 9637, inmovilizadas en Agar sin curtir.

tratados al 1%. Mientras que el biocatalizador sin curtir presenta una pérdida del 58% respecto a su actividad inicial, además de que físicamente sufre daños notorios en su apariencia.

En cuanto al efecto que puede ejercer el glutaraldehído sobre el glutaraldehído sobre la actividad de la enzima, se observó que el menor porcentaje de actividad pérdida corresponde a la concentración del 1%, teniendo un porcentaje del 17.8%, le sigue en orden progresivo la concentración del 2%, que tiene un porcentaje de pérdida del 24.4%. Las concentraciones correspondientes al 3 y 4% poseen el mismo valor de pérdida que es del 47%, (ver tabla 5.2 y figura 5.8). De aquí se deduce que conforme se aumenta la concentración del agente bifuncional, se tiene una mayor inactivación de la enzima durante el proceso de curtido.



TABLA 5.2. Efecto de la concentración del glutaraldehído en la actividad enzimática de penicilino amidasa unida a las células de E. coli ATCC 9637 inmovilizadas en Agar.

% Clutaraldehído	A C T I V I D A D	
	( U/g ) * %(retención)	
1	23.04	82.2
2	21.29	75.6
3	14.74	52.6
4	14.78	52.7
Control	28.03	100

( U/g ) \* =  $\mu$ Mol 6-APA/g de biocatalizador. 30 min.)

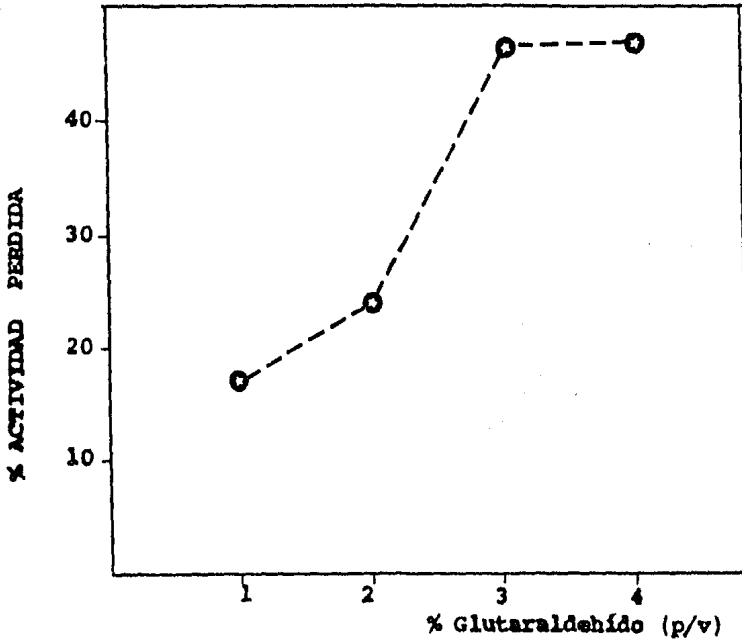


Figura 5.8. Efecto del glutaraldehído sobre la actividad de penicilino amidasa en células de E.coli ATCC 9637 inmovilizadas en Agar.

Conociendo todos éstos resultados podemos establecer las condiciones de la técnica de inmovilización por atrapamiento empleando como soporte Agar:

- a) Disolver 3.5g de Agar en 70ml de solución de acetatos (Na) a una concentración fisiológica de 0.062M, pH 7.0 y a una temperatura de 80°C durante 5 minutos con agitación. Puede también disolverse la muestra sometiéndola a condiciones de esterilización (T 121°C, presión 1.5 Ib/plg<sup>2</sup>) durante 3 minutos.
- b) Preparar una suspensión de células de E. coli ATCC 9637 de manera que se tenga una concentración de 0.12mg/ml. Adicionar 30ml de esta suspensión, la cual se preparó disolviendo el paquete celular en la solución de acetato 0.062M, pH 7.0.
- c) Mezclar perfectamente las células con el agar a una temperatura de 50°C durante 5 minutos.
- d) Una vez homogenizada la mezcla se vierte sobre una superficie fina (en este caso se utilizaron cajas Petri de vidrio de 8.0, 12.0 y 25cm de diámetro).
- e) Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora (T= 20-25°C).
- f) Una vez gelificada la preparación se procede a fraccionar en pequeños cubos; los cuales posteriormente son curtidos de acuerdo a la técnica dada en el Apéndice B. Recordando que la concentración a emplearse de glutaraldehído es del 2% (p/v).

En la figura 5.9 se muestra la apariencia física que presenta el biocatalizador desarrollado.

#### 5.4. Aspectos del biocatalizador desarrollado.

##### 5.4.1. Perfil de pH.

El perfil de pH para las células inmovilizadas es presentado en la figura 5.10., donde se observa que la inmovilización no ejerce alguna variación notable sobre el pH óptimo determinado para las células libres (Tabla 5.3.).

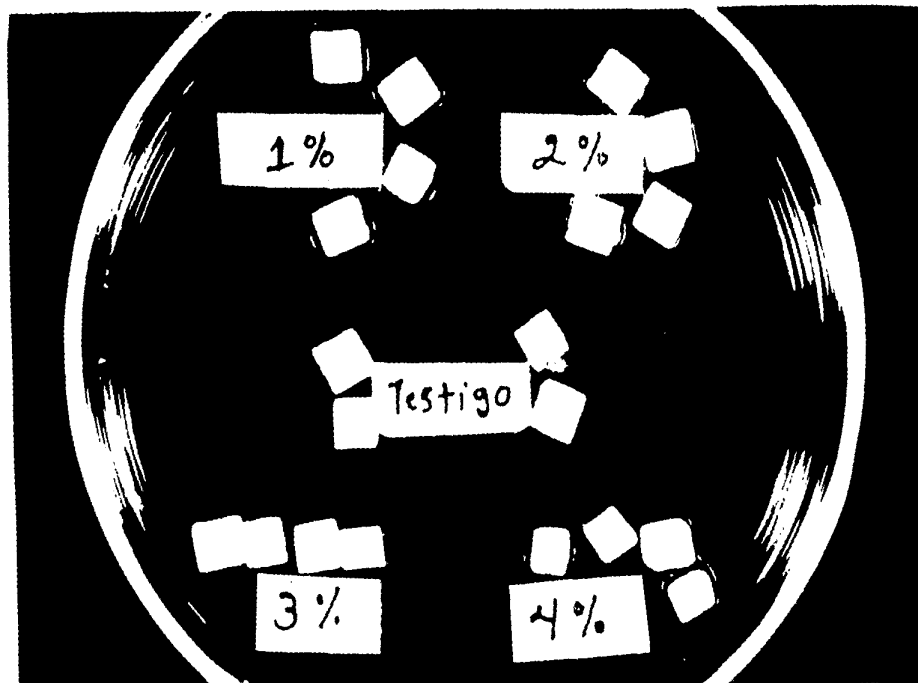


Figura 5.9. Aspecto que presentan los biocatalizadores obtenidos a las diferentes concentraciones de glutaraldehído probadas. Se puede apreciar una diferencia de intensidades entre el testigo y las demás muestras; ya que al tratar el biocatalizador con la solución de curtido éste toma diferentes colores que van del rosa a un café oscuro, conforme se aumenta la concentración del glutaraldehído. (Escala:—, representa 0.50cm )

La importancia de establecer la influencia del pH sobre la velocidad de la reacción, se debe a que los sitios activos presentes en las enzimas, están compuestos frecuentemente de grupos ionizables, que deben encontrarse en su forma iónica apropiada, para que pueda mantener la conformación del sitio activo, y la adecuada unión con los sustratos.

La gráfica del pH "óptimo", indica que se tiene una disminución de la actividad cuando se emplean valores superiores o inferiores a 8.0. Esto quizás se debe a que se tiene la inadecuada formación de las parte iónicas del sustrato o de la enzima, ó de ambas; y en el último de los casos que se ésta inactivando la enzima, o se tiene la combinación de los dos efectos. Debemos recordar que Savitskaya, et. al. (48), mencionan que el perfil de pH para la enzima producida por E. coli, tiende a formar una campana como es nuestro caso, y ésto lo atribuyen a que deben existir 3 formas de equilibrio: ácida ( $AH_2^+$ ), neutral ( $AH^0$ ) y básica ( $A^-$ ), distribuidas en forma natural.

#### 5.4.2. Perfil de temperatura y energía de activación.

De acuerdo a los datos reportados sobre la temperatura óptima de la enzima penicilino amidasa, tenemos que dependen del origen de la enzima, por lo que se aprecia un amplio intervalo de valores que va de 20 a 55°C. Además de que también depende del estado en que se encuentre la enzima; ya sea en las células intactas, libres, o inmovilizada. En nuestro estudio encontramos que la temperatura óptima es de 55°C (Fig. 5.12). Este resultado coincide con el valor obtenido para la enzima unida a células de E. coli ATCC 11105 inmovilizada en colágena y para las células de E. coli ATCC 9637 inmovilizadas en carragenina (7). Sin embargo la estabilidad de la enzima se ve afectada a partir los 50°C, aún en la forma inmovilizada, la temperatura muestra mejor estabilidad y que se ha empleado en este trabajo con fines comparativos es a 40°C.

La energía de activación aparente, se determinó usando los resultados obtenidos en el perfil de temperatura (Fig. 5.13), encontrando un valor de 5.45Kcal/mol.

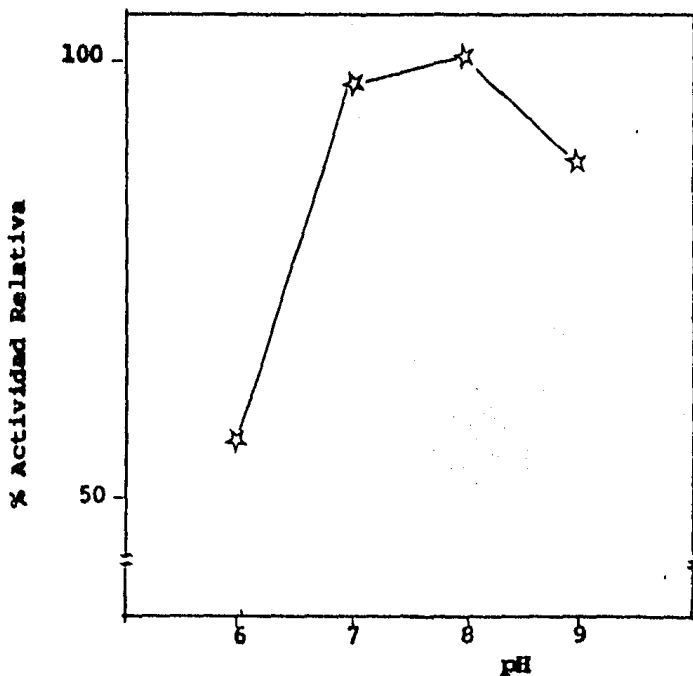


Figura 5.10. Perfil de pH de las células de *E. coli* ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa inmovilizadas en Agar. Temperatura 40°C en 30 minutos. La máxima actividad fue considerada como 100%.

TABLA 5.3. Temperatura y pH óptimos para la actividad de Penicilino amidasa

Fuente de la enzima	PH	Temperatura (°C)	Ref.
<u>E. coli</u> ATCC 9637			
cél. intactas	7.5	30	Kaufman (7)
enz. soluble	7.8-8.0	50-52	Bondareva (7)
enz. insoluble	7.5	37	Self (7)
cél. intactas	8.0	40	Sandoval (47)
cél. inmovilizadas	8.0-8.5	55	Casas (7)
cél. inmovilizadas	8.0	55	Este trabajo
<u>E. coli</u> NCIB 8743A			
cél. intactas	8.2	50-55	Cole (13)
enz. soluble	8.2	37	Balasingham (3)
enz. insoluble	7.65	37	Warburton (3)
<u>E. coli</u> sp.	7.0	30-35	Brandl (4)
<u>E. coli</u> sp.			
cél. intactas	8.5	40	Sato (7)
cél. inmovilizadas	8.5	40	
<u>E. coli</u> D816			
cél. intactas	8.4	50	
cél. inmovilizadas	9.0	55	Wang (55)

De los pocos datos reportados en la literatura sobre energía de activación de la penicilino amidasa, tenemos que nuestro valor es el más bajo, ya que Savitskaya, reporta un valor de 11.4 Kcal/mol para la enzima libre. Balansingham reporta un valor de 8.853 Kcal/mol para la enzima libre perteneciente a E. coli NCIB 8743A y finalmente Gio-venco que da un valor de 10.4 Kcal/mol para la enzima inmovilizada de E. coli en esferas de acetato de celulosa. Nuestro valor presenta una disminución de aproximadamente la mitad en relación a cada uno de los valores reportados.

La explicación a este fenómeno es que mientras que para la enzima libre la influencia de la temperatura es evaluada directamente sobre la velocidad de la reacción, para la enzima unida a las células de E. coli inmovilizadas se evaluará el efecto sobre una combinación de resistencias (37); se tienen problemas difusionales internos, los cuales se pueden comprender en relación a que las partículas de las células inmovilizadas son mayores que en el caso de las enzimas inmovilizadas.

Estas limitaciones pueden ser reducidas usando partículas de soportes irregulares con una relación relativamente alta del área superficial y el volumen, pero esto puede provocar un rápido desgaste del biocatalizador, en el caso de emplearse en un reactor de tanque agitado o puede originar flujos irregulares, además de comprimirse en el caso de emplearse en un reactor de lecho empacado.

#### 5.4.3. Determinación de las constantes cinéticas ( $K_m$ y $V_{max}$ ).

La determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  (parámetros del Modelo de Michaelis-Menten) se efectuó aplicando la representación de Lineaweaver Burk, usando Penicilina G como sustrato (Fig. 5.14).

El valor de  $K_m$  fue de 2.61 mM y una  $V_{max}$ , de 0.2274  $\mu\text{Mol}$  de 6-APA  $\cdot\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

De acuerdo con los datos de la Tabla 5.4., se observa que hay grandes variaciones entre las constantes cinéticas. Esto quizás se



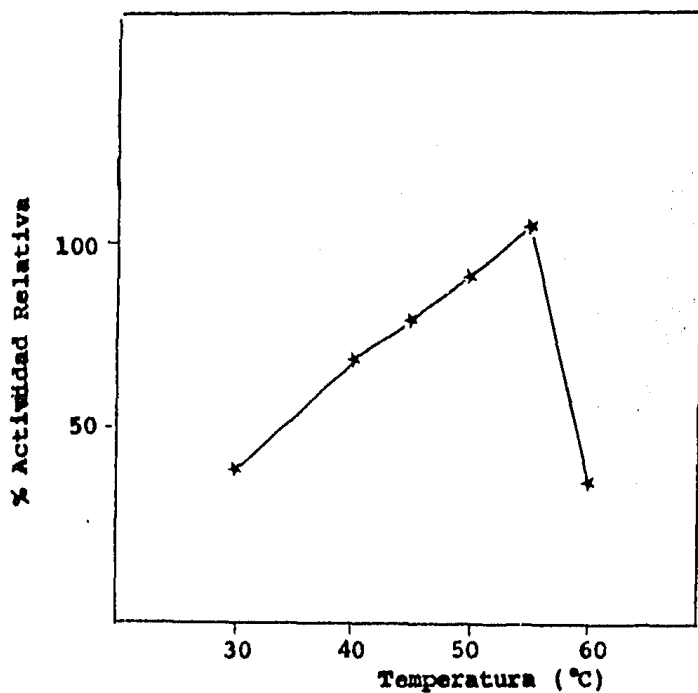


Figura 5.11. Perfil de temperatura de las células de E.coli ATCC 9637 inmovilizadas en Agar. Este perfil se elaboró usando una sol. amortiguadora de fosfatos 0.03M, pH 8.0 en 30 minutos. La máxima actividad fue considerada como 100%.

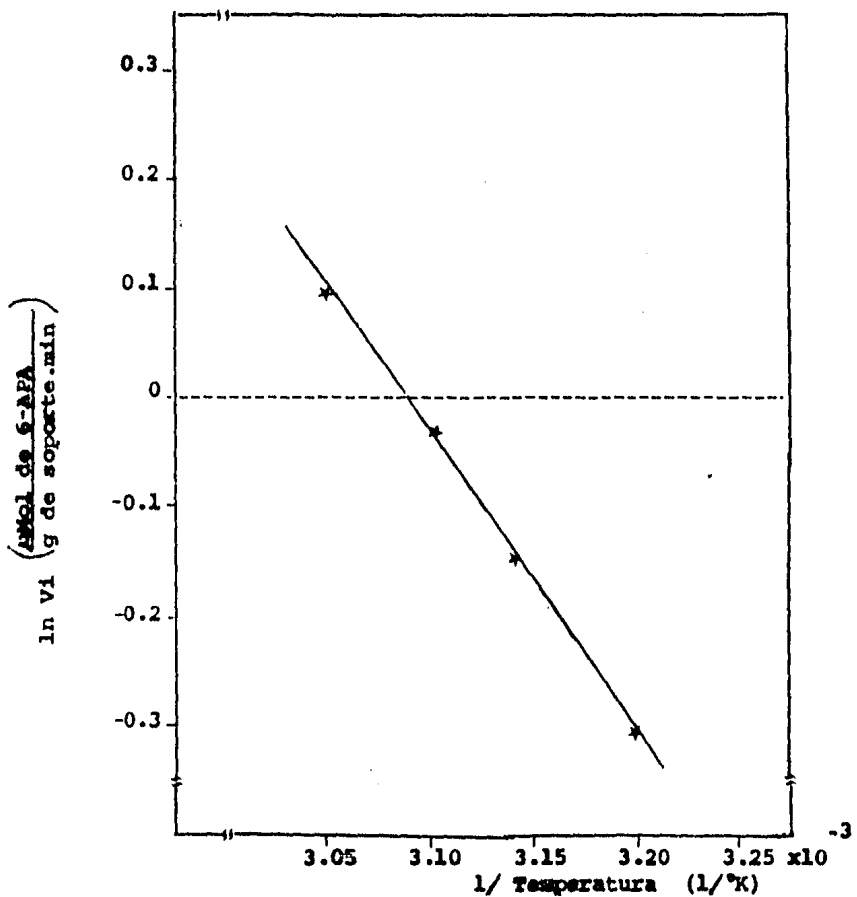


Figura 5.12. Energía de activación para la reacción de hidrólisis de la Penicilina G-K, ( $E_a = 5.46$  Kcal/mol,  $Q_{10} = 1.3$ ). Las condiciones de reacción fueron pH 8.0, usando una solución amortiguadora de fosfatos 0.03M.

debe a las condiciones usadas para la determinación de los parámetros que en cada caso son diferentes, además de no olvidar que cada enzima varía dependiendo de su origen.

Aún así se observa que la  $K_m$  determinada en este trabajo presenta uno de los valores más bajos dentro de las  $K_m$  para los sistemas inmovilizados.

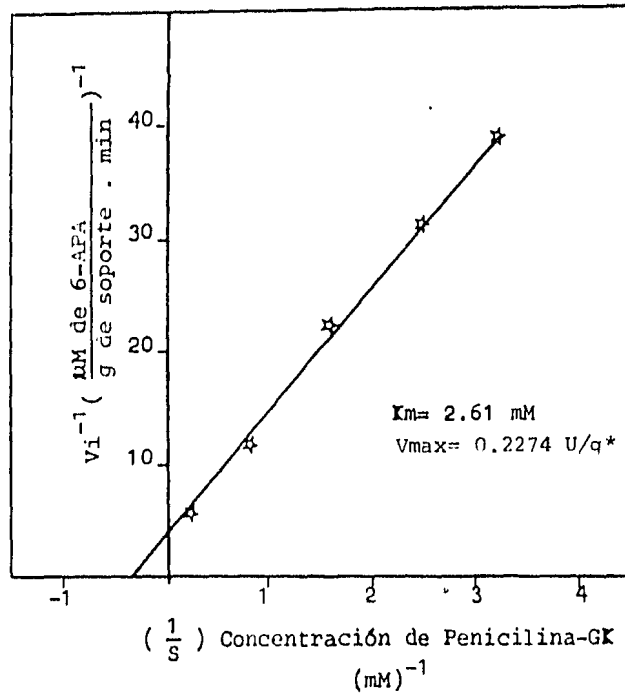
La cinética de las células inmovilizadas, usualmente es más compleja que la correspondiente a las enzimas inmovilizadas. Ya que se tiene la presencia adicional de una barrera difusional creada por la existencia de la pared celular intacta y la membrana citoplasmática. De ahí que la cinética propia de las células inmovilizadas y su efectividad puedan definirse en relación al comportamiento de ellas al eliminar las limitaciones difusionales o establecer que tan significativas son éstas.

Los efectos difusionales son más notorios cuando la reacción enzimática es muy rápida o la concentración del sustrato es baja, o cuando se tienen soportes con una alta porosidad, así como una baja actividad o un prolongado uso de las partículas inmovilizadas.

En base a los resultados antes mencionados observamos que nuestro sistema presenta serios problemas difusionales, ya que tenemos una gran variación de la energía de activación, así como un importante incremento en la  $K_m$  y  $V_{max}$ . Por lo que se determinó el factor de efectividad que es una medida relativa de la disminución de la velocidad de reacción ocasionada por los efectos difusionales y se define como:

$$\eta = \frac{\text{velocidad de reacción observada}}{\text{velocidad de reacción en ausencia de resistencia a la difusión interna}}$$

Suponiendo que la enzima obedece al modelo de Michaelis-Menten, la velocidad de reacción estará dada por:



**Figura 5.13.** Efecto de la concentración de Penicilina G-Potásica en la actividad de la enzima penicilino amidasa presente en las células de E. coli ATCC 9637 inmovilizadas en Agar. La determinación fue hecha a pH 8.0 en sol. amortiguadora de fosfatos 0.03M y a 40°C con agitación rotatoria.

\*  $(U/q) = \mu\text{Mol de 6-APA} / q \text{ de soporte} \cdot \text{min.}$

Tabla 5.4. Comparación del Km obtenido experimentalmente en el sistema inmovilizado con los encontrados en la literatura.

Fuente de la enzima	pH	T (°C)	Km Soluble (mM)	Km Inmov. (mM)	KI G-APA (mM)	KI AFA (mM)	Referencias
<u>E. coli</u>							
ATCC 9637	-	-	7.7	3.0	-	-	Demain (17)
	8.0	40	-	4.7	170.5	28.9	Park (45)
	7.5	37	1.5	7.7	-	-	Self (47)
	8.0	40	0.14 cél. completas	-	7.2	1.1	Sandoval (47)
	8.0	40	- cél. completas	2.6	-	-	Este trabajo
<u>E. coli</u>							
NCIB 8743A	7.0	37	0.77	-	5.9	4.7	Balasingham (3)
	7.5	"	0.74	-	6.5	4.8	"
	8.0	"	0.67	-	7.1	4.8	Warburton
	8.0	"		0.63	9.0	4.6	Lilly, M.D. (37)
	8.5	"	0.80	-	5.3	5.1	
	8.0	27	0.77	-	5.3	5.8	
	8.2	50	30.0 cél. completas	-	-	-	Demain y Cole (16)
<u>E. coli</u>							
ATCC 11105	8.1	25	0.025	-	0.20	15	Kutzbatch (36)
	7.8	37	-	2.0	-	-	Klein (32)

Continuación:

Fuente de	pH	T (°C)	Km Soluble (mM)	Km Inmov. (mM)	KI 6-APA (mM)	KI AFA (mM)	Referencias
<u>E. coli</u>							
sp.	8.0	30	1.35-1.59	-	-	-	Brandl (4)
	7.5	-	17.5	-	-	-	Badr-Eldin (1)
<u>E. coli</u>							
C15 (NCIB9465)	5.5	-	4.0	-	-	-	Holt (24)
<u>E. coli</u>							
D 816	8.4	50	6.3	-	-	-	Wang (55)
	9.0	55	-	11.4	-	-	

$$V_r = \left( \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \right) \eta$$

En ausencia de problemas difusionales, la velocidad de reacción estará dada por la cinética de Michaelis-Menten y será igual a uno. En base a ésto se hizo un estudio comparativo de velocidad de reacción para diferentes tamaños de soporte, y de esta forma determinar la influencia de las resistencias internas.

En base a ésto se desarrollo el siguiente experimento en donde a partir de un biocatalizador de 0.5cm por lado de cubo, se fue reduciendo sucesivamente, es decir primero se dividió a la mitad a su vez nuevamente a la mitad hasta la total desintegración del biocatalizador. Se observo que conforme se disminuía el tamaño de partícula, la velocidad de reacción aumentaba.

Tamaño	Actividad	$\eta$
Entero	23.33	0.42
1/2	26.58	0.49
1/4	29.83	0.55
desintegrado	54.47	_____

\* Actividad = U/g de biocatalizador

De este estudio se encontró que el factor de efectividad para el biocatalizador desarrollado es de 0.42

## VI Conclusiones.

Se cumplió con el objetivo de dar un panorama general sobre la evolución que ha tenido la tecnología enzimática, así como el desa-

rollo de una metodología para la inmovilización por atrapamiento de células completas de Escherichia coli ATCC 9637, con actividad de penicilino amidasa, usando como soporte Agar.

Se logró producir lotes de células con una actividad específica de 1.7 U/mg de proteína.

En el estudio fisicoquímico del soporte se estableció la concentración apropiada (3.5%), en donde el soporte presenta una buena fuerza de gel. Se determinó el pH al cual se deberá preparar, y el tipo de iones que deberán estar presentes durante la formación del enrejado polimérico, de manera que no se altere la fuerza del gel que es de  $1.2 \times 10^{-4}$  Kg/m<sup>2</sup>. El pH corresponde a un valor de 7 y se uso una solución de acetatos 0.062M.

En cuanto a la capacidad de atrapamiento se escogió la relación 1:1, en donde se tiene la mejor expresión de actividad, aunque no buena capacidad de retención.

Para mejorar la capacidad de retención y estabilidad a la agitación del biocatalizador se empleó glutaraldehído en una concentración del 2%, en donde se observó una disminución del 25% en la actividad enzimática.

La disminución de la actividad se debió a que el glutaraldehído afecta la actividad de la enzima penicilino amidasa y no a un aumento en los problemas difusionales.

El biocatalizador desarrollado presenta limitaciones difusionales, debido a que presenta una disminución en su energía de activación, mientras que su Km aumenta así como su Vmax.

Además que conforme se disminuyó el tamaño de partícula la expresión de la actividad fue aumentando lo mismo que el factor de efectividad.

La actividad específica del biocatalizador desarrollado es de



## 23.2 U/g de biocatalizador.

### Sugerencias.

Establecer la vida operacional del biocatalizador desarrollado empleando un reactor enzimático.

Seleccionar el reactor enzimático en base al tipo de reacción que se efectúa y a la configuración del biocatalizador.

Optimizar la forma del biocatalizador con el fin de disminuir las limitaciones difusionales, así como una mejor estabilidad mecánica.

Incrementar la relación células-agar para elevar la actividad específica del biocatalizador (Unidades/g de soporte). Ya sea por el uso de agentes químicos que además del atrapamiento establezcan un entrecruzamiento; o por la combinación del agar con otros polisacáridos y/o empleando una cepa hiperproductora de la enzima.

Establecer un modelo cinético que prediga el comportamiento del sistema de células inmovilizadas.

Hacer una evaluación económica sobre los costos de producción del biocatalizador.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Badr-Eldin, S.M., and Attia, M.M., *Acta Microbiol., Pol., Ser.* 135, pp 43 (1973).
2. Balasingham, et.al., *Biochem., Biophys., Acta*, 276, pp 250-256 (1951).
3. Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., and Lilly, M.D., *Biochem Biophys Acta*, 284, pp 278-284 (1972).
4. Brandl, E., Hoppe Zeyler's, *Z., Physiol. Chem.*, 342, pp 86 (1965).
5. Bomstein, J., and Evans, G.W., *Anal. Chem.*, 37, pp 576-578 (1965).
6. Bucke, C., *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Vol. 1, ed., Wiseman A., and Wiley, J., N.Y., pp 147-168 (1976).
7. Casas, T.L., "Producción del ácido 6-aminopenicilánico por Hidrólisis Enzimática de la Penicilina G". Tesis para obtener el grado de Maestría, I.I.B.M., U.N.A.M., México (1981).
8. Chibata, I., Tosa, T., *Advances Applied Microbiol* 22, pp 1-25 (1977).
9. Chibata, I., *Immobilized enzymes research and development*. Halsted Press, New York., (1978).
10. Clauseu, V., *Técnicas de Laboratorio en Biología Molecular Y Bioquímica*, Ed., Manual Moderno (1975).
11. Cole, M., Savidge, T., and Vanderhaghe, H., "Penicillin acylase Antibiotic Inactivation and Modification, Vol 45, pp 698-721 (1975).
12. Cole, M., "Hydrolysis of Penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *E.coli*". *Biochem. J.*, 115, pp 733-739 (1969).
13. Cole, M., "Deacylation of acylamino compounds other than penicillins by the cell-bound penicillin acylase of *E.coli*". *Biochemn., J.*, 115, pp 741-745 (1969).

14. Cole, M., "Microbial synthesis of penicillins and 6-APA".  
Biochem. Process, 2, pp 35-46 (1967).
15. Cole, M., Nature 203, pp 519-520 (1964).
16. Demain, A.L., Methods in Enzymology, (Kaplan, D., and Jakoby, W.B.), Vol. 23, pp 86, Academic Press N.Y., (1971).
17. Demain, A.L., Developments in Ind. Microbiol., 12, pp 56 (1971).
18. Dixon, M., Webb, E.C., Thome, C.J., and Tipton, K.P., Enzymes Ed. Longman Group Limited, London (1979)
19. Folin, O., and Ciocalteu, V., "On Tyrosine and Tryptophane Determination in proteins", J.BIO.Chem., Vol, 73, (2) (1927).
20. Giovenco, S., Maimme, A., "Immobilized Penicillin acylase in cellulose acetate beds". 2° Congreso Internacional de Biotecnología, Eastbourne, Inglaterra (1981).
21. Gould, B.J., Topics in Enzymes and Fermentation Biotechnology Vol. 2, Ellis Horwood Limited, N.Y., (1978).
22. Grubhofer, N., Schleith, L., Naturwissenschaften, 40, pp 508 (1953).
23. Hamilton-Miller, J.M.T., Bacterial Rev., 30, pp 760-771, (1976).
24. Holt, R.J., and Stewart, G.T., Nature (London), 201, pp 824 (1964).
25. Hultin, O.H., "Current and Potential uses of Immobilized Enzymes" Food technology, (oct.), pp 66-82 (1983).
26. Jack, T.R., Zajic, J.E., "The immobilization of whole cells" in Advances in Biochemical Engineering, (Fiechter, A., Ghose T.K., Blakebrough) Vol, 5 N.Y., pp 126 (1977).
27. Karube, I., Matsunaga, S., Mitsuda, S., and Suzuki, S., J.Ferment. Technol., 55, pp 243-248 (1977).
28. Karube, I., Mitsuda, S., Matsunaga, S., and Suzuki, S., Biotechnol and Bioeng., 19, pp 1535-1547 (1977).
29. Karube, I., Huriyama, E., Matsunaga, S., and Suzuki, S., "Methane Production from Waste waters by immobilized Methanogenic Bacterial", Biotechnol. and Bioengineering, Vol. 22 pp 847-857, (1980).
30. Katchalski, E., Nature, 188, pp 856 (1960).
31. Kierstan, M., Bucke, C., Biotechnol. and Bioeng., 19, pp 387-397 (1977).

32. Klein, J., Wagner, F., "Immobilized Whole Cells", *Biotechnol. Decheman Monographs*, 82, pp 142 (1978).
33. Klein, J., and Wagner, F., *Enzyme Engineering*, Vol 5 (1980).
34. Kolot, B.F., "New trends in yeast technology immobilized cell". *Process Biochem* (Oct./Nov.), pp 2-8 (1980).
35. Kolot, B.F., "Microbial carriers-strategy for selection". *Process Biochem.*, (Aug/Sept.), pp 2-9 (1981).
36. Kutzbach, C., and Rovenbusch, E., "Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *E. coli* ATCC 31105, *Z. Physiol. Chem.*, 354, pp 45-54 (1974).
37. Lilly, M.D., *Biotechnology, Decheman Monographs*, 82, pp 1693 (1978).
38. López, M.C.A., "Determinación de los efectos de transferencia de masa en la cinética observada de enzimas inmovilizadas *Re. SOC. QUIM., Mex.*, Vol 25, (5), pp 522-528 (1981).
39. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.J., and Randall, R.J., *Biol. Chem.*, 193 (1951).
40. Mattiason, B., and Mosbach, K., *Biochem Biophys, Acta*, 235, pp 253 (1971).
41. Mc. Laren, A.D.J., *Phys, Chem*, 58, pp 129 (1954).
42. Messing, R.A., et al., *ACS Symposium*, Series 106 (1979).
43. Navarro, J.M., and Durand, G., "Immobilized Microbial Cells". *Process, Biochem.*, (Sept.), pp 14-23 (1978).
44. Nelson, J.M., Griffin, E.G., "Adsorption of Invertebrate". *J. AM. Chem. SOC.*, 38, pp 1109 (1916).
45. Park, M.J., and Choi, Y.CH., "The production of 6-aminopenicillanic acid by a Multistage Tubular Reactor Packed with Immobilized Penicillin Amidase". *Biotechnol., and Bioeng.*, Vol 24, pp 1623-1637 (1982).
46. Prath, J., and Axón, R., "Immobilization of enzymes to Agar Agarose and Sephadex Supports", *Methods in Enzymology Academic Press, N.Y.*, Vol 44, pp 19-45 (1976).
47. Sandoval, H., "Cinética que rige la reacción de hidrólisis de la penicilina G, por la penicilina amidasa". Trabajo de tesis para obtener el Grado de Licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M., México (1980).
48. Saviskaya, M., Mys, P.S., Levitov, M.B., and Shellenberg, E.H., "Application of Immobilized microbial acylase for the synthesis of 6-APA". *Advances in Enzyme Engineering*, Vol. 1 (1975).
49. Savidge, T., Cole, M., "Penicillin Acylase" (assay) *Antibiotic Inactivation and Modification*, Vol. 45, pp 698-721 (1975).

50. Sumer, J.B., *Science*, 108, pp 410 (1948).
51. Toda, K., and Shoda, M., "Sucrose Inversion by Immobilized Yeast cells in a complete mixing reactor", *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. 17, pp 481-497 (1975).
52. Toda, K., "Interparticle Mass Transfer study with a Packed column of Immobilized Microbes", *Biotech, and Bioeng.*, Vol 17, pp 1729-1747 (1975).
53. Tosa, T.J., Sato, T., Mori, K., Yamamoto, I., Takato, Y., and Chibata, I., "Immobilization of enzymes and Microbial cells using carragenan as matrix", *Biotechno., and Bioeng.*, 21, pp 1677-1709 (1979).
54. Venkatasubramanian, K., and Vieth, R.W., "The utility of supported enzyme systems", *Chemtech.*, (Nov.), pp 677-684 (1973).
55. Wang, Q., Li, X., and Yuan, Z., "Immobilization of Microbial Cells using Gelatin and Glutaraldehyde"., *Advances in Biochemical Engineering*, (Frechter, A., Ghose, T., Blakebrough, N.,) Vol. 9, pp 215 (1982).
56. Weetall, H.H., "Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry"., *Process Biochem.*, (Jul/Aug), pp 3-30 (1975).
57. Warburton, D., Balasingham, K., Dunnill, P., and Lilly, M.D., *Biochem, Biophys Acta* 284, pp 278-284 (1972).
58. Zittle, C.A., *Adv. Enzymol.*, 14, pp 319 (1953).

## VIII APENDICES.

## Apéndice A

## A.1 Materiales

## A.1.1 Reactivos.

En el desarrollo experimental se emplearon los siguientes reactivos que a continuación se enlistan en orden alfabético, indicando su procedencia:

PRODUCTO	PROCEDENCIA
Acetato de sodio R. A.	J. T. Baker
Acido 6 aminopenicilánico	Sigma
Acido clorhídrico R. A.	J. T. Baker
Acido fenil acético	Sigma
Acido sulfúrico R. A.	J. T. Baker
Agar bacteriológico	Difco y Bioxón
Albumina bovina	Sigma
Carbonato de sodio R. A.	J. T. Baker
Cloruro de amonio R. A.	J. T. Baker
Cloruro de calcio R. A.	J. T. Baker
Cloruro de sodio R. A.	J. T. Baker

Etanol R. A.	J. T. Baker
Fosfato monobásico R. A.	J. T. Baker
Fosfato dibásico R. A.	J. T. Baker
Glutaraldehído	Merck
Hidróxido de potasio R. A.	J. T. Baker
Hidróxido de sodio R. A.	J. T. Baker
p-dimetil-amino-benzaldehído R. A.	Merck
Penicilina G. potásica	Fermic S. A.
Reactivo Fenol-Folin Ciocalteu	Sigma
Sulfato cúprico pentahidratado R. A.	J. T. Baker
Sulfato ferroso R. A.	J. T. Baker
Sulfato de magnesio R. A.	J. T. Baker
Sulfato de potasio R. A.	J. T. Baker
Tartrato de sodio y potasio R. A.	J. T. Baker
Amortiguador de referencia pH 7 y pH 4	Sigma
Papel indicador de pH	pHydrion

#### A.1.2. Equipos:

## E Q U I P O

## M A R C A

Centrífuga con cabezal G S.A.	Dupont Instruments Sorvall RC-5 Super Speed.
Centrífuga clínica, 5000 rpm	Sol. Bat. Aparatos Científicos.
Colorímetro (Spectronic 20)	Bauch & Lomb, Co.
Cronómetro	Haste Sport.
Baño con agitación y control de temperatura	New-Brunswick.
Balanza analítica	Bauch 2000
Fermentador Bioflo	New-Brunswick.
Agitador magnético	Corning.
Parrilla con agitación magnética	Thermolyne.
Barras magnéticas	Curtin U.S.
Estufa	Felisa.
Potenciómetro	Corning 30.
Vortex (Super-Mixer)	Lab. Line Instruments.
Soporte universal	
Pinzas de 3 dedos con nuez	
Pesas	



Cajas petri desechables (8cmØ)	
Desecador	Pyrex
Micropipetas (200 y 100 ul)	Gilson
Matraces Erlenmeyer (125,250,500ml)	Pyrex
Vasos de precipitado (100,250,500ml)	Pyrex
Matraces aforados (10,100,200,1000ml)	Pyrex
Pipetas volumétricas (1,10ml)	Pyrex

## Apéndice B.

### B.1. Técnicas Analíticas.

#### B.1.1. Proteína (método de Lowry; Lowry *et. al.*, 1951).

Es uno de los métodos más sensibles para medir la concentración de proteína (desde 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), el color es desarrollado por el reactivo de Folin después de un tratamiento alcalino. La coloración final es el resultado de una reacción de Biuret de la proteína con el ión  $\text{Cu}^{2+}$  en álcali y la reducción del reactivo fosfotúngstico-fosfomolibdico por la presencia de tirosina y triptofano en la proteína.

#### Procedimiento.

Preparar las siguientes soluciones:

Solución A = 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_2$  en Na OH 0.1N

Solución B =  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5%

Solución C = Tartrato de Na y K 1%

Reactivo D = Solución C + Solución B (relación 1:1 v/v)

Reactivo E = 1ml del reactivo D más 50ml de la solución A, si se prepara al momento esta solución no necesita decantarse (no usar después de un día de su preparación).

Reactivo de Folin = Diluir el reactivo de Folin con agua destilada en una relación de 1:1 v/v

Preparar una solución patrón de albúmina bovina con una concentración de 1  $\text{mg}/\text{ml}$ , para obtener concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Una curva patrón se representa en la figura B.1.

Determinación de proteína en células microbianas.

- a) Tomar 0.1 ml de la suspensión de células para la mezcla de reacción.
- b) Aforar a 1 ml con agua destilada
- c) Añadir 5 ml del reactivo E
- d) Reposar durante 10 minutos
- e) Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin
- f) Reposar durante 30 minutos y leer a 590 nm contra un blanco de reactivo<sup>x</sup>
- g) La solución patrón de albúmina se procesa de la misma forma que las muestras.

<sup>x</sup> El blanco de reactivo consiste en colocar 1 ml de agua destilada y procesarlo de igual forma que las muestras.

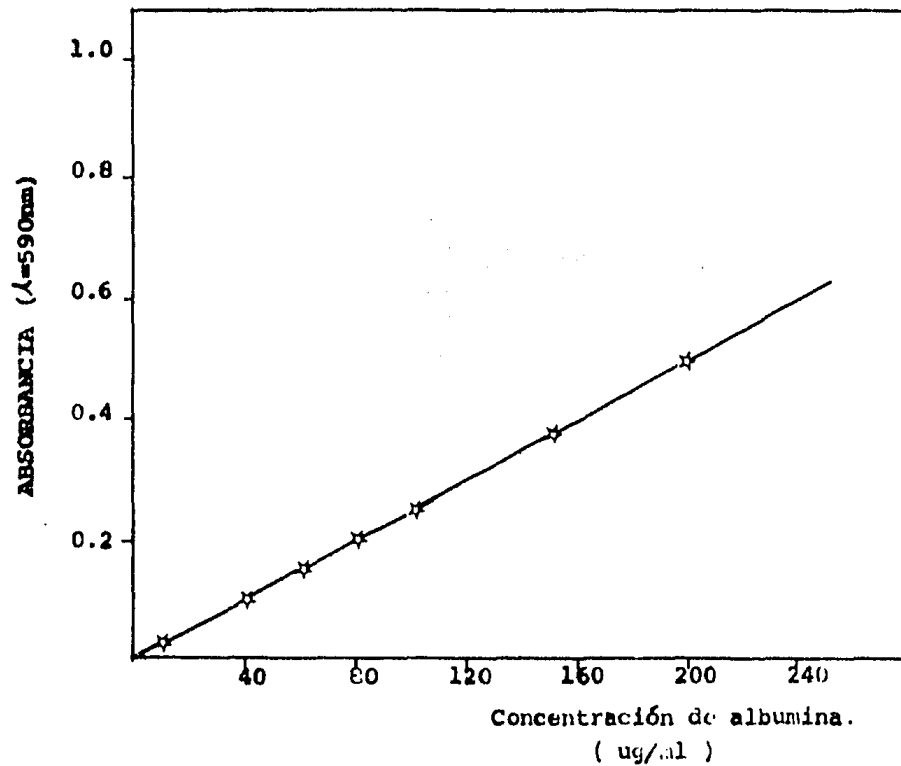
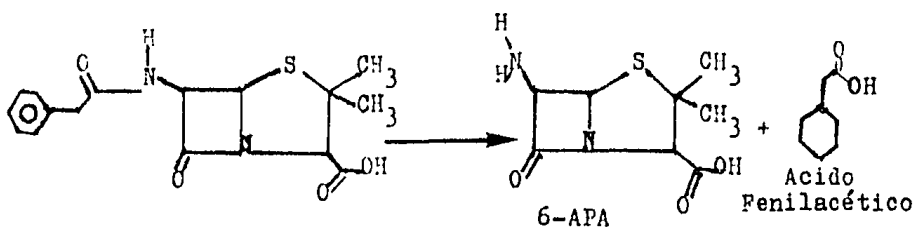


Figura B.1. Curva patrón de albumina bovina.

### B.1.2. Cuantificación del ácido 6-amino-penicilánico por el método del p-dimetil-amino-benzaldehído.

El método del p-dimetil-amino-benzaldehído se fundamenta en hacer reaccionar a éste con el grupo amino presente en el ácido 6-amino-penicilánico, para dar lugar a la formación de una base de Schiff colorida, la cual se puede estimar cuantitativamente empleando un colorímetro a una longitud de onda de 415 nm.

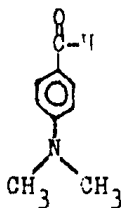


Benzilpenicilina

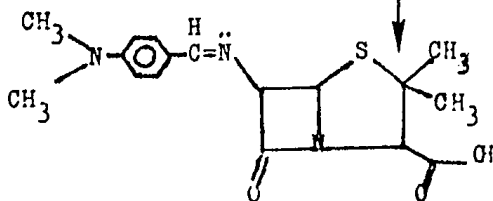
6-APA

Acido Fenilacético

+



p-Dimetil-amino-benzaldehído



BASE DE SCHIFF. Compuesto cromóforo

Abs. máxima a 415 nm.

## PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1) Reactivo de p-dimetil-amino-benzaldehído  
Pesar 1g de p-dimetil-amino-benzaldehído y disolverlo en 50ml de alcohol etílico al 60% (v/v), adicionar 0.5ml de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 10ml con el alcohol etílico al 60%. Guardar el reactivo en frasco ámbar.
- 2) Solución patrón de 6-APA.  
Preparar una solución de 2.5 mg/ml de 6-APA usando solución amortiguadora de fosfatos 0.03M, pH 8.0 en caso de no disolverse añadir cuidadosamente unas gotas de KOH 0.1N, cuidando que el pH no suba más de 8.0.

## Curva patrón.

- 1) A partir de la solución patrón hacer diluciones progresivas de esta solución, tomando 1 ml de la solución de 6-APA y adicionando 1ml de solución amortiguadora, agitar.
- 2) Una vez preparada la serie de diluciones, tomar 0.2ml de cada solución de 6-APA y depositarlas en tubos de centrifuga, las cuales ya contienen 4.8ml de alcohol etílico absoluto.
- 3) Adicionar 2.5ml del reactivo de p-dimetil-amino-benzaldehído en cada tubo y agitar.
- 4) Centrifugar los tubos a 4,800 rpm durante 10 minutos y leer en el colorímetro a 415 nm, empleando un blanco de reactivos.
- 5) El blanco de reactivos consiste en 0.2ml de solución amortiguadora, siguiendo el mismo procedimiento.
- 6) Realizar la curva por duplicado y graficar los valores como se indica en la figura B.2.

Las limitaciones de este método consisten en que si existen otras aminas primarias además de la presente en el 6-APA, éstas interferirán en la determinación. Además es necesario tener un preciso control del tiempo en que se desarrolla la coloración, ya que conforme pasa éste, el color puede ir disminuyendo en su absorción, dando lecturas de absorción menores.

Se debe realizar una curva patrón 6-APA, cada vez que se preparen nuevos reactivos.

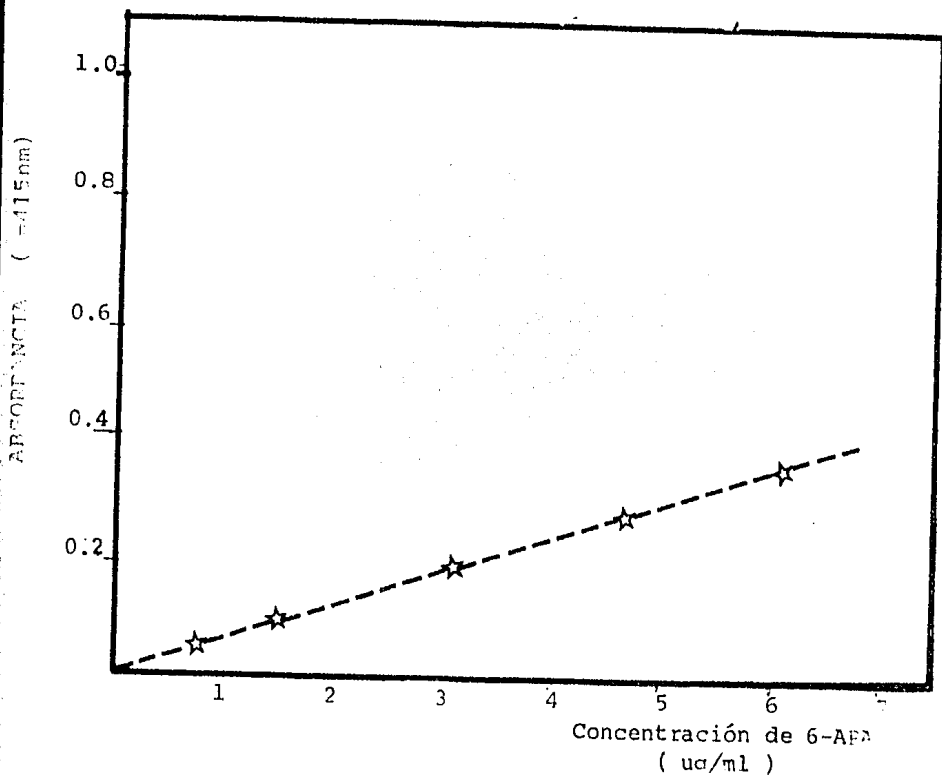


Figura B.2. Curva patrón del ácido 6-aminopenicilánico.

### B.1.3. Determinación de peso seco.

En un matraz de 500 ml de capacidad, colocar 100 ml de medio mínimo de cultivo (0.2% de ácido fenilacético y 0.8g/l de  $\text{NH}_4\text{CL}$ ). Inocular al 1.5% (v/v), y utilizar las condiciones de crecimiento previamente establecidas (T 29°C, agitación rotatoria de 200 rpm, pH 7.4 antes de esterilizar).

El crecimiento se siguió hasta que la bacteria alcanzó su fase estacionaria. Se tomaron muestras de 2 ml cada hora, 1 ml se diluyó con agua destilada en una relación de 1:1 y se determinó la D.O. a 560 nm. El ajuste a el valor 0 del espectrofotómetro se realizó con agua destilada. El mililitro restante se filtro através de una membrana Millipore (tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ) las cuales estaban previamente pesadas. Las muestras se dejaron durante 18 horas a una temperatura de 80°C, pesándose posteriormente hasta peso constante en las tres primeras cifras del punto decimal; con los valores obtenidos se construyó una curva de D.O., contra peso seco, que se muestra en la figura B.3.



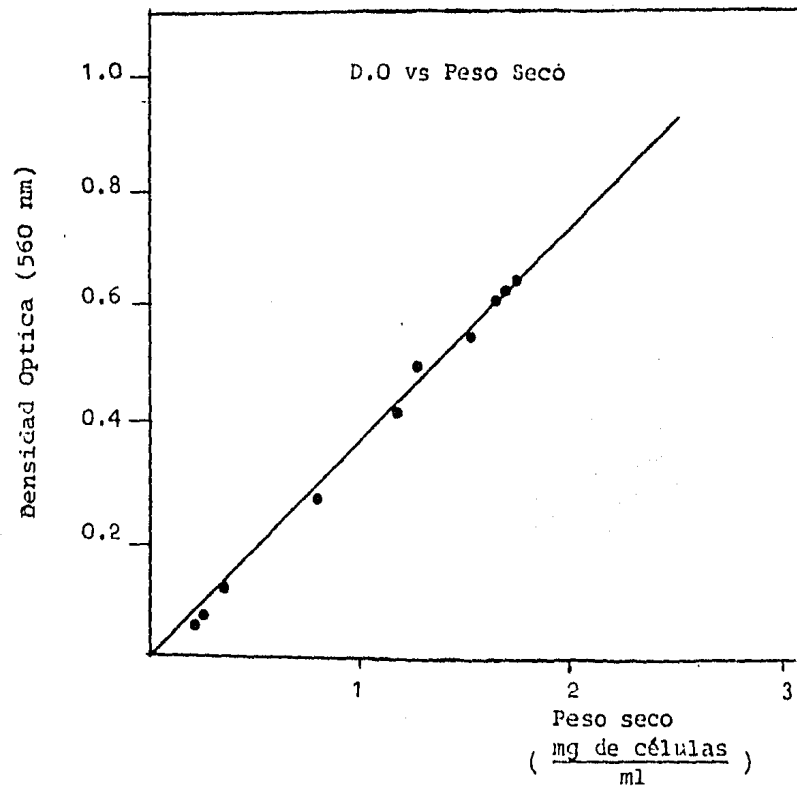


FIGURA B.3. Curva patrón de Peso Seco de E.coli ATCC-9637.

## B.2. Procedimiento para curtir soportes constituidos por polisacáridos.

### 1.- Preparación de la solución de curtido.

Pesar 24.6g de acetato de sodio (0.3M) y colocarlos en un vaso de precipitados de 1000 ml de capacidad, con 700 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH 7.0. Añadir 5.7 mililitros de etilen diamina; ésta última deberá estar a una concentración de 0.085M.

La adición de la etilendiamina deberá hacerse lentamente y en frío, utilizando una campana de extracción, ya que se desprenden vapores tóxicos. Posteriormente se ajusta el pH a un valor de 7.0 usando ácido fosfórico concentrado y se lleva a 1000 ml con la solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH 7.0.

### 2.- Curtido.

- a) Se toman 100g (peso húmedo) del biocatalizador (células-agar) previamente fraccionado y se colocan en un vaso de precipitados de 1000ml de capacidad.
- b) Se resuspenden las partículas del biocatalizador en 500 ml de la solución de curtido y se agitan lentamente durante 5 minutos. La operación deberá realizarse a 4°C.
- c) Se añade el glutaraldehído, de manera que se tenga una concentración final del 2.0% (p/v).
- d) Se deja agitar durante 30 minutos a 4°C.
- e) El biocatalizador se lava perfectamente con agua destilada, hasta eliminar el color naranja de la solución de curtido, el biocatalizador después del tratamiento adquiere una coloración amarilla, que finalmente se oscurece hasta dar un color café. Finalmente se lava con solución amortiguadora de fosfatos 0.03M pH 8.0.