



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA
C.B.S. POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE
INMOVILIZACION DE *Kluyveromyces marxianus* EN
ALGINATO DE BARIO**

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

QUE PRESENTA:

JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

ASESORES:

M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ
M. EN C. MARIANO GARCIA GARIBAY

UAM. XOCHIMILCO DEPTO. SISTEMAS BIOLÓGICOS
LAB. DE BIOTECNOLOGIA

MEXICO, D. F.

1996

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa;

222247

Por impulsarse a seguir adelante...

A mis hijos:

Para ofrecerles una diferente forma de pensar...

A Gloria Florido Gutiérrez:

En su memoria...

Al M. en C. Alejandro Azaola Espinoza:

Por invitarme a colaborar en su equipo de trabajo...

1. RESUMEN

En el presente trabajo se analizan los aspectos físicos y biológicos de un sistema de inmovilización de células de levadura *Kluyveromyces marxianus* en alginato de bario endurecido con glutaraldehído. En los primeros resultados, la hidrólisis de la inulina al 6% efectuada en un reactor en lote fué de un 80 % del potencial total de azúcares reductores en 3 horas, con una productividad de 6.88 g/l-h. Las mismas células inmovilizadas fueron reutilizadas por 5 corridas en el transcurso de 10 semanas encontrándose que el porcentaje de hidrólisis en la última corrida fué de 92.8% de actividad residual en relación a la primera. No se encontró diferencia significativa empleando diferentes concentraciones de glutaraldehído como agente estabilizador del alginato de bario, utilizando finalmente una concentración de glutaraldehído 0.3 M. El empleo del glutaraldehído redujo la salida de células del sistema de inmovilización, observándose que no hubo pérdida significativa de la actividad de las células del sistema de inmovilización.

La actividad enzimática dependió de la carga celular y del diámetro de esfera. Se tomaron como valores una concentración celular de 256 mg de células por ml de alginato y un diámetro de 2.1 mm. El tratamiento térmico (65°C/5 min) de las células inmovilizadas mejoró su actividad alcanzando 8 g/l-h de azúcares reductores. Este tratamiento no afectó en la estabilidad del sistema de inmovilización en 5 corridas realizadas. Al analizar el efecto de la temperatura en células inmovilizadas se encontró que se aumentó la actividad enzimática en un intervalo de temperatura de 55 a 70°C, la enzima presentó termoestabilidad durante una hidrólisis en 60 minutos. El valor de eficiencia obtenido experimentalmente fué de $\eta = 0.65-0.73$. Cuando se empleó el diámetro de esfera de 1.43 mm se alcanzó una eficiencia de $\eta = 0.79$, pero las esferas fueron menos resistentes mecánicamente. Existieron problemas de difusividad en los primeros 15 minutos alcanzando el equilibrio despues de este tiempo, el valor del coeficiente de difusividad (D_E) obtenido fué de $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Los parámetros cinéticos del sistema de inmovilización fueron K_m' de 0.522 mM y V_{max}' de $113.7 \mu\text{M min}^{-1}$. El sistema de inmovilización tuvo valores del módulo de Thiele (Φ) cercanos a 1, mostrando que las limitaciones que se presentan fueron difusionales. Las esferas de alginato de bario con glutaraldehído mostraron mayor resistencia a la temperatura, abrasión, sales y agentes quelatantes.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	4
3. Generalidades.....	6
3.1 Características y ventajas de células inmovilizadas.....	6
3.2 Transferencia de masa.....	8
3.2.1 Transferencia de masa externa.....	9
3.2.2 Transferencia de masa interna.....	9
3.2.3 Difusión de solutos en esferas de gel.....	12
3.2.4 Cálculo del coeficiente de difusión.....	14
3.3 Alginato.....	16
3.4 Inulina.....	17
3.5 Inulinasa.....	17
4. Objetivo general y particulares.....	20
5. Materiales y métodos.....	21
5.1 Microorganismo y condiciones de cultivo.....	21
5.2 Aumento de la permeabilidad de la célula.....	21
5.3 Técnica de inmovilización.....	21
5.4 Determinación de la actividad enzimática.....	22
5.5 Determinación de la hidrólisis enzimática por células inmovilizadas por lote.....	22
5.6 Obtención de la eficiencia del sistema de inmovilización.....	22
5.7 Tratamiento endurecedor de las esferas de alginato de bario.....	23
5.8 Determinación de la velocidad de salida de células de las esferas de alginato.....	23
5.9 Efecto de sales sobre las esferas de alginato de bario durante su almacenamiento.....	23
5.10 Determinación de la concentración celular en las esferas de alginato de bario.....	23
5.11 Determinación de la difusión en las esferas de alginato de bario.....	23
6. Resultados y discusión.....	25
6.1 Cinética de hidrólisis de inulina por células libres e inmovilizadas.....	25
6.2 Mejoramiento de la permeabilidad de la pared y membrana celular en células libres.....	25
6.3 Problemas de estabilidad.....	27
6.4 Efecto de las sales en el almacenamiento de la esfera a 4°C.....	27
6.5 Salida de células de las esferas.....	28
6.6 Efecto de la concentración de glutaraldehído en la estabilidad de las esferas de alginato..... de bario.....	29
6.7 Influencia de la carga celular y diámetro de esfera en la eficiencia del sistema de	

inmovilización	31
6.8 Aumento de la permeabilidad de las células inmovilizadas	33
6.9 Difusión de la inulina a través de la esfera de alginato de bario	35
6.10 Determinación de la eficiencia del sistema de inmovilización	36
6.11 Relación entre el diámetro de esfera y la eficiencia del sistema de inmovilización	38
6.12 Efecto de la temperatura en el sistema de inmovilización	38
6.13 Análisis del sistema de inmovilización a través del módulo de Thiele	39
7. Conclusiones	42
8. Comentarios finales	44
9. Bibliografía	46

2. INTRODUCCION

Los procedimientos utilizados para la elaboración de aditivos en productos farmacéuticos se han dirigido hacia el uso de técnicas de biotecnología; algunas de éstas emplean en su procesos enzimas, que son catalizadores biológicos que tienen alta especificidad sobre el sustrato y cuya actividad es fácilmente controlada al ajustar las condiciones de la reacción, la investigación sobre de estos catalizadores ha permitido usar sustratos baratos y abundantes.

Para llevar los procesos a la práctica se han desarrollado diversas técnicas de inmovilización de enzimas o células completas de microorganismos que permiten alcanzar altos niveles de conversión, la más ampliamente utilizada es el atrapamiento de células en geles hidrofílicos que pueden contener una alta densidad de células, la principal limitación de estos sistemas es la restricción difusional de sustratos y productos a través de ellos, por lo tanto una alta porosidad es una característica deseable (SivaRaman y col., 1982).

La fructosa es un azúcar natural que puede ser empleado como edulcorante en la industria alimentaria y farmacéutica (Barker, 1976). No solamente tiene propiedades organolépticas deseables, sino que tiene mayor poder edulcorante que la sacarosa y mucho más que la glucosa. Esta propiedad le permite reemplazar a la sacarosa en algunas preparaciones farmacéuticas como jarabes. Por lo tanto ofrece un alto valor intrínseco (Gelardi, 1991).

Una buena alternativa para la producción de jarabes con alto porcentaje de fructosa es a partir de la hidrólisis de un polifructano como la inulina. La inulina es de origen vegetal y sustituye al almidón como reserva alimenticia en plantas de la especie *Compositae*. La inulina consiste en aproximadamente 35 residuos de D-fructosa terminados por un residuo D-glucosa. Muchos microorganismos contienen inulina (2,1-β-D-fructano hidrolasa, EC 3.2.1.7), la cual es capaz de hidrolizar inulina y se ha sugerido su uso en la producción de fructosa desde los años cuarenta. Byun y Nahm (1978) mostraron que la inulina de *Kluyveromyces fragilis* puede ser empleada para hidrolizar los azúcares de la alcachofa (*Helianthus tuberosus*).

Para la obtención de la fructosa se han usado métodos químicos, pero tienen la desventaja de utilizar altas temperaturas y un agente acidificante. El efecto combinado de pH y calor provoca la mineralización del jugo, aumentando los costos del proceso (Guiraud y Galzy, 1981).

En este trabajo se propuso diseñar un sistema de inmovilización por atrapamiento, empleando alginato de bario como matriz, inmovilizando células de levadura de *Kluyveromyces marxianus* productoras de inulina y utilizando como sustrato inulina para la producción de jarabes con alto porcentaje de fructosa. Se analizó la cinética de hidrólisis de inulina de Dalia (Sigma) por la acción enzimática presente en células libres de *Kluyveromyces marxianus*, su aplicación para el sistema de inmovilización con alginato de bario, la estabilidad de las esferas de alginato de bario al almacenarse en distintas soluciones, la cinética de la hidrólisis de inulina en esferas reutilizadas en varios lotes, el mejoramiento de su reutilización empleando para ello

glutaraldehído como agente endurecedor, el diámetro de esfera y carga celular mas adecuado, y el mejoramiento de la productividad con el aumento de la permeabilidad aplicado en las células inmovilizadas; con las optimizaciones necesarias para mejorar su estabilidad y mantener su productividad.

3. GENERALIDADES

En años recientes, los procesos de inmovilización de células completas han sido desarrollados por el descubrimiento del enorme potencial que ofrecen los microorganismos en la industria química. La técnica de inmovilización ha sido definida por Rosevear (1984) como el procedimiento en el cual se confina una enzima catalíticamente activa o una célula dentro de un sistema, permitiendo el libre paso del sustrato y del producto a través de él. Tampion y Tampion (1987) la han definido como una célula o una porción de ella, que por medios naturales o artificiales es impedida de moverse independientemente de sus vecinas en todas las partes de una fase acuosa del sistema bajo estudio. Las enzimas o células se emplean en la industria de forma inmovilizada cuando sean utilizados como biocatalizadores una y otra vez, o bien de forma continua.

3.1 CARACTERÍSTICAS Y VENTAJAS DE CELULAS INMOVILIZADAS

Varias características y ventajas ofrecen los sistemas de inmovilización para la explotación económica de células inmovilizadas en lugar de utilizar células libremente suspendidas. En primer lugar, el sistema posee una alta actividad biocatalítica, el agente biológicamente activo se concentra en un volumen pequeño tanto como sea posible. Esta actividad debe ser mantenida durante un tiempo largo y debe ser posible recobrar y reciclar el agente biológico.

La segunda característica es la durabilidad del sistema. Aunque esto influiría de alguna manera la actividad biocatalítica, puede ser considerado como relacionado con las características funcionales del soporte. Si se emplea un reactor con el contenido estático, como uno de lecho empacado, las partículas estarían comprimidas bajo el peso del material de arriba. Con un reactor de lecho fluidizado o de agitación el movimiento de las partículas una sobre otra y las paredes del recipiente provocarían una abrasión, las células serían removidas del soporte o el mismo soporte se fracturaría, por tanto es deseable una resistencia a la abrasión. Otro aspecto de su durabilidad es la resistencia a la degradación microbiana, su operación es deseable en condiciones donde los contaminantes microbianos no pudieran desarrollarse fácilmente.

También mejora los rendimientos de los productos que podría ser atribuido a muchos factores tales como extender la actividad biocatalítica, cambios metabólicos ventajosos o la canalización del flujo del material dentro de la célula a través de una vía particular. Además mejora la estabilidad del producto, debido al corto tiempo de residencia de productos inestables o la disminución por degradación microbiana del producto (Dervakos y Webb, 1991).

Asumiendo que el sistema tiene alta actividad y durabilidad, la principal restricción en la bioconversión frecuentemente se centra alrededor de los problemas de difusión de sustratos y de productos. La resistencia y la tortuosidad de las vías de difusión han sido tópicos de interés, particularmente aquellos relacionados con los modelos matemáticos. Es imposible obtener un

sistema que sea óptimo para todos los criterios. Generalmente, la durabilidad es mas significativa económicamente que la completa minimización de restricciones difusionales.

Desde que se empezaron a estudiar los sistemas de inmovilización de enzimas purificadas, se ha descubierto que están limitados a simples reacciones que no involucran cofactores, además que presentan dificultades en su reutilización. Como resultado de esto, se ha incrementado el interés de emplear sistemas de inmovilización de células completas, que pueden catalizar reacciones de varios pasos, involucrando una serie completa de enzimas diferentes (Nuñez y Lema, 1987).

Las comparaciones económicas entre los procesos que involucran enzimas y células inmovilizadas con otras alternativas posibles resultan sumamente complejas. Mucho depende del costo del sistema adoptado y de fuerzas de mercado no controlables. Sin embargo, es posible hacer ciertas generalizaciones de cada proceso con sus ventajas y dificultades.

Entre las ventajas que ofrecen los sistemas de inmovilización están, entre otras, el que proporcionan una larga estabilidad, usualmente son reutilizables y la recuperación del producto es fácil. Aunque la inmovilización celular ha sido desarrollada después de la inmovilización de enzimas, éste ha tenido efectos benéficos económicos inmediatos, al evitar los costos de separación y purificación enzimática que presenta la inmovilización de enzimas, además de que la inmovilización celular es útil en procesos multienzimáticos y es posible regenerar las células, ventaja que no tiene la inmovilización de enzimas. Frecuentemente, las enzimas presentes en células inmovilizadas exhiben mejor estabilidad que las mismas enzimas inmovilizadas en estado puro. Como una de las dificultades que tienen los sistemas de inmovilización podemos mencionar principalmente la baja difusión de sustratos a través de la matriz y a través de las células en el caso de enzimas intracelulares, desventaja que se presentan en sistemas que utilizan como soporte geles.

La tecnología de la fermentación sumergida tiene la ventaja de que es extensamente utilizada, es bien entendida y el equipo fácilmente disponible. Pero los ciclos desperdiciados de esterilización del medio, inoculación, crecimiento de células y limpieza del equipo de fermentación son algunas de sus dificultades, que en los sistemas de inmovilización pueden ser reducidos. Como se notó previamente, una de las principales ventajas de la inmovilización es extender la vida metabólica de células en un estado estacionario, además la recuperación del producto es más fácil. Debido a la intensificación del proceso el tamaño del recipiente puede ser reducido en un proceso con células inmovilizadas. En comparación a la fermentación continua la reducción del recipiente es menos importante, pero sus beneficios se dan en el ahorro de los componentes del medio y en la operación en que no se consideren condiciones de crecimiento.

Para ciertos productos hay procesos químicos alternativos. En general éstos requieren temperaturas y presiones altas, son menos específicos y se obtienen productos secundarios.

Las técnicas de inmovilización han sido clasificadas en cuatro procedimientos básicos de acuerdo a lo propuesto por Rađovich (1985a), siendo: **inmovilización sin acarreador**, que consiste en la formación de agregados celulares por floculación natural o por floculación inducida utilizando agentes que modifican la carga superficial de las células (por ejemplo, polielectrolitos aniónicos o catiónicos); **acoplamiento covalente**, empleando un tratamiento con agentes entrecruzadores como el bromuro de cianógeno; **adsorción a través de enlaces iónicos**, hidrofóbicos o de hidrógeno sobre un acarreador inerte; y **atrapamiento en un material inerte semipermeable** tal como los geles, alginatos, fibras o membranas.

Conforme al proyecto del sistema de inmovilización, el atrapamiento resulta más fácil y barato, las características deseables que debe tener un acarreador en el atrampamiento son las siguientes. En la inmovilización: 1) controlar en lo posible el tamaño y porosidad del medio de atrapamiento, especialmente para reactores de escala industrial, 2) que los agentes atrapantes formen una matriz estable en el medio acuoso a temperaturas y valores de pH compatibles con la acción enzimática del microorganismo, 3) todos los acarreadores deben ser baratos y fácilmente disponibles, el costo del proceso de inmovilización debe ser lo más bajo posible.

En la producción: 1) el acarreador debe poseer estabilidad mecánica para resistir largos periodos en el reactor en el cual sean utilizados y estabilidad química en presencia de los otros componentes del sistema, 2) el acarreador debe ser inerte para el microorganismo, 3) el medio de atrapamiento debe permitir la libre difusión de sustrato, producto y otros metabolitos, especialmente los dos últimos, porque pueden inhibir la reacción, 4) el acarreador debe tener capacidad para soportar una alta densidad de células.

Una ventaja sustancial de un sistema de inmovilización es la alta densidad de células y velocidad de flujo que se emplean con células inmovilizadas que permiten incrementar la productividad y la facilidad de purificar el producto. Trabajando con velocidades de dilución más grandes que la velocidad de crecimiento de microorganismos contaminantes también ayuda a resolver problemas de contaminación. Por otra parte, los sistemas de inmovilización presentan problemas como: posibles alteraciones metabólicas que dependen de las características de las células que se empleen, ya sea, células vivas en activa reproducción, células que son viables pero no reproducibles o células muertas; la necesidad de asegurar una eficiente difusión de sustratos y productos a través de la matriz; y los costos de inmovilización (Nuñez y Lema, 1987).

3.2 TRANSFERENCIA DE MASA

El diseño de reactores bioquímicos que pueden maximizar las ventajas de las células inmovilizadas requiere entender las limitaciones de la fase interna del sistema de inmovilización y la transferencia de masa de la interfase.

3.2.1 Transferencia de masa externa

La transferencia de masa de la interfase incluye todos los pasos de la transferencia de masa de los sustratos y nutrientes hacia adentro de la matriz y la de productos a la superficie externa de la matriz de la célula inmovilizada (MCI). La MCI es la entidad que incluye el soporte y las células inmovilizadas. Los puntos donde se presenta resistencia a la transferencia de masa están en la capa gaseosa, en la interfase gas-líquido, en la capa líquida adyacente a esa interfase, en la masa líquida, en la capa líquida alrededor de la MCI y en la interfase líquido-MCI. La resistencia se incrementa en la capa líquida o en la interfase líquido-MCI.

Los efectos de la transferencia de masa de la interfase cuando una reacción ocurre en una de las fases son tradicionalmente medidos por comparación de la velocidad global de la reacción (R) y la velocidad de reacción cuando no hay gradiente de concentración entre la masa de la solución y la superficie (R_B). La transferencia de masa y la reacción ocurre en serie. En estado estacionario la velocidad de la transferencia de masa del sustrato desde la masa líquida es igual a la velocidad global de la reacción en la superficie no porosa de la MCI (Buchholz, 1982). El factor de efectividad externo, η' , es definido como $\eta' = R/R_B$ y está en función del número de Damköhler, Da , que es la relación entre la máxima velocidad de reacción a la máxima velocidad de transferencia. Cuando la velocidad de transferencia de masa es mucho más lenta que la velocidad de reacción ($Da \gg 1$), la velocidad de reacción es mucho menos dependiente de la temperatura y varía linealmente con la superficie reactante (Radovich, 1985b).

3.2.2 Transferencia de masa interna

Dada la dificultad de conducir detalladamente experimentos bien controlados con enzimas y células inmovilizadas, se han hecho considerables esfuerzos para aplicar la teoría matemática de reacción y difusión en medios porosos para estos sistemas. Un vasto número de soluciones que involucran ecuaciones diferenciales usando varios tipos de geometría y de reacción han sido revisados en la literatura. Los resultados de estos cálculos han permitido estimar la velocidad de reacción en un sistema inmovilizado, basado en estimaciones de la actividad intrínseca y la difusividad de sustratos y productos en el agregado.

Para resolver las ecuaciones que gobiernan el proceso de transporte y de reacción en el agregado, se asumen los siguientes puntos de acuerdo con Karel y col. (1985):

- a) El agregado es isotérmico. Los gradientes de temperatura en un agregado de células inmovilizadas serían generalmente mínimos.
- b) La Ley de Fick gobierna el proceso de difusión en el agregado. El flujo de cada componente depende solamente de su propio gradiente de concentración.
- c) El agregado es representado como una fase homogénea. Se asume que el agregado sería representado como una fase homogénea caracterizada de tal forma que las concentraciones de

cada especie se encuentren uniformemente distribuidas y puedan ser usadas en la expresión cinética de la actividad de la célula. Se asume que es homogénea debido a las dificultades de describir las interacciones entre los componentes del sistema.

d) Un coeficiente de partición y un coeficiente de transferencia de masa definen el transporte externo a la partícula. Las condiciones están dadas por el flujo y el equilibrio entre las concentraciones interna y externa a la superficie de la matriz, el equilibrio se asume que es representado por un coeficiente de partición y el flujo de cada componente por un simple coeficiente de transferencia de masa, los cuales caracterizan la hidrodinámica en el seno del líquido y en la masa de la concentración.

e) El agregado se encuentra en un estado estacionario. Para minimizar la dependencia del tiempo, el tiempo caracterizado para establecer la concentración del estado estacionario sería más corto comparado con la escala del tiempo sobre las cuales las condiciones en el reactor cambia.

f) El problema se puede reducir a que dependa de una sola variable espacial. Si solamente interesa la reacción completa del sistema, ha sido mostrado que la solución de la geometría depende de una sola escala (L) la cual está dada por la relación entre el volumen (V_a) y el área de contacto (A_a). Un parámetro p es empleado para desarrollar una simetría generalizada, donde se considerase esférico $p = 2$. Dos importantes parámetros adimensionales gobiernan la conducta del problema, siendo el Módulo de Thiele Φ , que se define como la relación entre las velocidades de reacción y de difusión interna y el número de Biot modificado β , definido como la razón entre las velocidades de transferencia de masa interna y externa.

g) Hay solamente una reacción y una sola concentración. Para simplificar el modelo se considera que únicamente se presenta una reacción en el sistema.

h) No hay dependencia espacial de la difusividad y la actividad intrínseca.

De acuerdo con los puntos anteriores se considera una sola reacción en estado estacionario, con una actividad intrínseca uniforme y con una difusividad efectiva constante.

Las limitaciones de la transferencia de masa causada por la resistencia del transporte dentro de la matriz de inmovilización afecta la actividad de las células inmovilizadas. Un gradiente de concentración dentro de la MCI es establecido en estado estacionario. Asumiendo que la distribución de las células es tal que la reacción de fermentación ocurre por todo la MCI, el proceso sería modelado simultáneamente como difusión y reacción. El efecto de la transferencia de masa interno es también medido por un factor de efectividad, η , el cual es definido como la relación de la velocidad de la reacción del sistema inmovilizado con la velocidad de reacción cuando toda la superficie interior de la partícula catalizadora es expuesta a la misma concentración del sustrato como aquella de la superficie exterior de la partícula. Para células inmovilizadas, η sería la relación entre la efectividad de la MCI frente a la efectividad de las células libres. Las variables significativas que determinan las limitaciones de difusión

intraparticular son dadas por el módulo de difusión de Thiele Φ . El módulo de Thiele es el producto del parámetro de simetría espacial L y el parámetro difusión-reacción. Siendo L la relación del volumen de la partícula catalizadora y el área de contacto.

La verificación detallada del modelo de reacción-difusión es difícil de proponer, debido a lo incierto que resulta asegurar la actividad de las células, la difusividad efectiva y la distribución de las células en el sistema de inmovilización. Una simple y útil técnica que puede ser empleada es la variación de condiciones experimentales de cuando menos uno de los parámetros que integran el módulo de Thiele. Esto sirve como prueba de la existencia de limitaciones de transferencia de masa. Se pueden usar para este propósito la variación de: tamaño de partícula, concentración celular y actividad enzimática de células individuales.

Satterfield (1970) grafica η contra un módulo de Thiele observable, el cual depende solamente de cantidades medibles: la velocidad de reacción global, concentración del sustrato en la partícula y la difusividad efectiva del sustrato en la MCI, cuando se aplica una cinética de Michaelis-Menten.

Los valores de η son usualmente los más confiables y pueden determinarse decreciendo el tamaño de partícula hasta que la velocidad de la reacción global por unidad de masa del biocatalizador tenga un valor de $\eta = 1$, por ejemplo cuando la transferencia de masa intrafase no es la limitante. Sliniger y col. (1982) e Hiemstra y col. (1983) determinaron η calculando la relación de la velocidad específica de reacción observada usando células inmovilizadas contra células libres.

Las limitaciones de la transferencia de masa interna pueden también ser determinadas variando, el radio de la esfera y el contenido de células viables contenidas en la MCI. Para un tamaño dado de partícula, el cambio en la velocidad de reacción observada por unidad de biocatalizador estaría directamente proporcional al cambio en la carga celular si la difusión interna no es la limitante (Klein y Vorlop, 1983).

La diferencia en la velocidad de conversión del sustrato para biocatalizadores libres e inmovilizados puede ser expresado por dos diferentes factores de efectividad (Kasche, 1983). El primero, el factor de efectividad estacionario η , que es la relación de la velocidad de conversión inicial con la misma concentración del sustrato para la misma cantidad de biocatalizador libre e inmovilizado.

$$\eta = v_{obs,i} / v_{obs,f}$$

Sin embargo, esta relación de velocidades iniciales no es muy adecuada para propósitos prácticos, principalmente cuando el interés primario es el tiempo que lleva al biocatalizador convertir una cantidad definida de sustrato. En este caso, se introduce un factor de efectividad

operacional η_0 que corresponde a la relación entre el tiempo para convertir una cierta cantidad de sustrato con enzima libre, τ_i , y el biocatalizador con la misma cantidad de enzima inmovilizada τ_i ,

$$\eta_0 = \tau_i / \tau_i$$

Ambos factores pueden ser usados para caracterizar sistemas inmovilizados (Kasche, 1983). Una desviación del valor 1 indica que la cinética del sistema inmovilizado es influenciada por factores adicionales fuera de aquellos que gobiernan la cinética para el biocatalizador en soluciones homogéneas. Los valores son generalmente menores de 1 debido a limitaciones en la transferencia de masa fuera de la partícula biocatalizadora (difusión hacia las capas externas) y dentro de la partícula (acoplada a la reacción-difusión).

La velocidad de conversión del sustrato por enzimas o células unidas a membranas o polímeros en sistemas naturales o artificiales depende de la velocidad de transferencia del sustrato a través de la partícula biocatalizadora y puede por lo tanto diferir considerablemente de la velocidad correspondiente para la misma cantidad de enzima en soluciones homogéneas.

3.2.3 Difusión de solutos en esferas de gel

Una de las formas para alcanzar una efectiva inmovilización es el atrapamiento de un agente biológico dentro de una matriz de gel. El sistema usualmente tiene tres fases: la fase biocatalítica, el flujo de alimentación/producto y la fase gaseosa del sustrato introducido y del producto generado. La completa descripción del sistema requiere el conocimiento de todas las fases. El transporte de sustratos y productos entre las fases y su relación con la productividad específica del biocatalizador inmovilizado.

Varios factores afectan la productividad específica del biocatalizador inmovilizado cuando se comparan con microorganismos individuales en una suspensión libre. Algunos de los factores son las condiciones fisicoquímicas de las esferas comparada con la masa líquida y la resistencia en el transporte de masa de los sustratos necesarios y los productos resultantes dentro de la matriz (Scott y col. 1989). Este fenómeno debe ser rigurosamente entendido para un efectivo diseño de un sistema de bioreactor y predecir su conducta. Se han realizado recientes investigaciones de transporte de masa con materiales de geles, con y sin el biocatalizador, pero los resultados son muy ambiguos.

Limitaciones significativas de difusión son comunes en los sistemas de atrapamiento en geles y pueden causar que el sustrato se agote o que exista inhibición por producto dentro de la matriz. Las células son muy sensibles a su microambiente, una concentración adecuada de sustratos y productos dentro de las esferas juegan un importante papel en la productividad y crecimiento celular (Arnaud y col., 1992). Las condiciones del proceso de operación tales como

velocidad de flujo y concentración de nutrientes en la fase líquida son óptimamente determinados si las limitaciones son superadas. Las condiciones óptimas claramente se basan en un análisis de difusión y reacción en la matriz celular.

Un análisis efectivo incluye el desarrollo de un modelo matemático y la medida correcta de su cinética y su difusividad sin embargo, en los sistemas de inmovilización celular la medición de su cinética y difusividad es difícil. La reducción de la difusividad del soluto debido a la obstrucción de las células inmovilizadas es particularmente difícil de predecir o de medir. Es incorrecto asumir la equivalencia de las cinéticas entre células libres e inmovilizadas, pero podría ser un punto de referencia para mostrarnos que ventaja ofrece el sistema de inmovilización en su cinética.

Existen dos estrategias que se han empleado para medir difusiones efectivas en la matriz. La primera utiliza células vivas inmovilizadas y mide la velocidad de asimilación del soluto desde la masa líquida. Algunos la han utilizado para determinar la difusión del oxígeno en levaduras inmovilizadas en alginato; el uso de células vivas, sin embargo, pueden comprometer medidas de difusividad (Chresand y col., 1988).

La estrategia alternativa es matar o desactivar las células antes de inmovilizar, separando la difusión-reacción en la medida subsecuente, algunos autores midieron la difusión de glucosa y etanol en levaduras inmovilizadas en alginato, el etanol fue usado para desactivar las células otros emplearon $HgCl_2$ (Scott y col., 1989). El criterio importante para que el tratamiento correcto para desactivación de la célula es que las características físicas de las células sea retenida.

Si se asume que la resistencia de la transferencia de masa externa no sea un factor importante, entonces la difusión interna a través de la matriz será el transporte primario de interés. La técnica seleccionada es la que usa un tanque con buena agitación en el cual las esferas están en contacto con una solución acuosa, la difusión del soluto es estudiada por los cambios de concentración en la solución. A pesar de la baja exactitud que se ha reportado comparada con otras técnicas, tiene la ventaja de ser el método más simple para determinar la difusividad efectiva de un compuesto en un gel. De hecho la interferometría holográfica podría ser mas exacta, sin embargo, tiene la desventaja de emplear geles transparentes (la cual excluye la posibilidad de estudiar el efecto en presencia de células en el gel) y la sofisticación del equipo necesario.

Las restricciones difusionales internas son causadas por el tamaño pequeño (y tortuosidad) de los poros en el soporte. Esto fuerza el flujo del fluido dentro de los poros de la esfera bajo condiciones normales de operación. La restricción es medida como coeficiente de difusividad que compara el valor obtenido en solución libre, resultando:

$$D_E = D \theta / \tau$$

Donde D es el coeficiente de difusión medido en solución libre, D_E es el coeficiente de difusión efectivo medido dentro de las partículas del soporte, θ es la porosidad de las partículas y τ es un factor de tortuosidad el cual representa el largo camino por el cual atraviesan las moléculas difundiendo entre dos puntos dentro de la partícula. La ley de Fick describe de la mejor manera la velocidad de difusión de las moléculas del sustrato.

Por tanto, las propiedades del transporte de masa dentro de la matriz debe ser conocido para predecir la efectividad del biocatalizador incorporado. El alginato permite la rápida difusión de solutos de bajo peso molecular, aunque hay algunas evidencias que altas concentraciones de alginato afectan la velocidad de difusión de los solutos.

Johansen y Flink (1986) consideraron que las propiedades del alginato pueden influir en las características de las células de levaduras inmovilizadas (especialmente en el transporte de masa), las propiedades que primeramente influyen son el peso molecular del alginato (caracterizado por su viscosidad), la proporción entre el ácido gulurónico y ácido manurónico (proporción G/M) y la concentración de alginato en el inmovilizado. Pueden también influir otras propiedades como la resistencia del gel, la estabilidad del gel, la retención y número final de células inmovilizadas.

3.2.4 Cálculo del coeficiente de difusión

Existen discrepancias en los valores que se reportan para el coeficiente de difusividad (D_E) de la glucosa esto es probablemente debido a que las condiciones experimentales adoptadas por diversos investigadores no son estrictamente comparables y que las matrices poliméricas tienen diferente origen comercial, por ejemplo, el alginato tiene marcadas diferencias en su composición química, dependiendo de la especie, procedimiento de extracción, tiempo de recolección, (Alteriis y col., 1990).

Si asumimos que la resistencia a la transferencia de masa externa no es un factor importante, entonces la difusión interna a través de la matriz del gel sería el transporte primario de interés. La medición de la difusión interna de un soluto a través de las perlas de inmovilización esta apoyada en el desarrollo teórico propuesto por Cranck (1975).

Por tanto, las perlas de alginato son suspendidas en una solución bien agitada teniendo una concentración conocida inicial del soluto de interés (Scott y col., 1989). Se asume que todas las perlas esféricas son de un radio homogéneo R . El volumen del líquido libre, excluyendo el espacio ocupado por las esferas, es V_L , mientras el volumen de las esferas es V_S . Cuando las perlas que estan libres del soluto son suspendidas en una solución conteniendo el soluto a una concentración inicial de C_L^0 , la difusión dentro de la perla ocurriría, reduciéndose la concentración del soluto en la fase líquida, C_L , en un tiempo de contacto dado, t . Después de cierto tiempo, la concentración final de equilibrio es C_L^∞ . Si no hay resistencia a la transferencia de masa en la interfase líquido-

perla, una modificación de la derivación de Crank resulta en una expresión matemática que permite la determinación del coeficiente efectivo de difusión D_E del soluto.

La difusión de la concentración del sustrato en la solución está dada por la ecuación (1). La ecuación es una serie infinita que permite la predicción de la concentración del soluto en la fase líquida, C_L , como una función del tiempo de contacto t , si los valores de R , α , C_L^0 y D_E son conocidos. Primero, q_n sería determinado por una solución falso-verdadero de la ecuación (3). La solución de las series para C_L es entonces relativamente resuelta si un mínimo número de elementos son adecuados para determinar D_E .

$$1) C_L = C_L^0 \left[\frac{\alpha}{1 + \alpha} + 6\alpha \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_E q_n^2 t / R^2}}{9(1 + \alpha) + \alpha^2 q_n^2} \right]$$

V_L = volumen del líquido

$$2) \alpha = \frac{V_L}{V_S} \quad V_S = \text{volumen de las esferas}$$

$$3) \tan q_n = \frac{3 q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad \text{sol. raíces positivas}$$

C_L = concentración en un tiempo dado

C_L^0 = concentración inicial

∞ = concentración en equilibrio

t = tiempo de cada muestra

R = radio de las esferas

D_E = coeficiente de difusividad (10^{-4} a 10^{-8} cm^2/s)

Un parámetro es establecido para D_E en cada conjunto de valores experimentales de t y C_L . Esto es, un valor para D_E es asumido dentro de un predeterminado rango de valores (por ejemplo 10^{-4} a 10^{-8} cm^2/s), y entonces C_L es determinado y comparado con los valores experimentales.

Dependiendo de la diferencia entre los dos valores de C_L y los nuevos valores para D_E es entonces asumido como el valor obtenido, el proceso es repetido hasta que las diferencias entre los valores calculados y experimentales sean relativamente pequeños. El proceso resulta en varios valores de la difusividad efectiva para cada prueba.

Las actividades de enzimas inmovilizadas son usualmente expresadas en términos del número de gramos de producto formado por gramo de enzima/célula inmovilizada usada por hora, o como gramo de producto formado por litro de volumen de reactor por unidad de tiempo. Los efectos combinados de los factores, los cuales afectan las propiedades intrínsecas de la enzima son expresadas como factores de efectividad, junto con las pérdidas de actividad que tengan lugar durante la inmovilización, a los que también se denominan eficiencia de acoplamiento, porcentaje de retención y recuperación de actividad (Wiseman, 1986).

3.3 ALGINATO

El alginato esta presente en todas las algas marinas café, principalmente en el sargazo gigante (*Macrocystis pyrifera*), que es la especie mas importante para la producción de alginatos. En México se ha venido cosechando desde 1958, con una producción promedio de 28,300 toneladas por año. El proceso de producción se basa en una serie de reacciones de intercambio iónico que permite extraer del alga el alginato de sodio, dicho tratamiento se inicia con el secado de las algas, se les adiciona un ácido diluido. Para extraer los alginatos se les someten a una solución alcalina de carbonato de sodio, el alginato queda en la solución, separando la masa de algas por centrifugación o filtración. La solución de color café claro es tratada nuevamente con ácido o calcio, obteniéndose los alginatos en forma gelatinosa (si se usó ácido) o como fibras (si se empleó calcio). Finalmente para obtener el alginato de sodio se le agrega sodio y por último las fibras se secan y muelen. El producto final es un alginato en polvo de color amarillo claro.

Químicamente, los alginatos consisten en polímeros lineales de ácido 1,4 β -D-manurónico y de ácido 1,4 α -L-gulurónico. Investigaciones sobre la estructura del polímero han revelado que estos dos azúcares están presentes en todas las moléculas de alginato arreglados en tres tipos de grupos: bloques de residuos de manurónico y gulurónico alternándose (MGMGMG...), bloques de ácido manurónico (MMMMM...) y de ácido gulurónico (GGGGG...), el orden en el arreglo de estos bloques y su proporción determinan las propiedades gelificantes del alginato.

El alginato tiene múltiples aplicaciones en las industrias farmacéutica, hulera, textil, papelería, de los alimentos y cervecera. Se utilizan para espesar, dar consistencia de gel, dar estabilidad y suavizar productos. Cuando se usa para producir un gel estable, el alginato usualmente se mezcla con una sal de calcio, este método es usado básicamente para formar perlas de alginato que contenga células viables o muertas. Debido a que los geles de alginato son térmicamente irreversible, las perlas de alginato pueden usarse a temperaturas elevadas (Guiseley, 1989).

El alginato rico en ácido gulurónico es el más adecuado para gelificar, los alginatos con mayor cantidad de ácido manurónico son más deformables. El modo en que se forma su estructura química es llamado modelo de caja de huevo, debido a la conformación axial de los

enlaces de los carbonos C-1 y C-4 de los bloques poliguluronato, estas secciones de la molécula dan lugar a una forma mas rígida que las secciones que comprenden bloques de polimanuronatos. La estructura espacial resultante hace que los grupos carboxilo sean idealmente adecuados para establecer enlaces intercatenarios, pero solamente entre los bloques poliguluronatos.

En cuanto las propiedades físicas y químicas del alginato que se utiliza en la inmovilización de células, el alginato forma esferas con muchos cationes divalentes y trivalentes, son térmicamente resistentes, permitiendo su uso a temperaturas altas, pero se destruyen o se hinchan por un exceso de cationes tales como el Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , K^+ o por agentes quelatantes como el EDTA, citratos, fosfatos y polifosfatos, que provocan la pérdida de Ca^{2+} (Chetham y col., 1979). Se mejora la resistencia mecánica de las perlas de alginato usando bario en lugar de calcio como agente gelificante. La afinidad de los iones de bario hacia el alginato es mucho mas alta que de los iones calcio, Las perlas de alginato de bario son muy estables en soluciones ácidas o neutrales en contraste a las de alginato de calcio. Las perlas son más estables a los efectos químicos (amortiguador de fosfato) y mecánico (sonicación), demostrado por Tanaka e Irie (1988). Las esferas de alginato de bario se han usado como matriz para células y tejidos en vivo (Zekorn y col., 1992).

3.4 INULINA

La inulina es un polímero de origen vegetal que sirve como reserva de carbohidratos en los géneros *Compositae* y *Gramineae*, mencionándose la alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*), chicoria (*Cichorium intybus*), diente de león (*Taraxacum officinale*), dalia (*Dahlia pinnata*). La inulina y análogos de inulina son polifruktanos, que consisten en cadenas lineales de polifructosa con enlaces β -2,1 terminando con una unidad de glucosa. Cerca de 30 moléculas de fructosa forman una cadena de inulina, el promedio de longitud de una cadena de inulina varía en función de la planta y de la estación. Debido a la variación en la longitud de la cadena, el peso molecular de la inulina varía entre 3500 y 5500 Da. La inulina es insoluble en agua fría, aún en agua con una temperatura de 55°C es ligeramente soluble (5%). Es hidrolizable en un medio ácido a alta temperatura ($70\text{-}80^{\circ}\text{C}$). Las inulinasas hidrolizan inulina en fructosa u otros oligosacáridos bajo condiciones medianas de reacción, esto es a 50°C y pH de 5 (Vandamme y Derycke, 1983).

3.5 INULINASA

Las inulinasas son β -fructosidasas que atacan los enlaces β -2,1 de las moléculas de polifruktanos, las inulinasas se encuentran en plantas y en microorganismos, incluyendo hongos, levaduras y bacterias (Vandamme y Derycke, 1983, Allais y col., 1987).

En levaduras, la enzima responsable para la degradación de la inulina es una β -fructosidasa no-específica (inulinasa: 2,1-D-fructanfructanohidrolasa; EC 3.2.1.7) que libera moléculas de azúcares con enlaces $\beta(2,1)$ de cadenas de unidades de fructosa.

Los primeros que describieron la producción de inulinasa por *Saccharomyces fragilis* fueron Snyder y Phaff (1960) que parcialmente la purificaron por un procedimiento basado en una fijación y elución sobre DEAE-celulosa. Posteriormente, con el nombre de *Kluyveromyces fragilis*, Byun y Nahm (1978) usaron la inulinasa para hidrolizar polímeros de fructosa de un extracto de alcachofa de Jerusalem, obteniendo un jarabe que consistía en 77% de fructosa y 23% de glucosa. Negro (1978) mostró que la actividad enzimática de la inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* es más alta, frente a inulinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Candida kefir*. El procedimiento para obtener la enzima consiste en precipitar con ácido tánico y posteriormente purificarla sobre una columna de DEAE-Sephadex A-50. GrootWassink y Fleming (1980) crecieron *Kluyveromyces fragilis* en cultivo continuo sobre un medio complejo, para producir mayor cantidad de inulinasa en comparación del cultivo sumergido, utilizando como sustrato inulina. La inulinasa frente a la invertasa es más resistente a la inhibición por sustrato, es más termoestable y tiene ligeramente menos actividad de transferasa, estas propiedades sugieren que la inulinasa de *K. fragilis* representa una buena alternativa en relación a la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Hewitt y GrootWassink (1984) concluyeron que la levadura industrial *Kluyveromyces fragilis* es un excelente productor de inulinasa bajo diferentes condiciones de inducción. La síntesis de la inulinasa sufre una fuerte represión catabólica en cultivos sumergidos creciendo sobre sustratos inductores solos o mezclados; el glicerol y el malato no reprimen la inulinasa. Actualmente esta levadura es conocida como *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*.

La inulinasa puede ser secretada al medio de cultivo o permanecer asociada en la pared celular. La inulinasa secretada al medio de cultivo tiene un peso molecular de cerca de 165 kDa, consiste en dos subunidades de proteína y contiene un 34% de masa como carbohidrato. La inulinasa asociada a la pared celular tiene el mismo contenido de carbohidratos, pero es un tetrámero con peso molecular promedio de 350 kDa (Rouwenhorst y col. 1990a). La enzima se distribuye entre las fracciones del sobrenadante, pared celular y la unida a la célula, dependiendo de las condiciones de cultivo, especialmente la enzima unida a la célula presenta bajos niveles cuando se usa lactosa o glucosa como fuente de carbono; la enzima del sobrenadante generalmente se mantiene constante cerca del 50% de la fracción total de la enzima a diferentes condiciones de cultivo; al incrementar la velocidad de dilución a 0.6 h^{-1} en cultivo continuo hay un incremento ligero de la enzima de la pared celular, dicho incremento fue paralelo al decremento en la cantidad de enzima unida a la célula (Rouwenhorst y col., 1988).

La utilización de la inulina como fuente de carbono mejora los niveles de producción de inulinasa en *K. fragilis* (Parekh y Margaritis, 1985). La enzima es termoestable a temperaturas altas (Cruz-Guerrero y col., 1995).

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de inmovilización con alginato de bario para células completas de *Kluyveromyces marxianus*; empleando las células inmovilizadas para hidrolizar polifruktanos de inulina, obteniendo fructosa, azúcar de alto valor agregado empleado en la industria alimentaria y farmacéutica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Diseñar el sistema de inmovilización para *Kluyveromyces marxianus*, utilizando alginato de bario con cubierta de glutaraldehído.
- 2) Estudiar el efecto de la temperatura y del litio en la permeabilidad de la membrana y/o pared celular para aumentar la actividad enzimática de inulinasas localizadas en estos sitios y su aplicación en células inmovilizadas.
- 3) Estudiar el efecto del glutaraldehído como agente endurecedor de la esfera de alginato.
- 4) Encontrar las condiciones mas adecuadas de tamaño de esfera y carga celular que permitan obtener la mejor efectividad del sistema de inmovilización de alginato de bario.
- 5) Comprobar si el efecto de la temperatura y de litio en la permeabilidad de la membrana o pared celular es aplicable al sistema de inmovilización de alginato de bario.
- 6) Calcular la eficiencia de células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* variando el diámetro de esfera.
- 7) Determinar los parámetros del sistema de inmovilización: Módulo de Thiele, los valores aparentes de V_{max} y K_m y el coeficiente de difusividad.
- 8) Determinar los parámetros que afectan la estabilidad de las esferas de alginato de bario durante su reutilización en varios lotes:
 - a) Del sistema de inmovilización: efecto de sales, resistencia a la ruptura mecánica, método de conservación y efecto de la temperatura.
 - b) De la célula inmovilizada: vida media de la enzima, velocidad de salida de células del sistema de inmovilización y efecto de la temperatura en la enzima.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

La levadura utilizada fué *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 la cual es una cepa hiperproductora de inulinasa (Cruz-Guerrero y col. 1995)

Se utilizó un medio completo que consistió en inulina al 1% y extracto de levadura al 0.5%, a un pH de 4.5. Se esterilizó a 10 libras/pulgada² por 10 minutos

Las células se cultivaron en un matraz erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio a 30°C por 24 h a 200 rpm para adaptación; posteriormente se tomaron 10 ml y se transfirieron al matraz de inóculo bajo las mismas condiciones y finalmente se tomó una alícuota de este último para inocular el matraz de fermentación de 500 ml con 100 ml de medio a una concentración celular de 0.3 mg/ml, fermentación que dura 24 horas. Las células se cosecharon a las 24 horas cuando aún estaban en fase logarítmica.

5.2 Aumento de la permeabilidad de la célula

Debido a que una fracción de la inulinasa se encuentra distribuida en la pared celular y unida a la célula (Rouwenherst y col., 1988). Y con el fin de mejorar la eficiencia del sistema de inmovilización la célula de la levadura se permeabilizó, aplicándose dos métodos: tratamiento térmico y uso de cationes de metales alcalinos. En el primero las células se trataron térmicamente 5 minutos a 65°C, temperatura que provoca la muerte de las células previniendo la fermentación de la fructosa sin afectar la actividad de la inulinasa (Thonart y col., 1988). El segundo método fué un procedimiento que se empleó para transformar células de levadura y que Das y col. (1984) aplicaron en *Kluyveromyces fragilis*. Una porción de 2.0 ml de una suspensión de células fué transferida a un tubo de ensaye, agregándose un volumen equivalente de una solución de LiCl 0.2 M, después se incubó a 30°C con agitación suave durante una hora.

5.3 Técnica de inmovilización

El alginato de sodio fué disuelto completamente en agua destilada a una concentración de 1.5% (p/v) a una temperatura cercana a 65°C. Posteriormente, cuando la temperatura disminuyó a unos 35°C, se agregó una suspensión de células centrifugadas para tener una concentración aproximada de 100 mg de peso seco de células por ml de solución de alginato.

La formación de las esferas se logró utilizando una técnica en la cual la mezcla gelificada fué forzada por una bomba peristáltica a pasar por una aguja hipodérmica para tener un tamaño uniforme. Las gotas formadas fueron colectadas en un recipiente con BaCl₂ 0.125 M con agitación. La mezcla se mantuvo en la solución de BaCl₂ toda la noche.

5.4 Determinación de la actividad enzimática

La mezcla reactiva usada para determinar la actividad enzimática de la inulina de células libres tuvo un volumen final de 15 ml, conteniendo 0.5 g de peso seco de células, 5 ml de inulina al 6% y la cantidad suficiente de buffer de acetatos 0.3 M pH 5.0. Después se incubó a 50°C por 15 minutos, se tomó una alícuota de 0.1 ml de la reacción y ésta se colocó en baño maría con agua en ebullición durante 5 minutos con 3 ml del reactivo DNS para medir los azúcares reductores (Miller, 1959). Una unidad de actividad de inulina (U.E.) fué definida como la cantidad de enzima que produce una μmol de azúcares reductores por minuto a 50°C.

5.5 Determinación de la hidrólisis enzimática por células inmovilizadas por lote

La hidrólisis se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 125 ml en una incubadora con agitación orbital (a 50°C y 200 rpm). Las células inmovilizadas en alginato de bario contenían aproximadamente 0.5 gramos en peso seco de células y se agregaron 5 ml de una solución de inulina al 6%. El volumen de trabajo del matraz fué de 15 ml, aforando con buffer de acetatos 0.3 M, pH 5.

Se tomaron muestras cada 15 minutos. La acción enzimática fué detenida al agregar DNS en baño maría a 92°C por 5 minutos. El tiempo de la hidrólisis se estableció en 3 horas aproximadamente. La determinación de la actividad enzimática fué igual a la realizada para células libres, la unidad de actividad de inulina (U.E.) es definida como la cantidad de enzima que produce una μmol de azúcares reductores por minuto a 50°C.

Las constantes cinéticas de K_m' y V_{max}' para el sistema de inmovilización fueron estimados empleando la gráfica de Lineweaver-Burk con los datos obtenidos con soluciones de inulina (1,2,3,4,5,6,7,8 y 9 % p/v). Los análisis fueron hechos por triplicado.

5.6 Obtención de la eficiencia del sistema de inmovilización

Para conocer las limitaciones difusionales internas del sistema de inmovilización, se calculó la eficiencia del sistema de inmovilización en relación a células libres. Esta eficiencia se definió como:

$$\eta = v_{\text{obs}} / v^*$$

Fuó determinado experimentalmente por comparación de la actividad del sistema de inmovilización (v_{obs}) con la actividad de la misma en células libres (v^*), correspondiendo a la velocidad de reacción observada en presencia de resistencias difusionales y la velocidad de reacción observada en sistemas de células libres (Jamuna y Ramakrishna, 1992).

5.7 Tratamiento endurecedor de las esferas de alginato de bario

Las esferas de alginato de bario con células inmobilizadas en alginato de bario se suspendieron en glutaraldehído a diferentes concentraciones (0.1, 0.3 y 0.6 M) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después del tratamiento se lavaron con agua destilada y almacenaron en solución de BaCl_2 0.125 M (Bajpai y Margaritis, 1985a).

5.8 Determinación de la velocidad de salida de células de las esferas de alginato

Un volumen de 5 ml de esferas de alginato de bario conteniendo células inmobilizadas fueron lavadas y puestas en agitación con 25 ml de agua destilada, en un matraz erlenmeyer de 125 ml, a una temperatura de 50°C y 200 rpm, en un agitador orbital durante 24 horas.

A intervalos de tiempo de 60 minutos se tomaron alícuotas de 5 ml del sobrenadante y se midió por densidad óptica a 550 nm la salida de células de las esferas.

5.9 Efecto de sales sobre las esferas de alginato de bario durante su almacenamiento

Para conocer el efecto que tienen las sales sobre la estabilidad física de las esferas de alginato de bario, se colocaron en matraces erlenmeyer volúmenes de 3 ml de esferas con células inmobilizadas y 15 ml de cada una las siguientes sales: NaCl 0.5 M, Acetato de sodio 0.3 M, K_2CO_3 0.5 M y agua destilada como control, durante 24 horas. Determinando su estabilidad física midiendo el radio de la esfera antes y después de almacenarse.

5.10 Determinación de la concentración celular en las esferas de alginato de bario

Para la determinación de la concentración celular se prepararon 50 ml de una solución de EDTA al 0.1 M, se agregó un ml de esferas y se calentó a 65°C con agitación durante 15 minutos; posteriormente, se agregaron 0.2 g de carbonato de potasio a la solución hasta la completa disolución de las esferas. Se tomó una alícuota de un ml y se realizaron tres lavados con agua destilada centrifugándose para finalmente medir la concentración de células por D.O. a 550 nm.

5.11 Determinación de la difusión en las esferas de alginato de bario

Un volumen conocido de esferas con células desactivadas por temperatura a 90°C , fué colocado en el fondo de un vaso de precipitados y un volumen conocido de solución de inulina al 1% fué rápidamente vaciado en el recipiente. Una fuerte agitación fué mantenida para evitar la resistencia de transferencia de masa externa. El experimento fue realizado a 30°C . Se tomaron alícuotas de la solución en tiempos de 1, 3, 5, 8, 11, 15, 20, 30, 40 y 50 minutos. La disminución de la concentración de inulina en la solución fué medido a través de la técnica de fenol-sulfúrico modificado para azúcares totales (Rao y Pattabiraman, 1989). El coeficiente de difusividad (D_E)

fué calculado por el método propuesto por Cranck (1975). Un programa TURBO PASCAL fué usado para ser escrito y corrido a través de una computadora VECTRA 486/33VL

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Cinética de hidrólisis de inulina por células libres e inmovilizadas

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos al comparar las actividades enzimáticas tanto del sistema de inmovilización como en células libres. En ambos casos se alcanzó una hidrólisis de la inulina cercana al 80 % del total de azúcares reductores posibles, después de tres horas. Aunque no fué notoria la diferencia entre el sistema de inmovilización y las células libres en cuanto al porcentaje de hidrólisis. Si se observa el perfil de las actividades enzimáticas específicas durante los primeros 60 minutos, se tuvo una mayor actividad en células libres que en células inmovilizadas, y a partir de este tiempo ambas actividades fueron semejantes. Fué claro que el sistema de inmovilización en los primeros tiempos de reacción de la hidrólisis de la inulina tuvo un porcentaje menor frente a las células libres por problemas de difusividad y de contacto entre el sustrato y la enzima.

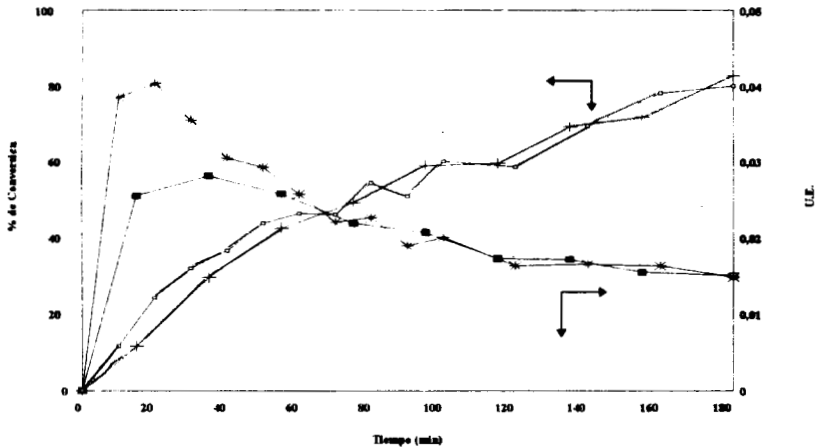


Fig. 1 Comparación de la cinética de hidrólisis de inulina entre células libres e inmovilizadas. amortiguador de acetatos pH 5, temperatura de 50°C a 200 r.p.m. durante 3 horas. (□) Células libres (+) Células inmovilizadas (▲) Actividad enzimática células libres (■) Actividad enzimática células inmovilizadas.

6.2 Mejoramiento de la permeabilidad de la pared y membrana celular en células libres

Con el fin de mejorar el sistema de inmovilización, se permeabilizó la pared y/o membrana celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus* empleando dos métodos, por tratamiento

térmico y por efecto de un catión (litio). El efecto que produjo cada tratamiento se observa en la figura 2 donde el control alcanzó una actividad enzimática específica de 0.03 aproximadamente a los 20 minutos, en cambio el tratamiento térmico y el tratamiento con el catión litio mostraron un efecto significativo sobre la actividad enzimática específica respecto al control, alcanzando en las células tratadas térmicamente 0.0597 U.E. a los 10 minutos y en las células tratadas con litio se obtuvo 0.0517 U.E. a los 20 minutos. El resultado es explicado debido a que la pared celular de *Kluyveromyces marxianus* es mas sensible a cambios de la fuerza iónica, de pH y de tratamiento de tiores, que la pared celular de otras levaduras como *S. cerevisiae*. La temperatura provocó huecos en la pared celular que elimina dicha barrera y el litio, tratamiento empleado en transformaciones de levaduras, actuó sobre la pared celular de la levadura despolarizando la membrana, permitiendo la entrada de grandes moléculas (Das y col., 1984, Ito y col., 1983). Se obtuvo un incremento del 33 % de la actividad en células tratadas térmicamente y de 55 % de la actividad en células tratadas con litio en relación al control durante los primeros 30 minutos. Además, se observó que después de los 60 minutos no hubo diferencia significativa en la actividad enzimática en las células con los tratamientos y el control. Debido a que la concentración del sustrato presente en el matraz ha disminuido. Se consideran solo los primeros 60 minutos porque en ese tiempo sus actividades fueron mayores y constantes.

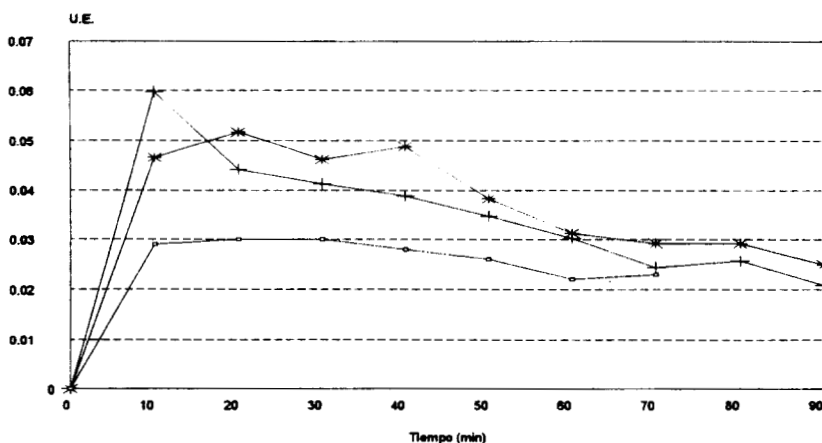


Fig. 2 Actividades enzimáticas de células libres de *Kluyveromyces marxianus* con diferentes condiciones. Antes de utilizarse: tratamiento térmico, 65°C durante 5 minutos, tratamiento con litio 0.2 M, durante 30 min. En la hidrólisis: agitación 200 r.p.m. temperatura 50°C. (□) Con agitación sin tratamiento térmico. (+) Con agitación 65°C/ 5 minutos. (*) Con agitación, con Litio 0.2 M

6.3 Problemas de estabilidad

De las diversas técnicas de inmovilización de células la más ampliamente utilizada es el atrapamiento de células en geles hidrofílicos como el alginato de bario. Allais y col. (1987) encontraron que un medio completo que contenga extracto de levadura aumenta la tasa de crecimiento de células de Levadura de *Kluyveromyces fragilis*. Aquí también se presentó el aumento de masa celular, aunque también mejoró la actividad enzimática contrario a lo mencionado por dichos autores.

Al reutilizarse tres veces el sistema de inmovilización de alginato de bario, se observó que el sistema no mantiene la estabilidad deseada para emplearse en un bioreactor; su productividad decae en la segunda corrida 25 % y en la tercera corrida 62 % (datos no presentados); las esferas aumentan su diámetro de 2.68 a 3.4 mm. Estas esferas se conservaban en amortiguador de acetatos y azida de sodio.

El efecto de los cationes indicado por Chetham y col. (1979) también se presentó en las esferas de alginato de bario sin glutaraldehído. Se observó que al agregar una solución de $BaCl_2$ 0.3 M a las esferas que habían aumentado de volumen, éstas en menos de una hora retomaron su diámetro original, se probó en otras esferas con una solución más diluida de $BaCl_2$ (0.125 M), también presentó disminución del diámetro pero tardó más en volver a su diámetro original. Después de conservarse 24 horas en las soluciones de $BaCl_2$ su diámetro fue más pequeño. Se emplearon soluciones de $BaCl_2$ 0.125 M para preservar su dureza y minimizar la salida de células de las esferas de alginato de bario (Margaritis y Bajpai, 1981).

Se tiene que su pérdida de productividad fué muy pronunciada, Bajpai y Margaritis (1985a) mejoraron la estabilidad de su sistema de inmovilización de alginato de calcio utilizando un agente endurecedor como el glutaraldehído, éste fué también empleado para mejorar la estabilidad del sistema de inmovilización con alginato de bario.

6.4 Efecto de las sales sobre el almacenamiento de la esfera a 4°C

Con los resultados anteriores, fué notorio que la estabilidad física de la esfera de alginato de bario fué afectada por la forma en que se conservó y que ésto produjo una caída de su productividad al reutilizarse en varias corridas. Por tanto, se probó que efecto tenían diferentes cationes sobre las esferas en su almacenamiento (Chetham y col., 1979) y que ventaja ofrecía utilizar el glutaraldehído como agente endurecedor (Bajpai y Margaritis, 1985a). El Cuadro 1 muestra el efecto que produjeron tres soluciones de sales con dos cationes Na^+ y K^+ sobre esferas con y sin glutaraldehído. Se tomó como control el agua destilada

Como se observa en el Cuadro 1, el $NaCl$ y el acetato de sodio afectaron a la esfera produciendo un aumento del diámetro de ésta. Este efecto se debió a que el bario, quién forma la estructura rígida de la esfera, rompe su unión con el alginato desplazándose hacia la solución

acuosa de la sal (Seese, 1979). Esto provocó que la esfera perdiera firmeza en su estructura, aumentara su diámetro y produjera la salida de células con la consiguiente pérdida de la actividad enzimática en la esfera, dicho efecto fué eliminado empleando glutaraldehído 0.3 M de acuerdo a la utilizada por Bajpai y Margaritis (1985a). Como observamos en el Cuadro 1 el glutaraldehído proporcionó una mejor estabilidad física a la esfera.

Cuadro 1 Efecto de las sales sobre el diámetro de las esferas de alginato de Bario

	Diámetro original de la esfera con o sin glutaraldehído	Diámetro de la esfera sin glutaraldehído después de su almacenamiento	Diámetro de la esfera con glutaraldehído despues de su almacenamiento
NaCl	2.68 mm	3.8 mm	2.70 mm
K ₂ CO ₃	2.68 mm	destruida	2.70 mm
CH ₃ COONa	2.68 mm	3.7 mm	2.68 mm
H ₂ O Dest.	2.68 mm	2.68 mm	2.68 mm

El K₂CO₃ tiene una acción mayor destruyendo a la esfera de alginato de bario, se puede emplear para romper el alginato y medir la carga celular o las concentraciones de sustrato y producto, para estudios de difusividad. Dado que en esferas con glutaraldehído el efecto es mínimo, se emplean tanto cationes de potasio como EDTA (agente quelatante) y temperatura de 90^oC en acción conjunta para la destrucción de la esfera.

6.5 Salida de células de las esferas

Con el fin de observar el efecto que pudiera tener la abrasión mecánica en el sistema de inmovilización, se midió la salida de células inactivadas de las esferas de alginato de bario con glutaraldehído durante la agitación por periodos largos, ocurriendo a una velocidad de 14.8 µg/h.g de peso seco de células inmovilizadas. Cheetham y col. (1979) reportaron una velocidad de 22 µg/h.g de peso seco de células inmovilizadas. Se observó que en el transcurso de las 24 horas la pérdida de células de la esfera permaneció insignificante. Esto permite inferir que la pérdida de células es mínima cuando se emplea glutaraldehído como agente estabilizador.

La estructura física de la esfera de alginato de bario con glutaraldehído no sufrió cambio alguno en su diámetro, durante las 24 horas en que estuvo en agitación.

6.6 Efecto de la concentración de glutaraldehído en la estabilidad de las esferas de alginato de bario

En un proceso industrial, ya sea químico o bioquímico, la reducción de costos y el mejoramiento de la productividad son dos factores que se desean en el desarrollo del proceso industrial.

Las células inmovilizadas en alginato de bario se convierten en biocatalizadores que pueden emplearse varias veces con altos niveles de conversión, por tanto es necesario mantener su actividad y estabilidad para que cumpla con estos requisitos y alcancen una productividad adecuada, con la consecuente disminución de los costos.

Con los resultados anteriores podemos considerar que: 1) las esferas deben conservarse en una solución de $BaCl_2$ para mantener su estructura; 2) las sales afectan a la estructura de la esfera provocando la salida del Ba^{2+} y por tanto la salida de células; 3) el glutaraldehído mejora la estabilidad de la esfera (Bajpai y Margaritis, 1985a).

Tomando en cuenta estas consideraciones, se montaron cuatro experimentos; el primero que sirvió de control con esferas de alginato de bario sin glutaraldehído; el segundo con esferas recubiertas con glutaraldehído 0.1 M, el tercero con esferas recubiertas con glutaraldehído 0.3 M y el cuarto con esferas recubiertas con glutaraldehído 0.6 M.

El tiempo que se estableció para la realización del experimento abarcó 9 semanas; entre cada corrida se conservaba a $4^{\circ}C$ en una solución de $BaCl_2$ 0.125 M para evitar problemas de inestabilidad mecánica del sistema de inmovilización.

Cuadro 2 Productividad de las esferas con diferentes concentraciones de glutaraldehído. (g/l·h)

	Primera Corrida 1ª semana	Segunda Corrida 3ª semana	Tercera Corrida 5ª semana	Cuarta Corrida 7ª semana	Quinta Corrida 9ª semana	Media*	Desv. Estándar
Control†	7.54	6.89	6.8	4.7	3.8	5.94	1.6
0.1 M	7.54	6.6	6.66	6.68	6.35	6.76	0.45
0.3 M	6.87	7.03	7.3	6.46	6.72	6.87	0.31
0.6 M	7.17	6.47	7.69	7.14	6.96	7.08	0.43

† sin glutaraldehído

* ANOVA. No hay diferencia significativa entre las concentraciones de glutaraldehído
Si hay diferencia significativa en relación al control

Los resultados del Cuadro 2 muestran que después de las cinco corridas, el control presentó un decaimiento en la productividad hasta tener el 50.39 % de la productividad inicial, no se observó que su estabilidad física fuera afectada, pero su decaimiento fué pronunciado, posiblemente fué debido a que existió pérdida de células que provocaron la disminución de la

actividad enzimática. En cambio, cuando se utilizó el glutaraldehído como agente estabilizante de la actividad enzimática, la productividad después de cinco corridas disminuyó 84.21, 97.81 y 97.07 % al tratarse con glutaraldehído 0.1, 0.3 y 0.6 M respectivamente. La cubierta de glutaraldehído proporcionó mayor estabilidad a la actividad enzimática dentro de la esfera.

El análisis de varianza de las actividades enzimáticas entre los cuatro experimentos, mostró que hubo efecto por el glutaraldehído, pero al analizar las tres concentraciones de glutaraldehído no existió diferencia significativa entre cada concentración.

Bajpai y Margaritis (1985a) han reportado que el tratamiento de la esfera de alginato con glutaraldehído resulta en un pequeño decremento de la productividad mismo que se observó en el sistema de inmovilización de alginato de bario, presentándose en la primera corrida donde el control tiene la mayor productividad, junto con el de menor concentración de glutaraldehído.

Las variaciones en las actividades máximas alcanzadas a las tres horas son explicadas debido a que puede existir fluctuaciones en la transferencia de masa dentro de la esfera, aunque se tenga control en la temperatura, agitación y volumen de trabajo, el paso del sustrato y del producto no es constante, limitaciones en la transferencia de masa interna están presentes (Radovich, 1985b).

Para tener otro criterio sobre el comportamiento de las esferas de alginato con las células inmovilizadas se emplearon las actividades enzimáticas.

Cuadro 3 Actividades enzimáticas (U.E.) a diferentes concentraciones de glutaraldehído, durante cinco corridas

	Primera Corrida	Segunda corrida	Tercera corrida	Cuarta corrida	Quinta corrida	Desv. Estándar	Media
Control s/glut.	0.0241	0.020	0.0182	0.0117	0.0095	0.0060	0.0167
0.1 M	0.0226	0.0202	0.0204	0.0215	0.0179	0.0017	0.0205
0.3 M	0.0223	0.0201	0.0213	0.019	0.019	0.0014	0.0203
0.6 M	0.0230	0.0194	0.0219	0.0197	0.0192	0.0017	0.0206

El Cuadro 3 muestra las actividades enzimáticas cuando se alcanzó el estado de equilibrio entre los 30 y 90 minutos de cada lote y con cada tipo de esfera. Se empleó este tiempo para evitar la influencia de otros factores como la transferencia de masa; se observa que las esferas de control tienen una caída en la actividad enzimática, de 0.0241 U.E. hasta 0.0095 U.E., demostrando con esto que las esferas han perdido estabilidad debido posiblemente a la pérdida de carga celular.

Los resultados obtenidos al emplear diferentes concentraciones de glutaraldehído muestran el mismo efecto que al utilizar la productividad del sistema. No hay diferencia significativa entre cada concentración de glutaraldehído.

6.7 Influencia de la carga celular y diámetro de esfera en la eficiencia del sistema de inmovilización

Con el fin de encontrar las condiciones mas adecuadas del sistema de inmovilización de las esferas de alginato de bario con glutaraldehído, se realizó un diseño experimental con 2 criterios y 3 niveles; variando la carga celular y el diámetro de esfera, cada combinación se realizó con tres repeticiones.

Cuadro 4 Actividades enzimáticas obtenidas con tres diámetros de esfera y tres concentraciones de masa celular, del sistema de inmovilización de alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M (n= 9)

Carga celular (mg/ml)	Diámetro (mm)		
	1.8	2.1	2.8
181	0.023 U.E. $\sigma = 0.00238$	0.0226 U.E. $\sigma = 0.00197$	0.0225 U.E. $\sigma = 0.00084$
256	0.01684 U.E. $\sigma = 0.0001$	0.01673 U.E. $\sigma = 0.00075$	0.01555 U.E. $\sigma = 0.000876$
348	0.0121 U.E. $\sigma = 0.0011$	0.01193 U.E. $\sigma = 0.00058$	0.01 U.E. $\sigma = 0.00133$

σ = desviación estándar.

En los experimentos de hidrólisis de la inulina, se escogieron tres concentraciones de células de levadura de 181, 256 y 348 mg/ml en peso seco, obtenidos por turbiedad a 550 nm, destruyendo un volumen de 1 ml de esferas en EDTA y K_2CO_3 con una temperatura de 65°C. Es esperado que la carga celular influyera en la velocidad de hidrólisis, en la eficiencia de las células inmovilizadas y en la resistencia del gel; se escogieron también tres diferentes diámetros de esfera: 1.8, 2.1 y 2.8 mm que se obtuvieron con diferentes agujas hipodérmicas, esperando que el área de contacto influyera en la velocidad de hidrólisis y en la eficiencia del sistema.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 4. Se observa que no existe diferencia en las actividades enzimáticas cuando se empleó una misma concentración celular a tres diferentes diámetros de esfera, en cambio cuando se analizan de acuerdo con las concentraciones celulares la

actividad enzimática disminuyó cuando aumentábamos la carga celular. Por la mayor cantidad de células que ocupaban la matriz y que se encontraban más aglomeradas por el glutaraldehído posiblemente provocaron problemas de difusividad dentro de la esfera y que por tanto, existieran espacios muertos dentro de la esfera. Además, en la determinación de la actividad enzimática específica es importante considerar la cantidad de masa celular entre la cual se divide el número de moles de azúcares reductores obtenidos.

Con el fin de obtener los diámetros y concentraciones mas adecuados para el sistema de inmovilización se hizo una comparación de la eficiencia del sistema de inmovilización de alginato de bario con la eficiencia de células libres, la concentración celular tanto del sistema de inmovilización como de las células libres fué la misma, los resultados se muestran en el Cuadro 5.

Se realizó un análisis de varianza que muestra que existe un efecto de la carga celular y del tamaño de esfera en cuanto a la eficiencia del sistema de inmovilización y las combinaciones mas eficaces fueron con una carga celular de 181 y 256 mg/ml en peso seco A₅₅₀ y con el diámetro de 1.8 y 2.1 mm en la esfera, a partir de la media mas alta de acuerdo con la Prueba de Tukey.

Cuadro 5 Eficiencia de las células inmovilizadas en alginato de bario con Glutaraldehído 0.3 M con respecto a células libres con tres diferentes diámetros de esfera y tres diferentes concentraciones de masa celular (n=3)

Diámetro de esfera (mm)	Masa celular (mg/ml)		
	181	256	348
1.8	0.646 $\sigma = 0.046$	0.636 $\sigma = 0.029$	0.521 $\sigma = 0.046$
2.1	0.654 $\sigma = 0.0051$	0.627 $\sigma = 0.023$	0.514 $\sigma = 0.0215$
2.8	0.62 $\sigma = 0.012$	0.584 $\sigma = 0.019$	0.431 $\sigma = 0.054$

σ = desviación estándar

Es lógico que el menor diámetro proporcionó una mayor eficiencia del sistema, pero al tener una mayor carga celular y por el tratamiento con glutaraldehído, se provocó una aglomeración de células y por tanto disminuyó la transferencia de masa, como se demuestra en la combinación 1.8 mm y 348 mg/ml. En cambio en la combinación de carga celular de 181 mg/ml con un diámetro de 2.8 mm, no es tan bajo el porcentaje de eficiencia debido a que no hubo tantos problemas de aglomeración.

Bajpai y Margaritis (1986) analizaron el efecto de la concentración celular en la producción de fructosa, su rango de concentraciones de carga celular fue de 117, 161, 190 y 227 mg/ml en peso seco en un bioreactor de lecho empacado a diferentes velocidad de dilución. Encontraron que existió salida de células de las esferas cuando se incrementó la concentración de las células inmovilizadas, ellos consideraron que la matriz se debilitó con altas concentraciones celulares. Con la mas alta concentración alcanzó la máxima productividad, pero después de 15 días tuvo una pérdida de actividad del 15 %.

6.8 Aumento de la permeabilidad de las células inmovilizadas

Debido a que se obtuvieron mejores resultados en la productividad por la permeabilización de pared y/o membrana celular en células libres, se aplicó el mismo tratamiento en el sistema de inmovilización. Primero se hizo el tratamiento térmico y con litio a las células de levadura antes de ser inmovilizadas, en los resultados obtenidos no hubo diferencia en la productividad, ni en la actividad enzimática (datos no presentados), estadísticamente no hubo diferencia significativa al 95% entre el control y los tratamientos.

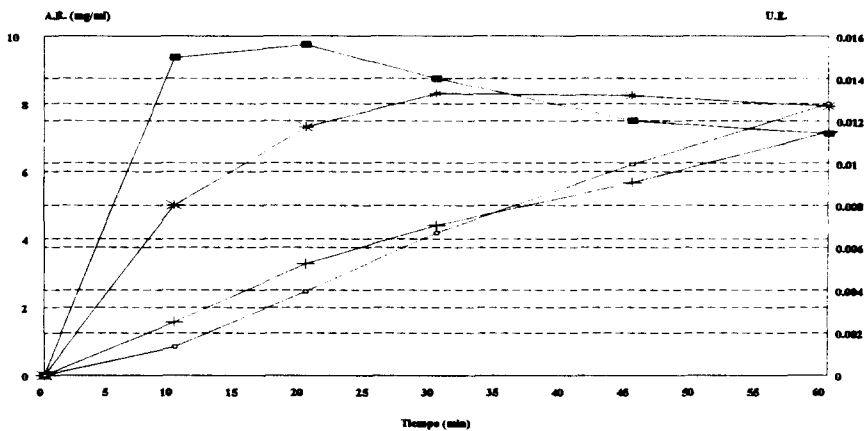


Fig. 3 Hidrólisis de inulina por células inmovilizadas en alginato de bario, comparación entre células inmovilizadas con tratamiento térmico (65°C/5 min) antes de la hidrólisis y células inmovilizadas sin tratamiento, como control. (□) Sin tratamiento térmico (+) Con tratamiento térmico (*) Actividad enzimática sin tratamiento (■) Actividad enzimática con tratamiento

Workman y Day (1984), trataron de incrementar la permeabilidad de la pared celular empleando acetato de etilo, y para evitar que se liberara la enzima asociada, la célula fué tratada con glutaraldehído, sus resultados indicaron que no incrementaron la difusión de la inulina a

través de la pared celular. Thonart y col. (1988) intentaron también mejorar la productividad empleando el tratamiento térmico de las células antes de inmovilizar y sus resultados fueron negativos.

En los primeros 30 minutos la velocidad de producción de azúcares reductores fué significativa en el sistema de inmovilización con el tratamiento térmico en relación al control, aunque al final no hay diferencia significativa; el aumento de la velocidad de producción se observa mejor en los perfiles de actividad enzimática específica, donde fué significativo el aumento de actividad en los primeros tiempos, ver la Figura 3. Posiblemente el aumento de temperatura antes de la hidrólisis tuvo un efecto en la velocidad de reacción de la enzima, que se reflejó en una mayor actividad en los primeros tiempos, más que a la existencia de un mejor transporte de masa del sustrato hacia la enzima.

Con el fin de conocer si el tratamiento térmico afectaba la estabilidad del sistema de inmovilización, se realizaron varias corridas con un mismo lote de células inmovilizadas dejando un intervalo de una semana entre cada una, almacenándose a 4°C con cloruro de bario. Antes de empezar cada corrida se les hacía el tratamiento térmico a las células inmovilizadas. Los resultados se muestran en la Figura 4 en donde se observa que la productividad se mantuvo constante durante las cinco corridas no existiendo diferencia significativa entre cada una, pero si con respecto al control con un nivel de significancia de 0.95.

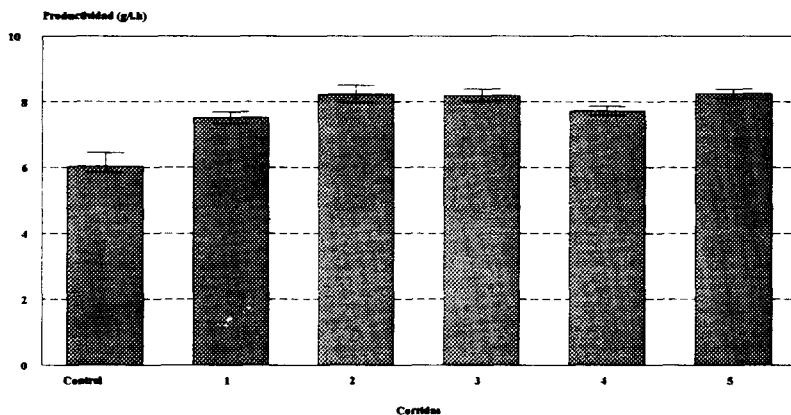


Fig. 4 Productividad de las células inmovilizadas en alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M con tratamiento térmico (65°C/5 min) antes de la hidrólisis en cinco corridas, frente a un control sin tratamiento térmico. Durante 60 minutos, pH 5, temperatura 50°C y 200 r.p.m.

6.9 Difusión de la inulina a través de la esfera de alginato de bario

Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en la Figura 5; el experimento se llevó a cabo por triplicado y los valores dados son los valores medios. La curva patrón de la concentración de inulina (azúcares totales) fue obtenida por el método del fenol-sulfúrico y se muestra en la Figura 6. Los valores experimentales de la curva patrón también fueron repetidos tres veces para comprobar la reproducibilidad de la técnica experimental utilizada. La Figura 5 muestra que las limitaciones difusionales son una de las razones de la baja efectividad de este sistema de inmovilización. Aunque se ha reportado difusividad de pequeñas moléculas (tales como la glucosa) en geles de alginato de calcio (Estapé y col., 1992) no se han encontrado valores para grandes moléculas de polifructanos. El conocimiento de estos valores podrían ser de mucha utilidad para asegurar la influencia de las limitaciones difusionales en las células inmovilizadas.

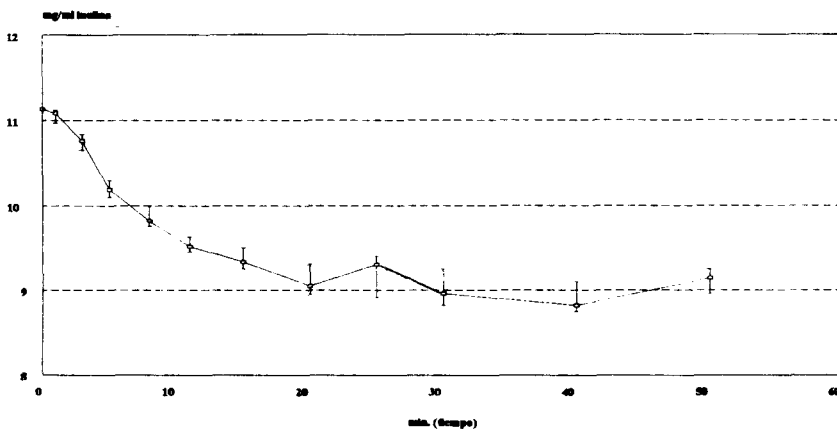


Fig. 5 Difusión de la inulina en esferas de alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M. El diámetro de la esfera fué de 2.1 mm, con una concentración de 256 mg de células en peso seco por ml de alginato. Las células están desactivadas por temperatura (90°C).

La difusión de moléculas en polímeros porosos tales como el alginato es influenciado por muchos factores como: ciertas características de la matriz, como hinchamiento, el entrecruzamiento y por la misma matriz, condiciones externas tales como temperatura y presión, forma y volumen molecular de los solutos.

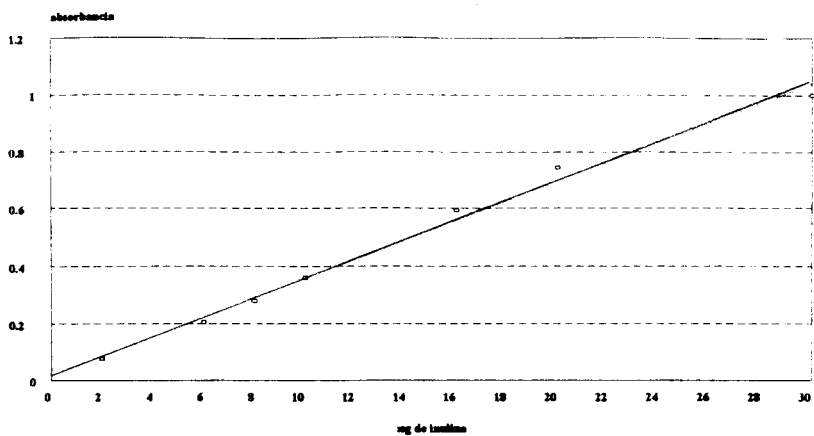


Fig. 6 Curva patrón de inulina, obtenido por el método del fenol-ácido sulfúrico modificado para azúcares totales. Valores de la curva : $r = 0.9960911$ $b = 0.01859751$ $m = 0.03404$

Para moléculas grandes y complejas es importante tomar en cuenta sus características geométricas y diversos autores solo han considerado el peso molecular como parámetro para determinar la difusividad (Longo, y col., 1992).

Los resultados muestran que la completa difusión de la inulina dentro de las esferas de alginato transcurrió durante los primeros 15 minutos aproximadamente, a partir de ese tiempo el sistema alcanza su estado de equilibrio. El valor del coeficiente de difusividad de la inulina a través de las esferas de alginato de bario con glutaraldehído, fué determinado por el método propuesto por Cranck (1975) y que aplicó Chresand y col. (1988) para determinar difusividades, siendo D_E de $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Doherty y col. (1995) mostraron que al estimar el coeficiente de difusividad era importante tomar en cuenta la medida del tamaño de esfera, su medición debía ser con las esferas húmedas, usando un Vernier y observándolas microscópicamente, debido a que al perder humedad empezaban a disminuir su tamaño, fenómeno que se observaba también en las esferas de alginato de bario con glutaraldehído. Consideraron finalmente que una desviación de mas-menos 10% del diámetro de la esfera no tenía efecto significativo en el cálculo del coeficiente de difusividad (D_E .)

6.10 Determinación de la eficiencia del sistema de inmovilización

Cheetham (1983) ha discutido que las propiedades que presentan las matrices de un sistema de inmovilización dependían de la difusividad. Por tanto para obtener los valores

experimentales de η se requerirían los datos de difusividad efectiva del sustrato, D_E dentro de la matriz.

Slininger y col. (1982) consideraron que la penetración de las moléculas del sustrato en la perla de inmovilización dependía de la velocidad de difusión. El factor de efectividad lo obtuvieron mediante el cálculo de la velocidad específica de producción de etanol de células inmovilizadas entre la velocidad específica de producción de etanol de células libres, el valor obtenido por ellos fué de $\eta = 0.4$ debido a problemas de difusividad del sustrato en la perla de alginato.

La actividad de las células inmovilizadas aumentó después del tratamiento térmico como se observa en la Figura 3, aunque fué inferior al obtenido en células libres. La obtención de la eficiencia del sistema de inmovilización con alginato de bario y glutaraldehído 0.3 M se basó en el método propuesto por Jamuna y Ramakrishna (1992) que lo define como la razón de la actividad enzimática de células inmovilizadas frente a la misma cantidad de células libres en idénticas condiciones. El valor experimental fué del orden de 0.65-0.73, un valor mayor al obtenido antes del tratamiento térmico que fué de 0.62-0.654 (Cuadro 5). La eficiencia de las células inmovilizadas siempre es menor de uno debido a que depende del transporte de masa externo e interno y que es observable en la Figura 5 de difusividad del sustrato.

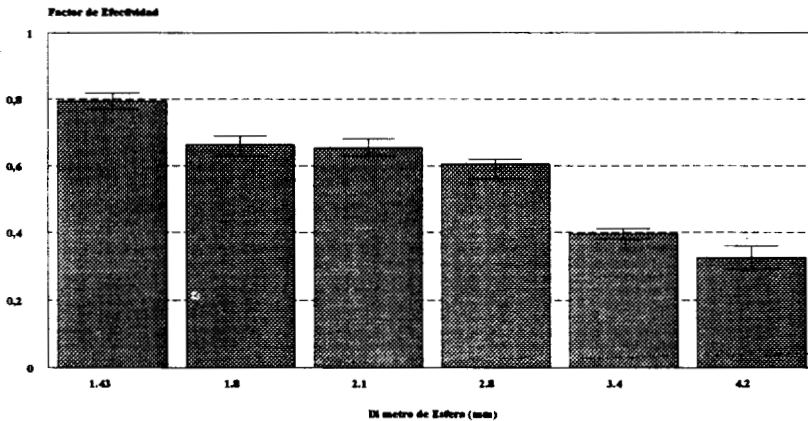


Fig. 7 Relación de la eficiencia (actividad enzimática de células inmovilizadas entre actividad enzimática de células libres) contra diámetro de esfera. Células inmovilizadas en alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M, concentración celular de 260 mg por ml de alginato.

6.11 Relación entre el diámetro de esfera y la eficiencia del sistema de inmovilización

Para mostrar la relación que existe entre la eficiencia del sistema de inmovilización y el diámetro de esfera se consideraron seis diferentes tamaños de diámetro de esfera, con una misma concentración celular de 260 mg en peso seco/ml; los resultados están dados en la Figura 7 en la que se observa que la máxima eficiencia se alcanzó con un diámetro de 1.43 mm, teniendo un valor de $\eta = 0.79$; el valor más bajo obtenido fue de $\eta = 0.35$ con un diámetro de 4.2 mm. Se demuestra que la eficiencia del sistema de inmovilización es más alta a medida que se reduce el tamaño de la esfera, debido principalmente a que se acerca a condiciones iguales al sistema de células libres.

6.12 Efecto de la temperatura en el sistema de inmovilización

Debido a que el tratamiento térmico de 65°C no afectaba la estabilidad de la enzima y que éste mejoraba la actividad enzimática dentro del sistema de inmovilización en los primeros 20 minutos en relación al control. Se probó un intervalo de temperaturas en corridas de 60 minutos en las que se midió la productividad y actividad enzimática para conocer a qué temperatura se desactivaba la enzima. Los resultados se muestran en la Figura 8 en la que en un intervalo de 55 a 70 °C el sistema de inmovilización alcanzó la mayor productividad; a los 75°C ésta decayó drásticamente desactivándose la enzima por desnaturalización, el manejo de datos de productividad no muestran el comportamiento del sistema de inmovilización durante el transcurso de los 60 minutos. Al observar el Cuadro 6 donde se muestran las actividades enzimáticas durante un tiempo de 60 minutos, la actividad enzimática en el intervalo de temperatura de 55 a 70 °C aumentó aproximadamente un 40% en relación a la temperatura de 50°C. A partir de los 75°C la actividad enzimática decayó drásticamente y conforme el tiempo pasa es menor su actividad.

Cuadro 6. Actividades enzimáticas del sistema de inmovilización de alginato de bario con glutaraldehído a diferentes temperaturas (U.E.)

Temperatura (°C)	Tiempo (min)				
	10	20	30	45	60
45	0.00643	0.0098	0.0118	0.013	0.01326
50	0.0046	0.01152	0.012	0.013	0.0145
55	0.012	0.0149	0.018	0.0185	0.02
60	0.0072	0.014	0.016	0.0175	0.0178
65	0.0107	0.0152	0.01678	0.0188	0.02255
70	0.0099	0.01468	0.0163	0.0182	0.019
75	0.003	0.0018	0.00132	0.0008	0.00099

La actividad enzimática entre los 30 y 60 minutos se mantuvo en el intervalo de temperatura de 45 a 70°C y no se observó decaimiento significativo de la actividad enzimática.

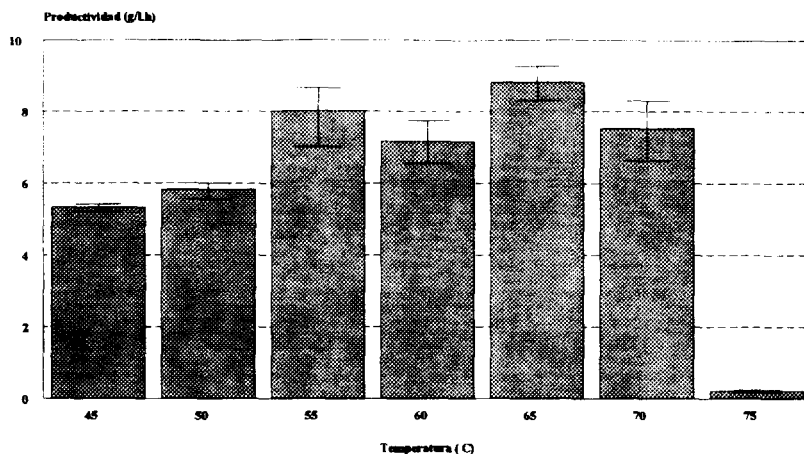


Fig. 8 Productividad de las células inmovilizadas en alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M con un intervalo de temperaturas de 45-75°C. Efectuado por lote durante 60 minutos. Diámetro de esfera de 2.1 mm, concentración celular de 260 mg por ml de alginato.

Este efecto fue observado por Bajpai y Margaritis (1985b) en su sistema de inmovilización consistente en alginato de calcio y gelatina en la que su temperatura óptima fué de 60°C, pero la actividad de la inulina decreció aproximadamente un 15% después de 60 minutos de exposición a 70°C.

Estos resultados muestran que el sistema de inmovilización de alginato de bario protege a la enzima de los efectos térmicos, permitiendo trabajar a temperaturas mayores que aumentarían la productividad y disminuirían el problema de contaminación microbiana. La levadura *Kluyveromyces marxianus* es termotolerante y capaz de crecer a temperaturas de 45 a 50°C (Ward y col., 1995), además que la enzima inulina de la misma levadura presenta una buena termoestabilidad como lo demostró Cruz-Guerrero y col. (1995).

6.13 Análisis del sistema de inmovilización a través del módulo de Thiele

Para predecir la conducta que presenta el sistema de inmovilización en relación a la difusividad y la actividad de la enzima, se ha considerado este sistema como un caso especial de reacción química limitada por la difusión, análisis que es común en ingeniería química y que recientemente ha sido revisado en el contexto de la inmovilización de células completas. Por lo

que fué empleado el parámetro adimensional módulo de Thiele, el cual se definió como la relación entre las velocidades de reacción y de difusión interna. Para este sistema de inmovilización se asumió que: a) las células pueden ser representadas como una reacción homogénea con una constante de difusividad y un coeficiente de partición, b) el sistema de inmovilización tiene una geometría esférica y las células estan en un estado estacionario con una alimentación de sustrato que se difunde de acuerdo con la ley de Fick y que al mismo tiempo es hidrolizado por la enzima, c) se ignora la influencia de otros solutos y solamente se considera a la inulina, d) se considera la actividad intrínseca de la enzima como una cinética de Michaelis-Menten. Para detallar experimentalmente el modelo de difusión-reacción del sistema de inmovilización se varió el tamaño de partícula y se graficó η (eficiencia) vs. Φ (módulo de Thiele). Cuando se tienen valores de $\Phi \ll 1$ los problemas de difusividad son mínimos y la única limitante es la reacción de la enzima, cuando son valores de $\Phi < 1$ las limitaciones que se presentan son de índole difusionales, y cuando $\Phi > 1$ los problemas son tanto de difusión como de reacción.

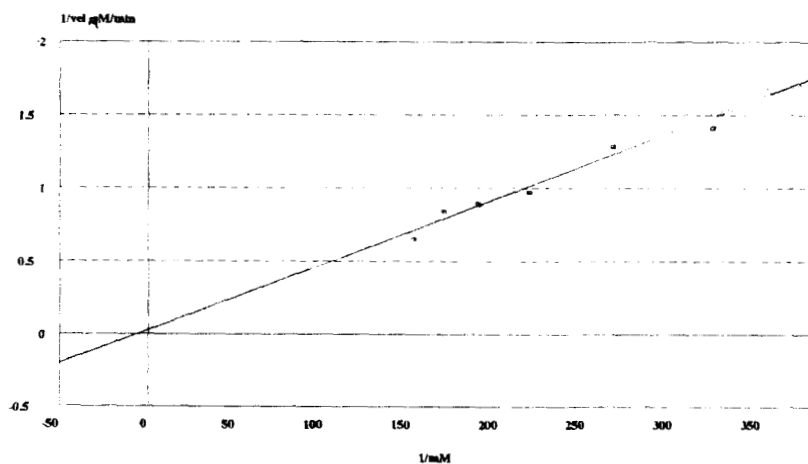


Fig. 9 Gráfica de Lineweaver-Burk para células inmovilizadas

$$V_{max}' = 113.7 \mu M/min \quad K_m' = 0.522 \text{ mM} \quad r = 0.990536$$

Para comprobar si el sistema de inmovilización coincide experimentalmente con el módulo de Thiele los resultados se muestran en la Figura 10. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por la gráfica de Lineweaver-Burk Figura 9, de este modo se tuvieron los valores aparentes de K_m' de 0.522 mM y de V_{max}' de $113.7 \mu\text{mol min}^{-1}$ para el sistema de inmovilización. Algunos autores han reportado valores de K_m de la inulinasa sobre inulina de 7.4 mM (Vandame y Derycke, 1983)

y de 3.04 mM (Cruz-Guerrero y col., 1995), pero estos valores cinéticos han sido para enzima cruda.

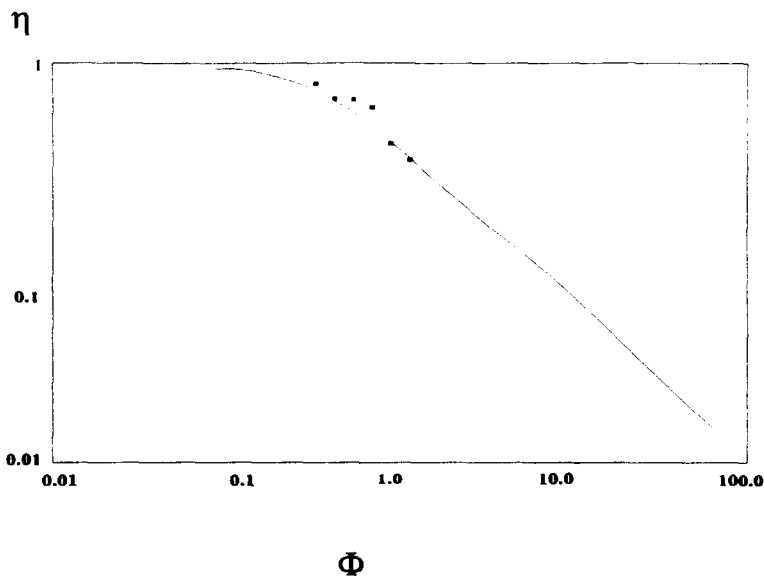


Fig. 10 Módulo de Thiele obtenido experimentalmente en el sistema de inmovilización de alginato de bario con glutaraldehído 0.3 M, concentración de 260 mg de células por ml de alginato.

La difusividad del sustrato fué calculada por el método propuesto por Cranck (1975) teniendo un valor $D_E = 2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Se varió el radio de esfera para obtener los valores experimentales de eficiencia. El sistema de inmovilización tuvo valores del módulo de Thiele Φ cercanos a 1, en la región superior donde muestra que las limitaciones que se presentan en el sistema son de índole difusional.

222247

7.CONCLUSIONES

Las células libres frente al sistema de inmovilización presentaron mayor actividad en los primeros 60 minutos; una hidrólisis del 80 % del total de la inulina se alcanzó a las 3 horas tanto en el sistema de inmovilización como de células libres. El tratamiento térmico o con litio, aumentó la actividad enzimática de las células libres, en ambos casos se mejoró la permeabilidad de la membrana celular.

Pero al emplearlo en las esferas de alginato de bario, el aumento de la permeabilidad con el tratamiento térmico o con litio a las células de levadura antes de inmovilizarlas no mejoró la productividad del sistema de inmovilización, como también lo observó Thonart y col. (1982), estadísticamente no hubo diferencia significativa (95%); en cambio, al darle un tratamiento térmico a las células ya inmovilizadas antes de emplearlas en la hidrólisis de la inulina aumentó su productividad significativamente en los primeros 30 minutos. El tratamiento térmico no afectó la estabilidad del sistema de inmovilización en 5 corridas realizadas.

Los resultados obtenidos demostraron que las esferas de alginato de bario, para mantener la estabilidad, deben tratarse con una solución de glutaraldehído para formar una capa sobre la superficie de la esfera que contiene la carga celular, el glutaraldehído forma una red con las aminas primarias de las proteínas de las células, la cual impide salida de células o de la enzima en el sistema de inmovilización.

A pesar de que se estabiliza la estructura física del sistema de inmovilización con el glutaraldehído, la salida de células del sistema de inmovilización después de 24 horas de agitación continua fué de 14.8 $\mu\text{g/h}\cdot\text{g}$ de células en peso seco, resultados que son menores a los reportados por Cheetham y col. (1979) para células inmovilizadas en alginato de calcio.

Para mantener la estabilidad del sistema de inmovilización, es necesario tener cuidado en su conservación y tratamiento después de cada lote. Las esferas deben conservarse en una solución de cloruro de bario para mantener su estructura, al guardarse en solución amortiguadora de acetatos o de azida de sodio, provoca que la perla se hinche, debido a la salida de los cationes Ba^{2+} que mantienen la estructura del medio. Varios cationes tienen un efecto físico importante en el sistema de inmovilización al almacenarse y el glutaraldehído permite mantener la estructura física.

En cuanto las condiciones más adecuadas de carga celular y de diámetro de esfera fueron de 181 y de 256 mg/ml con un diámetro de 1.8 y 2.1 mm. Se decidió trabajar con una concentración celular de 256 mg/ml y diámetro de 2.1 mm. No se emplea el diámetro menor debido a que hay problemas de obstrucción en la aguja hipodérmica más delgada, provocando que el proceso de inmovilización sea más tardado; además en su eficiencia no hubo diferencia significativa (95%) entre los diámetros de 1.8 y 2.1 mm.

Después de un año de inmovilizadas, las células siguen presentando actividad enzimática en un porcentaje cercano al 90 % del original, por tanto el sistema mantiene una estabilidad duradera.

Debido al alto peso molecular de la inulina (aprox. 5000 Da.) el sistema de inmovilización presenta problemas de difusividad del sustrato en los primeros 15 minutos, alcanzando el equilibrio a los 20 minutos, por lo que la actividad enzimática mas alta se alcanza a partir de este tiempo. El valor del coeficiente de difusividad obtenido fué $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

La eficiencia del sistema de inmovilización es afectado por el diámetro de esfera. Con el diámetro de 4.2 mm se tuvo una eficiencia de 0.35 y con el diámetro de 1.43 mm se alcanzó una eficiencia de 0.79. Con el diámetro de esfera que se trabajo se tuvo una eficiencia de 0.627.

La productividad del sistema de inmovilización se mejora con temperaturas de 55 a 70°C. El aumento de temperatura no altera la actividad de la enzima, el alginato de bario con glutaraldehído es termoestable y protege a la enzima de su desnaturalización, aumentando la velocidad de reacción de la enzima, además que disminuye las posibles contaminaciones.

El sistema de inmovilización entra en el tratamiento generalizado del fenómeno de reacción-difusión del módulo de Thiele; los valores experimentales cayeron en la región del módulo que corresponden a los valores cercanos a 1, el tamaño de la molécula es causa primaria de la dificultad en la difusión. La baja difusividad es una característica que presentan los sistemas de inmovilización en hidrogeles pero que se ven compensados por el hecho de que el proceso de inmovilización resulta sencillo y barato, además que es termoresistente y mantiene una larga estabilidad con una actividad enzimática durable.

8. COMENTARIOS FINALES

El sistema de inmovilización con alginato de bario resultó novedosa para inmovilizar células de *Kluyveromyces marxianus*, en trabajos anteriores se han utilizado otros tipos de hidrogeles, generalmente empleando como agente endurecedor el calcio. La inmovilización con alginato de bario es relativamente poco usada, en los últimos años son pocos los reportes sobre inmovilización con alginato de bario, a excepción de una técnica de inmovilización de isletas de Langerhans con alginato de bario (Zekorn y col., 1992). Estos investigadores propusieron como alternativa para el tratamiento de la Diabetes, utilizar técnicas de inmovilización.

El alginato de bario resultó adecuado por presentar mayor resistencia, además inocuo para introducirse en el organismo. Conforme a esto, el emplear alginato de bario con células de *Kluyveromyces marxianus*, levadura que es utilizada industrialmente, evita posibles problemas de patogenicidad y de toxicidad por el uso del bario.

El alginato de bario es estable durante un lapso de tiempo aceptable, después de 3 meses mantiene la actividad enzimática mayor al 90 % de actividad residual, el glutaraldehído proporcionó mayor durabilidad al sistema de inmovilización. El utilizar dos formas de inmovilización, un hidrogel y el glutaraldehído aumentó la vida media del sistema.

Anteriormente se había reportado que las células de *Kluyveromyces marxianus* eran termotolerantes creciendo a temperaturas de 45⁰C (Ward y col., 1995) y que la enzima era termoestable (Cruz-Guerrero y col., 1995), la inmovilización de la levadura con alginato de bario con glutaraldehído permitió trabajar a temperaturas relativamente altas sin mostrar decaimiento en su actividad enzimática, la hidrólisis a temperaturas de 60 -70⁰C disminuye posibles problemas de contaminación microbiana.

La difusividad de inulina en el alginato de bario no se había calculado anteriormente, Longo y col. (1992) determinaron el coeficiente de difusividad de proteasas a través del alginato de calcio, con pesos moleculares superiores a la inulina y con moléculas mas pequeñas, pero al linealizar sus resultados, obtuvieron una gráfica que permitía determinar valores de difusividad intermedios, el valor del coeficiente de difusividad obtenido de acuerdo con el peso molecular de la inulina, era muy cercano al interpolado por dicha gráfica, aunque las condiciones podrían ser diferentes.

Además, se analizó el sistema a través del módulo de Thiele para predecir la conducta del sistema en relación a la difusividad y la actividad enzimática.

La inmovilización de *Kluyveromyces marxianus* en alginato de bario puede ser empleada para hidrolizar polifruktanos, como la inulina, la durabilidad y estabilidad del sistema permite ser utilizado industrialmente. Su desventaja frente a otros sistemas de inmovilización es la poca disponibilidad de materia prima rica en inulina, los jarabes de maiz con alto contenido de fructosa

que usan la isomerasa inmovilizada son económicamente mas fácil de obtener, por la disponibilidad de materia prima durante todo el año. Aunque, se puede aprovechar que la inulinasa es una enzima que tiene actividad de inulinasa e invertasa (Rouwenhorst y col., 1990b) y que podría usarse la sacarosa como segunda materia prima par la obtención de jarabes fructosados.

Como continuación del trabajo se propondría hacer una revisión del comportamiento y estabilidad de la actividad enzimática de las células de *Kluyveromyces marxianus* en alginato de bario durante una hidrólisis continúa de inulina y probar la actividad de invertasa de la levadura para utilizar la sacarosa como materia prima y darle un valor agregado mayor a la azúcar.

9. BIBLIOGRAFIA.

- Allais, J.J., Hoyos-López, G., Kammoun, S. and Baratti, J.C.(1987) "Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity" *Appl. Environmental Microb.* 53:942-945.
- Alteriis, E., Scardi, V., Masi, P. and Parascandola, P. (1990) "Mechanical stability and diffusional resistance of a polymeric gel used for biocatalyst immobilization" *Enzyme Microb. Technol.* 12:539-545.
- Arnaud, J.P., Lacroix, C. and Castaigne, F. (1992) "Counterdiffusion of lactose and lactic acid in κ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped lactic acid bacteria" *Enzyme Microb. Technol.* 14:715-724.
- Bajpai, P. and Margaritis, A. (1985a) "Improvement of inulinase stability of calcium alginate immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells by treatment with hardening agents" *Enzyme Microb. Technol.* 7:34-36.
- Bajpai, P. and Margaritis, A. (1985b) "Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cell containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties" *Enzyme Microb. Technol.* 7:373-376.
- Bajpai, P. and Margaritis, A. (1986) "Optimization studies for production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*" *Process Biochem.* 21:16-18.
- Barker, S.A. (1976) "Pure fructose syrups" *Process Biochem.* 11:20-25.
- Buchholz, K. (1982) "Reaction engineering parameters for immobilized biocatalysts", In: *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 24, Fiecher (Ed.), Springer-Verlag, 39-71.
- Byun, M. and Nahm, B.H. (1978) "Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis" *J. Food Sci.* 43:1871-1873.
- Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, Ch. (1979) "Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels" *Biotechnol. Bioeng.* 21:2155-2168.
- Chresand, T.J., Dale, B.E. and Hanson S.L. (1988) "A stirred bath technique for diffusivity measurements in cell matrices" *Biotechnol. Bioeng.* 32:1029-1036.
- Cranck, J. *The Mathematics of Diffusion* 2nd Ed., Oxford University Press, London, 1975, pp. 93-96.
- Cruz-Guerrero, A., García-Peña, Y., Barzana, E., García-Garibay, M., and Gomez-Ruiz, L. (1995) "*Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain" *J. Ferment. Technol.*, 80:159-163.
- Das, S., Kellermann, E. and Hollenberg, C.P. (1984) "Transformation of *Kluyveromyces fragilis*" *J. Bacteriol.* 158:1165-1167.

- Dervakos, G.A. and Webb, C.** (1991) "On the merits of viable-cell immobilisation" *Biotech. Adv.* 9:559-612.
- Doherty Speirs, E., Halling, P.J. and Mcneil, B.** (1995) "The importance of bead size measurement in mass-transfer modelling with immobilised cells" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:440-444.
- Estapé D., Gòdia F. and Solà C.** (1992) "Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel" *Enzyme Microb. Technol.* 14:396-401.
- Gelardi, R.C.** *Alternative sweeteners* 2nd De., Lyn O'Brien Nabors and Marcel Dekker, Inc., New York, 1991, pp. 219-246.
- GrootWassink, J.W.D. and Fleming, S.E.** (1980) "Non-specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties" *Enzyme Microb. Technol.* 2:45-53.
- Guiraud, J.P. and Galzy, P.** (1981) "Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin" *Enzyme Microb. Technol.* 3:683-688.
- Guiseley, K.B.** (1989) "Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization" *Enzyme Microb. Technol.* 11:706-716.
- Heimstra, H., Dykhuizen, L and Harder, W.** (1983) "Diffusion of oxygen in alginate gels related to the kinetics of methanol oxidation by immobilized *Hansenula polymorpha* cells". *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:189-196.
- Hewitt, G.M. and GrootWassink, J.W.D.** (1984) "Simultaneous production of inulase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*" *Enzyme Microb. Technol.* 6:263-270.
- Ito, H., Fukuda, Y. Murata, K. and Kimura, A.** (1983) "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations" *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Jamuna, R. and Ramakrishna, S.V.** (1992) "Continuous synthesis of thermostable α -amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate" *Enzyme Microb. Technol.* 14:36-41
- Johansen, A. and Flink, J.M.** (1986) "Influence of alginate properties and gel reinforcement on fermentation characteristics of immobilized yeast cells" *Enzyme Microb. Technol.* 8:737-748.
- Karel, S.F., Libicki, S.B. and Robertson, C.R.** (1985) "The immobilization of whole cells: engineering principles" *Chem. Eng. Sci.* 40:1321-1354.
- Kasche V.** (1983) "Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysis" *Enzyme Microb. Technol.* 5:2-13.
- Klein J. and Vorlop, K.D.** (1983) "Immobilized cells catalyst preparation and reaction performance", In: *Foundations of Biochemical Engineering*, Vol. 207, Blanch, Papoutsakis, Stephanopoulos (Eds.), ACS Symp. Ser. pp 377-392.

- Longo, M.A., Novella, I.S., García, L.A. and Díaz, M.** (1992) "Diffusion of proteases in calcium alginate beads" *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 586-590.
- Margaritis, A. and Bajpai, P.** (1981) "Repeated batch production of ethanol from Jerusalem artichoke tubers using recycled immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*" *Biotechnol. Lett.* **3**:679-682.
- Miller L.** (1959) "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars" *Anal. Chemistry.* **31**(3):426-428.
- Negoro, H.** (1978) "Inulase from *Kluyveromyces fragilis*" *J. Ferment. Technol.* **56**:102-107.
- Núñez, M.J. and Lema J.M.** (1987) "Cell immobilization: Application to alcohol production" *Enzyme Microb. Technol.* **9**:642-651.
- Parekh, S. and Margaritis, A.** (1985) "Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**:446-448.
- Radovich, J.M.** (1985a) "Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells" *Enzyme Microb. Technol.* **7**:2-10.
- Radovich, J.M.** (1985b) "Mass transfer limitations in immobilized cells" *Biotech. Adv.* **3**:1-12.
- Rao, P. and Pattabiraman, T.N.** (1989) "Reevaluation of the Phenol-Sulfuric Acid Reaction for the estimation of hexoses and pentoses" *Anal. Biochem.* **181**:18-22.
- Rosevear, A.J.C**(1984) "Immobilized biocatalysts -A critical review" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **34B**:127-132.
- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van Der Baan, A.A., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.** (1988) "Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 656" *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1131-1137.
- Rouwenhorst, R.J., Ritmeester, W.S., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P.** (1990a) "Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species" *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3329-3336.
- Rouwenhorst, R.J., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W.A. and Dijken, J.P.** (1990b) "Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556" *Appl. Environmental Microbiol.* **56**:3337-3345.
- Scott, Ch. D., Woodward, Ch. A. and Thompson, J.E.** (1989) "Solute diffusion in biocatalyst gel beads containing biocatalysis and other additives" *Enzyme Microb. Technol.* **11**:258-263.
- Satterfield, C.N.** *Mass transfer in heterogeneous catalysis*, MIT Press. Mass. USA. 1970 pp 47-59.
- Seese, W.** *Curso Básico de Química* Primera edición en español. Edit. El Manual Moderno. México, D.F. (1979) pp: 125-127.

- SivaRaman, H., SeetaramaRao, B., Pundle, A.V. and SivaRaman C.** (1982) "Continuous ethanol production by yeast cells immobilized in open pore gelatin matrix" *Biotechnol. Lett.* 4:359-364.
- Sliniger, P.J., Bothast, R.J., Black, L.T. and McGhee J.E.** (1982)"Continuous conversion of D-xylose to ethanol by immobilized *Pachysolen tannophilus*" *Biotechnol. Bioeng.* 24:2241-2251.
- Snyder, H.E. and Phaff, H.J.** (1960) "Studies on a betafructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*" *Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 26:433-452.
- Tampion J., and Tampion M.D.** *Immobilized cells: principles and applications.* Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain (1987) pp: 1-18, 77-115.
- Tanaka, H. and Irie, S.** (1988) "Preparation of stable alginate beads in electrolyte solutions using Ba²⁺ and Sr²⁺" *Biotechnol. Techniques* 2:115-120.
- Thonart, P., Roblain, D., and Rikir, R.** (1988) "Improvement of inulin hydrolysis yeast cell reactor by mutants selection" *Appl. Biochem. Biotechnol.* 17:193-202.
- Vandamme, E.J. and Derycke, D.G.** (1983) "Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications" *Adv. Appl. Microbiol.* 29:139-176.
- Ward C., Nolan A.M., O'Hanlon K., McAree T., Barron N., McHale L. and McHale A.P.** (1995) "Production of ethanol at 45°C on starch-containing media by mixed cultures of the thermotolerant, ethanol-producing yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and the thermophilic filamentous fungus *Talaromyces emersonii* CBS814.70" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:408-411.
- Workman, W.E. and Day, D.F.** (1984) "Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells" *Biotechnol. Bioeng.* 26:905-910
- Wiseman, A.** *Principios de Biotecnología* Primera edición en español. Edit Acribia. Zaragoza, España (1986) pp. 200-241.
- Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Schnettler, R., Klöck, G., Hering, B., Zimmermann, U., Bretzel, R.G. and Federlin, K.** (1992) "Barium-cross-linked alginate beads: a simple one-step method for successful immuno-isolated transplantation of islets of Langerhans" *Acta Diabetol.* 29:99-106.