

VENTAJAS DE LA INMOVILIZACION MICROBIANA PARA UN PROCESO BIOTECNOLOGICO

GRACIELA CHALELA A.

M. Sc. Dr. Ret. Nat.

HUMBERTO ESCALANTE H.

Ingeniero Químico, M. Sc.

MYRIAM MURCIA

Ingeniera Química.

RUBEN HOZMAN MORA

Ingeniero Químico

RESUMEN

La inmovilización de biocatalizadores, concretamente células microbianas, se constituye en el mejor proceso en la actualidad para aprovechar al máximo su capacidad transformadora en la obtención de sustancias de interés industrial, como son los L-aminoácidos, ácidos orgánicos, antibióticos y alcoholes, sustancias que contribuyen al mejoramiento del nivel de vida en cuanto a alimentación, prevención de enfermedades y obtención de combustibles a partir de fuentes renovables, ya que en estos procesos se opera a condiciones moderadas de presión y temperatura consiguiéndose un ahorro energético. Por otra parte la conversión y la especificidad son mayores que los obtenidos en los procesos de fermentación tradicional además es posible efectuar procesos biotecnológicos con reutilización de células inmovilizadas sin pérdida considerable de su actividad catalítica.

OBJETIVOS

Los objetivos básicos de este trabajo fueron: a) la normalización de una técnica efectiva y viable de inmovilización de células vivas (de acuerdo a la disponibilidad de recursos en nuestro medio), b) desarrollar la anterior técnica en la inmovilización de Sccharomyies cerevisiae y comprobar su actividad biosintética en la fermentación alcohólica a partir de la melaza de caña de azúcar como sustrato, c) desarrollar un modelo cinético para la fermentación, en operación discontinua, a nivel de laboratorio.

GENERALIDADES SOBRE EL PROCESO DE INMOVILIZACION

Existen gran variedad de transformaciones bioquímicas que emplean microorganismos como fuente natural de biocatalizadores, los cuales se clasifican como: células enteras activadas y multiplicadas, células sin multiplicar o esporas, células modificadas por manipulación de su contenido genético, enzimas solubles crudas o purificadas, enzimas inmovilizadas y células inmovilizadas o no.

La inmovilización de biocatalizadores puede definirse como el confinamiento de sus moléculas en una fase insoluble que presenta intercambio efectivo con la fase externa a través de una estructura porosa característica del material.

Los métodos más efectivos para efectuar la inmovilización de biocatalizadores son los que producen estructuras porosas donde se confinan las moléculas, La inmovilización por enlace covalente a polímeros activados es probablemente el método más usado, al igual que la adsorción física en soportes porosos.

- a. El atrapamiento dentro del retículo poroso de un polímero o de microcápsulas limitadas por membranas semipermeables que permiten la difusión de sustrato y producto es otra forma de inmovilización.
- b. La reticulación o estrechamiento con reactivos biofuncionales produce agregados insolubles. Ver Figura 1.
- c. La unión mediante enlace covalente requiere el desarrollo de reactivos químicos que forman enlaces entre soportes y enzimas; se desarrolló exponencialmente en la década de los sesenta; algunos materiales destacados son el vidrio poroso y la cerámica.

La formación de retículos poliméricos de porosidad tal que impida el derramamiento de biocatalizador a la fase externa, se obtiene por condensación química de monómero o por geificación de polímeros lineales como agar, agarosa o kappa-carragenina; el gel resultante se somete luego a endurecimiento.

La microencapsulación es el confinamiento de moléculas biocatalíticas en pequeñas partículas esféricas limitadas por membranas, las cuales pueden ser sólidas (nylon o nitrocelulosa) o líquidas (hidrocarburos o detergentes).

Se conoce también la inmovilización de organelos, tales como cloroplastos y mitocondrias, aún más interesante resulta la posibilidad de co-inmovilización como el es caso de Saccharomyces Cerevisiae y Escherichia coli inmovilizadas en poliacrilamida para producción de glutatona.

La pérdida de actividad, se reduce considerablemente pues la dotación enzimática de la célula se mantiene en su ambiente natural, la membrana celular constituye una barrera protectora de los agentes externos y excluye muchos desnaturalizadores químicos como iones metálicos. En la mayoría de las preparaciones con células inmovilizadas se obtiene inaccesibilidad a cualquier microorganismo contaminante, haciéndose innecesario el uso de nitrógeno libre para mantener el ambiente inerte durante el proceso.

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE Saccharomyces Cerevisiae

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos de gran interés científico e industrial, por la variedad de sustratos en los que se desarrollan y las condiciones extremas que soportan (Temperaturas altas y amplio rango de pH)

Las levaduras, hongos no filamentosos, son aptas para realizar transformaciones químicas debido, a que la razón área superficial a volumen es elevada. A través de la historia las levaduras han servido al hombre en procesos fermentativos como la producción de pan, bebidas alcohólicas y otras sustancias alimenticias. Las levaduras están muy diseminadas en la naturaleza, la mayoría son saprófitas, es decir viven sobre materia orgánica muerta. Las que habitan asiduamente el suelo, secretan un limo que les permite soportar la secación. También aprovechan un gran número de compuestos de carbono, lo que les da ventaja para obtener sus nutrientes si se les compara con otro grupos de microorganismos.

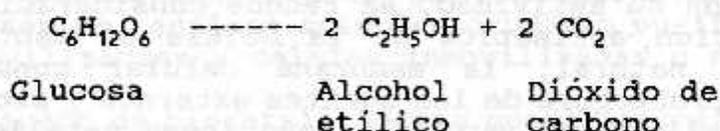
El método más común de reproducción de las levaduras, es la gemación, aunque también lo hacen por esporulación o fisión.

El género Saccharomices permanece a la subfamilia Saccharomycoideae y a la familia Saccharomycetaceae, son células redondas, ovales, alargadas o en hilos con pseudomicelio, reproducción vegetativa por gemación multilateral, contiene de una a cuatro esporas por asca. Su catabolismo cambia de oxidativo a dominante fermentativo

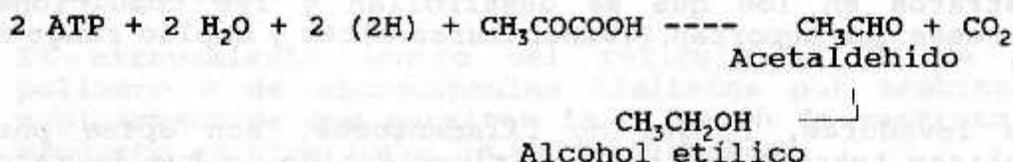
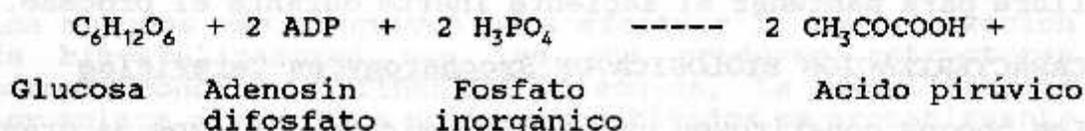
cuando actúa sobre azúcares comunes, no asimila nitratos.

El catabolismo de azúcares, como la glucosa, es anaerobio (fermentativo) y más conocido como fermentación alcohólica, con base en el producto final alcohol etílico.

La relación global es:



Esta transformación obedece al esquema glutacolíptico:



El Acido pirúvico se considera el compuesto clave en la degradación de glucosa, en la fermentación hay oxidación parcial del sustrato y compuestos inestables como aceptadores finales de electrones. Antes de que se lleve a cabo la fermentación de los polisacáridos se presenta la hidrólisis por enzimas (hidrolasas), el tipo de estas varía con la especie. Las levaduras son fuentes ricas en lactosa, invertasa y catalasa de interés comercial.

UTILIZACION DE CELULAS INMOVILIZADAS

- Producción de aminoácido: usando células de Aspergillus ochraceus con reticulación de albúmina con glutaraldehído.

Usando Escherichia Colli inmovilizada en poliacrilamida para la obtención de ácido L-aspárico.

Usando células co-inmovilizadas de "Speudomenas da cunhae y Escherichia Colli" en carragenina para la obtención de L-alanina.

- Producción de antibióticos: La literatura reporta pocos estudios referentes al empleo de células inmovilizadas para obtener antibióticos, entre ellos:

El uso de micelio y protoplasma de Penicillium Crysoogenun en poliacrilamida y algionato de calcio para producir penicilina G a partir de glucosa.

La inmovilización de Streptomyces clavuligerus en poliacrilamida para producir cefalosporina C.

Obtención de bacitracina con células de :Bacillus sp inmovilizadas en poliacrilamida.

Usando Achromobacter sp o Bacillus megaterium inmovilizados por enlace iónico a DEAE- celulos para producir ampicilina a partir de ácido G-aminopenicilánico.

- Producción de ácidos orgánicos: producción de Acido L-málico a partir de ácido fumárico, inmovilizando Brevibacterium amoniagenes o Brevibacterium flavum.

Producción de ácido acético utilizando Acetobacter Aceti inmovilizado en material cerámico poroso y empleando glucosa como sustrato.

- Producción de alcoholes: empleando Saccharomyces cerevisiae inmovilizadas en K-carragenina, glucosa como sustrato para obtener alcohol etílico.

Producción continua de N-butanol e isopropanol usando Clorstridium Botyricum atrapada en algionato de calcio.

Otros usos que se dan a la células inmovilizadas son la obtención de enzimas extracelulares, como en el caso de la L-amilasa usando Bacillus sbtilis Inmovilizados en poliacrilamida, también la (producción) obtención de proinsulina con Bacillus subtilis inmovilizados en esferulas de agarosa.

MATERIALES UTILIZADOS PARA LA INMOVILIZACION Y SUS CARACTERISTICAS

Los materiales de origen orgánico, incluidos los polímeros naturales, poseen características físicas como porosidad y ausencia de reactividad que los hacen aptos para inmovilizar células microbianas ya que al emplearlas en procesos en procesos de transformación ofrecen ciertas

ventajas deseables como son: Limpieza, economía, alta porosidad y fácil control del proceso; teniendo en cuenta estas características se seleccionaron para inmovilizar Saccharomyces cerevisiae: agar, agarosa y K-carragenina.

Agar: Granulado y compuesto de sulfato de calcio y un polisacárido que contiene galactosa. El agar es una sustancia mucilaginosa seca extraída de varias especies de algas rojas, forma geles de alta resistencia a 40 °C y no presenta toxicidad reconocida.

Agarosa: Es un hidrocolide aislado del agar proveniente de algas marina, utilizado comúnmente en electroforesis pues la matriz del gel constituye un medio ideal para que migren moléculas cargadas con iones cuando se aplica un voltaje determinado; es una sustancia altamente hidrofílica, su temperatura de gelificación es de 36 °C. La agarosa se clasifica según su contenido de sulfato el cual es el principal componente de los grupos iónicos que la constituyen.

K-carragenina: Este polisacárido está compuesto por una unidad estructural de B-galactosa y 3,6-anhidro-L-D-Galactosa. Su peso molecular oscila entre 100.000 y 800.000, con un contenido de éster de 20 a 30%, es soluble en solución salina fisiológica en rango de temperatura de 70-80 °C. Se gelifica por contacto con solución de iones metálicos como K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , Ca^{++} , Cu^{2+} , Fe^{3+} aminas y solventes orgánicos miscibles en agua. Es un extracto de algas ampliamente usado en las industrias farmacéuticas y alimenticias por su propiedades como gelificante, espesante y agente estabilizador.

TECNICAS DE INMOVILIZACION EMPLEANDO AGAR Y AGAROSA

La técnica tiene por objeto inmovilizar células de Saccharomyces cerevisiae incluyéndolas en la partícula esféricas de agar y agarosa para utilizarlas en un proceso de fermentación; el procedimiento empleado fue (ver Figura 2):

- El agar o agarosa se disolvió con agitación continua en agua desmineralizada a 50 °C, hasta que se obtuvo una solución homogénea.
- La solución polimérica se esterilizó en un autoclave a 15 psi, 15 minutos.

- Se disolvió la levadura Saccharomyces cerevisiae en agua tibia a 30 °C. La suspensión obtenida se añadió a la solución polimérica estéril a 45 °C.
- La solución de células-Polímero se agregó gota a gota sobre la fase aceitosa hidrofóbica bajo agitación magnética durante 10 minutos, formándose esférulas aproximadamente de 3 mm de diámetro y buena consistencia. Las esférulas se lavaron perfectamente con agua estéril para retirar el aceite impregnado y las células adheridas a la superficie de las partículas.

La técnica exigió condiciones de esterilidad en el ambiente y en el material utilizado, para eliminar la concentración microbiana externa. La temperatura de gelificación del material y la temperatura máxima que soporte el microorganismo son parámetros fundamentales para la efectividad de esta técnica.

TECNICAS DE INMOVILIZACION EMPLEANDO LA K-CARRAGENINA

Los pasos empleados fueron los siguiente (ver Figura 3):

- La K-carragenina se disolvió en solución salina fisiológica estéril, esta solución fue precalentada a 80 °C, para obtener así una solución homogénea.
- La solución se esterilizó en un autoclave a 15 psia durante 15 minutos.
- Se preparó una suspensión celular de Sccharomyces Cerevisiae, disolviendo levadura en agua tibia, esta suspensión se añadió a la solución de K-carragenina estéril, se homogenizó y se guardó a 4 °C durante 15 minutos.
- Al gel resultante se le adicionaron 50 cc de solución de KCl 0,3 M estéril, el preparado se mantuvo bajo refrigeración 12 horas, tiempo en el cual el gel se consolidó.
- Se cortaron partículas de forma cúbica, con bisturí estéril; éstos se guardaron en solución de KCl a 0,3 M, durante 2 horas en el refrigerador.

EXPERIMENTACION

Utilizando las técnicas y los materiales descritos anteriormente se procedió a inmovilizar Saccharomyces cerevisiae para realizar unos ensayos preliminares que suministraran información acerca de los siguientes aspectos: Estabilidad de las células inmovilizadas, tiempo requerido para la fermentación alcohólica, concentraciones de agar, agarosa y K-carragenina que aseguran una inclusión efectiva y activa referida al número de microorganismos inmovilizados y la producción de alcohol etílico respectivamente, los ensayos se realizaron empacando los microorganismos inmovilizados en una columna (ver Figura 4), la cual se operó sin agitación o con agitación (recirculando el sustrato). Las Tablas 1 y 2 reportan los parámetros utilizados en las pruebas preliminares para obtener las esférulas de agar, agarosa y K-carragenina.

FERMENTACION ALCOHOLICA EN OPERACION DISCONTINUA

Las células de Saccharomyces cerevisiae se empacaron en la columna y se suministró como sustrato melaza de 15 Brix, se observó el avance de la actividad fermentativa, durante un lapso de tiempo de 96 horas, registrándose producción de dióxido de carbono, cambio de color aparente de la melaza y variación de sus propiedades organolépticas. La estabilidad de las células inmovilizadas se conservó, por lo cual se ensayó la reutilización empleando una solución de melaza pasteurizada el baño maría durante 15 minutos a 80 °C, las características de la solución se modifican considerablemente comprobándose la efectividad de la técnica de inmovilización y la posibilidad de reutilizar las células inmovilizadas sin pérdida aparente de su actividad biocatalítica.

FERMENTACION ALCOHOLICA EN OPERACIONES DISCONTINUA CON AGITACION MEDIANTE RECIRCULACION

Repetiendo la inmovilización de células pero operando la columna haciendo recircular el sustrato, a través del lecho empacado, se tomaron muestras cada 24 horas cuantificándose la conversión de sustrato y la variación de pH para analizar su influencia sobre las células inmovilizadas. Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla 3. Al final del proceso las células inmovilizadas conservaron su estabilidad y su actividad.

Estos ensayos preliminares sirvieron para determinar las

concentraciones de los materiales poliméricos apropiados para realizar la inmovilización de la levadura. Los valores escogidos fueron:

Agar 8 y 5,3% g/ml
 Agarosa 6 y 4% g/ml
 K-carragenina 3,4% g/ml

Tiempo requerido para la fermentación alcohólica: 4 a 5 días.

Con base en los resultados anteriores se estableció una metodología de acondicionamiento del microorganismo con el objetivo de mejorar su utilización, ésta incluyó las etapas de: inmovilización, activación y utilización reutilización.

TABLA 1. Parámetros utilizados para agar y agarosa en ensayos preliminares.

Fase acuosa 25 ml agua desmineralizada
 Fase Aceitosa 50 ml aceite de Soya
 Tiempo de agitación 10 minutos

Material	Peso (g)	%P/V
Agar	1,325	5,30
	1,500	6,00
	1,650	6,6
	2,000	8,00
Agarosa	0,500	2,00
	0,875	3,50
	1,000	4,00
	1,500	6,00
Agar-Agarosa	1.0 - 0,75	4,0 - 3,0

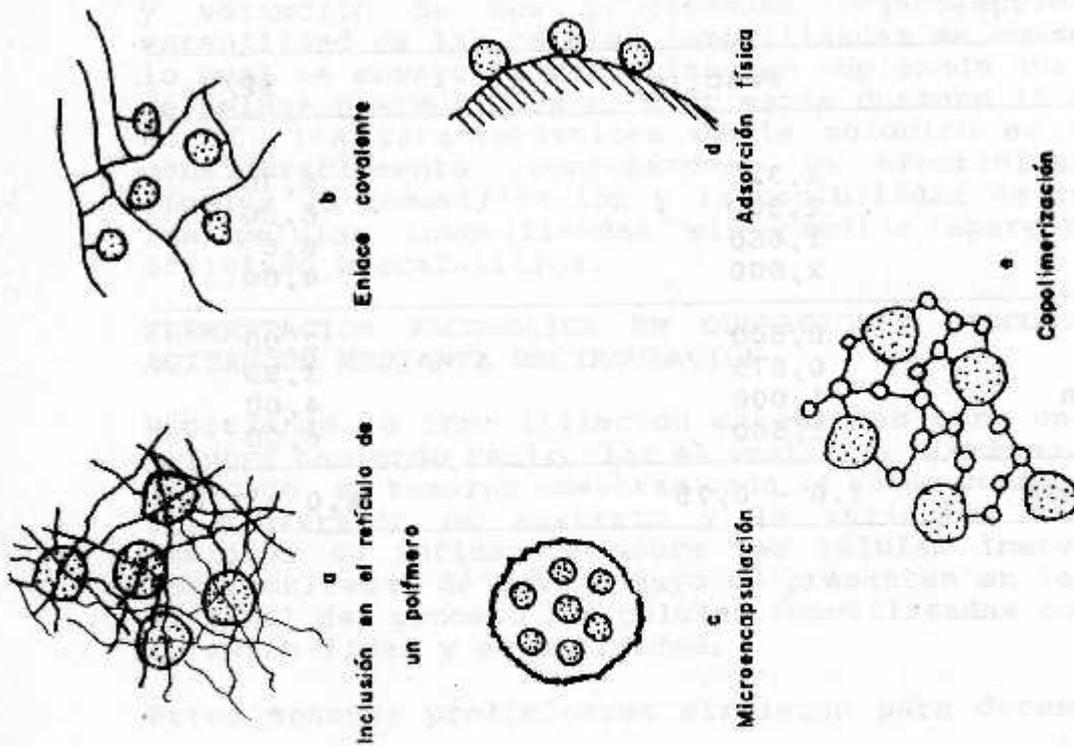


FIGURA 1. Métodos comunes de inmovilización.

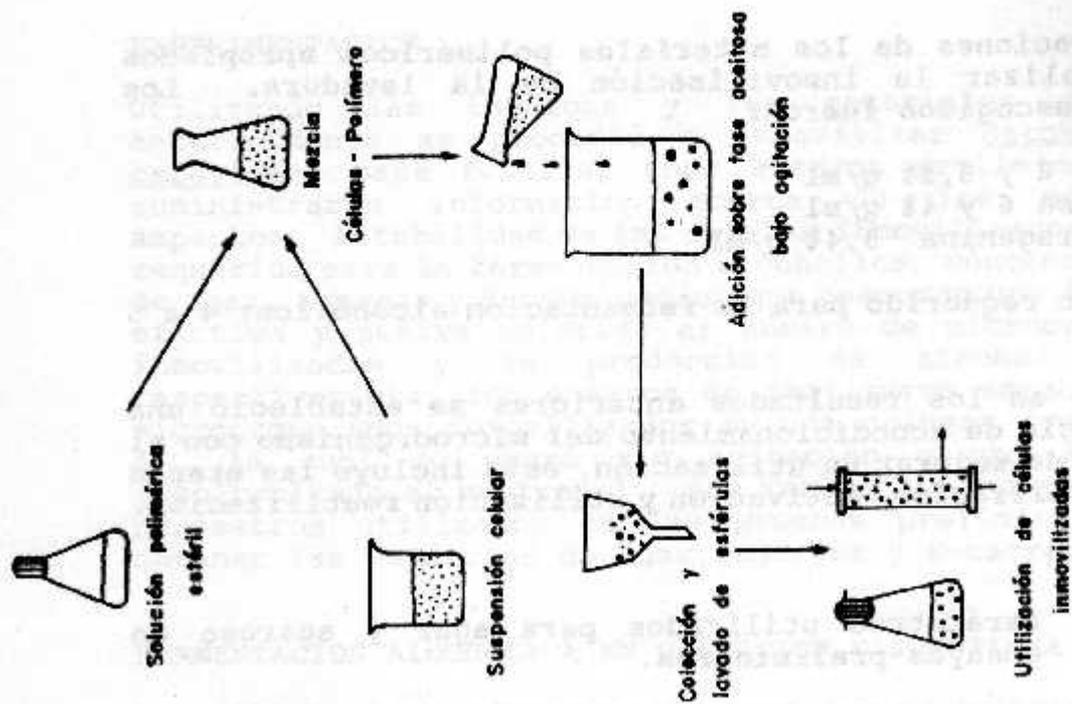


FIGURA 2. Diagrama de una técnica de inmovilización usando agar-agar y agrosa.

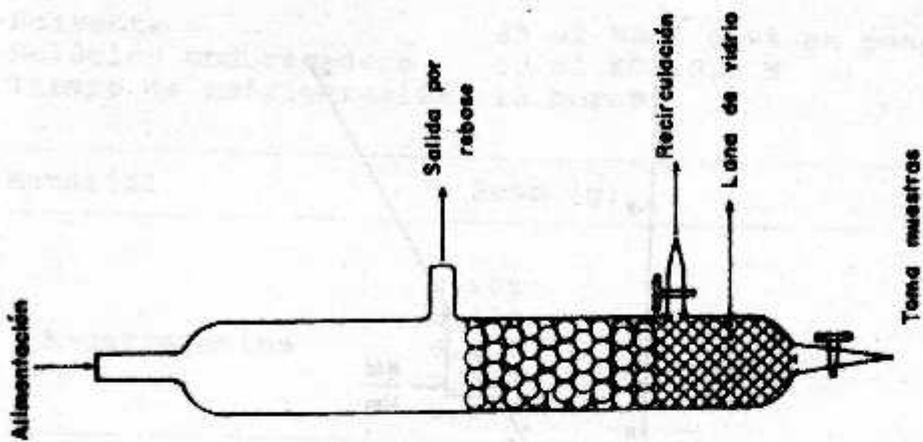


FIGURA 4. Esquema columna empacada

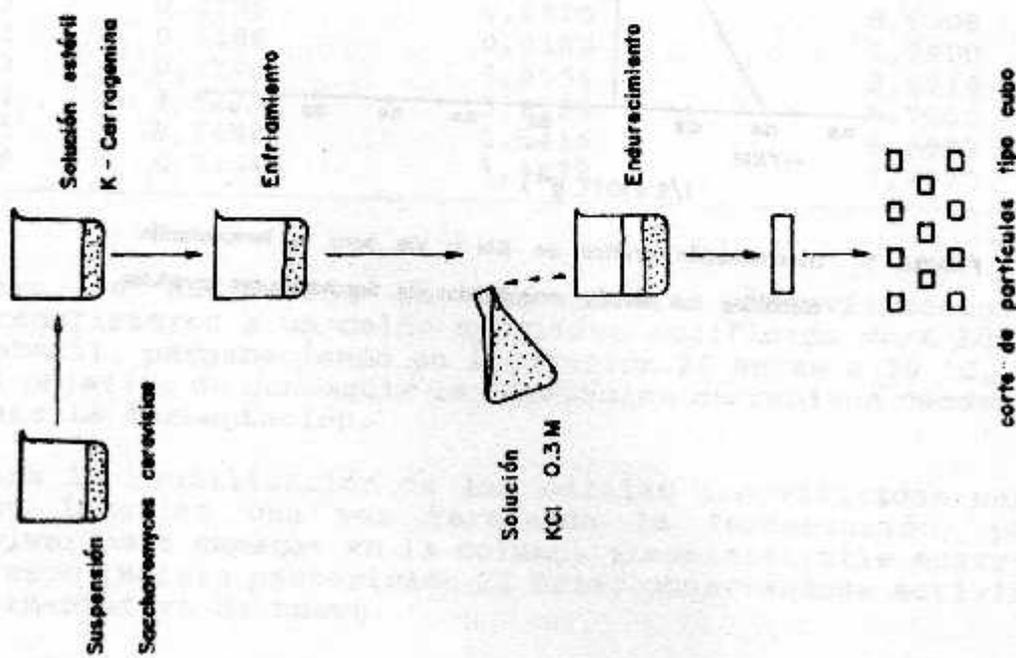


FIGURA 3. Esquema de inmovilización usando K-Carragenina

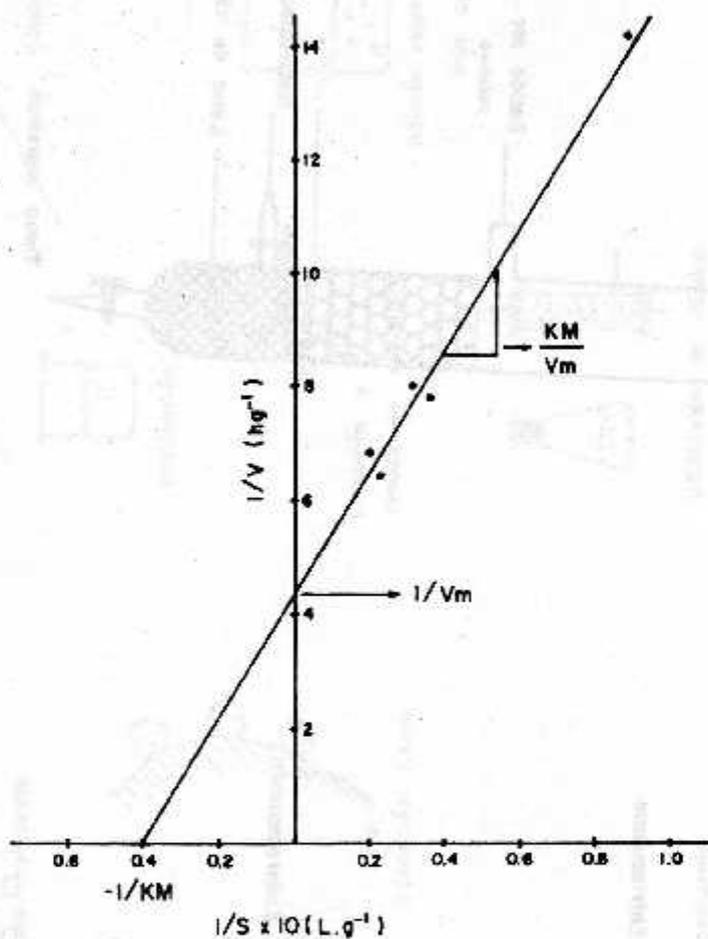


FIGURA 5. Determinación gráfica de K_m y V_m para la fermentación alcohólica con células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

TABLA 2. Parámetros utilizados para K-carragenina en ensayos preliminares.

Solvente	25 ml NaCl 0.9% en peso
Solución endurecedora	50 ml KCl 0.3 M
Tiempo de refrigeración	12 horas

Material	Peso (g)	%P/V
K-carragenina	0,400	1,6
	0,450	1,8
	0,500	2,0
	0,850	3,4
	0,875	3,5

TABLA 3. Cuantificación preliminar de producción se etanol.

Día	Etanol (g/100 ml)		
	Agar 6,6% P/v	Reutilización Agar 6,6 % P/V	Agarosa 4% P/V
1	0,2296	0,4826	0,5308
2	0,2186	0,9180	0,7900
3	0,7176	0,5554	2,6714
4	3,5236	5,9296	5,7056
5	8,7480	1,9416	6,2582
6	6,9304	1,4622	7,7070

Para la activación de las células inmovilizadas se transfirieron a un caldo nutritivo modificado Wort Lösung estéril, permaneciendo en incubación 20 horas a 30 °C, con el objetivo de conseguir la adecuación microbiana necesaria para la fermentación.

Para la reutilización de las células inmovilizadas basta con lavarlas una vez terminada la fermentación, para volverlas a empacar en la columna y suministrarle sustrato fresco (Melaza pasterizada 22 Brix) observándose actividad fermentativa de nuevo.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Se programó un diseño factorial 2^n , teniendo en cuenta como variables de proceso : concentración de las soluciones de agar y agarosa y densidad celular de la suspensión de : Saccharomyces cerevisiae. Las dos variables se trabajaron en dos niveles; para la concentración de las soluciones. La solución con base a los ensayos preliminares y la densidad celular de acuerdo a trabajos previos.

Los niveles de trabajo para la densidad celular:

Nivel alto	4 g/l
Nivel bajo	2 g/l

El tiempo de activación de la células inmovilizadas se fijó en 22 horas y la concentración inicial de melaza en 22 Brix.

La concentración de agar y agarosa fue:

	Nivel alto	Nivel bajo
AGAR	8%	5,3%
AGAROSA	6%	4,0%

Para la utilización del agar y la agarosa como matrices de atrapamiento las mejores condiciones obtenidas para la máxima producción de etanol, en operación discontinua, fueron:

	Agar	Agarosa
Día	5	3
pH	5,78	5,63
Brix	13,5	12
Conc. matriz	8% g/ml	4% g/ml
conc levadura	24,238 g/100 ml destilados	24,1348 g/100 ml destilados

La inmovilización en K-carragenina se realizó a 3,4% g/ml a partir de una concentración de Saccharomyces Cerevisiae de 2 g/l, sometiendo las células inmovilizadas a etapas de activación en caldo nutritivo durante 24 horas, obteniéndose como mejores condiciones para máxima producción de etanol la siguientes:

Día	5
Agar	16,9068 g/100 ml destilados
Agarosa	24,1286
K-carragenina	11,866

MODELO MATEMATICO DE CONCENTRACION ALCOHOLICA EN UN REACTOR DISCONTINUO

Los biorreactores con células inmovilizadas difieren de los reactores químicos en sus aspectos operativos característicos, dentro de los cuales cabe señalar que los primeros funcionaron a bajas presiones y temperaturas y por lo tanto el calor generado o consumido a lo largo del proceso es menor si se le compara con el calor asociado a la mayoría de las transformaciones químicas (19).

Cuando en un reactor discontinuo se emplea la cinética de Michaelis-Menten (*Saccharomyces cerevisiae* inmovilizados (19)) se obtiene una ecuación integrada que relaciona el tiempo que debe transcurrir la reacción para obtener la conversión de un volumen determinado de sustrato.

Para nuestro sistema de reactor que opera en forma discontinua, la expresión de balance de materia se simplifica a:

$$\text{Reacción} = r \cdot v \quad (1)$$

Donde

r: Velocidad de reacción

v: Volumen de la solución de sustrato

La cinética de células inmovilizadas es más compleja que la expresión para describir la actividad de su sola enzima, pero más sencilla que la cinética de la fermentación con células libres, pues usualmente no hay división celular posterior a la inmovilización.

Los factores que pueden llegar a afectar estos procesos cinéticos son:

- Efectos de restricciones difusional, tanto externa que afecta las transferencia de sustrato y producto en las inmediaciones de cada partícula de soporte, como interna, en lo referente a la difusión de sustrato y producto dentro del material que contiene el biocatalizador inmovilizado.

Las modificaciones más importantes de la cinética inherente

a células inmovilizadas son los efectos difusionales externos; éstos efectos se pueden minimizar incrementando la agitación en el reactor. La cinética también puede verse afectada por la existencia de una pared celular y una membrana citoplasmática osmoticamente intacta y difusionales, este efecto varía según el tipo de sustrato empleado y la estructura de la pared y la membrana celulares, llegándose a cuantificar gracias al incremento de la actividad una vez que se lisen.

Por lo tanto los parámetros cinéticos efectivos de la actividad enzimática de las células inmovilizadas: V_m velocidad máxima de reacción, K_m constante de Michaelis-Menten, están estrechamente relacionadas con la cinética correspondiente a estas enzimas, el modelo matemático es:

$$r = \frac{(V_m \cdot S)}{K_m + S} \quad (2)$$

Donde,

r : Velocidad de reacción

V_m : Velocidad máxima de reacción

K_m : Constante de Michaelis-Mentel

s : Concentración de sustrato

Linealizando la ecuación (2) se pueden obtener los valores de K_m y V_m de la gráfica de $1/r$ contra $1/S$.

$$1/r = 1/m + (K_m/V_m) \cdot 1/s \quad (3)$$

Definiendo los parámetros cinéticos, se procede a deducir el modelo de diseño reemplazando la expresión cinética en la ecuación de balance de masa:

$$-V \, ds/d\theta = \text{Reacción} = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (4a)$$

Separando variables

$$V_m \cdot d\theta = -(V) \frac{(K_m + S) \, dS}{S} \quad (4b)$$

Integrando entre el tiempo cero (inicial) y el tiempo

necesario para que el sustrato se convierta desde S_0 hasta S_1 :

$$V_m \cdot \theta = -V [K_m \cdot \ln(S_1/S_0) + (S_1 - S_0)] \quad (5)$$

TABLA 4. Condiciones para la determinación experimental de los parámetros cinéticos, K_m y V_m .

Volumen de solución de melaza	150 ml
Tiempo de fermentación	45 h
Peso de esférulas del 8% g/ml con levadura inmovilizada	21 g
Número de células de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> inmovilizadas	1,78 E7 células
Densidad celular de la suspensión inicial	2 g/l

TABLA 5. Datos de determinación gráfica de los parámetros cinético (K_m y V_m).

S (g/l)	1/S	r(g/h)	1/r
50	0,020	0,1481	6,75
40	0,025	0,1333	7,50
30	0,033	0,1379	7,25
20	0,050	0,1000	10,00
10	0,100	0,0689	14,5

Definiendo la concentración de sustrato $x = (S_0 - S_1)/S_1$

La ecuación se modifica a:

$$V_m \cdot \theta = V [- K_m \cdot \ln(1 - x) + x \cdot S_0] \quad (6)$$

Esta ecuación relaciona el tiempo y la conversión para un volumen de sustrato.

La determinación de los parámetros cinéticos V_m , velocidad máxima de reacción, y K_m , constante de Michaelis-Menten, se realizó gráficamente a partir del método de línea Weaver Burk; los datos para la gráfica 1/S contra 1/r (ver Figura 5), se obtuvieron inmovilizando las Saccharomyces cerevisiae en agar (empaquetando con ella el reactor) y realizando la fermentación alcohólica con sustrato

(solución de melaza) de cinco concentraciones de azúcar diferentes. Al cabo del tiempo fijado se cuantificó la conversión de azúcar en el sustrato, la velocidad de reacción se determinó como la razón de azúcar convertido en la unidad de tiempo. Las Tablas 4 y 5 reportan las variables y coordenadas obtenidas para realizar la Figura 5 que permitió hallar los siguientes valores:

Pendiente, $K_m/V_m = 107,53$

Intercepción con ordenadas, $1/V_m = 4,3$

$K_m = 25 \text{ g/l}$

$V_m = 0,2325 \text{ g/h}$

Los valores aparentes de los parámetros cinético se reemplazaron en la ecuación (6) de diseño y se calculó el tiempo requerido par alcanzar una conversión del 29% a partir de una solución de melaza del 22 Brix

$$\theta = (0,1 \text{ l}) / (0,2325 \text{ g/l}) [0,29 \cdot 121 \text{ g/l} - 25 \cdot \ln(1 - 0,29)]$$

$$\theta = 28 \text{ horas}$$

Ya que el tiempo experimental fue de 24 horas, se deduce que la ecuación de diseño, con los parámetros encontrados, presentan un error relativo del 14,28%.

CONCLUSIONES

- Se comprobó la eficacia de la metodología propuesta (constituida por tres etapas: inmovilización, activación y utilización-reutilización) par el empleo de células inmovilizadas en proceso biotecnológicos; como se demostró con Saccharomyces cerevisiae inmovilizada en agar, agarosa y K-carragenina para la producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar. Esta producción de alcohol sobrepasó considerablemente a lo que se obtiene por procesos de fermentación tradicionales, demostrando que realizar el proceso con células inmovilizadas constituye una apreciable ventaja en términos económicos.
- Las características de los materiales seleccionados (agar, agarosa y K-carragenina) como son: buena permeabilidad, ausencia de toxicidad y adecuada consistencia de los geles aseguraron que las células inmovilizadas conservaran su estabilidad y actividad biocatalítica, su utilización en reiteradas ocasiones.
- Se detectó inhibición por exceso de microorganismos, al

repetir las pruebas immobilizando mayor densidad de levadura, lo cual se debe a que en un momento dado los microorganismos llegan a taponar los poros de las esférulas en que se encuentran immobilizadas impidiendo el intercambio efectivo con la fase externa del sustrato.

- La reutilización de la células immobilizadas fue efectiva, en la mayoría de las pruebas la producción de etanol aumentó con respecto a la primera utilización; esto indica que las células immobilizadas generan una respuesta "de memoria", al entrar de nuevo en contacto con sustrato.
- La obtención de células immobilizadas estables, activas y libres de contaminación microbiana, exige adquirir destreza en el manejo de los materiales de atrapamiento, estudio de las condiciones térmicas que puede llegar a soportar el microorganismo y la determinación de una metodología que asegure al emplearlas en un proceso determinado.

BIBLIOGRAFIA

1. AIBA, S. y otros. Biochemical engineering. Academic Press. Tokio, 1973.
2. ATKINSON, B. Biochemical Reactor. Pion Limitet. London, 1974.
3. CHIBATA, I. and TOSA, T. Advances in applied microbiology. Academic. New York. vol 22, N 1, 1982.
4. KILARA, A. y otros. Biotechnology and Bioengineering. N 18. 1977.
5. NILSON, K. y otros. Eur. jorn. Aplied microbiology biotechnology. N 17, 1983.
6. PEICZAR, M. y otros. Microbiología. Mc graw Hill. México, 1982.
7. QUINTERO, R. Ingeniería Bioquímica. Alhambra S.A. México. 1981.
8. SERRANO, R. Introducción a la aplicación de las Enzimas. Alambra S.A. Madrid. 1985.

9. TREVAN, M. D. Immobilized Enzymes. Wiley & Son. New York. 1980.
10. WISEMAN, A. Topics in Enzymes and Fermentation Biothenology. Chichester, Ellis Horwood Limited. vol 4. 1980.

la utilización de las células microbianas en la producción de enzimas, en la mayoría de los casos se ha limitado a la producción de enzimas libres en el medio de cultivo. Este trabajo se centra en el estudio de las condiciones óptimas para la producción de enzimas inmovilizadas en soporte sólido, en particular en el caso de la pectinasa producida por *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

En el presente trabajo se describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.

El presente trabajo describe el estudio de las condiciones óptimas para la producción de pectinasa inmovilizada en soporte sólido, en particular en el caso de *Aspergillus niger*. Se describen los métodos utilizados para la preparación de los soportes y la inmovilización de las células, así como los resultados obtenidos en términos de actividad enzimática y estabilidad. Se discute la importancia de estos factores en el diseño de procesos de fermentación industrial.