

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**HIDRÓLISIS DE SACAROSA EN UN REACTOR DE LECHO  
EMPACADO CON INVERTASA Y *Aspergillus niger* INMOVILIZADOS  
EN EL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ**

DIRECTOR

**Dr. ERNESTO FAVELA TORRES**

DICIEMBRE 2005

---

---

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio 0471-0/Maestría en Biotecnología.

---

---

---

## CONTENIDO

<b>Índice de contenido</b> .....	i
<b>Índice de tablas y figuras</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	v
<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica</b> .....	2
2.1 Fermentación en medio sólido (FMS).....	2
2.1.1 Microorganismos utilizados en FMS.....	3
2.1.2 Humedad y actividad de agua en FMS.....	4
2.1.3 Soportes utilizados en FMS.....	6
2.2 Invertasa.....	8
2.2.1 Microorganismos productores de invertasa.....	9
2.2.2 Producción de invertasa.....	9
2.3 Invertasa inmovilizada.....	11
2.4 Hidrólisis de sacarosa.....	12
<b>Capítulo 3. Hipótesis</b> .....	17
<b>Capítulo 4. Objetivos</b> .....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos particulares.....	17
<b>Capítulo 5. Materiales y métodos</b> .....	18
5.1 Producción de invertasa.....	18
5.1.1 Microorganismo.....	18

---

5.1.2 Medio de cultivo.....	19
5.1.3 Soporte.....	20
5.1.4 Condiciones de cultivo.....	20
5.2 Desactivación de la enzima.....	21
5.3 Caracterización de la materia seca fermentada.....	22
5.4 Determinación de la velocidad de hidrólisis.....	22
5.5 Hidrólisis de sacarosa en continuo.....	23
5.6 Métodos analíticos.....	24
5.6.1 Actividad enzimática.....	24
5.6.2 Análisis de azúcares.....	26
<b>Capítulo 6. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
6.1 Producción de invertasa.....	27
6.2 Producción de la enzima autoinmovilizada.....	29
6.3 Desactivación de la enzima.....	31
6.4 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de sacarosa.....	35
6.5 Hidrólisis en continuo con diferentes concentraciones de sacarosa.....	38
6.6 Hidrólisis en continuo a diferentes temperaturas.....	41
<b>Capítulo 7. Conclusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Capítulo 8. Referencias.....</b>	<b>57</b>

---

---

## Índice de tablas y figuras

<b>Tabla 1.</b>	Composición del medio de cultivo Pontecorvo.....	19
<b>Tabla 2.</b>	Composición de la solución de elementos traza.....	19
<b>Tabla 3.</b>	Velocidad inicial de hidrólisis a diferentes temperaturas y $E_a$ .....	38
<b>Tabla 4.</b>	Velocidad inicial de hidrólisis a diferentes concentraciones de sacarosa.....	40
<b>Tabla 5.</b>	Velocidad inicial de hidrólisis en el reactor de lecho empacado a diferentes temperaturas, $E_a$ y $Q_{10}$ .....	44
<b>Figura 1.</b>	Sistema para hidrólisis en continuo de sacarosa.....	23
<b>Figura 2.</b>	Producción de invertasa por <i>A. niger</i> en FMS a diferentes tiempos.....	28
<b>Figura 3.</b>	Materia seca fermentada (msf).....	29
<b>Figura 4.</b>	Efecto de la concentración de $H_2SO_4$ sobre la hidrólisis de sacarosa.....	32
<b>Figura 5.</b>	Efecto de la concentración de $H_2SO_4$ sobre la actividad enzimática.....	33
<b>Figura 6.</b>	Efecto de la concentración de $H_2SO_4$ sobre la hidrólisis de sacarosa.....	34
<b>Figura 7.</b>	Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de hidrólisis de sacarosa en tubos de ensayo.....	36
<b>Figura 8.</b>	Efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad inicial	

---

	de hidrólisis en un reactor de lecho empacado de 5 cm <sup>3</sup> .....	40
<b>Figura 9</b>	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de hidrólisis en continuo.....	41
<b>Figura 10</b>	Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de hidrólisis en el reactor enzimático de lecho empacado.....	43
<b>Figura 11</b>	Hidrólisis de sacarosa en un reactor de 20 cm <sup>3</sup> operando a 60°C con sacarosa 2 M.....	46
<b>Figura 12</b>	Hidrólisis de sacarosa en un reactor de 200 cm <sup>3</sup> operando a 60°C con sacarosa 2 M.....	46
<b>Figura 13</b>	Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la viscosidad.....	51
<b>Figura 14</b>	Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la densidad.....	51
<b>Figura 15</b>	Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la difusividad.....	52
<b>Figura 16</b>	Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre el coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ).....	53
<b>Figura 17</b>	Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre el número de Damköhler ( $Da$ ).....	54

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar las condiciones de operación para la hidrólisis de sacarosa en continuo por la enzima autoinmovilizada en un reactor de lecho empacado, cuantificando la cantidad de azúcares reductores liberados, la velocidad inicial de hidrólisis y el porcentaje de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato y temperatura.

A las 45 horas de cultivo se obtuvo mayor producción de invertasa por *A. niger* B28C25 en fermentación en medio sólido usando agrolita como soporte, se utilizó este tiempo para posteriores fermentaciones. La invertasa se autoinmovilizó en el soporte pasando aire seco por la columna para obtener así la materia seca fermentada (msf).

Usando la materia seca fermentada (msf) como catalizador de la hidrólisis de sacarosa en tubos de ensayo, se observó que con una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.04 N se detenía la actividad enzimática a temperaturas menores a  $40^\circ\text{C}$ , por lo que se decidió utilizar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.04 N para este propósito. En esta etapa la mayor actividad enzimática se alcanzó a  $70^\circ\text{C}$ .

La mayor velocidad de hidrólisis se logró con una solución de sacarosa 2 M usando un reactor de lecho empacado de  $5\text{ cm}^3$  manteniendo el flujo y la temperatura constantes (0.1 ml/min y  $40^\circ\text{C}$  respectivamente).

Posteriormente se estudió el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado de  $20\text{ cm}^3$  manteniendo el flujo y la concentración de sacarosa constantes ( $0.1\text{ ml/min}$  y  $2\text{ M}$ ), se observó que a temperaturas bajas ( $40$  y  $50^\circ\text{C}$ ) el porcentaje de hidrólisis ( $15\%$ ) es menor comparado con el obtenido a temperaturas mayores ( $25\%$ ), sin embargo, en todos los casos el porcentaje de hidrólisis permanece constante durante  $40$  horas.

Para conservar la actividad de la enzima se eligió una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . En estas condiciones de mayor velocidad y porcentaje de hidrólisis (sacarosa  $2\text{ M}$  y  $60^\circ\text{C}$ ), se estudió el efecto de la velocidad de flujo sobre el porcentaje de hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado de  $20\text{ cm}^3$  y otro de  $200\text{ cm}^3$ , con un tiempo de residencia de  $17$  horas en ambos casos, lo cual corresponde a un gasto másico de sacarosa de  $1.6\text{ Kg/h}$ . En estas condiciones se logró un porcentaje de hidrólisis superior al  $50\%$  por un periodo mayor a  $70$  horas.

Se calculó el número de Damköhler ( $Da$ ) para relacionar la velocidad de reacción con la velocidad de difusión y de esta manera tener un panorama general sobre los procesos que pueden limitar la hidrólisis de sacarosa. El número  $Da$  calculado fue mayor a la unidad ( $336$ ) lo que sugiere que el proceso de hidrólisis de sacarosa está limitado por problemas de transferencia de masa.



## 1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en medio sólido (FMS) se ha utilizado durante siglos para la fabricación de alimentos, bebidas y otros productos (Mitchell *et al.*, 2000). En tiempos recientes, la aplicación de procesos biotecnológicos que involucran la FMS ha generado gran interés debido a que estos procesos se han convertido en una herramienta biotecnológica importante para la producción de diferentes bioproductos (Pandey, 1996) como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogas, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros (Mitchell *et al.*, 2000). Se han sugerido varias ventajas de la fermentación sólida sobre la fermentación líquida (Mitchell *et al.*, 2000) entre las que destacan la menor represión catabólica, la alta productividad de enzimas y la mayor concentración de enzimas (Romero-Gómez *et al.*, 2000).

Los jarabes de azúcar invertido principalmente usados en la fabricación de bebidas y en la industria de alimentos se producen por diferentes métodos. El más antiguo de estos métodos es la hidrólisis ácida a temperatura y presión elevadas (Mansfeld *et al.*, 1992). Otra posibilidad es la hidrólisis de sacarosa usando invertasa ( $\beta$ -D-fructofuranosidasa E.C. 3.2.1.26). La inmovilización de células con invertasa intracelular puede ofrecer ventajas económicas comparadas con la invertasa soluble. Además, el uso de células inmovilizadas permite su aplicación en procesos de hidrólisis de sacarosa en continuo (Monsan y Combes, 1983).

En este trabajo se evaluó la producción de invertasa en FMS y el uso directo de la materia fermentada para la hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado operando en continuo.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fermentación en Medio Sólido (FMS)

Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación líquida usando frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente, en este aspecto la fermentación líquida ofrece ventajas insuperables sobre la fermentación en medio sólido (Hölker *et al.*, 2004). Por otro lado, todas las enzimas pueden ser producidas por FMS con microorganismos sin manipular ofreciendo ventajas biotecnológicas sobre la fermentación líquida (Hölker *et al.*, 2004).

La FMS se ha utilizado por siglos, en un principio para la producción de alimentos, en las últimas 2 o 3 décadas el interés por los procesos de fermentación sólida se ha orientado a la síntesis de bioproductos como antibióticos (Barrios-González y Mejía, 1996), metabolitos secundarios (Trejo-Hernández *et al.*, 1992), entre otros.

Los procesos de FMS a escala industrial son utilizados principalmente en Japón modificando el tradicional proceso *koji* gradualmente hasta obtener procesos más sofisticados, en India se ha reportado (Kumar, 1987) la producción de pectinasas a mediana escala. En Francia una firma (Lyven S.A.) desarrolló un proceso para la producción de pectinasas con pulpa de remolacha. El composteo que fue desarrollado a pequeña escala para la producción de setas se ha modernizado y escalado en Europa y EEUU, varias compañías de Europa y EEUU producen setas por cultivo de *Agaricus*, *Pleurotus* o *Shii-Take* (Raimbault, 1998).

Los procesos de fermentación pueden ser divididos, generalmente, en fermentaciones en estado sólido y sumergido. La mayor diferencia entre estos dos bioprocesos es la cantidad de agua libre en el sistema. La fermentación en medio sólido (FMS) involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas de sustratos sólidos húmedos en ausencia de agua libre entre las partículas (Mitchell *et al.*, 2000). Sin embargo, el sustrato debe poseer la humedad necesaria para mantener el crecimiento y metabolismo de los microorganismos (Pandey 1992, Pandey 1994, Pandey *et al.*, 2000, Pandey *et al.*, 2001). Existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier bioproceso en FMS. Estos incluyen, la selección del microorganismo apropiado, la selección del sustrato, la cantidad de agua en el sistema, entre otros.

### **2.1.1 Microorganismos utilizados en FMS**

Bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en sustratos sólidos con aplicación en procesos de fermentación sólida. Las bacterias se utilizan principalmente en composteo, ensilaje y algunos procesos de alimentos (Doelle *et al.*, 1992). Las levaduras pueden ser usadas en la producción de etanol y alimentos (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1992).

Los hongos filamentosos es el grupo de microorganismos más importante usado en los procesos de FMS debido a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimológicas (Raimbault, 1998).

La forma de crecimiento de los hongos (hifas), su tolerancia a bajas actividades de agua ( $A_w$ ) y su resistencia a elevadas presiones osmóticas hacen a los hongos eficientes en la bioconversión de sustratos sólidos (Raimbault, 1998).

Los hongos filamentosos tienen otras características que presentan una ventaja sobre los organismos unicelulares. El crecimiento en forma de micelio rápidamente coloniza la superficie del sólido, que se acompaña de un incremento en la densidad, las hifas pueden crecer en busca de nutrientes disponibles. Además muchos hongos filamentosos producen enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas para degradar las macromoléculas de los sustratos sólidos (Mitchell *et al.*, 2000).

Muchos hongos filamentosos pueden crecer a valores de pH bajos, esta característica puede usarse en combinación con actividades de agua bajas para crear un medio ambiente favorable para el crecimiento de hongos y al mismo tiempo evitar contaminantes como bacterias y levaduras (Mitchell *et al.*, 2000). De esta manera los hongos filamentosos se han empleado en la formación de diferentes productos como enzimas hidrolíticas (Couri *et al.*, 2000), pectinasas (Bai *et al.*, 2004), glucoamilasas (Ellaiah *et al.*, 2002), ácido giberélico (Corona *et al.*, 2005) e inclusive moléculas que funcionan como inhibidores de enzimas (Rao *et al.*, 2005).

### **2.1.2 Humedad y Actividad de Agua ( $A_w$ ) en FMS**

Una de las características más importantes de la fermentación en medio sólido es la baja disponibilidad de agua en el sistema. La actividad de agua es un importante control de crecimiento microbiano y es menor que la encontrada en fermentación

líquida. Valores de  $A_w$  entre 0.95-0.98 pueden ser considerados típicos para sustratos sólidos, estos valores son ideales para el crecimiento de muchos hongos, especialmente hongos filamentosos, los cuales tienen un crecimiento óptimo a  $A_w$  de 0.96-0.98 y aún pueden crecer a  $A_w$  de 0.9. Como resultado de esto, la mayoría de los procesos de FMS utiliza hongos filamentosos (Mitchell *et al.*, 2000). En contraste muchas bacterias y levaduras crecen a actividades de agua de aproximadamente 0.99, este crecimiento disminuye cuando la  $A_w$  baja y es completamente inhibido a actividades de agua de 0.9 (Mitchell *et al.*, 2000).

El agua presente en los sistemas de FMS existe en forma compleja dentro de la matriz sólida o como una delgada capa que se absorbe en la superficie de las partículas. Sólo se tiene agua libre cuando la capacidad de saturación de la matriz sólida se excede (Raimbault, 1998). Sin embargo, el nivel de humedad al cual el agua libre se hace aparente varía considerablemente entre sustratos y depende de las características de enlace con el agua (Raimbault, 1998). Por ejemplo, el agua libre se observa cuando la humedad contenida excede el 40% en corteza de arce y del 50-55% en arroz y casava (Oriol *et al.*, 1988). Con lignocelulosa como sustrato el agua libre aparece después del 80% de humedad (Moo-Young *et al.*, 1983).

El nivel de humedad en los procesos de FMS puede variar entre 30 y 85% y tiene un marcado efecto en la cinética de crecimiento (Oriol *et al.*, 1988). El óptimo nivel de humedad para el cultivo de *Aspergillus niger* en arroz fue del 40%, mientras que en pulpa de café el nivel fue del 80%, lo que ilustra la ineficiencia del nivel de humedad como un parámetro para predecir el crecimiento microbiano (Raimbault, 1998).

El óptimo contenido de humedad para el crecimiento y la utilización de sustratos varían entre 40 y 70% pero depende del microorganismo y del sustrato usado para el cultivo (Raimbault, 1998). Por ejemplo, en el cultivo de *Aspergillus niger* en sustratos como casava (Raimbault y Alazard 1980) y en trigo (Nishio *et al.*, 1979) los niveles de humedad óptimos fueron considerablemente menores a los usados con pulpa de café (Peñaloza *et al.*, 1991) o con bagazo de caña (Roussos *et al.*, 1991). Esto es probablemente por la capacidad del agua de unirse a los últimos sustratos (Oriol *et al.*, 1988).

### **2.1.3 Soportes utilizados en FMS**

Dos tipos de sistemas de FMS pueden ser distinguidos dependiendo de la naturaleza de la fase sólida usada. El primero y más comúnmente usado (y el más estudiado) involucra sistemas de cultivo en materiales naturales, estos sistemas son llamados “cultivo en sustratos naturales”. El segundo sistema que es menos usado, se basa en cultivos con soportes inertes impregnados con medios líquidos definidos (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Los sustratos naturales usados en FMS sirven como soporte y como fuente de nutrientes, esto es una desventaja ya que la fuente de carbono forma parte de su estructura (Ooijkaas *et al.*, 2000). Durante el crecimiento del microorganismo el sustrato sólido es degradado y como resultado la geometría y las características físicas del medio cambian y consecuentemente la transferencia de masa y calor pueden disminuir (Barrios-González y Mejía, 1996).

Los soportes inertes del segundo sistema pueden ser de origen natural y sólo sirven como punto de anclaje para los microorganismos. Estos materiales incluyen cañamo, perlita, espuma de poliuretano (PUF), bagazo de caña y vermiculita (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Una de las ventajas de los soportes inertes sobre los sustratos naturales es la menor dificultad para recuperar los productos. Por ejemplo, las esporas de *Penicillium roquefortii* formadas dentro de granos de trigo sólo pueden recuperarse rompiendo el sustrato, mientras que las esporas producidas en partículas de pozolano (material volcánico) pueden recuperarse rápidamente sin destruir el soporte, por lo tanto, el proceso de recuperación se simplifica y el soporte puede ser reusado (Larroche y Gros, 1989).

Otras ventajas de los soportes inertes son: 1) Se puede diseñar un medio de producción adecuado y 2) Los balances de masa para procesos de modelamiento más avanzados y procesos de control son más fácilmente establecidos (Zhu, 1994) debido a que las concentraciones de todos los nutrientes del medio de producción son conocidas y pueden ser analizadas (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Para la utilización de soportes inertes impregnados con medios definidos en fermentación en medio sólido deben considerarse aspectos como costos y disponibilidad del soporte, factibilidad económica de utilizar un medio sintético o semisintético, impacto ambiental de los residuos sólidos generados, costos del proceso y formulación, costo de los registros y por supuesto el valor del producto (Ooijkaas *et al.*, 2000).

## 2.2. Invertasa

La  $\beta$ -D-fructofuranosidasa fructohidrolasa, comúnmente llamada invertasa y también conocida como  $\beta$ -D-fructofuranosidasa,  $\beta$ -fructosidasa,  $\beta$ -fructosilinvertasa y sacarasa fue descubierta por primera vez por Berthelot en 1860 (Neuman y Lamped, 1967). La reacción de rompimiento del residuo no reductor L-D-fructofuranosido es catalizado por la invertasa. El sustrato preferido de esta enzima es la sacarosa pero la invertasa tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis de rafinosa y estaquiosa (Fiedurek *et al.*, 2000, Belcarz *et al.*, 2002), produciendo una mezcla de fructosa y glucosa, esta mezcla conocida como azúcar invertida, tiene mayor poder edulcorante que la sacarosa y es usada en la producción de chocolate, bombones, jarabe, miel sintética, mermelada y jaleas. El azúcar invertido no es el único producto de importancia que produce la invertasa. La producción y aplicación de fructooligosacáridos formados por invertasa obtenida de cepas de *A. niger* ha ganado tremenda importancia comercial debido a sus propiedades funcionales; éstas incluyen: mejora de la microflora intestinal, alivian la constipación, disminuyen el colesterol y lípidos, promueven el crecimiento animal y son edulcorantes bajos en calorías (Nguyen *et al.*, 1999).

Actualmente, la invertasa es una de las enzimas más utilizadas en la industria de los alimentos, especialmente en la preparación de dulces, bebidas y en la producción de ácido láctico por fermentación de melazas (Acosta *et al.*, 2000). La invertasa también se utiliza para la hidrólisis de sacarosa en procesos de producción de etanol; lo que



evita la formación de sorbitol durante el proceso de fermentación (Lee y Huang, 2000).

### **2.2.1 Microorganismos productores de invertasa**

Se ha reportado la presencia de invertasa en bacterias, hongos, plantas superiores y en algunas células animales (Belcarz *et al.*, 2002, Mátrai *et al.*, 2000, Luxhoi *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre producción de invertasa se ha realizado con *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es un microorganismo particularmente interesante ya que mientras otras especies de levaduras que consumen sacarosa tienen la habilidad de sintetizar sólo una forma de invertasa intra o extracelular, *S. cerevisiae* sintetiza ambas formas de invertasa. Una es la proteína periplasmática glucosilada y la otra es una proteína citosólica no glucosilada (Belcarz *et al.*, 2002)

La invertasa es producida de manera comercial principalmente por *Saccharomyces cerevisiae* y por cepas de hongos del género *Aspergillus* como *A. niger*, *A. oryzae* y *A. ficcum* (Vargas *et al.*, 2004). En estos hongos la invertasa puede ser intra y extracelular. En *A. niger* se ha observado la presencia de múltiples formas de esta enzima y aproximadamente del 40-60% de ésta es intracelular (Vargas *et al.*, 2004).

### **2.2.2 Producción de invertasa**

Muchos de los trabajos sobre producción de invertasa se han hecho en fermentación líquida usando sacarosa y melazas como principal fuente de carbono. Belcarz y col. (2002) observaron que a una concentración de 1% de sacarosa se induce la síntesis

de invertasa por *C. utilis*. Siendo *S. cerevisiae* uno de los principales productores a nivel industrial, se ha cultivado en diferentes medios para producir altas cantidades de invertasa.

Con hongos filamentosos se han realizado numerosos intentos para incrementar la producción de invertasa. Se ha reportado (Fiedurek *et al.*, 2000) la selección de cepas de *A. fumigatus* utilizando técnicas de mutagénesis clásicas, encontrando la mayor actividad de invertasa extracelular e intracelular (5.27 U/ml y 0.44 U/ml) después de 96 horas de incubación, el incremento de la actividad de invertasa comparada con la cepa parental fue de dos veces aproximadamente. Mukherjee y colaboradores (2002) reportan la producción de invertasa por *Termitomyces clypeatus* cuando el hongo fue cultivado por 5 días en un medio sintético con 1% de sacarosa.

Una opción para la producción de invertasa son los procesos de fermentación en medio sólido . Se han sugerido varias ventajas de la fermentación sólida sobre la fermentación líquida (Mitchell *et al.*, 2000) entre las que destacan la menor represión catabólica, la alta productividad de enzimas y la mayor concentración de enzimas (Romero-Gómez *et al.*, 2000).

Montiel-González y col. (2002) compararon mutantes haploides de *A. niger*, previamente caracterizadas como sobreproductoras de enzimas y diploides de *A. niger* formadas a partir de las mutantes haploides, de esta manera encontraron una mayor producción de invertasa en FMS en comparación con el método convencional de fermentación líquida.

Romero-Gómez y col. (2000), compararon la producción de invertasa por *A. niger* en cultivo sumergido y en FMS con poliuretano como soporte, utilizando las cepas de *A. niger*, C28B25, N-402 y Aa20. Ellos observaron que el crecimiento es más rápido y con un nivel más elevado de biomasa en FMS comparado con la fermentación líquida; un análisis microscópico de los cubos de poliuretano mostró que el micelio se encuentra adherido al poliuretano generando espacios llenos con aire, esto sugiere que el cultivo en FMS no está limitado por la transferencia de oxígeno como en el caso de la fermentación líquida (Marsh *et al.*, 1998).

Previamente se han reportado altas producciones de enzimas en FMS sobre las obtenidas en fermentación líquida (Solís-Pereira *et al.*, 1993, Lekha y Lonsane 1994, Acuña-Argüelles *et al.*, 1995), que son atribuidas a las diferencias en la inducción y represión de síntesis de enzimas (Solís-Pereira *et al.*, 1993) o a diferencias estructurales de las enzimas (Lekha y Lonsane, 1994); sin embargo, se sugiere que la principal diferencia es la mejor producción de biomasa en ausencia de represión por glucosa en los sistemas de FMS (Romero-Gómez *et al.*, 2000).

### **2.3. Invertasa Inmovilizada**

La invertasa está catalogada dentro de las enzimas solubles de alta demanda (Huerta-Ochoa, 2004), por lo que se han usado diferentes métodos para tratar de obtener la mayor producción de esta enzima a partir de los microorganismos que comercialmente la producen. Sin embargo, se tienen desventajas ya que la enzima está en solución, lo que puede representar problemas en la purificación de los productos y generalmente la enzima no se puede recuperar, incrementando el costo

del proceso. Para tratar de evitar estos problemas se han diseñado métodos de inmovilización de enzimas para favorecer la reacción y reuso de las enzimas. Las enzimas pueden estar inmovilizadas en geles hidrofílicos como agar, agarosa, alginato, carregenina, o en matrices poliméricas semipermeables o en celulosa (Huerta-Ochoa, 2004).

Las ventajas de usar enzimas inmovilizadas son muchas y algunas tienen especial relevancia en el área de alimentos (Torres *et al.*, 2002). Sin embargo, la inmovilización de células con actividad invertasa puede ofrecer ventajas económicas comparadas con la inmovilización de invertasa soluble (Krastanov, 1997). Los materiales para inmovilizar células con actividad invertasa son diversos como poliacrilamida (Ghosh y D'Souza, 1989), polihidroxietilmetacrilato (Cantarella *et al.*, 1992), alginato (Pira *et al.*, 1991), gelatina (Parascandola *et al.*, 1993) y pectinato de calcio (Polakovic *et al.*, 1993) entre otros, sin embargo, ni uno de los métodos mencionados reúne las características catalíticas necesarias para su aplicación en procesos industriales de hidrólisis de sacarosa (Krastanov, 1997).

Se ha observado que la invertasa inmovilizada en diferentes materiales (Mansfeld *et al.*, 1992, Monsan y Combes, 1983, Prodanovic *et al.*, 2001, Krastanov 1997, Basha y Palanivelu, 2000), se puede mantener estable por periodos prolongados de tiempo a concentraciones de sacarosa y temperaturas relativamente elevadas.

## 2.4. Hidrólisis de sacarosa

Los jarabes de azúcar invertido principalmente usados en la fabricación de bebidas y en la industria de alimentos se producen por diferentes métodos. El más antiguo de estos métodos es la hidrólisis ácida a temperatura y presión elevadas (Mansfeld *et al.*, 1992). Sin embargo, el uso de esta técnica genera color indeseable en los productos además de otros inconvenientes. De esta manera se ha optado por el uso de resinas de intercambio iónico fuertemente ácidas para disminuir la intensidad del color en los productos y para mejorar de alguna manera los costos del proceso (Mansfeld *et al.*, 1992).

Moreau y col. (2000) realizaron la hidrólisis de sacarosa en medio acuoso en presencia de diferentes formas de zeolita logrando una alta selectividad para la reacción de hidrólisis, resaltando la capacidad de este método para actuar como un adsorbente específico para los colores formados durante el transcurso de la reacción, en particular el 5-hidroximetilfurfural, reduciendo la cantidad de este compuesto hasta 100 ppm en los productos.

Nasef y col. (2005) reportan la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa mediante el uso de membranas con ácido sulfónico preparadas insertando estireno en poli(tetrafluoroetileno-co-perfluorovinil eter) (PFA), usando radiación gama seguida por la sulfonación con ácido clorosulfónico. Mediante esta técnica se reportó que la actividad catalítica de las membranas es mucho mayor que las resinas de intercambio iónico comerciales y se sugiere que este método tiene potencial para desplazar el uso de ácido sulfúrico y las resinas de intercambio iónico en los procesos de hidrólisis de sacarosa, sin embargo, la actividad catalítica de las

membranas depende de la temperatura de reacción y de la concentración de grupos sulfónicos en la membrana.

Otra posibilidad para obtener los jarabes de azúcar invertido es la hidrólisis enzimática de la sacarosa. La invertasa ( $\beta$ -D-fructofuranosidasa E.C. 3.2.1.26) tiene la capacidad para hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, evitando de esta manera la formación de color en los productos y produciendo jarabes de azúcar invertido de alta calidad (Krastanov, 1997). Sin embargo el uso de invertasa soluble no es una alternativa viable en términos de costos del proceso y de estabilidad de la enzima, por lo que se ha propuesto que la inmovilización de células con invertasa intracelular puede ofrecer ventajas económicas comparadas con la invertasa soluble. Principalmente por el hecho de que las enzimas inmovilizadas pueden ser reutilizadas, por ejemplo, Tümtürk y colaboradores (2000) reportan que la invertasa inmovilizada en un dímero granular puede ser reutilizada hasta 50 veces manteniendo el 100% de la actividad inicial. Tanriseven y Doğan (2001) inmovilizando invertasa producida por *S. cerevisiae* en cápsulas de gel de alginato de calcio pueden reutilizarla 20 veces sin perder actividad. Además el uso de células inmovilizadas permite su aplicación en procesos de hidrólisis de sacarosa en continuo (Monsan y Combes, 1983).

Boudrant y Cheftel (1975) estudiaron la inmovilización de invertasa en resinas de intercambio iónico de Amberlita para su aplicación en la hidrólisis en continuo de sacarosa en un reactor tubular, las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo por 8 días con soluciones de sacarosa al 50% (p/v) a pH 4 y 30°C, logrando un porcentaje

de hidrólisis constante cercano al 76%. Sin embargo, existe deserción de la actividad enzimática del complejo invertasa-IRA 93 (resina) cuando aumenta la concentración del buffer y cuando se incrementa la temperatura, disminuyendo el porcentaje de hidrólisis.

Monsan y Combes (1983) utilizaron invertasa inmovilizada en granos de maíz para hidrolizar soluciones de sacarosa concentradas, comparando la eficiencia de conversión de la invertasa inmovilizada en un reactor de tanque agitado y en un reactor de lecho empacado, encontrando que el reactor de lecho empacado es mucho más eficiente. Para los procesos de hidrólisis utilizaron dos reactores de 0.1 y de 1 L, mostrando que no existen diferencias apreciables en la eficiencia de hidrólisis en ambos reactores, logrando el 90% de conversión en soluciones de sacarosa 2 M. En este trabajo se resalta la importancia que tienen la velocidad de flujo y la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de la sacarosa.

Los esfuerzos para diseñar sistemas con la capacidad de hidrolizar soluciones de sacarosa concentradas son notables, por ejemplo, Mansfeld y col. (1992) utilizan invertasa inmovilizada en poliestireno para la hidrólisis en continuo de sacarosa. Prodanović y col. (2001) inmovilizan la invertasa vía carbohidrato humedecido para lograr un 90% de conversión con sacarosa 2.5 M. Akgöl y col. (2001) inmovilizan la invertasa mediante microesferas magnéticas de polivinilalcohol que poseen una alta estabilidad operacional y sugieren que tienen gran potencial para su uso en procesos de hidrólisis en continuo. A pesar de las ventajas que pueden ofrecer estos sistemas, en la mayoría de los casos tienen en común el uso de preparados comerciales de la

enzima para evitar los procesos característicos de producción y purificación de la enzima y de esta manera sólo enfocarse a mejorar los procesos de inmovilización.

En este contexto parece importante explorar un sistema que evite los pasos de separación, purificación e inmovilización de enzimas, para orientarse prácticamente al proceso mismo de hidrólisis.



### **3. HIPÓTESIS**

Si la invertasa producida en un cultivo en medio sólido de *A. niger* puede autoinmovilizarse de manera estable, entonces la hidrólisis de sacarosa puede llevarse a cabo en continuo a concentraciones elevadas de sustrato y por periodos prolongados de tiempo en un reactor de lecho empacado con invertasa autoinmovilizada.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar las condiciones de operación para la hidrólisis de sacarosa en continuo por la enzima autoinmovilizada en un reactor de lecho empacado.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer el tiempo de máxima producción de invertasa por *A. niger* en cultivo en medio sólido.
2. Determinar las condiciones de reacción para el ensayo enzimático.
3. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la invertasa en función del tiempo.
4. Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la eficiencia de hidrólisis enzimática en el reactor tubular.
5. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima en el reactor tubular.
6. Establecer la concentración de sacarosa y el flujo volumétrico para caracterizar el reactor de hidrólisis enzimática.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Producción de Invertasa

#### 5.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 que pertenece a la colección del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Esta cepa se ha reportado anteriormente como productora de invertasa (Romero-Gómez *et al.*, 2000, Montiel-González *et al.*, 2002). La propagación se realizó en tubos inclinados con agar papa dextrosa (PDA) con un periodo de incubación de siete días a 30°C.

La cepa se resembró periódicamente a partir de un tubo inclinado al que se le adicionaron 5 ml de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v), el contenido del tubo se homogeneizó con un vórtex y se tomaron alícuotas de 1 ml con las que se inocularon matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de PDA estéril, los matraces fueron incubados a 30°C por siete días.

Transcurrido el tiempo de incubación se cosecharon las esporas agregando 20 ml de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v) a cada matraz, posteriormente, se homogeneizó la suspensión mediante un agitador magnético, una vez homogeneizado se tomó 1 ml de la suspensión y se realizó una dilución 1:10 con agua destilada para realizar el conteo de esporas. Las esporas se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer.

### 5.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el medio Pontecorvo (ATCC 687) con 0.05% de extracto de levadura. Para su uso en los cultivos, el medio fue concentrado 16.66 veces y luego diluido para alcanzar la concentración de sacarosa establecida. La composición del medio de cultivo concentrado se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición del medio Pontecorvo

Compuesto	g/l
NaNO <sub>3</sub>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25.33
KCl	8.67
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.67
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01
Sacarosa	500
Extracto de levadura	8.33
Metales traza	1 ml

**Tabla 2.** Composición de la solución de elementos traza

Compuesto	g/l
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	1.67
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.83
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4.17

Para preparar el medio de cultivo se disolvieron las sales (una por una) en 50 ml de agua destilada, posteriormente, el extracto de levadura y finalmente la sacarosa, se aforó a 100 ml y finalmente se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de elementos traza.

La composición de la solución de elementos traza se detalla en la Tabla 2. Para su preparación se disolvieron los elementos en 85 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 3.5 (hasta la disolución de todos los minerales) con HCl al 10% y finalmente se aforó a 100 ml.

### **5.1.3 Soporte**

Como soporte se utilizó agrolita que fue tamizada hasta lograr un tamaño de partícula de 0.8-1.19 mm, la agrolita tamizada se lavó dos veces con agua caliente y posteriormente dos veces con agua destilada fría, se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas y posteriormente, para lograr un secado completo del soporte inerte (si) se secó en una estufa a 60°C por 24 horas.

### **5.1.4 Condiciones de cultivo**

Para realizar las fermentaciones se mezclaron 100 g de agrolita seca con el medio de cultivo previamente inoculado y la cantidad de agua para alcanzar una humedad inicial del 60% (p/v) y una concentración de sacarosa de 200 mg/gsi. Con la mezcla resultante se empacó aproximadamente 10 g en cada columna. Para las fermentaciones se utilizaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud. Las columnas se colocaron en un baño a temperatura controlada a 30°C con un flujo de aire de 100 ml/min. Se tomaron muestras a las 40, 45 y 60 horas de

cultivo para cuantificar la actividad enzimática midiendo la liberación de azúcares reductores por la técnica de Miller (1960).

La producción de la materia seca fermentada para los estudios de hidrólisis enzimática se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Al finalizar la fermentación (al tiempo de mayor producción de invertasa) se aplicó a cada columna un flujo mayor de aire seco aproximadamente 800 ml/min por 24 horas, al finalizar este tiempo el contenido de las columnas se recolectó y se almacenó para su posterior caracterización y la hidrólisis en continuo de sacarosa.

## 5.2. Desactivación de la enzima

Las condiciones para detener la actividad enzimática se realizaron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a concentraciones de 0.005 a 0.5 N. Se pesaron 50 mg de msf en tubos de ensayo, se adicionó agua,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y solución de sacarosa 0.1 M, los tubos se incubaron a  $50^\circ\text{C}$  por 10 min, transcurrido el tiempo se tomó 1 ml de muestra que se filtró para su análisis por HPLC (Perkin Elmer).

Como método alternativo para detener la actividad enzimática se utilizó una suspensión de  $\text{NaOH}\cdot\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  preparada con 1.2 g de NaOH y 4.88 g de  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Se pesaron 50 mg de msf en tubos de ensayo, se adicionaron 2 ml de la suspensión y 3 ml de sacarosa 2 M, se agitaron los tubos y se tomó muestra en tubos Eppendorf, estos tubos se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm. De cada tubo se tomaron 100  $\mu\text{l}$  y se aforaron a 100 ml para tener una dilución 1:1000; posteriormente se tomó 1 ml y se adicionaron 1.5 ml de DNS para cuantificar los

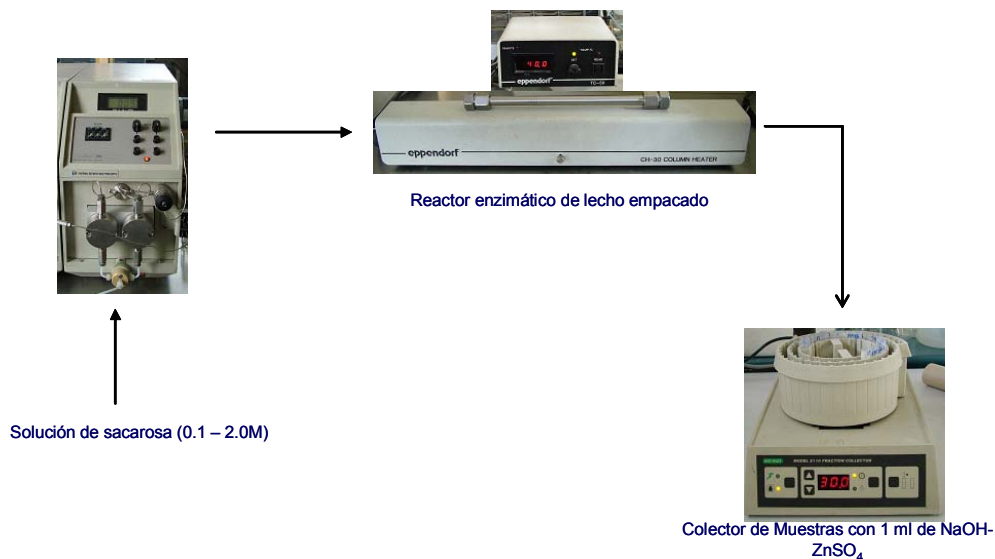
azúcares reductores liberados. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores por unidad de tiempo.

### **5.3. Caracterización de la materia seca fermentada**

Para evaluar el efecto de la temperatura, a 50 mg de msf (en tubos de ensayo) se adicionó 1 ml de sacarosa 0.1 M (a pH 7.04) y se incubó a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C) por 60 min. Cada 10 min se tomó un tubo y se agregaron 9 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.04 N para detener la reacción, se tomaron muestras que se filtraron para su análisis por HPLC (Perkin Elmer).

### **5.4. Determinación de la velocidad de hidrólisis**

Para esta determinación se utilizó un sistema de hidrólisis de sacarosa en continuo (Figura 1) que consistió en una bomba (constaMetric 3200) para alimentar las soluciones de sacarosa al reactor, un horno (Eppendorf TC-50) para controlar la temperatura del reactor, un reactor de acero inoxidable de 0.5 cm de diámetro y 25 cm de longitud empacado con la msf y un colector de muestras (Bio-Rad 2110) con tubos que contenían  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01 N para detener la reacción enzimática. Los experimentos se corrieron a flujo y temperatura constantes de 0.1 ml/min y 40°C respectivamente. Las concentraciones de sacarosa que se analizaron fueron de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 N. Los azúcares reductores liberados se cuantificaron por el método de Miller (1960). La velocidad se definió como miligramos de azúcares reductores liberados por unidad de actividad enzimática por hora (mg/Uh).



**Figura 1.** Sistema para hidrólisis en continuo de sacarosa

### 5.5. Hidrólisis de sacarosa en continuo

Se utilizó el sistema descrito en el apartado anterior con un reactor de 1 cm de diámetro y 25 cm de longitud y posteriormente, en un reactor de 3 cm de diámetro y 50 cm de longitud, con la suspensión NaOH-ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en los tubos para detener la reacción. Se estudiaron temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80°C manteniendo el flujo y la concentración de sacarosa constantes en 0.1 ml/min y 2.0 M respectivamente. El porcentaje de hidrólisis se determinó mediante los azúcares reductores liberados analizados por el método de DNS.

## 5.6 Métodos analíticos

### 5.6.1 Actividad enzimática

La actividad de invertasa se determinó en dos formas, la actividad soluble y la actividad total. Ambas actividades se cuantificaron midiendo la liberación de azúcares reductores por el método de Miller (1960). En ambos casos primero se realizó una curva estándar. La solución estándar se preparó adicionando 250 mg de glucosa y 250 mg de fructosa en 500 ml de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5. Posteriormente, se etiquetaron tubos del 1 al 7 y se les agregaron 1 ml de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5, al tubo 1 se le agregó 1 ml de la solución estándar y se agitó en vortex, de este tubo se tomó 1 ml y se adicionó al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 5, al cual después de la agitación se le extrajo 1 ml. Los tubos 6 y 7 que contenían solamente buffer de acetatos 0.1 M a pH 5 se utilizaron como blanco. Finalmente a todos los tubos se les agregó 1.5 ml de reactivo DNS.

Para cuantificar la actividad enzimática soluble se pesaron 0.5 g de msf y se adicionaron 5 ml de agua destilada, se agitó con una barra magnética por 5 minutos y se filtró a través de papel filtro Whatman 41, de esta manera se recuperó el extracto enzimático. Para cuantificar la actividad enzimática del extracto se utilizaron tubos rotulados como A y B, los tubos A se utilizaron para la reacción enzimática y los tubos B como testigos (ambos por duplicado). Primeramente, se preparó el sustrato que consistió en una solución de sacarosa 0.1 M en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5. En ambos tubos (A y B) se agregaron 0.9 ml de solución de sacarosa 0.1 M y se incubaron en un baño a temperatura controlada a 50°C, a los tubos B se les adicionaron 1.5 ml de reactivo DNS. Posteriormente, en ambos tubos se agregó 0.1



ml de extracto enzimático cada 30 segundos agitando en cada adición, después de 10 minutos de incubación para cada tubo se adicionaron 1.5 ml de reactivo DNS a los tubos A en intervalos de 1 minuto. Todos los tubos, tanto los de la curva estándar como los del ensayo enzimático se colocaron en un baño de agua a ebullición por 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en agua corriente. Finalmente, se leyó absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25 a una longitud de onda de 640 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

Para la determinación de la actividad enzimática total, se realizó una curva estándar con el procedimiento descrito anteriormente, posteriormente, se pesaron 50 mg de msf en tubos, se adicionaron 4.5 ml de solución de sacarosa 0.1 M (sustrato) en buffer de acetatos y 0.5 ml de agua destilada. Los tubos se incubaron en un baño a temperatura controlada a 50 °C por 10 minutos, los tubos se agitaron en vórtex cada 2 minutos, al término de los 10 minutos se tomó 1 ml de cada tubo y se pasó a otro tubo, se le adicionaron 1.5 ml de reactivo DNS. Los tubos de la curva estándar y los tubos del ensayo enzimático se colocaron en un baño a ebullición por 15 minutos, posteriormente, se dejaron enfriar en agua corriente para finalmente leer absorbancia como se describe anteriormente.

### 5.6.2 Análisis de azúcares

La concentración de azúcares reductores liberados se cuantificaron en la etapa de inactivación de la enzima y caracterización del polvo por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se utilizó una columna Phenomenex REZEX para ácidos orgánicos, con una longitud de 300 mm, un diámetro interno de 7.8 mm y un tamaño de partícula de 8  $\mu$ m. La temperatura de operación fue de 35°C, se utilizó como fase móvil ácido sulfúrico 5 mN filtrada y desgasificada, con un flujo de 0.6 ml/min. Los compuestos se analizaron mediante un detector de índice de refracción Perkin Elmer LC-30. Se utilizaron soluciones estándar de glucosa, fructosa y sacarosa a una concentración de 1 g/L.

Durante la determinación de la velocidad de hidrólisis y de hidrólisis en continuo la liberación de azúcares reductores se cuantificó por el método de DNS (Miller, *et al.*, 1960). De igual manera que en determinaciones anteriores se realizó una curva estándar, en esta etapa fue necesario hacer diluciones 1:1000; de estas diluciones se tomó 1 ml en tubos y se adicionaron 1.5 ml de reactivo DNS, los tubos se colocaron en un baño a ebullición por 15 minutos, posteriormente se dejaron enfriar en agua corriente y finalmente se leyó absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda25.

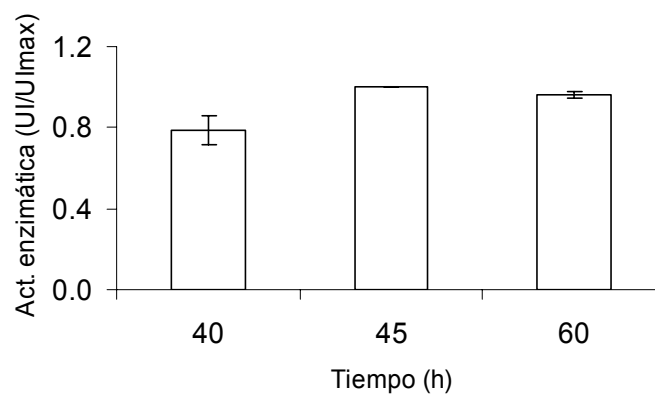
---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Producción de invertasa

Debido a las características del proyecto en la primera etapa se realizó la producción de la enzima mediante fermentación en medio sólido (FMS) utilizando agrolita como soporte inerte. Las fermentaciones se llevaron a cabo en columnas de vidrio por triplicado. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de fermentación (40, 45 y 60 horas) para evaluar la actividad enzimática y de esta manera determinar el tiempo de mayor producción de invertasa. La actividad enzimática se cuantificó mediante la liberación de azúcares reductores durante 10 minutos a 50°C. Se observó que la actividad enzimática aumentó al incrementar el tiempo de cultivo hasta alcanzar su mayor valor a las 45 horas con una actividad de 82.22 U/gmsf, después de este tiempo se observó una ligera disminución de la actividad enzimática (Figura 2). Muchos de los trabajos sobre producción de invertasa utilizan levaduras (Belcarz y col. 2002, Workman y Day, 1983) debido a que estos microorganismos son la fuente principal de esta enzima a escala comercial (Vargas y col. 2004) además de que la producción de invertasa se logra en tiempos menores, por ejemplo Costaglioli y col. en (1997) utilizando *Schwanniomyces occidentales* en un medio de cultivo suplementado con glucosa del 2-0.05% y rafinosa del 0.05-2% lograron la mayor actividad de invertasa a las 15 horas de cultivo. Con *Phaffia rhodozyma* en un medio de cultivo con sacarosa como inductor la producción de invertasa ocurre entre las 24 y 26 horas de cultivo (Persike *et al.*, 2002). Los hongos filamentosos son otra fuente para la producción de invertasa, sin embargo, los tiempos de cultivo generalmente

son mayores a los reportados para levaduras. En cepas de *A. fumigatus* se reportó la mayor actividad intracelular y extracelular después de 96 horas de cultivo (Fiedurek, *et al.*, 2000). Mukherjee y col. (2002) reportaron la producción de invertasa por *Termomitozyces clypeatus* cuando el hongo fue cultivado por 5 días en un medio sintético con 1.0% de sacarosa. Santana y col. (2005) reportaron la producción de invertasa por el hongo *Cladosporium cladosporioides* cultivado en medio semisintético después de 20 días de cultivo. En los casos anteriores la mayor producción de invertasa se logró en tiempos hasta 10 veces mayores a los reportados en este trabajo para el hongo filamentoso *A. niger* C28B25.



**Figura 2.** Producción de invertasa por *A. niger* en FMS a diferentes tiempos.

## 6.2. Producción de la enzima autoinmovilizada.

Una vez que se determinó el tiempo de mayor actividad de invertasa, el siguiente paso fue la producción de la materia seca fermentada (msf), para este proceso se realizaron fermentaciones bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1, al cabo de las 45 horas se pasó un flujo de aire seco por 24 horas para deshidratar el contenido de las columnas, el material deshidratado se colectó y se almacenó en refrigeración, de esta manera se obtiene la materia seca fermentada con una humedad de 1.7% (Figura 3).



**Figura 3.** Materia seca fermentada (msf)

El siguiente paso fue determinar la actividad enzimática en la materia seca fermentada, debido a que la invertasa se encuentra una parte ligada a la biomasa y otra parte libre, se cuantificó la actividad invertasa en ambas fracciones (Sección

5.6.1). Se obtuvo una actividad enzimática promedio total de 82.22 U/gmsf y una actividad de la enzima libre de 41.61 U/gmsf, estos resultados corresponden con lo reportado por Vargas y col. (2004) que sugieren que la invertasa producida por *A. niger* es del 40-60% intracelular.

Una de las principales desventajas de la inmovilización de enzimas es la disminución o pérdida de la actividad enzimática (Bayramoğlu *et al.*, 2003), D'Souza y Godbole (2002) inmovilizaron invertasa en cáscara de arroz usando polietilimina manteniendo una actividad de 2557 U/g. Gómez y col. (2005) inmovilizaron invertasa en quitina como soporte mediante la formación de un complejo de polielectrolitos, manteniendo una actividad de 1840 U/g. En estos estudios el objetivo principal es desarrollar un método de inmovilización con posibles aplicaciones y se observa que la actividad que logran mantener es hasta 30 veces mayor a la alcanzada en este proyecto, debido tal vez al uso de enzimas comerciales con una actividad muy elevada.

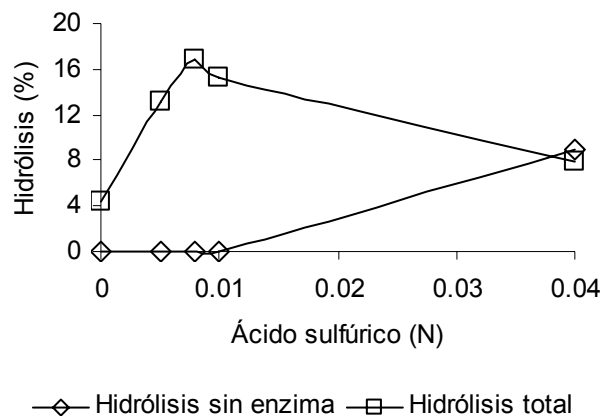
En los procesos de inmovilización de invertasa con aplicación en hidrólisis de sacarosa en continuo las actividades reportadas son hasta 67 veces más elevadas que la del presente trabajo, por ejemplo Monsan y Combes (1982) inmovilizaron invertasa con una actividad de 2300 U/g en granos de maíz para la hidrólisis en continuo de soluciones de sacarosa concentradas, posteriormente Mansfeld y col. (1992) utilizaron poliestireno para inmovilizar invertasa con una actividad de 1000 U/g para la hidrólisis en continuo de sacarosa y más recientemente Prodanović y col. (2001) realizaron la inmovilización de invertasa en un nuevo tipo de glicidil-metacrilato macroporoso manteniendo una actividad de 5500 U/g.

Estos reportes tienen en común el uso de enzimas comerciales con actividades elevadas para evitar la producción y el paso subsiguiente de purificación de la enzima, enfocándose principalmente en el método de inmovilización. Estos pasos (purificación e inmovilización de la enzima) pueden ser evitados mediante el uso como catalizador de la invertasa autoinmovilizada producida por *A. niger* en fermentación en medio sólido, con el que es posible hidrolizar soluciones de sacarosa concentradas (2 M) por periodos de más de 70 horas.

### **6.3 Desactivación de la enzima.**

Con el objetivo de evaluar la actividad enzimática en el reactor, a través del análisis de grupos reductores liberados por acción de la enzima, es necesario detener la actividad enzimática a la salida del reactor; para ello se utilizaron 2 métodos, desactivación por pH y desactivación con sulfato de zinc en solución alcalina, los resultados obtenidos se presentan a continuación:

En la Figura 4 se presentan los resultados del efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la hidrólisis de sacarosa en presencia y en ausencia de enzima.

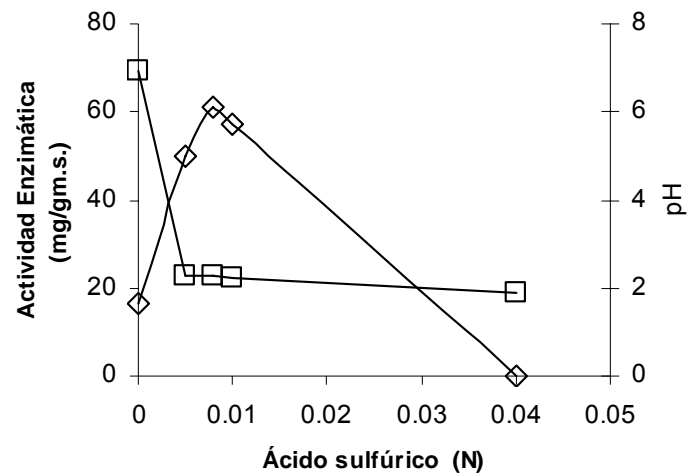


**Figura 4.** Efecto de la concentración de  $H_2SO_4$  sobre la hidrólisis de sacarosa.

Sin enzima en el sistema ( $\diamond$ ) y en presencia de enzima ( $\square$ ).

En ausencia de enzima la hidrólisis de sacarosa tiene lugar con concentraciones de ácido sulfúrico mayores a 0.01 N. En el rango de concentración de ácido sulfúrico de 0 a 0.01 N la hidrólisis de sacarosa es debida únicamente a la actividad invertasa. Para concentraciones de ácido sulfúrico mayores a 0.01 N la hidrólisis de sacarosa en presencia de enzima disminuye debido a la inactivación de la enzima. En la Figura 5 se presenta el efecto del ácido sulfúrico sobre la actividad enzimática y el pH de la mezcla de reacción.

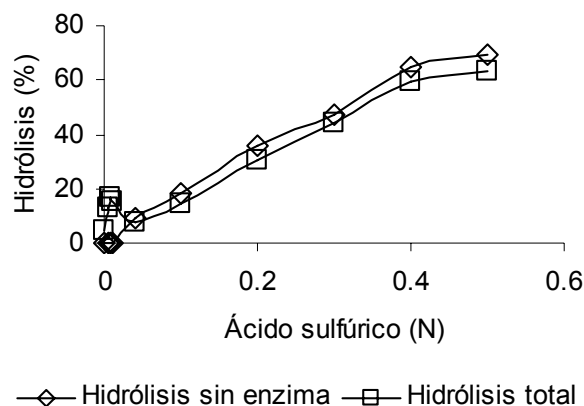




**Figura 5.** Efecto de la concentración de  $H_2SO_4$  sobre la actividad enzimática.

Actividad enzimática (◇), pH (□).

La mayor actividad enzimática se obtuvo con una concentración de ácido sulfúrico de 0.01 N; que corresponde a un valor de pH de 2. Se observó que a concentraciones bajas (0.005 N) de  $H_2SO_4$  con un pH de 2.30 no hay hidrólisis de sacarosa (0.1 N) debida al ácido pero aun se detecta actividad enzimática, a pesar de encontrarse a un pH menor al reportado para la actividad de esta enzima (Núñez, 2004). Sin embargo, al incrementar la concentración de  $H_2SO_4$  la actividad de invertasa disminuye hasta llegar a un punto en que la actividad enzimática prácticamente desaparece cuando la concentración de ácido es de 0.04 N con un pH de 1.89. Para concentraciones de ácido sulfúrico mayores a 0.05 N la hidrólisis de sacarosa es debida únicamente a las condiciones ácidas de reacción (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de la concentración de  $H_2SO_4$  sobre la hidrólisis de sacarosa

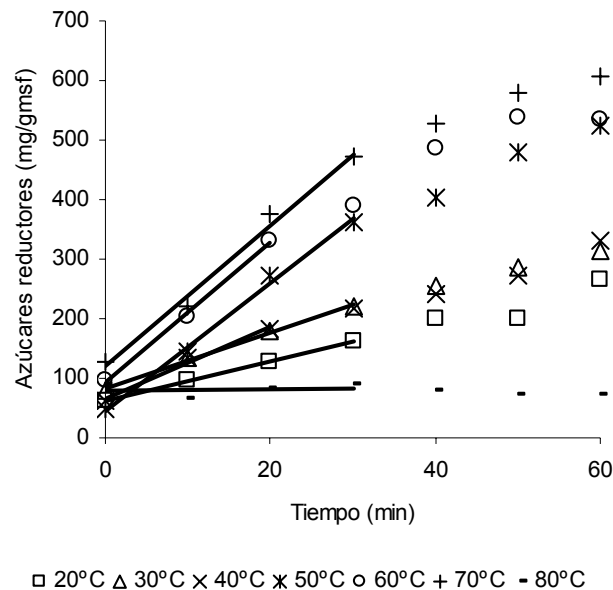
Sin enzima en el sistema ( $\diamond$ ) y en presencia de enzima ( $\square$ ).

Por lo anterior, para detener la reacción enzimática a la salida del reactor se seleccionó la hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  0.04 N. Estas condiciones fueron utilizadas para los estudios del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática en continuo con una concentración de sacarosa 0.1 N. Sin embargo, al realizar los estudios sobre el efecto de la concentración inicial de sacarosa en el reactor en continuo se observó que con concentraciones de sacarosa superiores a 1.0 M la actividad enzimática a la salida del reactor no se detenía, debido a una mayor estabilidad de la enzima en el medio más viscoso. Por lo anterior, para los estudios de hidrólisis con altas concentraciones de sacarosa, se utilizó el método de desactivación con una solución alcalina de sulfato de zinc (Almeida y Vitolo, 1984).

#### **6.4. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de sacarosa**

Muchas reacciones químicas transcurren a una velocidad mayor si la temperatura aumenta, las reacciones catalizadas enzimáticamente se comportan análogamente hasta cierto punto (Segel, 1982). Las enzimas son moléculas proteicas complejas, su actividad catalítica se debe a una estructura terciaria altamente ordenada y exacta. La estructura terciaria de una enzima se conserva en primer lugar por un gran número de enlaces débiles no covalentes, es decir, una enzima es una estructura frágil y muy delicada. Si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura terciaria se rompe y la enzima se desnaturaliza, o sea, pierde su actividad catalítica. Así al aumentar la temperatura, el aumento esperado en la velocidad de reacción es anulado por el aumento en la velocidad de desnaturalización (Segel, 1982).

Las temperaturas analizadas fueron de 20 a 80°C con un tiempo de incubación de 60 minutos. Los experimentos se llevaron a cabo en tubos de ensayo, que contenían msf y sustrato (sacarosa), transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada tubo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N para detener la reacción. Se observó que la velocidad inicial de hidrólisis de sacarosa aumenta cuando se incrementa la temperatura hasta alcanzar la mayor velocidad inicial de hidrólisis a 70°C disminuyendo drásticamente a temperaturas mayores (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de hidrólisis de sacarosa en tubos de ensayo. Las temperaturas estudiadas fueron 20 (□), 30 (Δ), 40 (x), 50 (✱), 60 (○), 70 (+) y 80°C (-).

El intervalo de temperaturas en donde se detecta actividad es similar al reportado para *C. utilis* que muestra tolerancia a cambios de temperatura de 30 a 90°C alcanzando su máxima actividad a 70°C (de la Vega, *et al.*, 1991, Belcarz, *et al.*, 2002, Workman y Day, 1983). La temperatura de mayor velocidad alcanzada en este proyecto es mayor a la reportada para la invertasa producida por hongos filamentosos como *A. niger* para el que se ha reportado la máxima actividad a 60°C (Shiomi y Onodera, 1988, Rubio y Maldonado, 1995), similarmente a 55°C para la invertasa producida por *A. niger* AS0023 (L'Hocine y col. 2000) y finalmente 60°C para la invertasa producida con la misma cepa utilizando PUF como soporte inerte (Núñez, 2004). Trabajar con invertasa a temperaturas relativamente elevadas puede ser conveniente debido a que en los procesos de hidrólisis de sacarosa un requisito

indispensable es trabajar a temperaturas de 60 a 70°C para reducir la viscosidad de las soluciones y disminuir el riesgo de contaminación principalmente (Krastanov, 1997).

Posteriormente, con las velocidades obtenidas, se calculó la energía de activación para la invertasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS con agrolita como soporte inerte, mediante la ecuación de Arrhenius (Tabla 3) obteniéndose un valor de 7.07 Kcal/mol que es menor al reportado para la invertasa producida por *A. niger* en cultivo líquido (9.13 Kcal/mol) (Rubio y Maldonado, 1995), sin embargo, es mayor a la reportada para la invertasa producida por la misma cepa en FMS con PUF como soporte inerte (5.6 Kcal/mol) (Núñez, 2004). Posteriormente se calculó el  $Q_{10}$  con un valor de 1.37, lo que sugiere que la velocidad de reacción se incrementa aproximadamente 37% al aumentar la temperatura 10°C. Este valor es menor al reportado para la hidrólisis de lactosa mediante la  $\beta$ -galactosidasa que es de 1.85. El valor calculado de  $E_a$  y el leve incremento en la velocidad de reacción al aumentar la temperatura 10°C ( $Q_{10}$ ) pueden estar asociados a problemas de transferencia de masa (Sección 6.6). Pues este valor corresponde a los valores típicos de  $E_a$  para procesos difusivos (6-7 Kcal/mol) en los que se sospecha de limitaciones de difusión en el proceso (Wang, *et al.*, 1979).

**Tabla 3.** Velocidad inicial de hidrólisis a diferentes temperaturas y energía de activación

Temperatura (°C)	Velocidad (mg/gmsfmin)
20	3.31
30	4.71
40	6.03
50	10.78
60	11.76
<b>70</b>	<b>11.85</b>
80	0.174
Ea (Kcal/mol)	
7.07	
Q <sub>10</sub>	
1.37	

### 6.5. Hidrólisis en continuo con diferentes concentraciones de sacarosa

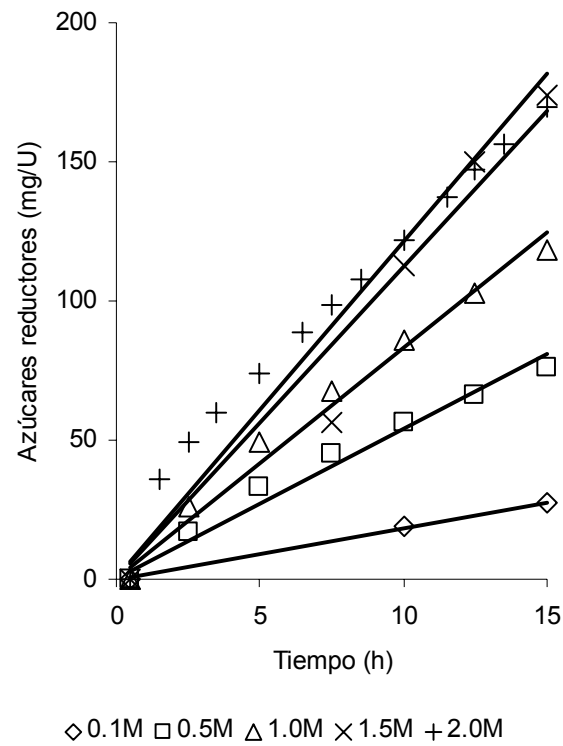
Una vez que se determinó cómo detener la actividad enzimática (Sección 6.3) y la temperatura a la que se alcanza la mayor velocidad inicial de hidrólisis (Sección 6.4), el siguiente paso fue realizar los estudios de hidrólisis de sacarosa en continuo, para lo que se utilizó el sistema descrito en la sección de Métodos y Materiales 5.4.

Una propiedad que deben poseer los sistemas de hidrólisis de sacarosa es la capacidad para hidrolizar soluciones de sacarosa concentradas (70% p/p) (Prodanovic y col. 2001). Se ha observado que la invertasa libre no posee esta

capacidad ya que alcanza su mayor actividad a concentraciones de sacarosa de 50 g/l que disminuye al aumentar la concentración de sacarosa (L'Hocine, *et al.*, 2000).

Es por esta razón que se decidió primero evaluar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad inicial de hidrólisis en el reactor enzimático de lecho empacado.

Se utilizó un reactor con una capacidad de operación de 5 ml, manteniendo la temperatura constante en 40°C, el flujo en 0.1 ml/min y se estudiaron concentraciones de sacarosa de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 M. Se observó que la velocidad inicial de hidrólisis aumentó al incrementar la concentración de sacarosa hasta alcanzar el máximo valor a concentraciones de sacarosa de 2 M (Figura 8), con las concentraciones de sacarosa estudiadas no se presentó disminución en la velocidad inicial de hidrólisis lo que puede sugerir que en este sistema no existen procesos de inhibición enzimática (Tabla 4).



**Figura 8.** Efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad inicial de hidrólisis en un reactor de lecho empacado de 5 cm<sup>3</sup> alimentado con diferentes concentraciones de sacarosa. 0.1 (◇), 0.5 (□), 1.0 (△), 1.5 (×) y 2.0 M (+).

**Tabla 4.** Velocidad inicial de hidrólisis a diferentes concentraciones de sacarosa

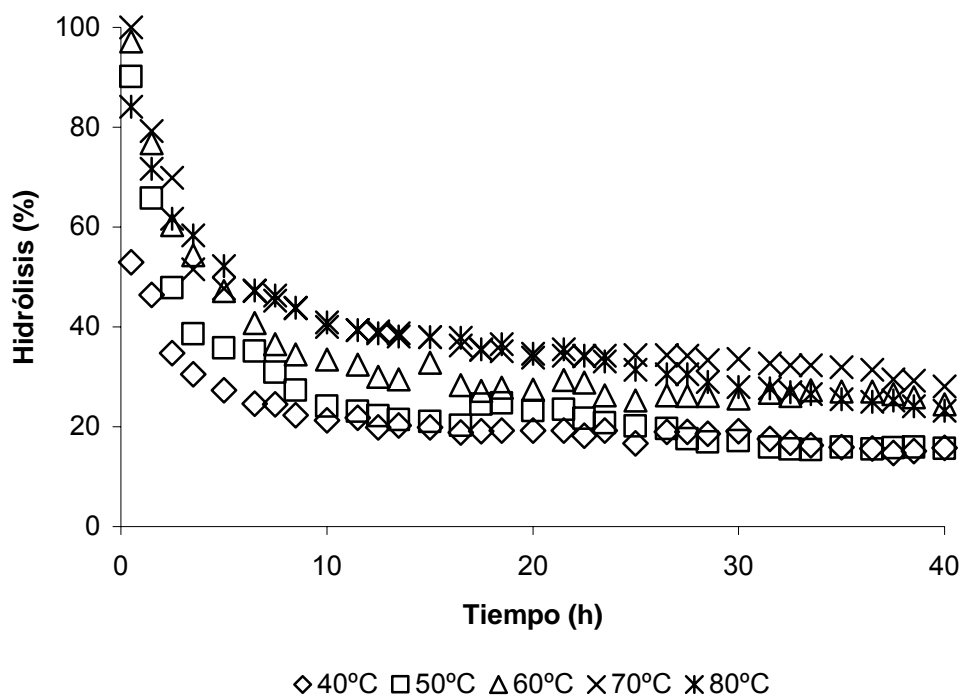
Concentración (M)	Velocidad (mg/Uh)
0.1	1.85
0.5	5.42
1.0	8.33
1.5	11.21
<b>2.0</b>	<b>12.13</b>



## 6.6. Hidrólisis en continuo a diferentes temperaturas

Para que un proceso de hidrólisis de sacarosa sea atractivo a escala industrial debe cumplir con algunos requisitos, entre los que destacan su capacidad para hidrolizar soluciones de sacarosa concentradas (70% p/p), además las enzimas deben permanecer estables por periodos prolongados de tiempo a temperaturas entre 60-70°C y finalmente el proceso de inmovilización si es el caso debe ser sencillo y económico (Prodanovic y col. 2001, Krastanov, 1997). El uso de invertasa inmovilizada o células con actividad invertasa inmovilizadas permiten su aplicación en procesos de hidrólisis de sacarosa en continuo en reactores de lecho empacado. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de sacarosa en continuo se utilizó un reactor de 20 mL de capacidad operando a un flujo de 0.1 mL/min de una solución de sacarosa 2 M con un tiempo de retención de 3.3 horas.

Se observó que a temperaturas de 40 y 50°C el porcentaje de hidrólisis fue muy similar de aproximadamente el 15 %, mientras que al aumentar la temperatura a 60, 70 y 80°C el porcentaje de hidrólisis se mantiene constante en aproximadamente 25% para los tres casos durante 40 horas (Figura 9). Estas temperaturas son similares a las utilizadas para la hidrólisis en continuo de sacarosa con levaduras inmovilizadas en lana, en donde utilizan temperaturas entre 40 y 70°C encontrando la mayor conversión de sacarosa a 70°C en un reactor con dimensiones similares (diámetro 1.2 cm, longitud 220 cm) y con un flujo de 3-4 ml/min con un porcentaje de hidrólisis constante a no menos del 50% durante 60 días (Krastanov, 1997).

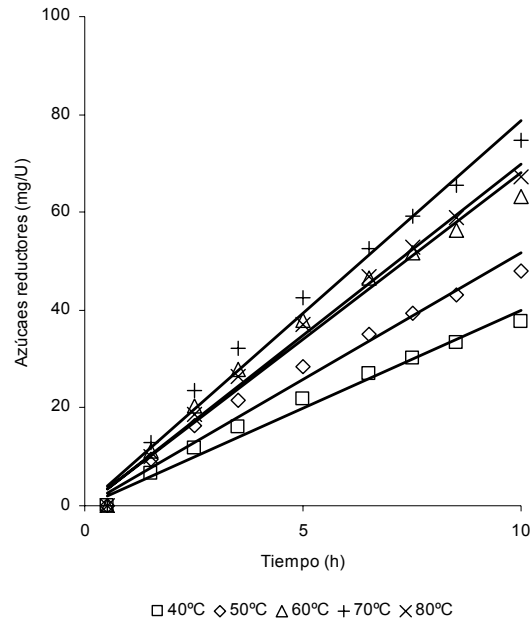


**Figura 9.** Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de hidrólisis en continuo. Se estudiaron temperaturas de 40 (◇), 50 (□), 60 (Δ), 70 (x) y 80°C (✱).

Para las invertasas inmovilizadas la temperatura de mayor conversión de sacarosa se encuentra dentro del intervalo de 40 a 70°C, tal es el caso para la invertasa inmovilizada en poliestireno para la hidrólisis en continuo de sacarosa con reactores de mayor volumen (0.3 y 50 L), en este caso la temperatura que se utilizó fue de 40°C para garantizar la mayor conversión de sacarosa y la estabilidad operacional (Mansfeld *et al.*, 1992). Para la enzima inmovilizada de *Cladosporium cladosporioides* (Santana *et al.*, 2005) la temperatura de mayor conversión de sacarosa es similar a la reportada para este trabajo (70°C), sin embargo, la concentración de sacarosa y el tiempo que se mantiene estable la enzima son

menores que los encontrados para la enzima autoinmovilizada en *A. niger* (5% y 3 horas respectivamente). En *A. niger* la invertasa puede ser intra y extracelular de esta forma en el reactor existe enzima libre y enzima autoinmovilizada, es por esta razón que el porcentaje de hidrólisis disminuye en las primeras horas debido al lavado de la fracción soluble (extracelular) y después de este tiempo se mantiene constante por la presencia de la enzima autoinmovilizada (Figura 9).

Posteriormente, se calcularon las velocidades iniciales de hidrólisis para las temperaturas analizadas, se observó un aumento en la velocidad inicial de hidrólisis al incrementarse la temperatura hasta alcanzar el máximo valor a 70°C, sin embargo, al aumentar la temperatura hasta 80°C la velocidad inicial de hidrólisis disminuye ligeramente (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de hidrólisis en el reactor enzimático de lecho empacado. Las temperaturas estudiadas fueron 40 (◇), 50 (□), 60 (△), 70 (+) y 80°C (x).

Se calculó la energía de activación que resultó de 4.89 Kcal/mol (Tabla 5) que es menor al reportado para la invertasa producida por *A. niger* en cultivo líquido (9.13 Kcal/mol) (Rubio y Maldonado, 1995), menor a la reportada para la invertasa producida por la misma cepa en FMS con PUF como soporte inerte (5.6 Kcal/mol) (Núñez, 2004) y menor a la obtenida para esta misma enzima en el análisis en tubos de ensayo (7.07 Kcal/mol). El factor  $Q_{10}$  que indica cuánto aumenta la velocidad al incrementar la temperatura 10°C también fue calculado, el valor obtenido (Tabla 5) sugiere que la velocidad sólo aumenta aproximadamente el 25% que es un incremento pequeño comparado con el valor de  $Q_{10}$  calculado para la hidrólisis de lactosa mediante  $\beta$ -galactosidasa que es de 1.85 en donde la velocidad prácticamente se duplica (Segel, 1982). La viscosidad de la solución de sacarosa 2 M puede ocasionar problemas de transferencia de masa en el sistema y puede ser debido a esto la reducción en los valores de  $E_a$  y  $Q_{10}$ .

**Tabla 5.** Velocidad inicial de hidrólisis en el reactor de lecho empacado a diferentes temperaturas,

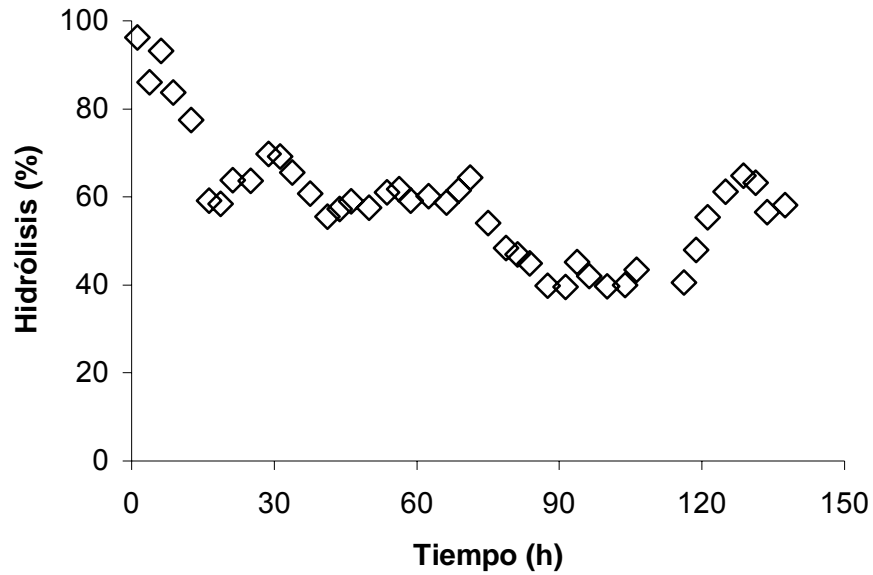
Energía de activación ( $E_a$ ) y $Q_{10}$	
Temperatura (°C)	Velocidad (mg/Uh)
40	4.01
50	5.18
60	6.81
70	7.88
80	6.99
$E_a$ (Kcal/mol)	
4.89	

---

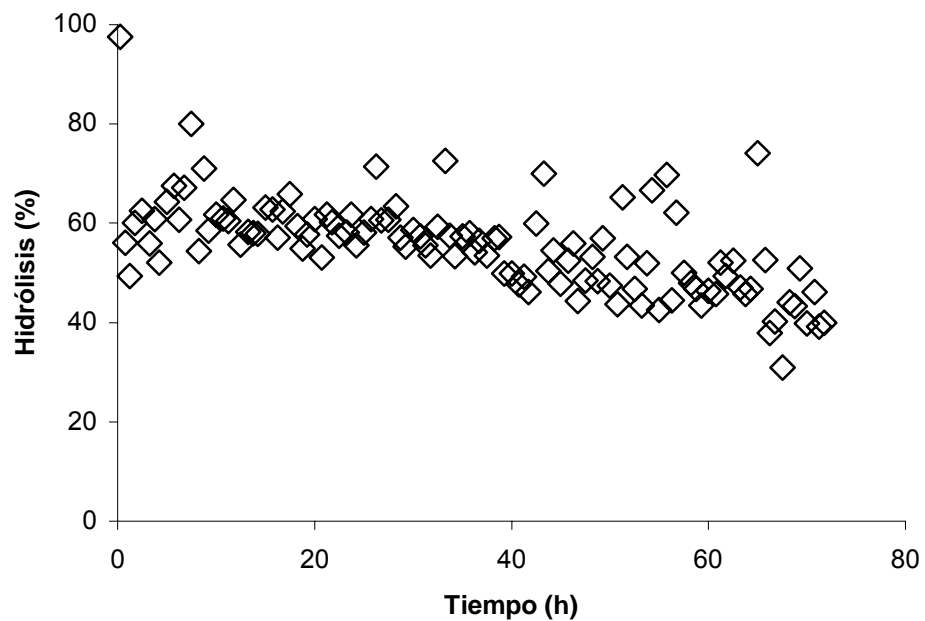
 $Q_{10}$ 1.24

---

Con los resultados anteriores se seleccionó la temperatura de 60°C manteniendo la concentración de sacarosa constante en 2.0 M para evaluar el efecto de la velocidad de flujo sobre el porcentaje de hidrólisis, primero se evaluó la columna de 20 ml con 4.48 g de msf a un flujo de 0.02 ml/min, se observó que al inicio del experimento se alcanzan porcentajes de hidrólisis prácticamente del 100% (Figura 11). Sin embargo, al transcurrir el tiempo el porcentaje de hidrólisis disminuye posiblemente debido al lavado de la fracción soluble de invertasa presente en el reactor, posteriormente el porcentaje de hidrólisis se mantuvo en promedio en 58.95% durante 140 horas de ensayo. Se observaron fluctuaciones en el porcentaje de hidrólisis provocadas posiblemente por las variaciones en el flujo ya que la bomba utilizada en este experimento mostró dificultades para mantener constante un flujo tan pequeño (0.02 ml/min), por lo que se decidió emplear una columna de 200 ml con 51.1 g de msf con un flujo de 0.2 ml/min, de esta manera se observó un comportamiento similar con un porcentaje de hidrólisis inicial del 100% que disminuye al transcurrir el tiempo, hasta alcanzar en promedio un 55.44% de hidrólisis de sacarosa por un periodo de 75 horas (Figura 12), se observó que al aumentar el volumen del reactor el porcentaje de hidrólisis no se ve afectado. Sin embargo, después de las 70 horas este porcentaje empieza a disminuir, debido tal vez a la inactivación térmica que sufre la enzima o al lavado de la fracción soluble que puede ser importante, similar a lo reportado por Mansfeld y col. (1992).



**Figura 11.** Hidrólisis de sacarosa en un reactor de 20 cm<sup>3</sup> operando a 60°C con sacarosa 2 M.



**Figura 12.** Hidrólisis de sacarosa en un reactor de 200 cm<sup>3</sup>, operando a 60°C con sacarosa 2 M.

Los sistemas de células inmovilizadas con actividad invertasa para la hidrólisis de sacarosa pueden ofrecer ventajas económicas sobre los sistemas con enzimas libres, además se pueden alcanzar porcentajes de hidrólisis elevados como los reportados para la enzima autoinmovilizada en *Cladosporium cladosporioides* que alcanza un porcentaje del 94.17% a 70°C (Santana *et al.*, 2005), mayor que el reportado para la enzima autoinmovilizada en *A. niger* C28B25, sin embargo, la concentración de sacarosa que utilizan y el tiempo que la enzima permanece estable son mucho menores (sacarosa al 5% y 3 horas respectivamente). Bajo condiciones similares a las utilizadas en este trabajo se estudió la hidrólisis de sacarosa en continuo con levaduras inmovilizadas en lana (Krastanov, 1997) logrando un porcentaje de hidrólisis de sacarosa 2.0 M no menor del 50% a 70°C con flujos de 3-4 ml/min con un tiempo de retención de 9 minutos aproximadamente manteniéndose estable por un periodo de 30 días después de los cuales este porcentaje disminuye. Con invertasa inmovilizada en poliestireno (Mansfeld *et al.*, 1992) se logró hidrolizar soluciones de sacarosa hasta 2.5 M, con un porcentaje de conversión del 80% y un periodo de estabilidad de 360 días, la diferencia entre estos resultados y los datos obtenidos en este proyecto pueden ser debidos a las diferencias en los volúmenes de los reactores utilizados (0.3 y 50 L), la cantidad de invertasa inmovilizada empacada en el reactor (90 g) y a la actividad de la invertasa inmovilizada (1000 U/g).

El bajo nivel de hidrólisis es debido, por una parte, al lavado de la enzima extracelular; sin embargo, también puede ser debido a problemas difusionales ocasionados por la elevada viscosidad de la solución, así como al régimen de flujo.

El número de reacción Damköhler (Da) permite estudiar el efecto de la transferencia de masa en procesos con reacción y difusión simultánea, como es el caso del objeto de estudio de esta tesis (Chen y Wang, 1997).

El número de reacción Damköhler (Da) se define como la relación de la máxima velocidad de reacción ( $V_{\max}$ ) sobre la máxima velocidad transferencia de masa, que corresponde al coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ) multiplicado por la concentración de sustrato ( $S_b$ ) y el área superficial de las partículas ( $a$ ) (Chen y Wang, 1997):

$$Da = \frac{V_{\max}}{K_L a S_b}$$

Ecuación 1.

Si el número  $Da \ll 1$  la velocidad de transferencia de masa es mucho mayor que la velocidad de reacción y no existen problemas de transferencia de masa, el paso limitante es la reacción. Cuando  $Da \gg 1$  la velocidad de reacción es mucho mayor que la velocidad de transferencia de masa, lo que significa que existe una gran limitación debido a la transferencia de masa.

El número Da se calculó a 60°C con la solución de sacarosa 2 M la cual tiene una viscosidad de 38.5 cP y los flujos utilizados en ambos reactores (0.02 y 0.2 ml/min). Como  $V_{\max}$  se consideró la velocidad inicial de hidrólisis en el reactor de 20 cm<sup>3</sup> (1111.9 mg/h). Sin embargo, el cálculo del número Da involucra el coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ), este coeficiente se determinó usando la definición del



número de Sherwood (Ecuación 2) que relaciona el coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ), la longitud característica del reactor ( $L$ ) y la difusividad molecular del soluto ( $D_{AB}$ ) (Chen y Wang, 1997).

$$Sh = \frac{K_L L}{D_{AB}}$$

Ecuación 2.

La difusividad molecular del soluto ( $D_{AB}$ ) es una característica que depende de la temperatura y de la viscosidad del fluido además de otros factores. Se utilizó la ecuación propuesta por Chen y Wang (1997) (Ecuación 3) para determinar la difusividad.

$$D_{AB} = \frac{7.4 \times 10^{-8} (O_B M_B)^{1/2} T}{n_B V_A^{0.6}}$$

Ecuación 3.

En donde  $O_B$  es un factor de asociación para el agua,  $M_B$  es el peso molecular del agua (g/mol),  $T$  es la temperatura (K),  $n_B$  es la viscosidad del solvente (cP) y  $V_A$  es el volumen molar del soluto ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ ). Una vez considerando las condiciones anteriores el número  $Da$  calculado para el sistema resultó mucho mayor que la unidad (336), lo que nos sugiere que el proceso de hidrólisis puede estar limitado por la transferencia

del sustrato al sitio activo de la enzima, evitando de esta manera alcanzar porcentajes de hidrólisis superiores.

Utilizando las Ecuaciones 1, 2 y 3 se realizó una simulación para observar como cambian los diferentes factores como la viscosidad, la densidad, el  $K_L$ , la difusividad y el número  $Da$ , en función de dos variables que son relevantes en este proyecto, que son la temperatura y la concentración de sacarosa.

Para realizar la simulación se trabajó con temperaturas de 10 a 70°C y concentraciones de sacarosa de 10 a 70%. Dado que las variables que nos interesan son función de ambos factores (temperatura y concentración de sacarosa) se decidió mantener la temperatura constante y variar la concentración de sacarosa de 10 a 70% con incrementos de 2.5%. De esta manera se tiene la viscosidad, densidad,  $K_L$ , difusividad y  $Da$  para cada concentración de sacarosa a una temperatura dada. Los datos de viscosidad y densidad se obtuvieron de la página <http://www.univ-reims.fr> esta página permite calcular la viscosidad y densidad administrando datos de temperatura y concentración de sacarosa.

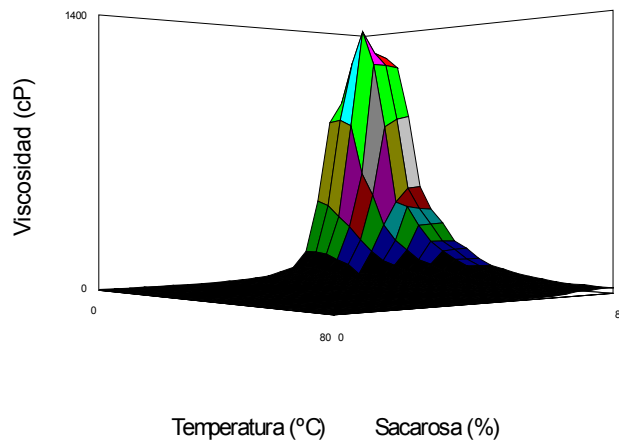


Figura 13. Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la viscosidad.

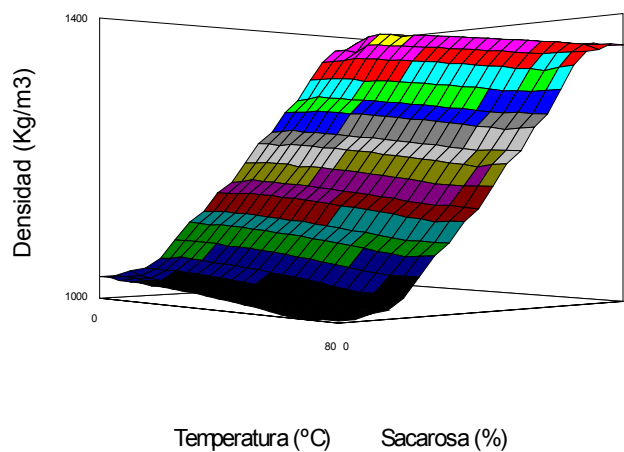


Figura 14. Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la densidad.

Concentraciones elevadas de sacarosa tienen un marcado efecto aumentando la viscosidad sobre todo a temperaturas bajas, al aumentar la temperatura la viscosidad disminuye, sin embargo, a concentraciones altas de sacarosa se observa que la viscosidad es elevada, aun incrementando la temperatura (Figura 13). La densidad

se incrementa principalmente al aumentar la concentración de sacarosa ya que al disminuir la temperatura no se observa un cambio importante en la densidad (Figura 14).

Con los datos de viscosidad obtenidos se calculó la difusividad molecular del soluto mediante la ecuación 3, con temperaturas de 10 a 70°C y la viscosidad correspondiente a soluciones de sacarosa de 10 a 70%. Posteriormente se calculó el  $K_L$  mediante la ecuación 2, para esto fue necesario calcular el número de Sherwood para las diferentes condiciones, los datos fueron obtenidos de la página <http://rpaulsing.com> reportando en todos los casos valores de 2.0 a 2.2.

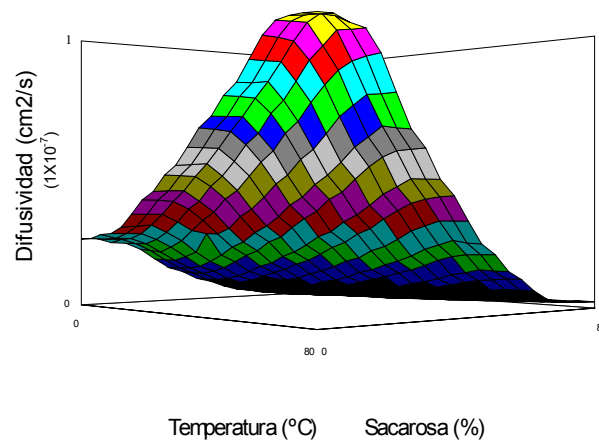


Figura 15. Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre la difusividad.

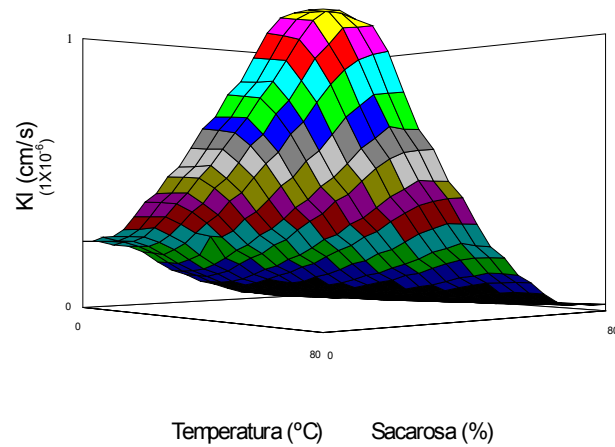


Figura 16. Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre el coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ).

La difusividad molecular ( $D_{AB}$ ) y el coeficiente de transferencia de masa ( $K_L$ ) tienen un comportamiento similar ya que ambos se favorecen a temperaturas elevadas cuando la concentración de sacarosa es baja (Figura 15 y 16).

Finalmente con los parámetros necesarios se calculó el número de Damköhler ( $Da$ ) mediante la ecuación 1.

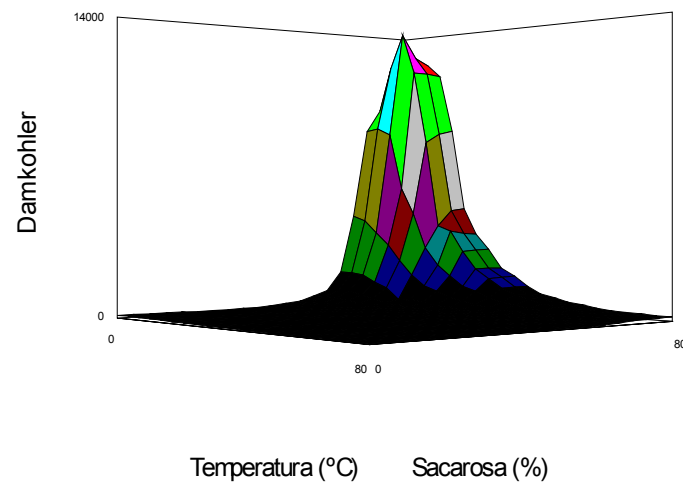


Figura 17. Efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa sobre el número de Damköhler (Da).

El número  $Da$  relaciona la velocidad de reacción con la velocidad de difusión, dados  $Da$  mayores que la unidad los problemas de transferencia de masa limitan el proceso, para el caso de esta simulación los números  $Da$  calculados fueron en todos los casos mayores a la unidad, encontrando valores mayores a 13000 cuando la concentración de sacarosa es del 70% y la temperatura es de 10°C, inclusive cuando la temperatura aumenta hasta 70°C y la concentración de sacarosa se mantiene en 70% el número de  $Da$  es mayor a 200.

Esto nos sugiere que el proceso está limitado por transferencia de masa aún a concentraciones bajas de sacarosa y temperaturas elevadas (Figura 17).

---

## 7. CONCLUSIÓN

General.

El uso de un reactor de lecho empacado con el hongo y la enzima autoinmovilizada permitió más del 50% de hidrólisis de una solución de sacarosa 2 M a 60°C por periodos de hasta 70 h, evitando de esta manera los procesos típicos de purificación e inmovilización de la enzima. Para incrementar el porcentaje de hidrólisis debe evitarse el lavado de la fracción soluble de la enzima a través de métodos de inmovilización *in situ*.

Particulares

La mayor producción de invertasa en fermentación en medio sólido se alcanzó a las 45 horas, un tiempo considerablemente menor al reportado para otras cepas de *A. niger* y para *Cladosporium cladosporioides*.

El secado del material sólido fermentado permitió estabilizar esta matriz porosa para ser utilizada como catalizador en el reactor empacado.

La mayor actividad de invertasa se alcanzó a los 70°C, esta temperatura es mayor que la reportada para la enzima libre (45°C), la enzima inmovilizada (50-55°C) y para la enzima producida en cultivo sólido (60°C).

La mayor velocidad de hidrólisis de sacarosa se obtuvo con una concentración de sacarosa 2 M a 70°C.

La hidrólisis continua de sacarosa en reactores de 20 y 200 mL de capacidad fue mayor al 50% con una solución de sacarosa 2 M a 60°C, manteniéndose constante por un periodo de más de 70 horas.

Las soluciones de sacarosa concentradas poseen una elevada viscosidad que aunado a los flujos tan bajos utilizados presentan un problema para la transferencia de masa, lo que se ve reflejado en el número de Damköhler que sugiere un proceso limitado por fenómenos difusivos.

### **Perspectivas.**

En este trabajo se presentaron los resultados de la hidrólisis de sacarosa en continuo con un sistema de invertasa autoinmovilizada en un reactor de lecho empacado en función de diferentes factores como son la temperatura, la concentración de sacarosa y el flujo.

Este tipo de sistema permite el uso del soporte utilizado para la producción de invertasa como catalizador para la hidrólisis de sacarosa evitando los pasos de purificación e inmovilización de la enzima, sin embargo, aun es necesario hacer estudios sobre procesos como la inmovilización del catalizador mediante un método sencillo para mantener toda la actividad enzimática o la recirculación de la solución de sacarosa para mejorar el porcentaje de hidrólisis, todo esto con el objetivo de incrementar y mantener el porcentaje de hidrólisis por periodos prolongados para que este tipo de sistemas sea atractivo para su aplicación industrial.



---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta N, Beldarraín A, Rodríguez L & Alonso Y. (2000). Characterization of recombinant expressed in methylotrophic yeast. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **(32)**: 179-187.
- Acuña-Argüelles, M. E. Gutiérrez-Rojas, M. Viniegra-González, G. Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **(43)**: 808-814.
- Akgöl, S. Kaçar, Y. Denizli, A. Arica, M. (2001). Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*. **(74)**: 281-288.
- Almeida, B. and Vitolo, M. (1984). Effect of Viscosity on Sucrose Hydrolysis Catalyzed by Invertase Obtained from *S. cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. **(26)**: 811-813.
- Bai, Z. H. Zhang, H. X. Qi, H. Y. Peng, X. W. Li, B. J. (2004). Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Technology*. **(95)**: 49-52.
- Barrios-Gonzáles, J. y Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. **(2)**, 85-121.

- Basha, S. Y. and Palanivelu, P. (2000). A novel method for immobilization of invertase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. (16): 151-154.
- Bayramoğlu, G. Akgöl, S. Bulut, A. Denizli, A. Arica, M. (2003). Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hidroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in continuous flow system. *Biochemical Engineering Journal*. (14): 117-126.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarzewskai, J., Penel, C., (2002). The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta* (1594):40-53.
- Boudrant, J. and Cheftel, C. (1975). Continuous hydrolysis of sucrose by invertase adsorbed in a tubular reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 827-844.
- Cantarella, M. Cantarella, L. Gallifuoco, A. Alfani, F. (1992). Invertase activity of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in poly (2-hidroxyethyl metacrylate) gels: kinetic and thermostability study in membrane reactors. *Journal Biotechnology*. (24): 159-168.
- Chen Jyh-Ping and Wang Juin-Bin. (1997). Wax ester synthesis by lipase-catalyzed esterification with fungal cells immobilized on cellulose biomass support particles. *Enzyme and Microbial Technology*. (20): 615-622.

- Corona, A. Sáez, D. Agosin, E. (2005). Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry*. (40): 2655-2658.
- Costaglioli P, Meilhoc E, Janatova I, Klein R and Masson M. (1997). Secretion of invertase from *Schwanniomyces occidentales*. *Biotechnology Letters*. (19): 623-627.
- Couri, S. Costa, S. Saavedra, G. A. Pereira, S. Augusto, A. C. (2000). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*. (36): 255-261.
- De la Vega, M. Cejudo, F. Paneque, A. (1991). Purification and properties of an extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*. *Enzyme and Microbial Technology*. (13): 267-271.
- D'Souza, S. Godbole, S. (2002). Immobilization of invertase on rice husk using polyhetylenimine. *J. Biochem. Biophys. Methods*. (52): 59-62.
- Doelle, H. W. Mitchell, D.A. y Rolz, C.E. (1992). Solid Substrate Cultivation. Elsevier Sci. Publ. Ltd; London & New York; p 466.
- Ellaiah, P. Adinarayana, K. Bhavani, Y. Padmaja, P. Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus niger* species. *Process Biochemistry*. (38): 615-620.

- 
- Fiedurek, J. Pielecki, J. Skowronek, M. (2000). Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Journal Basic of Microbiology*. (40): 111-118.
  - Ghosh, S. D'Souza, S. (1989). Crushing strength as a tool for reactor height determination for invertase-containing yeast cells immobilized in polyacrylamide. *Enzyme Microbiol Technol*. (11): 376-378.
  - Gómez, L. Ramírez, H. Villalonga, M. Hernández, J. Villalonga, R. (2005). Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*. Article in Press.
  - <http://rpaulsing.com>
  - <http://www.univ-reims.fr>
  - Hölker, U. Höfer, M. Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiol Biotechnol*. (64): 175-186.
  - Huang, W.C. Wang, A.Y Wang, L.T. Sung, H.S. (2003). Expression and characterization of sweet potato invertase in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (51): 1494-1499.
  - Huerta-Ochoa, S., 2004. Reactores enzimáticos. 1ª edición. Ed. UAM. México, D.F. pp. 13, 49.
  - Krastanov A. (1997). Continuous sucrose hydrolysis by yeast cells immobilized to wool. *Applied Microbiol Biotechnol*. (47): 476-481.

- Kumar, P.K.R. (1987). Microbial production of gibberellic acid. PhD Thesis, Mysore University, Mysore, India.
- Lamia L'Hocine, Zhang Wang, Bo Jiang, Shiyong Xu. (2000). Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*. (81): 73-84.
- Larroche, C. y Gros, J.B. (1989). Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid-state fermentation techniques. *Process Biochemistry*. (24): 97-103.
- Lee, W.C. Huang, C. T. (2000). Modelling of ethanol production using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. *Biochemical Engineering Journal*. (4): 217-227.
- Lekha, P. K. Lonsane, B. K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry* (29): 497-503.
- Luxhoi, J. Magid, J. Tscerko, D. Kandeler, E. (2002). Dynamics of invertase, xylanase and coupled quality indices of decomposing green and brown plants residues. *Soil Biology and Biochemistry*. (34): 501-508.
- Mansfeld, J, Schellenberger, A, Römbach, J. (1992). Application of Polystyrene-Bound Invertase to Continuous Sucrose Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. (40) : 997-1003.

- Marsh A. J. Mitchell, D. A. Stuart, D. M. Howes, T. (1998). O<sub>2</sub> uptake during solid state fermentation in rotating drum bioreactor. *Biotechnology Letters*. (20): 45-47.
- Mátrai, T. Mayer, S. Kçokai, S. Salamon, I. (2000). Invertase production of common moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Food Microbiology*. (61): 187-191.
- Miller, G. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Annual Bioch*. (2): 127-132.
- Mitchell, D.A, Berovic, M. y Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. (68): 65-135.
- Monsan, P, Combes, D. (1983). Application of Immobilized Invertase to Continuous Hydrolysis of Concentrated Sucrose Solutions. *Biotechnology and Bioengineering*. (26): 347-351.
- Montiel-González, A. Fernández, F. Viniegra-González, G. Loera, O. (2002). Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (102): 63-70.
- Moo-Young, M., Moriera, A.R. y Tengerdy, R.P. (1983). Principles of solid state fermentation. In The filamentous fungi. *Fungal Biotechnology*. (4): 117-144.

- Moreau, C. Durand, R. Aliès, F. Cotillon, M. Frutz, T. Théoleyre, M. (2000). Hydrolysis of sucrose in the presence of H-forms zeolites. *Industrial Crops and Products*. (11): 237-242.
- Mukherjee, S. Basak, S. Khowala, S. (2002). Regulation of activity and coinformation of sucrase by coaggregation with cellobiose in culture of medium of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Progress*. (18): 404-408.
- Nasef, M. Saidi, H. Senna, M. (2005). Hydrolysis of sucrose by radiation grafted sulfonic acid membrabes. *Chemical Engineering Journal*. (108): 13-17.
- Neuman, N. Lamped, O. (1967). Purification and properties of yeast Invertase. *Biochemistry*. (6): 468-475.
- Nguyen, D., Mattes, F., Hoschke, A., Rezessy-Szabó, J. y Bhat, M., (1999). Production, purification e identification of fructooligosaccharides produced by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Biotechnology Letters*. (21):183-186.
- Nishio, N., Tai, K. y Nagai, S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal of Microbiology and Biotechnology*. (8): 263-270.
- Núñez Gaona Oscar. (2004). Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Medio Sólido. Tesis de maestría.
- Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J. y Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*. (18), pp. 356-360.

- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-Gonzales, G. y Rimbault, M. (1988). Solid state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology*. (66): 57-62.
- Oriol, E., Rimbault, M., Roussos, S. y Viniegra-Gonzales, G. (1988). Water and water activity in solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (27): 498-503
- Pandey A. (1996). Special Issue on Solid State Fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. (55): 311-312.
- Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. (27): 109-117.
- Pandey A. (1994). Solid-state fermentation: an overview. *Wiley, New Delhi India*: 3-10.
- Pandey A. Soccol, C.R. Mitchell, D.A. (2000). New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. (35): 1153-1169.
- Pandey A. Soccol, C.R. Leo, J.A.R. Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation in Biotechnology. *Asiatech Publishers, Inc., New Delhi*. 221.
- Parascandola, P. Alteriis, E. Scardi, V. (1993). Invertase and acid phosphatase in free and gel-immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under different cultural conditions. *Enzyme Microbiol Technol*. (15): 42-49.
- Peñaloza, W., Davey, C.L., Kell, D.B. y Hedger, J.N. (1991). Real time monitoring of the accretion of *Rhizopus oligosporus* biomass during the solid



- substrate tempeh fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (7): 248-259.
- Persike, D. Bonfim, T. Santos, M. Lyng, S. Chiarello, M. Fontana, J. (2002). Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhus* (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Bioresource Technology*. (82): 79-85.
  - Pira, L. Pinto, C. Roiz, C. (1991). The effect of pretreatment on the invertase activity of gel-entrapped yeast biomass. *Journal Ind. Microbiol.* (8): 247-252.
  - Polakovic, M. Stefuca, V. Bales, V. Kurillova, L. Gemeiner, P. (1993). Heterogeneous enzymic hydrolysis in a biocatalytic packed bed formed by Ca-pectate gel beads. *Process Biochemistry*. (28): 549-552.
  - Prodanovic, R., Jovanovic, S., Vujcic, Z., (2001). Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnology Letters*. (23):1171-1174.
  - Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*. (1), No. 3.
  - Raimbault, M. y Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. (9): 199-209.
  - Rao, K. C. Karanth, N. G. Sattur, A. P. (2005). Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*. (40): 2517-2522.

- Romero-Gómez, S. J, Augur, C & Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. (22): 1255-1258.
- Roussos, S., Olmos, A., Rimbault, M., Saucedo-Castañeda, G. y Lonsane, B.K. (1991). Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: Conidiophores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*. (5): 415-420.
- Roussos, S., Rimbault, M., Viniegra-Gonzales, G., Saucedo-Castañeda, G. y Lonsane, B.K. (1991). Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micología Neotropical Aplicada*. (4): 83-98.
- Rubio, M. C, Maldonado, M. C. 1995. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, (30): 80-83.
- Santana, A, Costa, L. (2005). Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cell of *Cladosporium cladosporioides*. *Journal Biotechnol.* (8): 54-62.
- Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S. y Rimbault, M. (1992). Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (36):47-61.

- Segel, I. H. (1982). Cálculos de Bioquímica. Ed. Acribia. Zaragoza (España). Pp. 356-362.
- Shiomi, N. and Onodera, S. (1988). Beta-Configuration of D-fructofuranose released by action of invertases on sucrose. *Agricultural & Biological Chemistry*. (52): 2347-2348.
- Solís-Pereira, S. Favela-Torres, E. Viniegra-González, G. Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (39): 36-41.
- Tanriseven, A. Doğan, S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*. (36): 1081-1083.
- Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J., Ortiz, C., Fernández, R. y Guisan, J., (2002). Reversible immobilization of invertase on sepabeads coated with polyethyleneimine: Optimization of the Biocatalyst's stability. *Biotechnology Progress*. (18):1221-1226.
- Trejo-Hernández, M.R., Raimbault, M., Roussos, S. y Lonsane, B.K. (1992). Potential of solid state fermentation for production of ergot alkaloids. *Letters in Applied Microbiology*. (15): 156-159.
- Tümtürk, H. Arslan, F. Disli, A. Tufan, Y. (2000). Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine. *Food Chemistry*. (69): 5-9.

- Vargas, L., Pião, A., Domingos, R. y Carmona, E., 2004. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **(20)**:137-142.
- Wang, D. Cooney, C. Demain, A. Dunnill, P. Humphrey, A. Lilly, M. (1979). Fermentation and enzyme technology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. Pp. 88-89.
- Workman, W. and Day, D. (1983). Purification and properties of the beta-fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Letters*. **(160)**: 16-20
- Zhu, Y. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as carrier. *Biotechnology Letters*. **(16)**: 643-648.

---

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

"Hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y *Aspergillus niger* inmovilizados en el medio de cultivo sólido"

Que presentó

José Antonio Martínez Ruiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Vocal: Dr. Eliseo Cristianí Urbina

The image shows four handwritten signatures, each written on a horizontal line. The first signature is 'Saucedo', the second is 'Loera', the third is 'Aguilar', and the fourth is 'Urbina'. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.