

304434
1
205



UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

LICENCIATURA EN INGENIERIA DE ALIMENTOS
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

OPTIMIZACION DE UN PROCESO DE HIDROLISIS DE SUERO
DE LECHE CON ENZIMA BETA GALACTOSIDASA
INMOVILIZADA Y PREDISEÑO DEL REACTOR
ENZIMATICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A N :

MARIA DEL CARMEN ROCIO CHAVOLLA LEON
CARLOS CESAR CRUZ DIAZ CORDOBA

Director: Ing. Agustín Valerio

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	5
CAPÍTULO 1 - CONCEPTOS GENERALES	12
CAPÍTULO 2 - REACTORES DE ENZIMA NMOVILIZADA	40
CAPÍTULO 3 - DESARROLLO EXPERIMENTAL	56
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS	77
CAPÍTULO 5 - PRE-DISEÑO DEL REACTOR	83
CONCLUSIONES	91
APÉNDICE - MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA HIDRÓLISIS GLOSARIO DE TÉRMINOS	96
GRÁFICAS Y FUGURAS	109
BIBLIOGRAFÍA	118

INTRODUCCION

A nivel mundial la industrialización del suero de leche ha cobrado importancia recientemente, debido a que, siendo un subproducto poco utilizado se ha logrado identificar como materia prima con las características necesarias para poder incorporarlo a los procesos de elaboración de una gran variedad de productos alimenticios tales como jarabes, alcohol, obtención de gomas, panificación, yoghurts, bebidas, helados, aditivos alimenticios, y como sustituto de leche principalmente. Esto es obtenido mediante el rompimiento por hidrólisis de la molécula de lactosa en sus dos componentes esenciales, esto es, en glucosa y galactosa, con lo cual se logra que el lactosuero adquiera las siguientes propiedades:

- 1) Incremento de la solubilidad.
- 2) Incremento del poder edulcorante.

- 3) Facilita la fermentación.
- 4) Facilita las reacciones de oscurecimiento por reacciones de Maillard y caramelización de azúcares.
- 5) Evita problemas de cristalización de la lactosa.
- 6) Aumenta la digestibilidad de productos elaborados a base de suero de leche.

En la actualidad existen dos métodos conocidos para lograr esta hidrólisis, basados ambos en el rompimiento del enlace disacárido, obteniendo como producto los monosacáridos glucosa y galactosa. Uno de éstos métodos consiste en la utilización de ácido y calor; el cual tiene la desventaja de contar con un mercado muy restringido para su comercialización, así como una baja eficiencia y calidad en el producto final.

El otro método para lograr la hidrólisis es utilizando las tecnologías basadas en la hidrólisis enzimática, las cuales nos

proporcionan un producto de mejor calidad y una mayor versatilidad en su uso.

Por vía enzimática existen dos métodos de hidrólisis. El primero que utiliza enzima libre y el que se realiza a base de la enzima inmovilizada. El primero presenta algunos problemas como pueden ser; un mayor costo de producción y la presencia de la enzima en el producto final. En cambio con el segundo, se tiene la posibilidad de un proceso continuo, una larga vida de servicio debido a la estabilidad microbiológica y mecánica del soporte, la obtención de un producto libre de enzima y de manera colateral, resulta más económico.

En México, casi en su totalidad el volumen de suero de leche es desechado, provocando severos problemas ecológicos, principalmente por la contaminación del agua, debido al alto DBO (*Demanda Bioquímica de Oxígeno*) del suero de leche, además de ser

un desperdicio económico. Lo anterior debido a que en nuestro país no existe una infraestructura adecuada para la industrialización biotecnológica del lactosuero.

Entre estas tecnologías, se encuentran algunos tratamientos físicos como la ultrafiltración y la ósmosis inversa, tratamientos químicos como la hidrólisis ácida y tratamientos bioquímicos como la hidrólisis enzimática; esta última propuesta en la presente tesis.

Por esta razón estimamos que el trabajo que se presenta pretende aportar una alternativa viable, ya que en él se propone una tecnología adecuada para el aprovechamiento e industrialización en México del lactosuero.

DESCRIPCION DEL PROBLEMA

PROBLEMATICA DEL SUERO

Puede afirmarse, sin lugar a dudas que conforme aumenta la producción de queso a nivel mundial, existe en forma colateral un aumento en la producción de suero, debido a que en promedio por cada 10 Kg. de leche, se obtiene 1 Kg. de queso y 9 Kg. de suero.

El suero de leche es un material altamente nutritivo que contiene alrededor de la mitad de los sólidos de la leche entera, desafortunadamente se tienen datos que arrojan que más de la mitad del suero producido a nivel mundial, es desperdiciado,¹¹¹¹ no siendo éste el único problema, sino que además el suero desechado trae consigo un problema severo de contaminación del agua.¹¹¹¹

El suero es considerado un gran contaminante debido a su elevada DBO (*Demanda Bioquímica de Oxígeno*), que alcanza valores de los 3 000 mg/l, siendo que la "Ley Federal de Derechos en

Materia de Agua" estipula como máximo para la industria láctea una DBO de 100 mg/l de promedio diario, y 120 mg/l instantáneo."''''

Se tiene que por cada 1000 litros de suero desechados en un efluente, se requieren 4.5 millones de litros de agua no contaminada para que el oxígeno disuelto en esta, oxide la materia orgánica del suero."''''

APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DEL SUERO

Para resolver el problema que representa el manejo del suero de leche y lograr su aprovechamiento, una de las alternativas de solución es someterlo a un tratamiento para ser utilizado como aditivo en la industria de alimentos, ya que cuando se utiliza como aditivo en alimentos sin ningún tratamiento previo, sobrevienen los siguientes problemas debido a la presencia de lactosa:

- 1) Es poco soluble.
- 2) Tiene muy bajo poder edulcorante.
- 3) La mayoría de los consumidores no lo puede digerir.

1) El problema de la poca solubilidad, se manifiesta por la formación de cristales grandes, que traen consigo una textura áspera o arenosa en productos como la leche condensada, cajeta, helados y malteadas; así como la sedimentación de los cristales en el fondo de los contenedores.

2) Respecto al bajo poder edulcorante se puede hacer esta comparación, si a la sacarosa le asignáramos un poder edulcorante de 100, el de la lactosa llegaría apenas al 16, sin embargo el contenido calórico es tan alto como el de la sacarosa, por tal motivo no se utiliza como edulcorante.

3) En cuanto a su digestibilidad cabe mencionar que a nivel

intestinal, la enzima responsable de la digestión de la lactosa es una proteína llamada lactasa. Los animales mamíferos adultos carecen de este tipo de enzima, y los humanos dejan de producirla a partir de los 4 años de edad, principalmente en países en desarrollo. La ingestión de lactosa para individuos que carecen de esta enzima, provoca flatulencia, diarrea y dolores abdominales.

Para disminuir los problemas mencionados y aumentar la versatilidad y el valor agregado del suero se somete a un tratamiento enzimático.

La enzima beta-galactosidasa, más conocida como lactasa, se encarga de hidrolizar la lactosa descomponiéndola en glucosa y lactosa como se puede observar en la fig 1.

Un tratamiento completo del suero de leche incluye primero una separación de las proteínas, sales y vitaminas por algún método

físico, posteriormente una hidrólisis con lactasa para obtener una solución del 50% de glucosa y 50% de galactosa, y por último otro tratamiento enzimático con glucosa isomerasa inmovilizada, obteniendo al final un suero con una mezcla de glucosa, galactosa, fructosa y un poco de lactosa; con una mayor solubilidad y un mayor poder edulcorante. """"

El lactosuero hidrolizado, es un producto que actualmente ha cobrado importancia en la industria alimentaria mundial ya que, por sus características, sirve como materia prima para la elaboración de productos diversos tales como: """""""" "" ""

PRODUCTO	GRADO DE HIDROLISIS	COMPANIA PAIS
BEBIDA REFRES- CANTE SABOR DE FRUTAS	50%	BATLELLE RESEARCH CENTER GINEBRA. SUIZA.
CARAMELOS COMO SUS- TITUTO DE LECHE	50%	SPECIALIST DAIRY INGRE- DIENTS. E.U.A.
YOGHURT COMO SUS- TITUTO DE LECHE	50%	SPECIALIST DAIRY INGRE- DIENTS. E.U.A.
LECHE CONDENSADA COMO SUS- TITUTO DE LECHE	50%	SPECIALIST DAIRY INGRE- DIENTS. E.U.A.
BASES PARA FER- MENTACIONES COMO SUSTRATO	50%	BRITISH CHARCOALS & Mc DONALDS. GRAN BRETANA.
JARABES PARA SUSTITUIR AZUCAR EN MERHELADAS Y HELADOS	90%	MILK MARKE TING BOARD & CORNING GLAS WORKS. E.U.A.

TABLA 1

CAPITULO 1

CONCEPTOS GENERALES

1.1 GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS

Definición; Las enzimas son catalizadores biológicos, de naturaleza proteica que intervienen en todas las reacciones metabólicas energéticamente posibles que ellas aceleran por activación específica. Permiten alcanzar rápidamente el estado de equilibrio de la reacción sin modificarlo, al final de cada ciclo de reacción la enzima permanece inalterada.

Las enzimas son macromoléculas que pertenecen a la clase de las proteínas globulares. Algunas de ellas son homoprotéicas constituidas únicamente por un encadenamiento de ácidos aminados. Otras son heteroprotéicas que poseen una parte no proteica, un cofactor necesario para la actividad catalítica asociado fuertemente a la proteína.

Una de las características más importantes de las enzimas es

su especificidad y ésta se divide a su vez en:

1.1.1 Especificidad de reacción: Una enzima no puede catalizar sino un solo tipo de reacción.

1.1.2 Especificidad en cuanto al sustrato: Esta propiedad resulta del hecho de que toda reacción enzimática implica la fijación de sustrato en puntos bien precisos de la proteína enzimática.

En las enzimas existen una pequeña porción implicada en la fijación del sustrato, así como en la reacción de catálisis dicha porción, se conoce como "sitio activo".

Para que el sustrato pueda acoplarse al sitio activo, debe poseer al menos dos características distintas.

1.1.3 El enlace específico o unión que debe ser atacado por la

enzima.

1.1.4 La presencia de algún otro grupo funcional o grupo enlazante, tales como las vitaminas o algunos iones, que se unen a la enzima y sitúa al sustrato adecuadamente sobre el sitio activo.

Las enzimas heteroprotéicas utilizan diversos tipos de cofactores algunos son iones metálicos (Mg^{++} , Fe^{++} , Mo^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , K^{+}), y otros cofactores orgánicos (Nicotinamida, Coenzima A, Tiamina).

1.2 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS.

1.2.1 Concentración de sustrato.

1.2.2 pH.

1.2.3 Temperatura.

1.2.4 Concentración de iones.

1.2.5 Concentración de inhibidores.

1.2.1 Concentración de sustrato. Este factor afecta a la velocidad de reacción debido a la saturación del sitio activo de la enzima.

1.2.2 pH. La mayoría de las enzimas ven afectada su estructura eléctrica con cambios en el pH. Sin embargo el rango óptimo de pH para la actividad enzimática fluctúa entre los valores de 4 y 9, dependiendo en específico de cada enzima.

1.2.3 Temperatura. Al igual que ocurre en la mayoría de las reacciones químicas, las reacciones enzimáticas sufren un incremento en la velocidad de transformación al incrementar la temperatura. Aproximadamente la velocidad de reacción se duplica por cada aumento de 10°C en la temperatura.

Sin embargo un exceso de temperatura provoca una modificación en la estructura tridimensional de los péptidos que constituyen a la enzima, perdiendo ésta su actividad.

El rango de temperatura entre los cuales se tiene mayor actividad enzimática se encuentra entre los 25° y 50°C, sin embargo, se ha encontrado actividad enzimática a temperaturas menores de 0°C y cercanas al punto de ebullición del agua.

1.2.4 Concentración de iones. Afecta el equilibrio de cargas eléctricas de los péptidos que conforman las enzimas, teniendo así una activación a bajas concentraciones o la desnaturalización de la enzima en concentraciones elevadas.

1.2.5 Concentración de inhibidores. Son compuestos que originan una disminución o pérdida total de actividad enzimática. De acuerdo al mecanismo de acción, este tipo de compuestos puede

dividirse en dos grandes grupos:

El primero, es aquel en el cual, se tiene una pérdida de la estructura tridimensional de la proteína, teniendo así una pérdida total de la actividad enzimática.

El segundo grupo, es aquel en el cual, el inhibidor ocupa el sitio activo de la enzima, evitando con esto la transformación del sustrato, debido a la formación de un complejo enzima - inhibidor que retarda la reacción.

Este tipo de inhibición se clasifica en competitiva, acompetitiva, no competitiva y de inhibición irreversible .

1.2.6 Inhibición competitiva.- Se caracteriza por que el inhibidor puede combinarse con la enzima, de tal modo que compite con el sustrato para unirse al centro activo. Este tipo de

inhibición forma un complejo enzima - inhibidor similar al complejo enzima - sustrato. En la gráfica 1 se puede observar el efecto de un inhibidor competitivo en la actividad enzimática.

1.2.7 Inhibición acompetitiva.- En este tipo de inhibición el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo enzima- sustrato-inhibidor el cual no sufre la transformación a producto. En la gráfica 2 se puede observar el efecto del inhibidor acompetitivo.

1.2.8 Inhibición no competitiva.- Un inhibidor no competitivo puede combinarse con la enzima o bien con el complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la acción de ambos. Este tipo de inhibidores se unen a la enzima en un sitio activo por lo cual se consigue una deformación enzimática lo que lleva a una inactivación o una disminución en la velocidad de formación de complejo. En la gráfica 3 se puede apreciar este tipo de inhibición.

1.2.9 Inhibición irreversible.- Este tipo de inhibición sucede cuando el inhibidor es capaz de unirse de manera covalente a la enzima, modificando de manera permanente un grupo funcional necesario para la catálisis."''''

1.3 CLASIFICACION DE ENZIMAS.

Las enzimas se pueden clasificar en base a:

1.3.1 Su función.

1.3.2 Su origen y,

1.3.3 Su método de fijación.

1.3.1 Por su función: Encontramos dos maneras de nombrarlas, una trivial que consiste en agregar el subfijo "asa" al nombre del sustrato que transforman por ejemplo; la enzima lactasa que hidroliza al azúcar presente en la leche, la ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea con producción de amoníaco y dióxido de carbono, sin embargo esta manera de denominarlas ha resultado poco

conveniente dado que en la actualidad hay enzimas que han recibido nombres que químicamente son poco informativos. Por esta razón, se ha desarrollado un nuevo sistema para nombrar y clasificar a las enzimas, éste consiste en dividir a las enzimas en seis clases principales, las cuales son designadas en base a la reacción que catalizan. Tomando en cuenta esta clasificación tenemos:

Nombre	Clasificación
Oxido - reductasas	1
Transferasas	2
Hidrolasas	3
Liasas	4
Isomerasas	5
Ligasas	6

Oxidoreductasas; Catalizan las reacciones de oxido-reducción, es decir, transferencia de hidrógeno o de electrones de un donador

que esta oxidado a un receptor que esta reducido.

Transferasas; Catalizan las reacciones de transferencia de radicales o de agrupamientos (metilo, carboxilo, acilo, glucosilo, amino, etc.).

Hidrolasas; Provocan la hidrólisis de diversos tipos de enlace por ejemplo un ester, acetal, y peptídicos. Las subclases son definidas por la naturaleza general de enlace que es hidrolizado, las subclases dan precisión complementaria respecto al tipo de este enlace.

El nombre sistemático se forma de acuerdo al modelo "sustrato-hidrolasa" un prefijo que precisa la naturaleza del grupo eliminado cuando la enzima es específica para éste enlace. En general las hidrolasas son haloproteínas.

Liasas; Las liasas son proteínas que rompen enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno y carbono-nitrógeno con formación de un doble enlace en uno de los dos fragmentos.

Ligasas; Cuando las liasas actúan en sentido inverso, es decir con condensación de dos moléculas con desaparición de un doble enlace se le designa con el nombre de sintetetasas o ligasas.

Isomerasas; Catalizan las reacciones de isomerización cis-trans o también originan modificaciones intramoleculares que transfieren un agrupamiento o producen oxido reducción. ""

A las divisiones anteriores se les hacen una serie de subdivisiones las cuales nos indican el enlace en específico que modifican la enzima. ""

1.3.2 Por su origen las enzimas se pueden clasificar en:

Enzimas de origen animal.

Enzimas de origen vegetal.

Enzimas de origen microbiano.

Enzimas de origen animal. Son enzimas que forman parte del metabolismo natural de los animales y que se extraen para usos industriales. Como ejemplo se pueden mencionar:

Enzima renina obtenida del cuarto estómago del becerro hasta antes de la cuarta semana de vida.

Enzima pancreática que se extrae del páncreas de los cerdos. Esta enzima es una mezcla de proteasas, amilasas y lipasas.

Enzimas de origen vegetal. Se obtienen de los frutos o de la estructura de algunos vegetales. Por ejemplo:

Papaina, que se extrae del latex de la papaya.

Peróxidasas, obtenidas de la raíz del rábano.

Ureasa, que se extrae de la soya.

Amlilasas, que se obtiene de la cebada germinada.

Bromelina, se extrae de la piña.

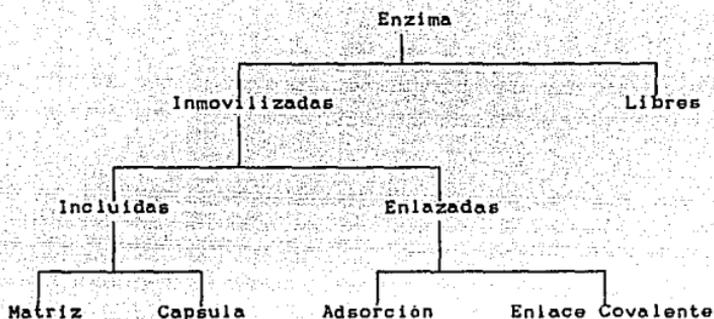
Fisina, obtenida del higo.

La mayoría de las enzimas de origen microbiano se obtienen al favorecer el crecimiento de cepas específicas de algunos microorganismos y se dividen en tres:

- Fúngicas
- Bacterianas
- Las que se obtienen de las levaduras.

1.3.3 Método de fijación:

Por su método de fijación las enzimas se dividen en:



Libres. Son aquellas enzimas que una vez aisladas de su origen natural, son estabilizadas en una solución acuosa, la cual sirve como vehículo para su utilización, y se denomina como libre porque una vez mezclada con el sustrato es irrecuperable por métodos económicamente viables.

Inmovilizadas. Son aquellas enzimas que una vez aisladas de su medio natural, se fijan en algún tipo de soporte por medio de diversas técnicas, las cuales van de métodos físicos muy simples tales como la absorción y encapsulamiento, a técnicas químicas como la fijación por enlace covalente. La ventaja de este tipo de enzima

es que se puede reutilizar por un periodo de tiempo relativamente largo. ""

Inmovilización por inclusión; consiste en la retención de la enzima en el interior de la red tridimensional de un polímero insoluble en agua o aprisionada en el interior de microcapsulas delimitadas por una membrana semipermeable en la cual los poros son lo suficientemente pequeños para impedir la difusión de las macro moléculas, pero suficientemente amplios para permitir el paso del sustrato y de los productos de reacción.

En este procedimiento la enzima misma no esta ligada al soporte y conserva su integridad funcional.

Inclusión en una matriz.

La enzima insolubilizada o dispersada en la solución de un

monomero, que se polimeriza inmediatamente en presencia de un agente de reticulación y de un coloide protector, (albumina, agarosa o dextrano). El gel obtenido se reduce a polvo después de una deshidratación y se suspende en agua en el momento de empleo.

Los polimeros sintéticos mas usados son; poliacrilamida, metacrilato, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, o naturales; almidón, carragenina K. Las enzimas pueden ser adheridas en membranas o en las fibras huecas.

Inclusión por microcapsulamiento. El nombre de encapsulamiento, se debe a que en este método un gel o una membrana rodea a una enzima por medio de una polimerización, o bien cuando la enzima es retenida en un polimero prefabricado por una formación subsecuente de una red. La microencapsulación y el encapsulamiento en fibra son otros ejemplos de este tipo de inmovilización, En algunos casos el término encapsulamiento ha incluido la

copolimerización que es esencialmente una forma de red.

En general, las técnicas de encapsulamiento tienen varias ventajas; permiten una alta concentración de enzimas; estas pueden ser retenidas sin ninguna modificación química o enlace que pueda provocar la pérdida de actividad. Varios sistemas enzimáticos pueden ser manejados debido a que el encapsulamiento permite la retención de las células vivas junto con sus sistemas enzimáticos.

El tamaño de las microcápsulas puede variar de 1 a 100 micrómetros.

Ventajas y desventajas del método de inclusión.

Ventajas.- Son convenientes para todos los tipos de enzima y en sistemas multienzimáticos, alta retención en un volumen pequeño, la totalidad de la masa protéica esta incluida en la red del

polimero o en las microcápsulas.

Desventajas.- Las moléculas pueden desprenderse con el tiempo, por otro lado las condiciones de la polimerización son desnaturizantes de la enzima. Pero el principal factor limitante es el freno de la transferencia de masa en el soporte; por fenómenos de impedimento estérico y de difusión a través del gel o de la membrana.

Fijación por enlace.

En esta técnica la enzima debe ser fijada al soporte, tan sólidamente como sea posible. Se deben considerar características tanto de las proteínas que se van a fijar, como del soporte; tamaño de las partículas, relación molar de los agrupamientos hidrofílicos e hidrofóbicos y grupos relativos, estos se dividen de acuerdo al enlace de la enzima en adsorción y enlace covalente.

Fijación por adsorción o enlace iónico.

La inmovilización por adsorción involucra numerosas fuerzas de interacción de baja energía entre el soporte y la proteína: fuerzas de Van de Waals, enlace de hidrógeno y uniones hidrofóbicas.

En el caso de soportes no porosos sobre los cuales se fija superficialmente la enzima, se forman en la proximidad de las partículas sólidas capas, sucesivas de moléculas de enzimas, unidas con mayor o menor fuerza. Cuando el material es poroso, la enzima penetra en los poros.

Fijación de la enzima mediante enlaces covalentes.

Este método involucra reacciones químicas creando un enlace irreversible entre la molécula enzimática y los grupos reactivos del soporte.

1.4 GENERALIDADES DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA.

La enzima lactasa, llamada así porque cataliza la hidrólisis del carbohidrato de la leche (lactosa), es conocida formalmente como β -galactosidasa, debido a su facultad de acelerar la hidrólisis del enlace de la glucosa y de la galactosa.

La β -galactosidasa es una enzima que se puede obtener de levaduras tales como Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis y Saccharomyces fragilis y de hongos como es el caso de Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, etc.

La enzima obtenida de levadura tiene un rango estrecho de estabilidad con respecto al pH que va de 6.5 a 7.5 limitando su aplicación al tratamiento de leche.

Su estabilidad con respecto a la temperatura esta limitada a

temperaturas no menores de 10°C y encontrando su actividad óptima en un rango de temperaturas que va de 30 a 35°C.

A temperaturas mayores de 45°C la enzima se inactiva rápidamente. Por otro lado, la enzima de origen fúngico es estable en un amplio rango de pH (4 a 6.5), teniendo su óptimo mínimo de 4 a 5, lo cual la hace particularmente adecuada para la hidrólisis de lactosa en suero ácido (se caracteriza por tener un porcentaje de ácido láctico de 0.4 y un pH de 5 a 5.3). La galactosidasa de origen fúngico es también más termoestable siendo su temperatura máxima los 69°C y una óptima de 55°C.

Con respecto a la inhibición por producto se tiene que la enzima producida a partir de levadura presenta menos inhibición que la de origen fúngico.

Esta enzima se puede encontrar en forma libre o inmovilizada,

es de color ambar, la cual sufre inhibición por la presencia de iones fierro (Fe^{++}), calcio (Ca^{++}) y activación por la presencia de potasio (K), cobalto (Co^{++}), magnesio (Mg^{++}) y zinc (Zn^{++}), los cuales se encuentran disponibles en forma y en cantidades suficientes en el suero y en la leche.

La inmovilización enzimática se puede lograr utilizando diversas técnicas y soportes, dependiendo del origen de la enzima y del tipo de reactor a utilizar. En la figura 2 se observa el mecanismo de reacción de la enzima β -galactosidasa.

1.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA.

La cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento, establece la relación que existe entre la velocidad de reacción enzimática y de las concentraciones de sustrato [S], y de la enzima [E], así como la influencia de algunos factores tales

como el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores y actividad del agua.

La cinética enzimática se basa en tres leyes generales que son:

1.5.1 El sustrato [S], forma con la enzima [E], un complejo intermediario [ES]. Este complejo resulta de la unión del sitio activo de la enzima y la molécula del sustrato.

1.5.2 La velocidad de reacción en el tiempo (t), es decir la velocidad de desaparición del sustrato, $-dS/dt$, o de la aparición del producto dP/dt que se representa por la pendiente de la tangente a la curva. P o $S = f(t)$ no es constante para las concentraciones dadas en la enzima o en el sustrato y disminuye en función del tiempo, debido a la desaparición del sustrato en el curso del desarrollo de la reacción.



Para las reacciones enzimáticas son válidos los principios generales de las reacciones químicas, las cuales por su cinética se clasifican de acuerdo al orden de reacción; teniendo reacciones de orden cero, de primer orden, segundo y tercer orden; según la influencia de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.

Las reacciones de orden cero son aquellas en las que la concentración del sustrato no tiene influencia en la velocidad de reacción. ""

Las reacciones de primer orden son aquellas que dan lugar a una velocidad directamente proporcional a la concentración del sustrato.

Las reacciones de segundo orden son aquellas en las que la velocidad de transformación es directamente proporcional al producto de la concentración del sustrato, o a la segunda potencia de la concentración del sustrato.

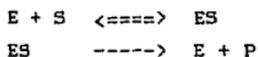
Tercer orden: este tipo de reacciones son aquellas cuya velocidad es proporcional al triple producto de la concentración del sustrato. Estas reacciones son escasas.

Ecuación que rige la cinética enzimática (Michaelis Menten)

En el caso de las reacciones enzimáticas se tiene que tomar en cuenta un rasgo característico de estas reacciones, el cual es conocido como saturación de la enzima con el sustrato. Esto provoca que a una baja concentración de sustrato la velocidad de reacción es casi proporcional a la concentración del mismo, siendo esta reacción de primer orden. Sin embargo, a medida que la

concentración de sustrato aumenta, la velocidad de reacción disminuye, dejando de ser proporcional a la concentración de sustrato; en esta zona el orden de la reacción es mixto. Al seguir aumentando la concentración del sustrato, la velocidad de reacción llega a ser independiente de ésta, aproximadamente a un valor constante siendo una reacción de orden cero.

Para explicar el fenómeno anterior Michaelis-Menten supuso que la enzima se combina con el sustrato para formar un complejo enzima-sustrato. En la segunda etapa, el complejo desaparece para formar enzima libre y producto mediante la siguiente reacción:



Basado en esto, se tiene que la velocidad de reacción esta caracterizada por una reacción de primer orden:

$$V_o = K[ES]$$

Sin embargo, como K y $[ES]$ no pueden ser medidas, se debe encontrar otra expresión que permita evaluar en función de otras variables. Para ello es necesario escribir una reacción por medio de la siguiente ecuación:

$$v = \frac{k[ES]}{K_1 + [S]}$$

CAPITULO 2

BIOREACTORES DE ENZIMA INMOVILIZADA

2.1 INTRODUCCION.

Siendo el reactor la parte clave dentro del proceso, comenzaremos por definirlo. Un reactor es el equipo del proceso en el que se realizan los cambios químicos necesarios de materia para poder obtener un producto determinado.

Por su operación, podemos identificar a los reactores en: "'''
discontinuos, continuos y semicontinuos:

2.1.1 Reactor discontinuo. Este tipo de reactor admite todos los reactivos al principio y los procesa según un curso predeterminado de reacción, durante el cual no se alimenta o extrae ningún tipo de material. Por lo común este tipo de equipo tiene la forma de un tanque con o sin agitación, y se usa para procesos de baja productividad principalmente.

2.1.2 Reactor continuo. En este tipo de equipo los reactivos se introducen y los productos se extraen simultáneamente y de manera constante. Esta clase de reactor puede tener la forma de un tanque, estructura tubular, o una torre y tiene multitud de aplicaciones en plantas de gran escala con el propósito de reducir los costos de operación y facilitar el control de calidad del producto.

2.1.3 Reactor semicontinuo. A esta categoría pertenecen aquellos reactores que no satisfacen por completo las dos clases antes mencionadas.

Por sus características de diseño podemos clasificar a los reactores en: "111" tanque, tubular y fases dispersas.

2.1.4 Reactor tanque; Es quizá el tipo de reactor de uso más común en la industria. En la mayoría de los casos está equipado con

algún medio de agitación, así como de elementos para la transferencia de calor. Esta clase de equipo permite el manejo en forma discontinua o continua y un amplio rango de temperaturas y presiones. En este tipo de equipo se consigue un mezclado casi perfecto, salvo los casos que se trabaje con líquidos muy viscosos.

2.1.5 Reactor tubular. Este tipo de reactor esta constituido ya sea de un solo tubo continuo o varios tubos en paralelo. Los reactivos penetran por un extremo del reactor y el producto sale por otro, con una variación continua de composición de la mezcla de reacción en estos dos puntos. La transferencia de calor del reactor o hacia éste se logra por medio de una camisa o un diseño de tubo y coraza. El reactor tubular tiene aplicación en casos en que sea indeseable el retromezclado en la dirección del flujo. Los tubos del reactor pueden estar empacados con gránulos de catalizador o sólidos inertes.

2.1.6 Reactor en torre. Esta clase de reactor se caracteriza por su estructura cilíndrica vertical con una relación grande entre la altura y el diámetro. Puede tener desviadores o rellenos sólidos (reactivos, catalizadores o inertes), o bien, quizá se limite sencillamente a una torre vacía, y se utiliza para procesos continuos de reacciones heterogéneas. Como ejemplo de ellos están el horno de cal y las unidades de absorción de gases para reacciones gas-líquido, incluyendo las torres empacadas, las de platos y las de rociamiento.

2.1.7 Reactor de fases dispersas. Este tipo de equipo se caracteriza por una columna vertical que contiene partículas de catalizador muy finas suspendidas en un medio líquido (por ejemplo, aceite) que puede ser uno de los reactivos. El reactivo gaseoso que se burbujea por la suspensión se disuelve en el medio líquido en donde se producen las reacciones catalizadas. Esta técnica facilita el control de la temperatura debido a la gran capacidad calorífica

y las características favorables de transferencia de calor del líquido.

2.2 REACTORES DE ENZIMA INMOVILIZADA

Numerosas enzimas, extraídas la mayor parte de microorganismos, son utilizados industrialmente como catalizadores. Como se mencionó anteriormente las enzimas pueden ser adsorbidas, enlazadas por enlaces covalentes, o por atracción en la superficie de soportes particulares, constituidos principalmente en materiales inorgánicos tales como; vidrio poroso, bentonita y óxidos metálicos. Pueden igualmente ser encerradas en el interior de microcápsulas o colocadas en membranas constituidas por polímeros biológicos o sintéticos, depositadas sobre una trampa plástica.

Para la selección del soporte se tienen, que tomar en cuenta los siguientes factores:

- El costo de operación de la inmovilización y la inversión de las necesidades de instalación.

- Actividad residual de la enzima fijada.

- Estabilidad del complejo en el transcurso de su utilización (pérdidas por desnaturalización o liberación de la enzima).

- Características del sustrato a tratar: masa molecular y viscosidad.

Chibata¹¹¹¹, distingue dos diferentes categorías de sistemas fermentativos dependiendo el modo de alimentación del sustrato:

2.2.1 Sistema de lotes:- Reactores agitados.

2.2.2 Sistema continuo:- Reactores de alimentación continua.

- Reactores de pistones de desagüe

Existe otra clasificación basada en la naturaleza del soporte y en la tecnología desarrollada:

2.2.3 Reactores de membrana

Debido a sus propiedades plásticas, los soportes de membrana pueden ser utilizados en diversos tipos de reactores. En ciertos casos la membrana constituye una simple barrera física que retiene las macromoléculas dentro del compartimiento de reacción; este es el fundamento de las membranas de ultrafiltración que se utilizan para recuperar el biocatalizador en los reactores de agitación como se puede observar en la figura 3.

La enzima puede estar en forma libre, soluble o fijada sobre partículas sólidas lo que acrecienta su volumen y permite trabajar con un mayor tamaño de poro de la membrana y con rendimientos más elevados.

El principal inconveniente de esta técnica es el fenómeno de "polarización" que consiste en una atracción por las diferentes cargas y se produce una acumulación de compuestos de masa molecular elevada sobre la cara superior de la membrana y una obstrucción de poros.

2.2.4 Reactores de soporte de partícula.

-Reactores agitados

-Reactores de lecho fijo

-Reactores de lecho fluidizado

Reactores agitados

El complejo insoluble enzima-sustrato, se mantiene en suspensión en el medio de reacción por agitación mecánica, en el régimen discontinuo. Entre cada ciclo se debe proceder a la recuperación de la enzima por filtración, centrifugación o

sedimentación. Conforme se va reutilizando la enzima hay una pérdida gradual de la actividad enzimática por lo cual es necesario un aumento progresivo del tiempo de permanencia en el reactor o el suministro de pequeñas cantidades de enzima nueva.

Este tipo de reactor es utilizado generalmente para sustratos de viscosidad elevada y para las enzimas que tienen una actividad relativamente débil. La oxigenación producida por la agitación puede provocar una rápida desnaturalización de la enzima. Este procedimiento es especialmente conveniente para las reacciones de oxidorreducción.

Entre las principales ventajas de ésta técnica tenemos:

- La simplicidad y el costo relativamente bajo de su funcionamiento.
- Una buena adaptabilidad a diferentes tipos de fabricación.
- Un fácil control de las condiciones de operación.

-La adición de enzima nueva.

Reactores de lecho fijo.

La enzima se encuentra fijada sobre un soporte dentro de una columna a través de la cual es percolada la solución a tratar. La alimentación continua del sustrato se puede hacer por flujo ascendente o descendente y se puede adaptar algún dispositivo para su recirculación.

La compactación de las partículas del soporte puede originar la formación de vías preferenciales del fluido a través de la columna, así como variaciones en el gasto y modificaciones en la curva de distribución de los tiempos de contacto.

Este tipo de reactor tiene el inconveniente de presentar una pérdida gradual de la enzima inmovilizada en función del gasto de

alimentación, de la viscosidad de la solución, del tamaño y la forma de las partículas del soporte, de la longitud así como de la geometría de la columna. Si la velocidad de alimentación es constante, la pérdida de enzima aumenta con el tiempo.

Si suponemos que todos los constituyentes del medio de reacción permanecen en contacto durante tiempos idénticos en el reactor, se puede considerar que cada elemento de volumen de líquido dV' se comporta como un microreactor homogéneo que se desplaza a la manera de un pistón a lo largo de la columna (fig 4).

Para el régimen permanente la velocidad de reacción se rige por la siguiente ecuación:

$$V' = \frac{Q_0 S_0}{V_{m\max}} \left\langle X_s - \frac{K'm}{S_0} \ln(1-X_s) \right\rangle$$

o bien

$$S_0 X_s = K'm \ln(1-X_s) + V' \frac{V_{m\max}}{Q_0}$$

La curva $S_0 X_s$ en función de $(\ln(1-X_s))$ es una recta de pendiente $K'm$ en donde la intersección con el eje de las ordenadas permite el cálculo de $V_{m\max}$. Para gastos bajos, existe una diferencia significativa entre la concentración media de sustrato en la columna y la concentración en la proximidad del sitio activo de la enzima y el valor de $K'm$ es más elevado para la enzima asociada que para la enzima libre. Cuando el gasto es elevado, esta diferencia tiende a decrecer a causa de una disminución del espesor de la capa límite, lo que mejora la transferencia de material.

Reactores de lecho fluidizado

El catalizador enzimático es mantenido en suspensión en el

reactor por la circulación ascendente de la solución a tratar o por la inyección de un gas. En éste sistema, al aumentar la superficie reactiva del complejo en relación al lecho fijo, es posible disminuir la cantidad necesaria de enzima. Mejora igualmente los intercambios térmicos y es conveniente para el tratamiento de afluentes de alta viscosidad. Además, los riesgos de obstrucción son menores que en el caso de las columnas compactadas. Sin embargo, las fuerzas de fricción de partículas sólidas y el líquido ascensional son responsables de la pérdida de carga y del establecimiento de corrientes de circulación que abaten considerablemente los rendimientos.

2.3 PERDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La pérdida de actividad enzimática con el tiempo es uno de los factores más importantes a determinar o incluso limitar la operación del sistema y su economía.

Básicamente hay tres formas de pérdida de actividad enzimática: "1111"

2.3.1 Salida de la enzima del sistema

2.3.2 Inactivación de la enzima.

2.3.3 Recubrimiento y aislamiento por parte del sustrato.

2.3.1 La Enzima puede salir del sistema por desorción, inestabilidad en los enlaces químicos, fugas a través de las membranas o por erosión del soporte.

2.3.2 La pérdida de actividad enzimática puede deberse a: desnaturalización térmica, inhibición o inactivación por los componentes de la alimentación o por acción de enzimas proteolíticas. La velocidad de desnaturalización puede ser afectada por el pH del sustrato, la temperatura o por la concentración del sustrato. De igual manera, una contaminación microbiana destruye la enzima o bloquea el acceso al sustrato.

2.3.3 Otros componentes de la alimentación, tales como las proteínas pueden también provocar el recubrimiento o bloqueo de los poros del soporte, resultando una pérdida de actividad aparente. Usualmente la velocidad de la pérdida de actividad es proporcional a la cantidad remanente de actividad, resultando en un patrón exponencial de disminución.

CAPITULO 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1 DESCRIPCION DEL SISTEMA UTILIZADO:

El proceso consiste en una hidrólisis enzimática por medio de la beta-galactosidasa inmovilizada en un proceso semicontinuo.

Elementos que intervienen en la hidrólisis:

3.1.1 Enzima beta-galactosidasa inmovilizada.

3.1.2 Suero de leche.

3.1.3 pH y Temperatura.

3.1.1 Enzima beta-galactosidasa inmovilizada.

Es una enzima de origen fúngico fuertemente unida al soporte fabricado de un polímero conocido comercialmente como plexiglass, el cual la hace insoluble e impide la pérdida de ésta, aún después de varios meses de uso.

3.1.2 Suero de leche.

El suero obtenido de las queserías se puede clasificar en suero dulce y suero ácido. La característica de acidez de cada uno de estos sueros está en función del tipo de queso elaborado.

Las características del suero son:

	DULCE	ACIDO
Humedad	93.7 %	93.5%
Grasa	0.5 %	0.04%
Proteína	0.8 %	0.75%
Lactosa	4.85 %	4.9%
Cenizas	0.5 %	0.8%
Acido Láctico	0.05 %	0.4%
pH	6.3	5.5

3.1.3 pH y Temperatura.

El pH óptimo de la actividad de la enzima es de 4.5, por lo cual ésta es más activa en el suero ácido. En el caso de sueros con pH neutro, el máximo de actividad que se alcanza es de un 20-30 %.

Temperatura. La máxima actividad enzimática se alcanza a los 60°C, pero cuando la hidrólisis es continua y el suero es ácido, la temperatura no debe exceder de los 45°C, para no acortar la vida de la enzima.

3.2 DESCRIPCION DEL EQUIPO:

3.2.1 Reactor.- El cuerpo del reactor consiste en un tubo de plexiglass de 10 cm de diámetro y 70 cm de longitud, con tapas de rosca dentro de las cuales se encuentra una malla circular de acero inoxidable.

El volumen del reactor es de 0.0054 m³.

3.2.2 Intercambiador de calor.- Consiste en un tanque cilíndrico de acero inoxidable, que contiene en la parte interna un serpentín de 5 m de longitud y 0.8 cm de diámetro, está provisto también de un agitador de propelas, que tiene como fin crear una convección forzada en el agua para incrementar la transferencia de calor.

3.2.3) Controlador de temperatura.- El control de temperatura se lleva a cabo en el intercambiador de calor, que está provisto de dos resistencias controladas por un termopar y un pirómetro que actúan como dispositivo de control que opera al registrarse una diferencia de 1°C entre la temperatura deseada y la temperatura real a la que está entrando el suero, accionando tanto la bomba como el generador de calor.

3.2.4 Bomba peristáltica.- Esta compuesta de dos baleros giratorios que hacen un movimiento rotatorio sobre una manguera de látex provocando un impulso tipo peristáltico, y tiene una capacidad de bombeo de 2 a 70 l/h pudiendo variar el gasto cambiando la velocidad de la bomba.

3.2.5 Sistema de transporte de fluidos.- Esta operación se lleva a cabo por medio de mangueras de PVC con un diámetro de 0.6 cm. las cuales, transportan el fluido a través de todos los componentes del sistema.

3.2.6 Prefiltros.-Es un par de mallas del No 400 de nylon , localizadas en la entrada y salida del reactor.

3.2.7 Filtro.-Es un filtro millipore 607 Neu-iseubura, se localiza entre el intercambiador de calor y el reactor.

3.3 FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO A ESCALA:

Preparación del sistema:

Consiste en dos operaciones que tienen como objetivo desalojar los restos de la solución desinfectante o salina según sea el caso, con el fin de que no tengan ningún efecto de inhibición con la enzima o contaminación del producto.

3.3.1 Primeramente se debe inyectar aire al sistema para desalojar la solución desinfectante que se encuentra a lo largo de él. Para realizar esta operación se deben colocar las válvulas en la posición adecuada (fig. 5a y 5b) e inyectar aire filtrado a una presión no mayor a las 15 lb/pulg².

3.3.2 Una vez eliminado el desinfectante, se colocan las válvulas en la posición de contraflujo (fig. 5a y 5b), y se

circulan por todo el sistema por lo menos 20 lts de agua limpia y pasteurizada. Esta operación se realiza con el fin de eliminar todos los residuos de desinfectante que podrían llegar a contaminar el producto.

Acondicionamiento del Sustrato:

Una vez preparado el suero, hay que asegurarse que no se encuentre a una temperatura mayor de 40°C y no presente precipitado o impureza antes de introducirlo al sistema.

Estabilización de Condiciones:

Para la estabilización de las condiciones se deberán colocar las válvulas en posición de hidrólisis (fig 5a y 5b) y comenzar a circular suero por el sistema, haciendo un "by pass" en el reactor. Desechando el flujo que salga al principio de esta operación, debido a que este trae residuos del agua de enjuague. Esta operación se efectúa con el fin de lograr condiciones estables de

flujo, y temperatura antes de comenzar con el proceso de hidrólisis.

Hidrólisis:

Una vez alcanzadas las condiciones deseadas de flujo y temperatura, se elimina el "by pass" y se inicia la alimentación constante al reactor en forma de goteo sobre el lecho de enzima inmobilizada. Puede darse el caso que al principio el goteo no sea uniforme, esto se debe a que existen aún burbujas de aire dentro del sistema.

Limpieza y Desinfección:

Inmediatamente después de que se terminó de hidrolizar todo el volumen de suero, se deberá realizar la limpieza. Esta etapa es de vital importancia en la duración y eficiencia de la enzima inmobilizada. El principio de la operación de limpieza se basa en la separación del lecho en unidades individuales, es decir lograr

la separación de cada uno de las esferulas de enzima. Esto se logra colocando las válvulas en la posición de contraflujo-limpieza' comenzando a alimentar agua limpia para el enjuague. Ya que se logró inundar el reactor, se comienza a introducir aire filtrado y se logra una fluidización del lecho.

Este estado de fluidización y contraflujo de agua se deberá mantener el tiempo necesario hasta que se logre apreciar visualmente que el agua tanto del reactor, como la que sale por la manguera es cristalina y no presenta olores. El agua de lavado debe estar entre 10 y 20 °C para no afectar la actividad de la enzima. El reactor se deberá dejar siempre inundado.

Esta operación se debe realizar cada 24 hrs., aunque no se utilice el reactor. Si el reactor no se va a utilizar en un periodo no mayor de 72 hrs., se debe dejar inundado con una solución desinfectante.

Si el reactor no va a ser utilizado por periodos mayores, se deberá dejar inundado con una solución de cloruro de sodio al 25% para inhibir el crecimiento de microorganismos. Esta solución debe ser cambiada por lo menos cada tres meses, repitiendo la operación de limpieza cada vez.

La solución desinfectante tiene como objetivo eliminar microorganismos patógenos y lograr inhibición del crecimiento de hongos principalmente. Para evitar el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos, se debe alternar el tipo de desinfectante. Los desinfectantes recomendados son:¹¹¹

-Peróxido de hidrógeno al 0.1%.

-Formaldehido al 0.1%

-Acido acético al 0.1%

-Acido fórmico al 0.1%

3.4 DESCRIPCION DE LA PARTE EXPERIMENTAL:

Objetivo: Determinar las condiciones estándar de pH, flujo, temperatura y concentración de iones de un reactor de lactasa inmovilizada, para lograr una hidrólisis del 50% de la lactosa en suero de leche desmineralizado.

3.4. Diagrama de bloques del desarrollo experimental:



Desarrollo experimental:

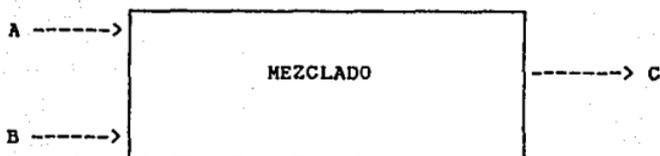
3.4.1 Estandarización de los elementos del proceso:

Por la dificultad para trabajar con suero fresco, se utilizó un suero en polvo desmineralizado con las siguientes características:

Humedad	2.5 %
Proteína	13 %
Grasa	0.8 %
Minerales	0.3 %
Lactosa	82.4 %
Cloruros	0.2 %

Con el objetivo de preparar un suero con características similares a las de un suero fresco que contiene 5 % de lactosa, se realizó el siguiente balance de materia:

BALANCE



Donde: A.- Suero en polvo

B.- Agua destilada

C.- Dilución del suero

Balance general

$$\text{masa (A)} + \text{masa (B)} = \text{masa (C)}$$

Balance de lactosa

$$A X_1^a + B X_1^b = C X_1^c$$

Donde X_1 fracción de lactosa

$$A (0.824) + B (0.0) = C (0.05)$$

$$A = C(0.05)/(0.824)$$

Suero en polvo (Kg) Agua (Kg) Sol suero (Kg)

(A)

(B)

(C)

0.060	0.94	1
0.121	1.878	2
0.182	2.817	3
0.242	3.757	4
0.303	4.696	5
0.364	5.636	6
0.424	6.576	7
0.485	7.515	8
0.542	8.454	9
0.606	9.394	10

Tabla 2. Sustitucion de (C) en el balance anterior para obtener distintas cantidades de suero.

Con ayuda de los datos de la tabla anterior se prepara la cantidad de suero al 5% de lactosa que se desea hidrolizar.

El suero no debe tener un exceso de sales minerales, debido a que la presencia de éstas disminuye la actividad enzimática y acortan la vida de la enzima.

Como se mencionó en el capítulo 3 existen dos tipos de suero; dulce y ácido. Para fines del experimento se le adicionó ácido láctico para simular un suero ácido. De esta forma se estandarizó el pH a 5.5. En el caso del suero dulce (pH 6.3) no hubo necesidad de adicionar ácido láctico.

3.4.2 Pasteurización:

Tiene la finalidad de disminuir la carga microbiana, evitando así la contaminación de la enzima. Esta operación se lleva a cabo a un pH no menor de 6, evitando con esto la precipitación de la proteína.

Las condiciones de Pasteurización son: Una temperatura de 72°C

durante un minuto, seguida de un enfriamiento a 10°C. En el caso de suero ácido la estandarización del pH se debe llevar a cabo después de la pasteurización para evitar la precipitación de proteínas.

3.4.3 Condiciones del Proceso:

- Influencia de iones potasio.

Según la literatura, la presencia de iones potasio incrementa la actividad de la beta-galactosidasa, por lo cual se añadió hidróxido de potasio en concentraciones de 10^{-1} y 10^{-2} molar⁽¹¹⁾.

- Temperatura.

Las temperaturas que se manejaron durante el experimento fueron de 30, 35, 40 y 45°C. Las temperaturas manejadas están dentro del rango que se recomienda para obtener una buena actividad de la enzima.

- Flujo.

Los flujos manejados fueron de 1.5, 8.14 y 15.3 l/h debido a que estos flujos son fácilmente controlables en el tipo de bomba manejado.

3.4.4 Hidrólisis:

Es el proceso más importante del desarrollo experimental, ya que aquí se lleva a cabo la hidrólisis de la lactosa en los dos monosacáridos que son la glucosa y la galactosa. Este proceso se lleva a cabo en el reactor tubular de lecho empacado descrito en el capítulo 2 con la alimentación en la parte superior, ya que de esta forma se asegura que el suero pase a través de las esférulas de enzima inmovilizada que conforman el lecho del reactor.

3.4.5 Cuantificación de la hidrólisis:

Para cuantificar el grado de hidrólisis es necesario evaluar

la cantidad de glucosa libre que hay después del tratamiento enzimático.

La cuantificación de la glucosa presente en el suero hidrolizado se lleva a cabo por el método de la glucosa-deshidrogenasa.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES:

Los resultados experimentales se obtuvieron combinando las siguientes variables:

-Temperatura: 30, 35, 40 y 45°C.

-Flujo: 1.5, 8.14 y 15.30 l/h.

-pH: 6.3 y 5.5.

-Concentración molar de iones potasio: 0, 0.01 y 0.001.

TABLA 3
RESULTADOS DE LA PARTE EXPERIMENTAL

PRUEBA No.	FLUJO [l/hr]	TEMP [°C]	pH	[K] [MOLAR]	% DE HIDROLISIS
01	1.50	35	6.3	0	28.00
02	1.50	40	6.3	0	44.00
03	1.50	45	6.3	0	53.87
04	8.14	35	6.3	0	22.18
05	8.14	40	6.3	0	36.12
06	8.14	45	6.3	0	39.40
07	1.50	30	5.5	0	21.10
08	1.50	35	5.5	0	43.10
09	1.50	40	5.5	0	63.00
10	8.14	30	5.5	0	19.80
11	8.14	35	5.5	0	37.19
12	8.14	40	5.5	0	60.91
13	15.30	40	5.5	0	48.30
14	15.30	45	5.5	0	53.00
15	1.50	35	6.3	0.01	45.74
16	1.50	40	6.3	0.01	60.86
17	1.50	45	6.3	0.01	79.01
18	1.50	35	6.3	0.001	35.00
19	1.50	40	6.3	0.001	46.98
20	1.50	45	6.3	0.001	59.60
21	8.14	35	6.3	0.01	33.97

22	8.14	40	6.3	0.01	44.70
23	8.14	45	6.3	0.01	52.30
24	8.14	35	6.3	0.001	28.47
25	8.14	40	6.3	0.001	39.02
26	8.14	45	6.3	0.001	42.98
27	1.50	30	5.5	0.01	19.60
28	1.50	35	5.5	0.01	35.64
29	1.50	40	5.5	0.01	57.64
30	8.14	30	5.5	0.01	17.43
31	8.14	35	5.5	0.01	32.81
32	8.14	40	5.5	0.01	52.84
33	1.50	30	5.5	0.001	20.05
34	1.50	35	5.5	0.001	40.55
35	1.50	40	5.5	0.001	59.13
36	8.14	30	5.5	0.001	18.01
/					
37	8.14	35	5.5	0.001	37.51
38	8.14	40	5.5	0.001	60.70

4.2 ANALISIS DE RESULTADOS:

PRUEBAS CON HIDROLISIS MAYORES DEL 50%

PRUEBA No	FLUJO (l/h)	TEMP. °C	pH	[K] MOLAR	OBSERVACIONES
03	1.50	45	6.3	0	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA MUY ALTA
09	1.50	40	5.5	0	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA.
12	0.14	40	5.5	0	*FLUJO BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA.
13	15.3	40	5.5	0	*FLUJO ALTO. *TEMPERATURA ADECUADA.
14	15.3	45	5.5	0	*FLUJO ALTO. *TEMPERATURA MUY ALTA.
15	1.50	35	6.3	0.01	*NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO. *FLUJO MUY PEQUENO.
16	1.50	40	6.3	0.01	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
17	1.50	45	6.3	0.01	*NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO. *FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA MUY ALTA.
19	1.50	40	6.3	0.001	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
20	1.50	45	6.3	0.001	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA MUY ALTA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
23	0.14	45	6.3	0.01	*FLUJO BAJO. *TEMPERATURA MUY ALTA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
29	1.50	40	5.5	0.01	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
32	0.14	40	5.5	0.01	*FLUJO BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
35	1.50	40	5.5	0.001	*FLUJO MUY BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.
38	0.14	40	5.5	0.001	*FLUJO BAJO. *TEMPERATURA ADECUADA. *NECESIDAD DE AGREGAR POTASIO.

En el cuadro anterior se pueden observar las condiciones de pH, flujo, temperatura y concentración de iones potasio en las que se obtuvieron hidrólisis del 50% y mayores.

4.3 ELECCION DE CONDICIONES PARA EL PRE-DISEÑO:

Analizando la tabla anterior, se eligieron las condiciones de proceso de la prueba número 13 para realizar el pre-diseño del reactor enzimático. Esta selección se debe a que primeramente el flujo que maneja es el más elevado (15.3 l/hr.); además la temperatura de operación (40°C) no afecta la vida útil de la enzima y que hace innecesaria la adición de iones potasio, lo cual evita el tener que invertir en un ingrediente más y tener otro paso en la operación. Por último el pH que se maneja (5.5) es el pH promedio de el suero ácido, lo cual evita tener que hacer un ajuste previo de pH.

CAPITULO 5

PRE-DISEÑO DEL REACTOR ENZIMÁTICO

5.1 INTRODUCCION:

El escalamiento es uno de los procesos más importantes, no sólo en la industria bioquímica, sino en toda la industria de la transformación en general.'''

Las etapas para llevar a cabo un escalamiento son:

5.1.1 Nivel laboratorio.

5.1.2 Planta piloto.

5.1.3 Nivel industrial.

5.1.1 Nivel laboratorio.-Por lo general en el laboratorio se opera con matraces agitados de 500 ml o pequeños fermentadores (20 lt), donde se establecen las variables cinéticas del proceso y se mejoran las cepas de producción.

5.1.2 Planta piloto.- Dentro de esta etapa se manejan volúmenes

desde 5 hasta 500 l, y además se busca alcanzar los siguientes

objetivos: """"

- Desarrollo del proceso.- Aquí es importante comenzar a utilizar la materia prima que se emplea a nivel industrial para observar los resultados esperados y no utilizar los reactivos de laboratorio empleados en la etapa anterior.

- Obtención de muestras para análisis de mercado y nuevos ingredientes.

- Establecer las condiciones de proceso, optimizar los costos de operación y prevenir riesgos asociados con el proceso.

- Poner a prueba nuevas formulaciones, con materia prima similar pero más económica.

- Es ideal para entrenar al personal que estará a cargo de la planta industrial.

- En algunos casos es conveniente que la planta piloto, tenga la capacidad, con pocas modificaciones de ser utilizada a nivel industrial.

5.1.3 Nivel industrial- Se manejan volúmenes de 500 a 400 000 litros y ya se tiene como objetivo una productividad. Cuando el escalamiento de un proceso sigue las etapas anteriormente descritas en ese orden, se le conoce como "escalamiento hacia arriba". Puede darse el caso que el escalamiento se haga en sentido inverso "escalamiento hacia abajo " .""En el proceso de escalamiento podemos tener las siguientes condiciones:

- un proceso nuevo y planta nueva,
- un proceso nuevo equipo existente,

- modificación del equipo existente para lograr una mejora en el proceso.

5.2 DISEÑO DEL REACTOR CON ENZIMA INMOVILIZADA:

De los datos obtenidos en la parte experimental de este trabajo y respetando la geometría del reactor podemos aplicar la ecuación matemática ^{“(1)”} de escalamiento teniendo:

$$Z/Q = dC/Rv(C) = -1/m \quad dC/R(C) \quad (1)$$

$$Q = 0.0153 \text{ m}^3/\text{H} / 0.0078 \text{ m}^2 = 1.9615 \text{ m/H} \quad (2)$$

$$Z = 0.018 \text{ m} \quad (3)$$

$$Z/Q = 0.091 \text{ H} \quad (4)$$

De los datos de geometría del reactor planta piloto se tiene que:

$$L/D = 7 \quad (5)$$

$$D = L/7 \quad (6)$$

De la fórmula de área transversal de un cilindro se tiene:

$$A = D^2 \cdot \pi / 4 \quad (7)$$

Sustituyendo 1 en 2 tenemos que:

$$A = L^2 / 196 \cdot \pi \quad (8)$$

F = Flujo de escalamiento

$$Q = F/A = F \cdot 196 / L^2 \cdot \pi \quad (9)$$

ENTONCES:

$$Z/Q = Z \cdot L^2 \cdot \pi / F \cdot 196 \quad (10)$$

De la geometría del reactor se tiene la siguiente relación de longitud con respecto a la altura del lecho:

$$L = 3.88 \cdot Z \quad (11)$$

SUSTITUYENDO 11 EN 10 TENEMOS QUE:

$$Z/Q = (Z) (3.88 \cdot Z)^2 (\pi) / F (196) \quad (12)$$

SIMPLIFICANDO

$$Z/Q = Z^3 / F \cdot 0.242 \quad (13)$$

SUSTITUYENDO 4 EN 13

$$0.91 = Z^3 / F \cdot 0.242 \quad (14)$$

SACANDO RAÍZ CÚBICA Y DESPEJANDO Z:

$$Z = (0.91 * F / 0.242)^{1/3} \quad (15)$$

Una vez obtenidas estas ecuaciones se procede a fijar el flujo con el cual se desea trabajar para hacer el escalamiento, en este caso se propone un flujo de 20,000 l/día.

La línea de hidrólisis de suero trabajará por espacio de 20 horas en forma continua, destinando 4 horas para su limpieza.

4.3 DIMENSIONES DEL REACTOR

Para asegurar un proceso continuo de hidrólisis, es recomendable trabajar con más de un reactor. Esto se debe a que en caso de presentarse algún problema (contaminación de la enzima) no se pierda la continuidad del proceso.

Con la ecuación (13) se realizan diferentes iteraciones para

obtener las dimensiones tanto del reactor como la altura del lecho de enzima inmovilizada para el flujo dado.

Utilizando el procedimiento anterior se obtuvieron las dimensiones para un reactor como se puede observar en la fig 6.

Altura del lecho = 1.554 m

Altura del reactor = 6.03 m

Díámetro = 0.86 m

Para obtener la cantidad necesaria de enzima se considera el volumen de lecho de la misma en el reactor, así como su densidad.

Densidad de la enzima^{'''} = 707.355 Kg/m³

Volumen del lecho = 0.580 m³

Cantidad de enzima = 410 Kg/reactor.

CONCLUSIONES

- Como se puede observar en la tabla 3 de resultados experimentales, las condiciones de operación del reactor y las características del suero influyen en el porcentaje de hidrólisis obtenido, variando éste desde el 17.3 hasta 79.01 %.

- De las corridas realizadas se resaltan las 15 pruebas donde se obtuvieron resultados de hidrólisis cercana al 50% o mayores. Para poder realizar un escalamiento se concluye que las mejores condiciones se presentan en la prueba No. 13 debido a:

Prueba No. 03.- Tiene una buena hidrólisis, pero el flujo que maneja es muy bajo y la temperatura puede acortar la vida de la enzima.

Prueba No. 09.- Al igual que la anterior, el flujo que maneja es muy pequeño, sin embargo, la temperatura es la ideal.

Prueba No. 12.- Aunque la temperatura es la ideal y el flujo es mas grande que las anteriores, este último no es lo

suficientemente alto.

Prueba No. 13.- En este caso la temperatura es la óptima y el flujo es el máximo alcanzado en la bomba.

Prueba No. 14.- En este caso las condiciones de flujo son las mejores, más no así las de temperatura que son elevadas trayendo consigo el problema antes descrito.

Prueba No. 15.- En este caso la temperatura manejada es baja, pero el flujo lo es también, además existe la necesidad de agregar iones potasio al suero, lo cual implica otro paso en la operación además de un gasto en reactivo.

Prueba No. 16.- Aunque aquí la hidrólisis obtenida es bastante elevada, el flujo es muy bajo es necesario agregar iones potasio.

Prueba No. 17.- Bajo estas condiciones se obtuvo el mayor grado de hidrólisis durante el experimento, pero las condiciones a las que se alcanzó fueron a una temperatura muy elevada, flujo muy pequeño y agregando iones potasio.

Prueba No. 19.- La temperatura es adecuada pero el flujo es

muy pequeño y es necesario agregar iones potasio.

Prueba No. 20.- La hidrólisis obtenida es alta, pero el flujo es muy pequeño, la temperatura es alta y hay la necesidad de agregar potasio.

Prueba No. 23.- El flujo es pequeño, la temperatura es alta y es necesario agregar potasio.

Prueba No. 29.- Es una hidrólisis alta, el flujo es muy pequeño y hay que agregar iones potasio.

Prueba No. 32.- Aunque la temperatura es la adecuada, el flujo que se maneja es pequeño y es necesario agregar iones potasio.

Prueba No. 35.- El grado de hidrólisis obtenido es elevado pero el flujo es muy pequeño y hay que agregar iones potasio.

Prueba No. 38.- En este caso también se obtuvo un alto grado de hidrólisis pero el flujo es pequeño y hay que agregar iones potasio.

- A partir de las relaciones geométricas de un reactor de planta piloto, se puede desarrollar un pre-diseño para el escalamiento empírico obteniendo la siguiente ecuación:

$$Z = (0.91 * F / 0.242)^{1/3}$$

- La ecuación anterior permite dimensionar un reactor con la altura de lecho adecuada para tratar según el efluente de cada planta.

- Consideramos que esta tecnología representa realmente una solución para el problema que representan las descargas para las industrias productoras de queso y además se pueden lograr ingresos por la venta del suero tratado por este método ya que aumenta su valor agregado.

APENDICE

METODOS DE CUANTIFICACION DE LA

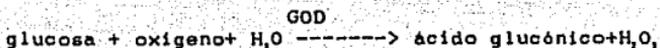
HIDROLISIS

A1 CUANTIFICACION DE LA HIDROLISIS ""

Para cuantificar el grado de hidrólisis es necesario evaluar la cantidad de glucosa libre que hay en la muestra después del tratamiento enzimático. Para llevar a cabo esto se encuentran los siguientes métodos:

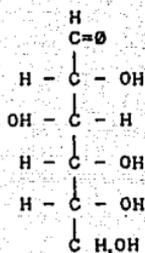
- a - Glucosa oxidasa
- b - Somogy-Nelson
- c - Punto crioscópico
- d - Glucosa deshidrogenasa
- e - Tiras reactivas para el análisis de glucosa

a) Glucosa oxidasa: Fundamento.- La glucosa oxidasa (B-D-glucosa; oxígeno-l-oxidorreductasa (GOD)), cataliza la oxidación de la glucosa según la ecuación siguiente:

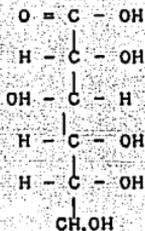


El peróxido de hidrógeno formado en este ejemplo reacciona en presencia de la peroxidasa (donador: hidrógeno-peróxido oxidoreductasa) (POD) con 4-aminoapirina y con 2-4 diclorofenol. Por copulación oxidante se forma antipirilpuinoninina fija. La cantidad de colorante formado es proporcional a la concentración de glucosa, y se lee en el espectrofotómetro a 510 nm.

b) Somoggi-Nelson: Fundamento.- Al hacer reaccionar un azúcar reductor, en este caso la glucosa, con hidróxido cúprico (sulfato de cobre+hidróxido de potasio) se forma óxido cúprico de color rojo. La base es la donación de electrones del reductante (que se oxida simultáneamente) al ión oxidado Cu^{II} que se transforma en ión Cu^I .



Azúcar reductor



Azúcar ácido

La reacción no es estequiométrica, pero es reproducible si se conservan constantes los reactivos y el tiempo de calentamiento. El óxido cúprico precipitado insoluble, no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con reactivo arsenozo-líbico que es reducido a ión verdoso que se mide en el espectrofotómetro.

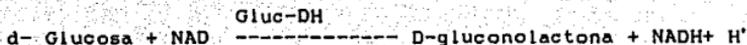
En este método el factor limitante es el agente reductor (glucosa) estando los reactivos en exceso por lo que puede usarse para medir la cantidad de $\text{Cu}^{\text{I}}\text{O}$ que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente.

c) **Punto crioscópico: Fundamento.**- El suero presenta un punto de congelación más bajo que el del agua destilada, debido principalmente a sus minerales disueltos y a su contenido de lactosa.

Por medio del punto de congelación se determinará la concentración de las soluciones, esto es, se medirá la cantidad de disolvente en una solución, en este caso el suero. Durante la hidrólisis de la lactosa, ésta se parte en dos moléculas, una D-glucosa y una D-galactosa, esta hidrólisis va acompañada por el descenso correspondiente del punto de congelación de esta solución.

d) **Método glucosa deshidrogenasa :** Fundamento.- Durante la hidrólisis de la lactosa, ésta se divide en dos monómeros (glucosa y galactosa). Mediante este método se cuantifica la glucosa producida durante la hidrólisis.

La glucosa deshidrogenasa (GLUC-DH) cataliza la oxidación de la glucosa, según la siguiente ecuación:



La adición de mutarrotasa (aldosa - l epimerasa), acelera la reacción. La cantidad de NADH es proporcional a la concentración de glucosa.

e) Tiras reactivas para el análisis de glucosa:

- Prepare 1 a 5 ml de soluciones de glucosa con agua destilada, siendo de 0.01%, 0.012, 0.014, 0.016, 0.018, 0.020, 0.024%
- El suero hidrolizado que va a ser analizado se diluye 1:100. En el caso de suero completamente hidrolizado se obtiene cerca de 0.02% de solución glucosa.
- Introduzca la tira reactiva. Compare el color supuesto por la muestra con el de las sustancias ya calibradas. La precisión puede ser de 10% grados de hidrólisis.

De los métodos anteriores, el más conveniente para la determinación del grado de hidrólisis es el de Glucosa deshidrogenasa, sobre todo por su exactitud, precisión y repetibilidad.

AZ METODO UTILIZADO (GLUCOSA DESHIDROGENASA)''''

Material: Las cantidades varían según el número de muestras

Pipetas de 1 ml.

Pipetas de 10 ml.

Matraces aforados de 100 ml.

Tubos de ensayo de 10 ml.

Baño maría

Vasos de precipitados.

Piseta.

Equipo

Balanza analítica

Centrifuga clínica

Espectrofotómetro Beckman DU - 50

Reactivos

- a) Solución desproteinizante 0.33 M de Cl_2
- b) Solución reactiva 0.12 M de amortiguador de fosfatos con un Ph 7.6; 0.15 M de cloruro sódico; 10 kU/l Gluc-dH; 0.21 kU/l de mutarrotasa;
0.22 mm de NAD. Mercktest 14335 Glucose
- c) glucosa anhidra y lactosa anhidra

Procedimiento

Preparación de la solución patrón glucosa-lactosa.

- a) Pesar 4.13 gr. de lactosa anhidra y 2.12 de glucosa anhidra, aforando cada uno a 100 ml. con agua destilada.

Solución patrón

% de hidrólisis	ml. sol. gluc	ml. sol. lact.	ml. agua
20	0.2	0.8	9
40	0.4	0.6	9
60	0.6	0.4	9
80	0.8	0.2	9
100	1.0	0	9

b) Tomar 1 ml. de cada uno de los patrones y agregar un mililitro de solución desproteinizante.

c) Tomar 2 ml. de la solución reactiva. Hacer por duplicado.

d) Mezclar e incubar a 15-25.

Temperatura 20°C a 25°C 37°C

Tiempo 10 - 60 min. 8 - 30 min.

e) Leer en el espectrofotómetro ajustando con el blanco.

Preparación de la muestra

- a) Pesar aproximadamente 1 gr. de la muestra (suero hidrólizado) aforar a 100 ml.
- b) Tomar 0.1 ml. y agregar 1 ml. de la solución desproteinizante.
- c) Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
- d) Tomar 0.2 ml. y agregar 2 ml. de la solución reactiva.
- e) Incubar a las temperaturas anteriormente mencionadas.
- f) Leer a 340 nm, ajustando con un blanco preparado con 0.4 ml. de la solución desproteinizante y 4 ml. de solución reactiva.

CURVA DE CALIBRACION

HIDROLISIS	ABSORBANCIA
20	0.16
40	0.2925
60	0.4060
80	0.5405
100	0.7230

Con los datos anteriores se tiene que:

Pendiente 0.687

Ordenada al origen 0.0122

Factor de correlación 0.996

% Hidrólisis = $(\text{absorbancia} - 0.0122) / (0.687)$

GLOSARIO DE TERMINOS

CAPITULO 1

E= enzima

S= sustrato

ES= complejo enzima sustrato

P= producto

V_0 = Velocidad de reacción

K= constante de velocidad

K= constante de Michaelis Menten

CAPITULO 2

S_0 = concentración inicial de sustrato

V_{max} = velocidad inicial máxima

X_s = fracción de sustrato

CAPITULO 5

Z= altura del lecho de enzima

\dot{Q} = gasto óptimo / area de flujo

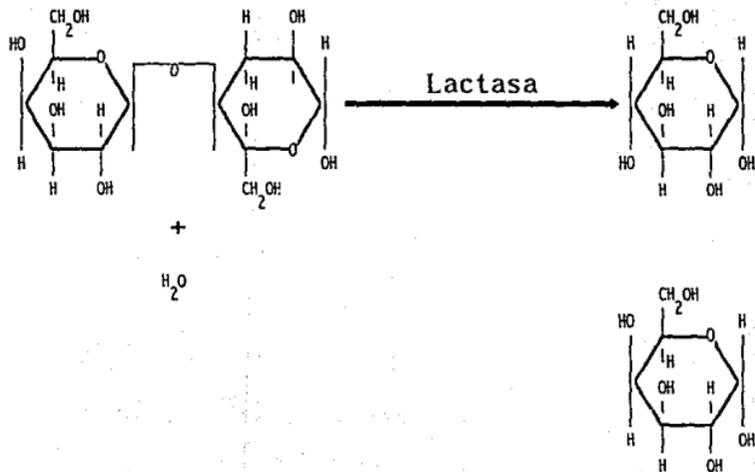
L= longitud del tubo del reactor

D= diámetro del reactor

A= area transversal del tubo del reactor

F= flujo de escalamiento

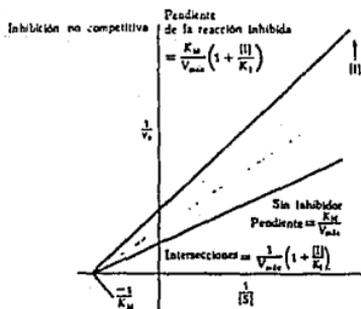
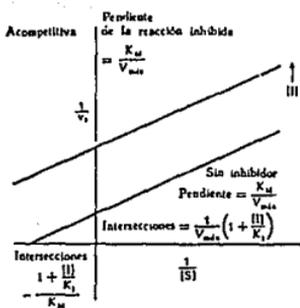
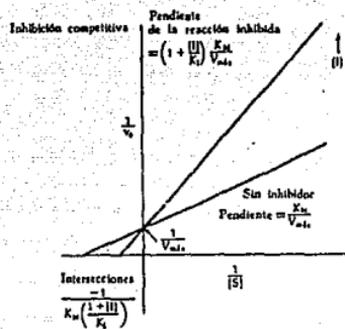
GRAFICAS Y FIGURAS



Lactosa y agua

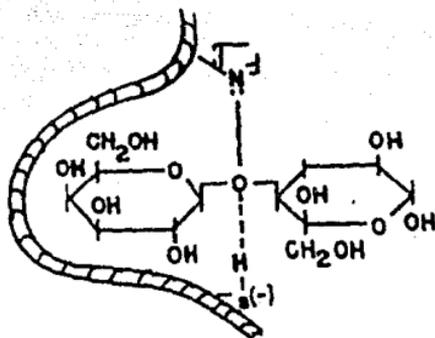
Glucosa y Galactosa

fig 1

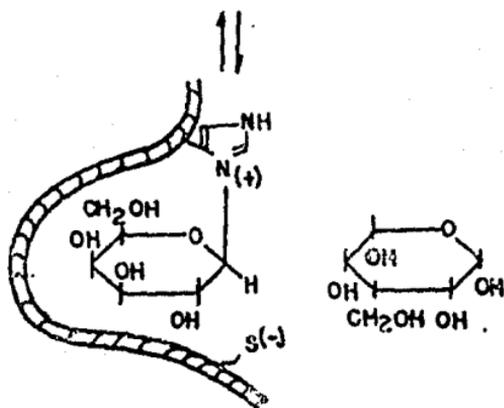


graficas 1,2 y 3

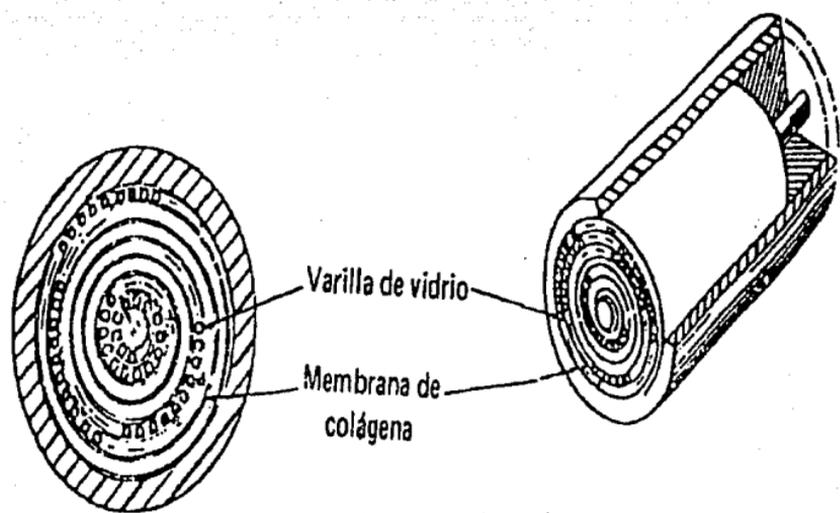
fig. 2



Molécula de 4-O β galactopiranosil
D-glucopiranososa en el sitio activo de la
enzima β -galactosidasa

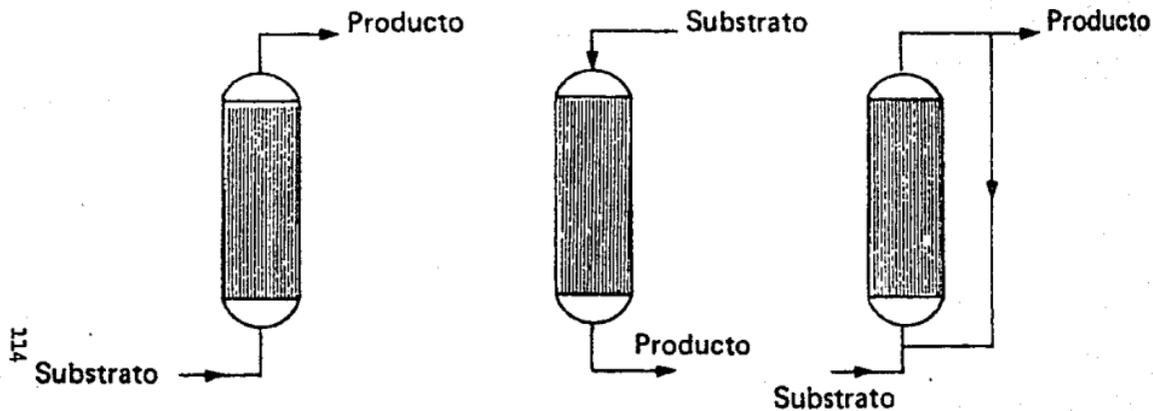


Complejo β -galactosidasa-galactosa + glucosa



Corte transversal de un reactor de membrana

fig. 3



Diferentes tipos de alimentación.
fig. 4

NOMENCLATURA

- R= REACTOR
 H= INTERCAMBIADOR DE CALOR
 P= BOMBA
 S= TANQUE DE SOLUCION DESINFECTANTE
 W= ENTRADA DE AGUA
 1-7= VALVULAS

Sentido de las válvulas para cada operación.

	NUMERO DE VALVULA						
	1	2	3	4	5	6	7
1- Condiciones estables							
2- Hidrolisis							
3- Enjuague							
4- Limpieza							
5- Contraflujo							

* NOTA.- CUANDO SE INYECTA AIRE AL SISTEMA, SE DEBE DETENER LA BOMBA POR COMPLETO Y LIBERAR LA MANGUERA DE LA MISMA.

Figura 5a

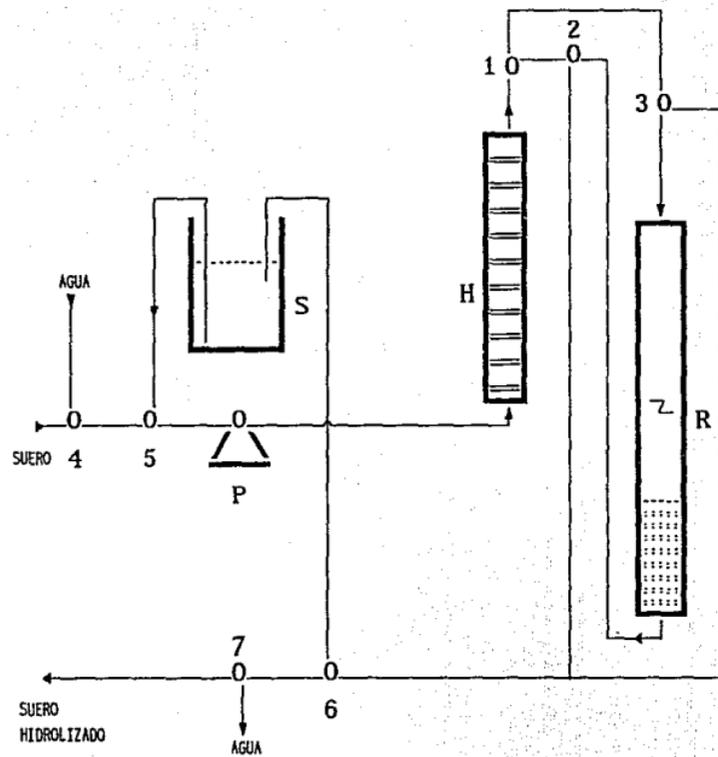
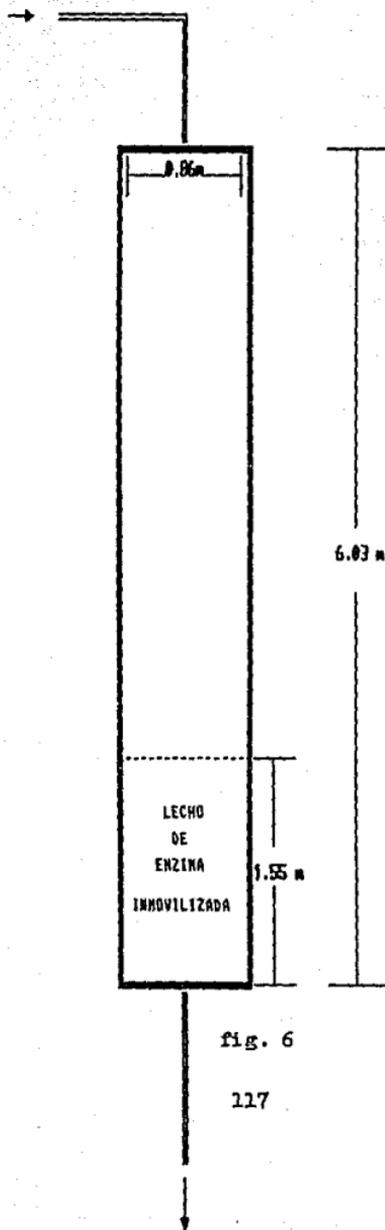


Figura 5b

REACTOR
DE
ENZIMA
INMOVILIZADA



BIBLIOGRAFIA

- I Lactofruit a New Soft Drink?
Food Engineering International.
Agosto 1978, Pag. 10-12.
- II New Use For Whey.
Food Manufacture.
Agosto 1986, Pag. 43-45.
- III Enzyme Break Through in UK.
Food Engineering International.
Octubre 1985.
- IV Sweeteners From Whey.
Food Technology in New Zealand.
Junio 1982, Pag. 33.

- V The effect of partial replacement of sucrose by hidrozod whey
lactose on the quality of canned peaches and pears.

Food Technology in Australia.

Abril 1976, Pag. 128-131.

- VI Albert Lehninger.

Principios de Bioquímica.

Ed. Omega.

España 1984.

Pags. 207-212.

- VII Ichiro Chibata.

Inmobilized Enzymes Research and Development.

J. Wiley and sons.

1978 U.S.A.

pp 1-18.

VIII Albert Lehninger Omega.

Bioquímica.

Ed. Omega.

1985 España.

pp. 185-207.

IX Pérez Gavilán Jorge

Bioquímica y Microbiología de la leche

Ed. Limusa.

México 1986.

X Miller J.J. / Brand J.C.

Enzymic Lactose Hidrolisis

Food Technology in Australia.

Vol. 32 (3).

Marzo 1980.

pp. 144-147.

XI RöHM

Enzyme Technology.

Lactase Preparation 7028 p - 935 - 04 - 1.

Mayo 1986 Alemania.

XII Pitcher Waynett

Immobilized Enzymes For Food Processing

Ed. CRC PRESS INC. U.S.A. 1980.

pag. 1-55.

XIII Anuario 1990.

Camara de Productos Elaborados Con Leche.

Datos Estadisticos 1990.

XIV Robert Perry Chilton.

Manual del Ingeniero Quimico.

McGraw Hill.

México 1982.

Sección 20-80.

XV Larios Quintero Rebeca

Métodos de Cuantificación de Glucosa

Universidad La Salle (tesis)

México 1987.

XVI Método para la cuantificación de la lactosa por medio de la
glucosa deshidrogenasa.

Merkotest.

Merck México.

XVII Scriban, Rene.

Biotecnología

Editorial el Manual Moderno.

México 1985.

págs. 369-378.

XVIII B. Atkinson.

Reactores Bioquímicos

Ed. Reverté.

México 1986.

págs. 211-233

XIX Hasselberger, Francis.

Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes

Nelson Hall.

Chicago 1978.

pág. 81-86.

XX Wang/Cooney/Demain.

Fermentation and Scale Up Technology.

John Wiley & Sons.

U.S.A. 1979

pág. 194-211

XXI Quintero Ramírez, Rodolfo.

Ingeniería Bioquímica

Alhambra Mexicana.

México 1990.

págs. 97-98.

XXII Hamilton/Jeffrey/Schruben & Montgomery

Biochemical Engineering

págs 322-323

XXIII Curso "Tratamiento de Aguas Residuales Industriales"

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Azcapotzalco

Abril 1992

XXIV Norma técnica ecológica

NTE-CCA-009/88.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología

23/09/1988.

XXV Inmobilized enzymes

Research and development

John Wiley & Sons.

New York, NY. 1978.