



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**DEGRADACIÓN DE LIMONINA POR CÉLULAS DE
Rhodococcus fascians INMOVILIZADAS POR
ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE ALCOHOL
POLIVINÍLICO Y PERLAS HUECAS DE ALGINATO
DE CALCIO. APLICACIÓN EN ZUMOS**

Tesis Doctoral presentada por

MARÍA LÓPEZ FOUZ



Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dña. M^a DOLORES BUSTO NÚÑEZ, PROFESORA TITULAR, Y D. MANUEL PÉREZ MATEOS, CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

INFORMAN:

Que el proyecto de investigación titulado: “DEGRADACIÓN DE LIMONINA POR CÉLULAS DE *Rhodococcus fascians* INMOVILIZADAS POR ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE ALCOHOL POLIVINÍLICO Y PERLAS HUECAS DE ALGINATO DE CALCIO. APLICACIÓN EN ZUMOS” ha sido realizado por Dña. MARÍA LÓPEZ FOUZ bajo su dirección.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis Doctoral, expresan su conformidad con dicha presentación.

En Burgos a 30 de Octubre de 2015

Fdo: Dra. M^a Dolores Busto Núñez

Fdo: Dr. Manuel Pérez Mateos



Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dña. PILAR MUÑIZ RODRÍGUEZ, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Degradación de limonina por células de *Rhodococcus fascians* inmovilizadas por atrapamiento en criogel de alcohol polivinílico y perlas huecas de alginato de calcio. Aplicación en zumos” presentada por Dña. María López Fouz para optar al grado de Doctora por la Universidad de Burgos ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de este Departamento bajo la dirección de los doctores, M^a Dolores Busto Núñez y Manuel Pérez Mateos.

Y para que conste, firmo el presente certificado,

En Burgos a 30 de Septiembre de 2015

Fdo. Pilar Muñiz Rodríguez

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento:

A mis directores de proyecto, la Dra. M^a Dolores Busto Núñez y el Dr. Manuel Pérez Mateos, por la planificación y orientación de este trabajo.

Al resto de profesores y personal del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos, por su ayuda y colaboración.

A todos mis compañeros de laboratorio, quienes han hecho que todo el trabajo sea más fácil, por su apoyo, amistad y por los buenos ratos que hemos compartido ¡Muchas gracias por esos cafés!.

A todos aquellos, que sin haber sido mencionados, han colaborado para que este trabajo viera la luz.

*Y finalmente, a mi familia, especialmente a mis padres a quien debo todo lo que soy, a mi hermana por que se que está siempre a mi lado y a Pedro, por preocuparse de todo lo que hago, su apoyo y comprensión que han facilitado la conclusión de este trabajo. Y sobre todo a mis hijas, Iria y Elsa por el tiempo que he dejado de pasar con ellas. A todos vosotros **Os quiero.***

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	15
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	21
2.1. LIMONOIDES – BASES BIOQUÍMICAS DEL AMARGOR O “DELAYED BITTERNES”	23
2.1.1. Estructura y propiedades de los limonoides.....	25
2.1.1.1. Estructura química y localización en la planta	25
2.1.1.2. Propiedades de los limonoides. Bioactividad	28
2.1.2. BIOQUÍMICA DE LIMONOIDES	31
2.1.2.1. Biosíntesis de limonoides en cítricos. Grupo de la limonina.....	31
2.1.2.2. Glucosidación de limonoides. Proceso natural de desamargado	34
2.1.2.3. Bases bioquímicas y estructurales del desarrollo del amargor retardado o “delayed bitterness” en zumos de cítricos.....	35
2.1.3. BIODEGRADACIÓN DE LIMONINA POR MICROORGANISMOS.....	36
2.2. DESAMARGADO DE ZUMOS DE CÍTRICOS. PROCESOS FÍSICO-QUÍMICOS Y BIOTECNOLÓGICOS.....	41
2.2.1. Procesos de separación físico-químicos.....	46
2.2.2. Procedimientos biotecnológicos	48
2.3. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS	53
2.3.1. Fundamentos de la inmovilización celular	55
2.3.2. Principales técnicas de inmovilización de células	56
2.3.3. Inmovilización por atrapamiento	61
2.3.3.1. Inmovilización en geles de alcohol polivinílico.....	63
2.3.3.2. Encapsulación en geles de alginato de calcio (hollow-beads).....	67
2.3.4. Efecto de la inmovilización sobre las células bacterianas	71
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
3.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LIMONINA.....	77
3.1.1. Medios de cultivo generales	80
3.1.1.1. Composición y preparación de los medios de cultivo líquidos.....	80
3.1.1.2. Preparación de los medios de cultivo sólidos	80
3.1.2. Ensayo de la tolerancia y acondicionamiento de microorganismos a limonoides	81
3.1.2.1. Preparación y caracterización de extractos de cáscara de naranja	82
3.1.2.2. Tolerancia de <i>Rhodococcus fascians</i> y <i>Microbacterium flavescens</i> al extracto de cáscara de naranja.....	83
3.1.2.3. Acondicionamiento de los microorganismos al extracto de cáscara de naranja	83
3.1.2.4. Tolerancia de los microorganismos a la limonina	84
3.1.3. Cinética de crecimiento microbiano	86

3.2. INMOVILIZACIÓN DE <i>R. fascians</i> POR ATRAPAMIENTO EN MATRICES POLIMÉRICAS	87
3.2.1. Atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico.....	89
3.2.1.1. Reactivos.....	89
3.2.1.2. Protocolo experimental	89
3.2.2. Atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico-polietilenglicol	91
3.2.2.1. Reactivos.....	91
3.2.2.2. Protocolo experimental	91
3.2.3. Atrapamiento por microencapsulación en perlas huecas (“hollow-beads”) de alginato de calcio.....	93
3.2.3.1. Reactivos.....	93
3.2.3.2. Protocolo experimental	93
3.2.4. Estabilidad operacional de los inmovilizados	94
3.3. APLICACIÓN DE LOS INMOVILIZADOS EN ZUMOS	95
3.3.1. Estabilidad de los inmovilizados en zumo sintético.....	97
3.3.2. Degradación de limonina en zumo sintético	98
3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	101
3.4.1. Determinación cuantitativa de limonina y contenido en limonoides	103
3.4.1.1. Reactivos.....	103
3.4.1.2. Protocolo experimental	103
3.4.1.3. Curva de calibrado	103
3.4.2. Caracterización del extracto de cáscara de naranja y zumo de naranja natural	105
3.4.2.1. Determinación de la acidez titulable	105
3.4.2.2. Determinación del pH y sólidos solubles (°brix)	105
3.4.2.3. Determinación del color y la turbidez.....	105
3.4.2.4. Determinación cuantitativa de proteínas.....	106
3.4.2.4.1. Reactivos.....	106
3.4.2.4.2. Protocolo experimental	106
3.4.2.4.3. Curva de calibrado	106
3.4.2.5. Ensayo de azúcares reductores.....	107
3.4.2.5.1. Reactivos.....	107
3.4.2.5.2. Protocolo experimental	108
3.4.2.5.3. Curva de calibrado	108
3.4.2.6. Determinación cuantitativa de limonina en zumos naturales de naranja	109
3.4.2.6.1. Reactivos.....	109
3.4.2.6.2. Protocolo experimental	109
3.4.2.6.3. Curva de calibrado	109

3.4.2.7. Determinación cuantitativa de flavonoides totales	110
3.4.2.7.1. Reactivos.....	110
3.4.2.7.2. Protocolo experimental	111
3.4.2.7.3. Curva de calibrado	111
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	117
4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA ACTIVA EN ENZIMAS QUE DEGRADAN LIMONINA.....	119
4.1.1. Estudios de tolerancia y acondicionamiento de microorganismos a limonoides	121
4.1.1.1. Tolerancia a medios de cultivo suplementados con extracto de cáscara de naranja	122
4.1.1.2. Acondicionamiento microbiano al extracto de cáscara de naranja	126
4.1.1.3. Tolerancia de las cepas acondicionadas de <i>R. fascians</i> y <i>M. flavescens</i> a limonina purificada	128
4.1.2. Degradación de limonina y cinética de crecimiento de la cepa acondicionada de <i>R. fascians</i>	131
4.2. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS ACONDICIONADAS DE <i>R. fascians</i> NRRL-B-15096 POR ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES Y ENCAPSULACIÓN.....	135
4.2.1. Inmovilización de <i>R. fascians</i> en criogeles de alcohol polivinílico (PVA)	138
4.2.1.1. Optimización del proceso de inmovilización en criogeles.	138
4.2.1.2. Estabilidad operacional en sistemas modelo	145
4.2.2. Inmovilización de <i>R. fascians</i> por encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio (“hollow-beads”).....	152
4.2.2.1. Optimización del proceso de inmovilización en perlas huecas de alginato de calcio	152
4.2.2.2. Estabilidad operacional en sistemas modelo	161
4.3. DESAMARGADO DE ZUMOS POR <i>R. fascians</i> INMOVILIZADO POR ATRAPAMIENTO.....	165
4.3.1. Degradación de limonina en zumo sintético por <i>R. fascians</i> inmovilizado en criogeles de PVA-PEG	168
4.3.2. Degradación de limonina en zumo sintético por <i>R. fascians</i> inmovilizado en perlas huecas.....	181
4.3.3. Desamargado de zumo natural de naranja por <i>R. fascians</i> inmovilizado por atrapamiento	186
5. BIBLIOGRAFÍA.....	193
6. CONCLUSIONES.....	215
7. ANEXOS	221

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción mundial de frutas cítricas supera los 100 millones de Tm anuales de las que una parte importante se deriva de la obtención de productos procesados como zumos, concentrados, bebidas cítricas aromatizadas y otros productos alimenticios. La Asociación Europea de Productores de Zumos (European Fruit Juice Association (2015)), en su informe sobre el consumo de zumo de fruta y néctares en la Unión Europea, recoge un volumen de producción de 9.702 millones de litros. Un 25,8% del consumo se produce en Alemania, (un cuarto del total), seguido de Francia, Reino Unido y España con el 38,3%. A nivel mundial, el consumo de zumo de fruta y néctar ha crecido en los últimos diez años, ascendiendo a 38.653 millones de litros en el año 2014, debido principalmente al incremento de la renta y del consumo de las clases medias en los países en desarrollo. Del análisis de la composición del mercado por tipos de productos, destacan los zumos con el 64% del total y los néctares el 36% restante, y de éstos, el 90% son de concentrados. Por variedades, el zumo de naranja sigue liderando el mercado, con el 38,8% del total y una evolución que sigue al alza.

Las industrias dedicadas a la elaboración de zumos de frutas se enfrentan a diversos problemas derivados de la composición natural de la materia prima que emplean. En estas industrias mantener la calidad del zumo depende en gran medida del conocimiento de la composición, variedad, madurez del fruto, y condiciones de almacenamiento del zumo. En las industrias de cítricos, la presencia de componentes naturales o resultantes del procesado, como flavanonas neohesperidósidos presentes en pomelo y limonoides presentes en naranja, pomelo o limón, provocan la aparición de intensos sabores amargos en los zumos. En concreto, en los productos a base de estos frutos, como zumo natural, zumo concentrado o puré de cítricos, la presencia de limonoides, como la limonina, pueden otorgar sabores extremadamente amargos, lo que origina problemas económicos e industriales relacionados con la importante reducción del valor de mercado y la incorporación de tecnologías adicionales para reducir o eliminar el compuesto amargo.

En el ámbito industrial se utilizan diversas estrategias para lograr niveles aceptables de limonoides en el zumo, como la reducción de la presión de extracción, el empleo de frutos más maduros, el aumento del pH o la aplicación de diferentes polímeros sintéticos. Estos últimos, los métodos físicos, son los más ampliamente utilizados y se basan en la adsorción específica del compuesto amargo a polímeros sintéticos de diversa naturaleza, tales como resinas de intercambio iónico, carbón activo, poliamidas o polímeros de Nylon. No obstante, las técnicas de adsorción presentan limitaciones, ya que los adsorbentes utilizados pueden alterar la

composición y la calidad del zumo (reacciones químicas directas, eliminación de nutrientes y componentes bioactivos, aromas, color, etc.), requieren la separación previa del zumo y de la pulpa, y/o disminuyen el rendimiento final.

Frente a estas limitaciones, el uso de biocatalizadores (microorganismos, enzimas...) representa una alternativa de especial interés en la hidrólisis de la limonina ya que se podría realizar un tratamiento del zumo sin separación de la pulpa, no se generan reacciones colaterales y tampoco se produciría contaminación medioambiental, características que resultan muy deseables en un flujo industrial.

La conversión bioquímica de los limonoides de cítricos fue estudiada primeramente en células microbianas. Las cepas de *Rhodococcus fascians* son las más estudiadas por tener la capacidad de producir de manera constitutiva la enzima limonoato deshidrogenasa, el resto de los microorganismos referenciados, hasta el momento, requieren la presencia de un inductor sin el cual no sintetizan enzimas capaces de metabolizar los limonoides. Un inconveniente es que esta enzima, limonoato deshidrogenasa, no es estable en medios ácidos, y precisa de NAD⁺ como coenzima lo que reduce en gran medida su aplicación directa como biocatalizador por lo que se precisa de la aplicación del microorganismo completo.

Cuando se plantea el uso de un biocatalizador resulta especialmente interesante el que pueda ser recuperado y reutilizado al final del proceso, que se pueda aplicar en procesos continuos y que tenga estabilidad operacional y larga vida, características que no se dan en las células libres y que pueden conseguirse si se somete al biocatalizador a un proceso de inmovilización. De hecho, la inmovilización de microorganismos en soportes adecuados presenta numerosas ventajas en cuanto a control y eficacia del sistema en procesos industriales y aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Sin embargo, a pesar de los estudios publicados, aún no se han establecido métodos de inmovilización ni soportes estándar de manera genérica para diferentes tipos de inmovilización. Todavía sigue siendo necesario estudiar, en cada caso, las características, propiedades y limitaciones concretas de cada aplicación. Hoy en día se reconoce cada vez más la importancia del soporte y del método de inmovilización, porque de ellos depende el microambiente que se genera en torno a las células y determina su efectividad.

En este marco de referencia, se ha planteado en este trabajo de Tesis el acondicionamiento de cepas microbianas que sean activas en la degradación de limonina y la inmovilización de los microorganismos seleccionados en soportes poliméricos, con vistas a conseguir una buena eficacia en la degradación del compuesto amargo y estabilidad operacional del biocatalizador que permitan su aplicación y reutilización en los procesos de desamargado de zumos.

La investigación planteada, por tanto, tiene como **objetivo general**, el desarrollo de un nuevo proceso biotecnológico basado en la inmovilización de biocatalizadores (células microbianas) para la eliminación de limonina que sea una alternativa a los procedimientos químico-físicos de desamargado.

Para la consecución del objetivo general se han abordado y desarrollado los siguientes **objetivos específicos**:

- *Producción de biomasa activa en enzimas que degradan limonina.* Para ello, se procederá al acondicionamiento de dos cepas microbianas (*Rhodococcus fascians* y *Microbacterium flavescens*) con extractos de cáscara de naranja, control de la tolerancia microbiana a limonina purificada y estudio de las cinéticas de crecimiento microbiano y capacidad de degradación de limonina en sistemas modelo.

- *Inmovilización de las células acondicionadas por atrapamiento en matrices poliméricas y estudio de su eficacia en la degradación de limonina.* Se llevará a cabo un estudio comparativo y optimización de dos procedimientos de inmovilización por atrapamiento, en criogeles de alcohol polivinílico y encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio. Se realizará un seguimiento de la degradación de limonina y estabilidad operacional de los distintos inmovilizados en sistemas modelo.

- *Aplicación de los inmovilizados en zumo sintético y zumo natural de naranja.* Se evaluará, en primer lugar, la estabilidad y capacidad de degradación de limonina de los inmovilizados obtenidos en zumo sintético. Por último, se procederá a su aplicación en zumo natural de naranja con evaluación de la estabilidad operacional y de las características físico-químicas del zumo tratado.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

**2.1. LIMONOIDES – BASES BIOQUÍMICAS
DEL AMARGOR O “DELAYED
BITTERNES”**

2.1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS LIMONOIDES

La proporción lipídica de la fruta es normalmente muy baja, del orden de 0,1-0,5% del peso fresco, a excepción de los frutos secos que contienen cantidades importantes de lípidos. La fracción lipídica de las frutas comprende acilglicéridos, glicolípidos, fosfolípidos, carotenoides, triterpenoides y ceras (Belitz y Grosch, 1997). En la fracción de los triterpenoides presentan especial interés los **limonoides**, que se encuentran presentes en los frutos y semillas de la familia de las Rutáceas dentro de la cual se pueden distinguir las especies *Citrus limon* (Limón), *Citrus sinensis* (Naranja), *Citrus reticulata* (Mandarina), *Citrus paradisi* (Pomelo), etc., y la familia de las Meliaceae con especies como *Aglaia odorata* (falsa lima), *Carapa nicaraguensis* (Cedro macho), *Trichilia havenensis* (Naranjillo), etc.

Dentro de la familia Meliaceae han sido aislados de extractos de corteza, hojas, raíces y semillas de *Azadirachta indica* var. *Siamensis* seis nuevos limonoides, 7-benzoil-17-epinimbocinol, 3-acetil-7-tigloilnimbodinina, 1-isovaleroil-1-detigloisalanninolide, 2,3-dihidro-3 α -metoxinimbolide, diacetil-20,21-epoxi-20,22-dihidro-21-dexiisonimbinolide y diacetil-20,21,22,23-tetrahidro-20,22-dihidroxi-21,23-dimetoxinimbina (Manosroi y col., 2014).

2.1.1.1. Estructura química y localización en la planta

Los limonoides son químicamente estructuras triterpenoides tetracíclicas altamente oxigenadas que biosintéticamente han sido clasificados por Hasegawa (2000) en cuatro grupos: limonina, calamina, ichangensina y limonoides 7 α -acetato (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Clasificación biosintética de limonoides de cítricos (Hasegawa, 2000).

<p>Grupo limonina</p> <p>Limonina, nomilina, obacunona, diacetilnomilina, ichangina, desoxilimonina, citrusina, limonol, 7α-obacunol, desoxilimonol, ácido nomilínico, ácido diacetilnominílico, ácido obacunónico, ácido desoxilimonoico, ácido isoobacunónico, ácido epi-isoobacunónico, ácido isolimonoico, ácido 19-hidroxiacetilnominílico, ácido isoobacunónico diosfenol y ácido 17-dihidrolimonoico A-ciclolactona.</p>
<p>Grupo Calamina</p> <p>Calamina, retrocalamina, ciclocalamina, isociclocalamina, metil isoobacunoato diosfenol, 6-ceto-7β-nominol, 6-ceto-7β-diacetilnominol, metil diacetilnomilinate, ácido calamínico, ácido retrocalamínico y ácido ciclocalamínico.</p>
<p>Grupo Ichangensina</p> <p>Ichangensina</p>
<p>Grupo Limonoides 7α-acetato</p> <p>Limonil acetato, 7α-obacunil acetato, 1-(10-19)abeo-obacunona-9(11)-en-7α-il acetato y ácido 1-(10-19)abeo-7α-acetoxi-10β-hidroxiisoobacunoico 3,10-lactona.</p>

Los limonoides presentes en los cítricos se pueden presentar en tres formas químicas diferentes: monolactonas, dilactonas y glucósidos. Como muestra la Tabla 2.2, la acumulación en los distintos tejidos de la planta es diferente en función de la forma química en la que se encuentre el limonoide. Mientras monolactonas, dilactonas y glucósidos se ubican en las semillas maduras, en la cáscara y pulpa de los frutos maduros sólo se encuentran monolactonas y principalmente glucósidos de limonoides.

Tabla 2.2. Limonoides y enzimas implicados en su formación en diferentes tejidos de cítricos (Hasegawa y Miyake., 1996).

<i>Tejidos</i>	<i>Monolactonas</i>	<i>Dilactonas</i>	<i>Glucósidos^a</i>	<i>Enzimas</i>
Tallos	Sí	---	---	E-1, E-2
Hojas	Sí	---	---	E2
Pulpa	Sí	---	Sí	E-2, E-3
Cáscaras	Sí	---	Sí	E-2, E-3
Semillas	Sí	Sí	Sí	E-2, E-3, E-4, E-5

^aSolamente en tejidos maduros

E-1: el grupo de enzimas implicados en la biosíntesis de nomilina a partir de acetato y mevalonato. E-2: enzimas implicados en la biosíntesis de otros limonoides a partir de nomilina. E-3: limonoide UDP-D-glucosiltransferasa. E-4: limonoide D-anillo lactona hidrolasa. E-5: limonoide 17-β-glucopiranosido β-glucosidasa

La proporción entre glucósidos y agliconas en zumo de naranja es aproximadamente 150:1, mientras que la proporción en las semillas maduras es de 1:2. El glucósido de limonina es el más abundante en la cáscara y la pulpa de los frutos, en las semillas es el glucósido de nomilina. También hay una diferencia significativa en la composición de limonoides entre la pulpa y la cáscara, en naranjas Valencia la nomilina y diacetilnomilina están presentes en la pulpa durante las etapas de crecimiento pero en la cáscara la diacetilnomilina no se encuentra presente y la nomilina solamente se detecta en los meses de julio y agosto (Hasegawa, 2000).

La limonina, el primer limonoide conocido, fue aislado como constituyente de cítricos en 1841 (Bernay, 1841), aislado del zumo de naranja en 1938 (Higby, 1938) y confirmado como la principal causa del amargor en zumos de naranja Navel en 1949 (Emerson, 1949). La estructura de este limonoide, determinada por una combinación de métodos de química orgánica y cristalografía de rayos X, permaneció desconocida hasta 1961 (Arnott y col., 1961), se detalla en la Fig. 2.1, y se corresponde con una dilactona triterpenoide que contiene en su

molécula dos anillos lactona (A y D), un grupo epóxido (E), un anillo furano (F), dos anillos dicarbocíclicos (B y C), un éter cíclico (A') y un grupo cetona.

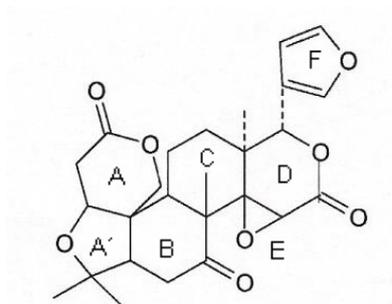


Fig.2.1. Fórmula estructural de la limonina (Seguí y col., 1992).

Es una sustancia de apariencia cristalina de color blanco-amarillento, no soluble en agua y soluble en disolventes orgánicos como dimetilfluoruro (DMF), diclorometano, dioxano y acetonitrilo. Se encuentra en las principales variedades de cítricos como el pomelo, naranja Navel y naranja Shamouthi, este compuesto ha sido uno de los más ampliamente estudiados debido a su abundancia e importancia en los transformados de cítricos como los zumos. Se ha demostrado en numerosos estudios que las hojas de limón (*C. limon*), sintetizan limonina a partir de nomilina y, posteriormente, este compuesto o su precursor no amargo (limonoato A-ciclomonolactona) se transporta a la fruta donde se acumula en las semillas, las membranas carpelares y la medula central (Hasegawa y Hoagland, 1977; McIntosh y col., 1982; Hasegawa y col., 1986; Ronneberg y col., 1995).

Los resultados de los análisis iniciales de los niveles de limonina en los diferentes tejidos de los frutos (Fig. 2.2), mostraron que el contenido más elevado de este compuesto se encuentra en el interior de las semillas seguido de la capa externa de las mismas, el segundo contenido más elevado de limonina se encuentra en el tallo y las hojas (31 y 36,6 $\mu\text{g}/100$ mg de fruta, respectivamente), seguido de la capa blanca que se encuentra bajo la piel de las naranjas y las membranas de los segmentos, albedo y flavedo. Los niveles más bajos se localizan en las vesículas de zumo (McIntosh, 2000).

Entre las 36 agliconas de limonoides aisladas de la familia *Citrus* y sus híbridos solamente seis son amargas: limonina, nomilina, ácido obacunoico, ichangina, ácido desoxilimonoico y ácido nomilínico. La limonina es el limonoide mayoritario encontrado en muchos de los zumos cítricos.

Un exámen de las estructuras de limonoides amargos y no amargos revela alguno de los

requerimientos estructurales para la detección del amargor (Hasegawa y Miyake, 1996). La percepción del amargor requeriría un anillo D cerrado, un grupo epóxido C14-C15, un grupo ceto en C-7 y un grupo acetilester en C-1 en el miembro número siete del A-anillo (Manners, 2007).

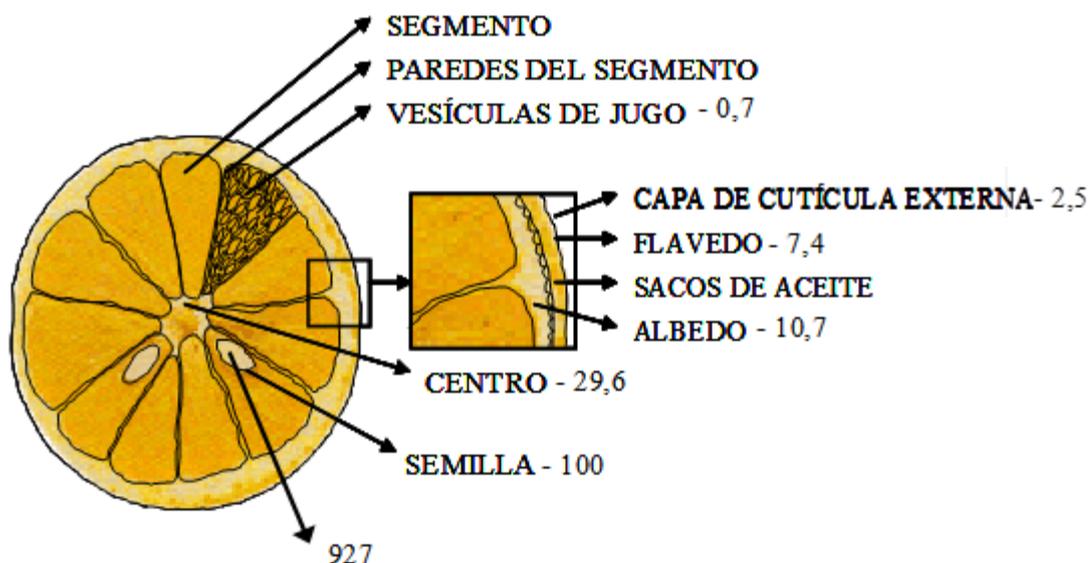


Fig. 2.2. Distribución de limonina en el fruto. La concentración de limonina se da en $\mu\text{g}/100$ mg de fruta (McIntosh, 2000).

2.1.1.2. Propiedades de los limonoides. Bioactividad

La gran atención que se está prestando en la actualidad a los limonoides, no se debe sólo al importante papel que desempeñan en la calidad de los productos procesados donde se encuentran presentes, sino también por los numerosos efectos beneficiosos que ejercen sobre la salud humana si se integran en la dieta diaria. Los limonoides como promotores de la salud humana, son compuestos bioactivos (Kaur y Kaur, 2015) con demostrada acción antialérgica, antiviral, potente actividad antiinflamatoria (Choodej y col., 2013), antioxidante (Manners, 2007), anticancerígena, en estudios *in vitro* con animales de laboratorio y en cultivos de células cancerosas humanas, y con capacidad para reducir los niveles de LDL-colesterol (Patil y col., 2009).

La bioactividad de los limonoides se ha observado tanto en las formas amargas (agliconas) como en los glucósidos (no amargos) (Karim y Hashinaga, 2002). Ambos tipos de estructuras han demostrado su acción inhibitoria sobre carcinogénesis inducida químicamente (Manners, 2007) y poseer actividad hipercolesterolemica y antioxidante (Miller y col., 1994; Kurowska y col., 2000).

La capacidad de una sustancia para inducir una mayor actividad de la enzima glutatión S-transferasa se ha correlacionado con una acción inhibitoria contra agentes carcinógenos (Hasegawa y Miyake, 1996). La glutatión S-transferasa es el mayor sistema enzimático de desintoxicación que cataliza la conjugación de glutatión con muchos compuestos electrofílicos, entre los que se encuentran numerosos agentes carcinogénicos. Los conjugados cancerígenos de glutatión son menos reactivos y más solubles en agua lo que facilita su excreción (Hasegawa y Miyake, 1996). Los limonoides de cítricos, con una fracción furano unida al D-anillo en la posición C-17, en estudios in vitro con ratones, demostraron su acción inductora sobre este sistema enzimático y, por tanto, su potencial **acción anticancerígena** (Kim y col., 2014). Entre los ocho limonoides evaluados en este trabajo, la nomilina era el inductor más potente en el hígado y en las mucosas del intestino delgado, obacunona y el ácido isobacunonico e ichangina también inducían la actividad anticarcinogénica en estos órganos (Kim y col., 2014).

Un estudio sobre los efectos inhibitorios de limonina y nomilina sobre la formación de neoplasia en ratones ICR/Ha inducida por benzopirenos mostraron que la nomilina reducía la incidencia de un número significativo de tumores en más del 50% a los 10 mg por dosis (Lam y Hasegawa, 1989). La limonina, con una menor acción inductora de la glutatión S-transferasa, fué menos efectiva. No obstante, la limonina resultó ser un potente inhibidor de la carcinogénesis inducida por via oral con 7,12-dimetilbenzantraceno en hámsters (Lam y Hasegawa, 1989). Los animales que recibieron limonina demostraron una reducción del 60% en la carga tumoral. Esta reducción se debió a una disminución del 20% en el número de tumores y del 50% en la masa tumoral. La nomilina era considerablemente menos eficaz.

El reconocimiento de la capacidad de muchos productos naturales en los alimentos para reaccionar con radicales libres ha conducido a la evaluación de la **capacidad antioxidante** de los limonoides en cítricos. Estas investigaciones mostraron que las capacidades antioxidantes de los limonoides abarcan un amplio intervalo, desde indetectable hasta propiedades superiores a las que muestra el ácido ascórbico (Poulose y col., 2005; Sun y col., 2005; Yu y col., 2006).

Por otro lado, la evidencia del potencial de los limonoides de cítricos para poseer **propiedades hipocolesterolémicas** fue primeramente obtenida en un estudio sobre el efecto de la ingesta de zumo de naranja y pomelo en los niveles de colesterol en ratones (Kurowska y col., 2000). Posteriormente se evaluaron estas propiedades en humanos, estudiando el efecto del consumo de zumo de naranja en 15 sujetos con elevados niveles de colesterol en plasma, se demostró un aumento de los niveles de HDL en un 21% y la relación LDL/HDL descendió en

un 16% en los sujetos evaluados (Kurowska y col., 2000)

Además de las propiedades bioactivas y saludables de los limonoides, estos compuestos tienen interés por su **actividad insecticida** y como **marcadores taxonómicos**.

La **actividad insecticida** de los limonoides se detectó por primera vez en 1982, con las investigaciones desarrolladas por Kloche y Kubo. Posteriormente se confirmó que los limonoides poseen actividad contra una serie de insectos como el escarabajo colorado, el gusano del maíz, el gusano cogollero, gusano de las yemas de abeto y el gusano del tabaco. En la actualidad, se dispone comercialmente de un preparado a base del limonoide azadiractina, “nee”, para su uso como repelente de insectos en alimentos y en cultivos ornamentales (Hasegawa y Miyake, 1996). Investigaciones más recientes con limonina y sus derivados han demostrado que los limonoides de cítricos poseen importantes propiedades insecticidas sobre el escarabajo colorado de la patata (Alford y col., 2000).

Los limonoides de cítricos son también unos excelentes **marcadores taxonómicos** porque determinadas rutas de biosíntesis son únicas y específicas de género y de especies. Esta información puede utilizarse para evaluar los sistemas de clasificación existentes y modificar estos esquemas. Los cultivadores de cítricos que están continuamente buscando nuevos injertos y nuevos rasgos genéticos pueden, con un análisis del contenido en limonoides, obtener una importante información para el estudio y generación de nuevas especies y evaluar posibles candidaturas, especialmente con la implantación de las técnicas de cultivo por fusión de protoplastos (Hasegawa y Miyake, 1996).

De esta forma, plantas del género *Fortunella*, *Poncirus* y del subgénero *Papeda* se han cruzado, con éxito, con especies cítricas híbridas. Estas variedades híbridas incluyen calamandin (*Fortunella*), yuzu, sudachi, kabasu, hanayum mechiyu y limón Ichan (de *Papeda*) y Citrange (de *Poncirus*). Estos híbridos, por tanto, también poseen dos grupos biosintéticos de limonoides. Calamandin contiene limonoides del grupo limonina y calamina, yuzu y los híbridos de *Papeda* contienen limonoides del grupo limonina e ichangensina y citrange contiene el 7-acetato limonoide y del grupo de limonina (Hasegawa y Miyake, 1996).

“Skimmiya japonica”, una especie de Rutácea de la subfamilia *Toddalioidae*, posee tres de los grupos de limonoides: limonina, calamina e ichangesina. Esta planta es la única que se ha encontrado que tenga más de dos grupos de limonoides de cítricos. Aunque se clasifica en una subfamilia que está bastante alejada de los cítricos, tiene una gran similitud genética al basarse en el análisis e identificación de componentes pertenecientes a los limonoides (Hasegawa y Miyake, 1996).

2.1.2. BIOQUÍMICA DE LIMONOIDES

2.1.2.1. Biosíntesis de limonoides en cítricos. Grupo de la limonina

Las rutas biosintéticas de limonoides propuestas se han basado en investigaciones sobre trazadores radioactivos y correlación de la estructura química. Los semilleros de cítricos son excelentes herramientas para la preparación de sustratos de limonoides marcados con C-14 desde mevalonato a acetato (Hasegawa y col., 1984).

Se han aislado e identificado treinta y seis agliconas y diecisiete glucósidos de limonoides en cítricos. Las rutas de biosíntesis de cada una de las agliconas han sido identificadas, así como los procesos de biosíntesis y de acumulación de las agliconas y los glucósidos. Las especies *Citrus* solamente contienen los limonoides del grupo limonina. Las rutas biosintéticas de cada una de las veinte agliconas presentes en este grupo han sido descritas detalladamente por Hasegawa y Miyake (1996).

El grupo biosintético de la limonina se encuentra en todas las especies de cítricos, híbridos de cítricos y numerosos miembros no cítricos de la familia de las Rutáceas. Los limonoides de este grupo se incluyeron en la Tabla 2.1 y la ruta biosintética se detalla en la (Fig 2.3).

Los limonoides más abundantes en los tejidos de los cítricos son compuestos pertenecientes al grupo de la limonina: limonina, nomilina, obacunona y diacetilnomilina. Numerosos estudios han demostrado la conversión de nomilina a obacunona así como la conversión de ésta a ácido obacunoico. La nomilina y el ácido diacetilnomilínico son los precursores más probables de todos los limonoides aislados de los cítricos y sus híbridos (Hasegawa y Miyake, 1996), y la nomilina se sintetiza a partir de acetato, mevalonato y furanosil pirofosfato, principalmente en la región del floema de los tallos así como en las hojas (Li y col., 2014). La trans-eliminación del grupo acetilo de la nomilina da lugar a la obacunona, y la apertura del anillo A-ciclo lactona de la obacunona da lugar al ácido obacunoico (Fig. 2.3). Las enzimas implicadas en estos dos pasos son la nomilina transacetileliminasa y obacunona A-ciclo lactona hidrolasa, que han sido aisladas de células bacterianas, pero no se han detectado en los cítricos. También se ha demostrado la conversión de ácido obacunoico a limonina (Herman y Hasegawa, 1985). Ichangina es el precursor inmediato de la limonina, sin embargo el paso de conversión a ichangina es hipotético. El ácido obacunoico se ha considerado como intermediario entre obacunoato y limonina. Sin embargo, nunca se ha demostrado la conversión del llamado ácido isoobacunoico a limonina. El ácido diacetilnomilínico y ácido nomilínico son dos de los principales ácidos de limonoides presentes en cítricos. En concreto el

ácido diacetilnomilínico es el precursor inicial de todos los limonoides presentes en cítricos. Los trabajos llevados a cabo hasta ahora demuestran la conversión del ácido diacetilnomilínico a nomilina en el tallo del limón, a partir del cual se transloca a otros tejidos del fruto. Así como que el ácido diacetilnomilínico parece ser biosintetizado también en los tallos y transportado posteriormente a otros tejidos.

Se ha demostrado aplicando trazas radioactivas que la limonina se transforma en desoxilimonina y 17-dihidrolimonoato A-ciclo lactona (Fig. 2.3). Otros limonoides minoritarios como el limonol y el 7α -obacunol se biosintetizan a partir de limonina y obacunona, respectivamente. Así, a través de diferentes rutas, individual o acumulativamente, las enzimas de cítricos pueden catalizar la transformación de limonina amarga en productos finales menos amargos. Por tanto, la reducción enzimática de la limonina en componentes no amargos parece ocurrir vía estas tres rutas (Fig. 2.3), la desviación hacia una u otra ruta es dependiente del nivel de enzimas catabólicas, de la especie de cítrico y del grado de maduración.

Las semillas de naranjas amargas (*Citrus aurantium*) poseen altas concentraciones de limonoides ácidos (ácido isolimonoico, ácido diacetilnomilínico y ácido 19-hidroxiacetilnomilínico). También contienen limonoides neutros como la limonina, diacetilnomilina e ichangina. Todos los limonoides presentes en *C. aurantium* derivan biosintéticamente del ácido diacetilnomilínico. Basado en un análisis estructural, la biosíntesis puede considerarse razonadamente que implica los pasos siguientes: hidroxilación del grupo metilo 19 del ácido diacetilnomilínico para dar ácido 19-hidroxiacetilnomilínico el cual forma ichangina por cerramiento del anillo de lactona. La limonina se forma a partir de ichangina por ciclación (Fig. 2.3).

El ácido isoobacunoico, presente en las semillas de pomelo, deriva del ácido obacunoico o más directamente por ciclación del ácido diacetilnomilínico. La presencia de ácido isoobacunoico en semillas soporta la hipótesis de que este compuesto quizás sea el precursor más inmediato de la limonina. Sin embargo, los análisis con trazas radioactivas mostraron que el ácido isoobacunoico no se convierte en limonina. De hecho, el ácido epiisoobacunoico, constituyente natural de las semillas de pomelo, es el único limonoide que tiene la configuración opuesta a la limonina en el C-1 y es, por lo tanto, poco probable que este implicado en la biosíntesis de limonina.

La limonina, por tanto, resulta ser más un producto final de la biosíntesis de limonoides, mientras que la nomilina parece ser el precursor de una gran mayoría de limonoides.

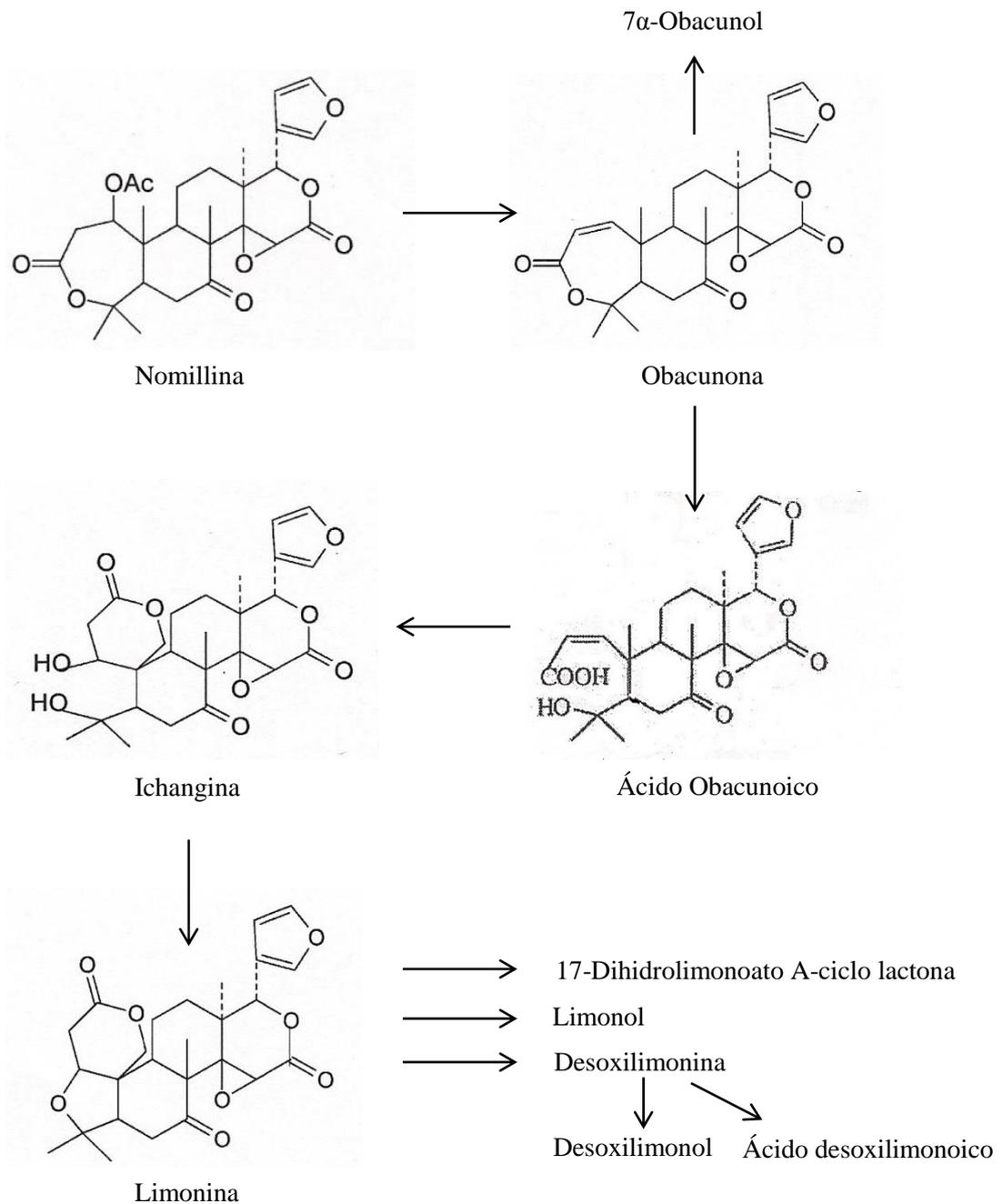


Fig 2.3. Ruta biosintética de limonoides del grupo de la limonina (Hasegawa, 2000).

2.1.2.2. Glucosidación de limonoides. Proceso natural de desamargado

Las agliconas de los limonoides se transforman en los derivados no amargos 17 β -D-glucopiranosidos durante la maduración de los frutos, este proceso natural de desamargado se conoce desde hace un siglo, pero el mecanismo en sí, no fue dilucidado hasta que no se descubrieron los glucósidos de limonoides en los tejidos de las frutas cítricas (Hasegawa y Miyake, 1996). En 1986, Hasegawa y col. determinaron que las agliconas se convierten en sus

respectivos glucósidos en los tejidos y semillas de los frutos durante los estadios tardíos de la maduración. Desde entonces, 17 glucósidos de limonoides han sido aislados e identificados de los cítricos y sus híbridos (Patil y col., 2009). En la Fig. 2.4 se incluyen algunas estructuras de estos compuestos.

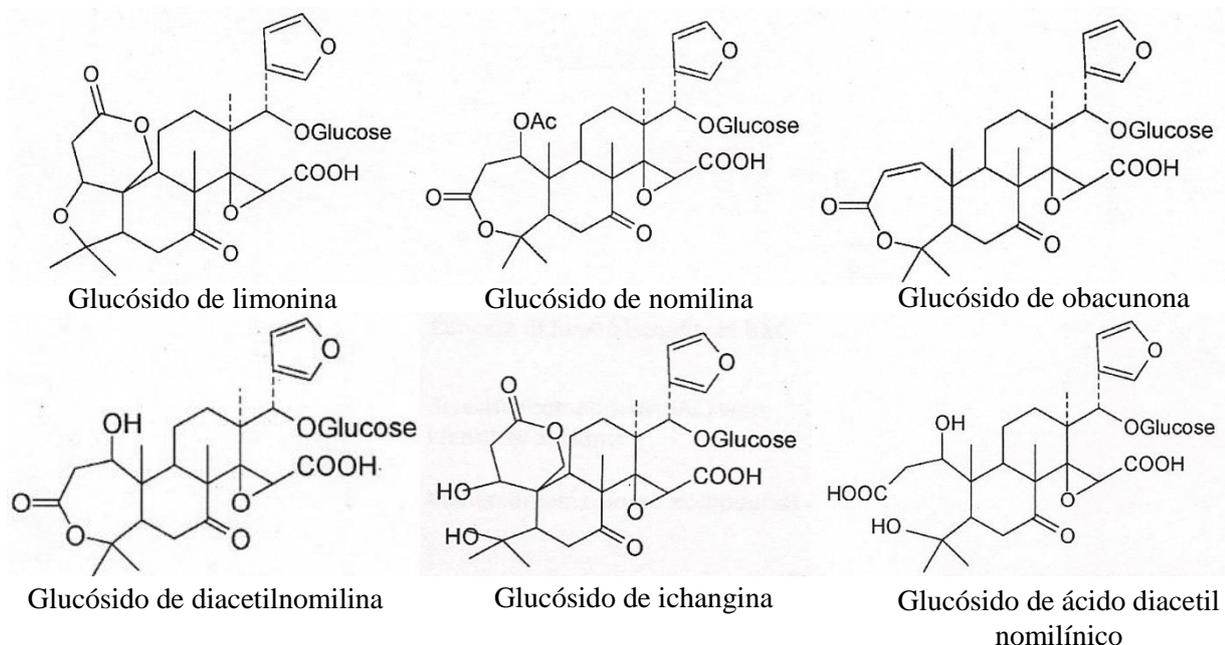


Fig. 2.4. Estructuras de algunos glucósidos de cítricos (Patil y col., 2009).

La reacción de glucosilación es catalizada por la enzima UDP-D-glucosa: limonoide glucosiltransferasa (Fig. 2.5). Esta enzima fue primero aislada en naranjas Navel (Hasegawa y col., 1991) y está presente solamente en los tejidos (Herman y col., 1991) y semillas de los frutos maduros (Fong y col., 1993). No se ha detectado en tallos, hojas y raíces.

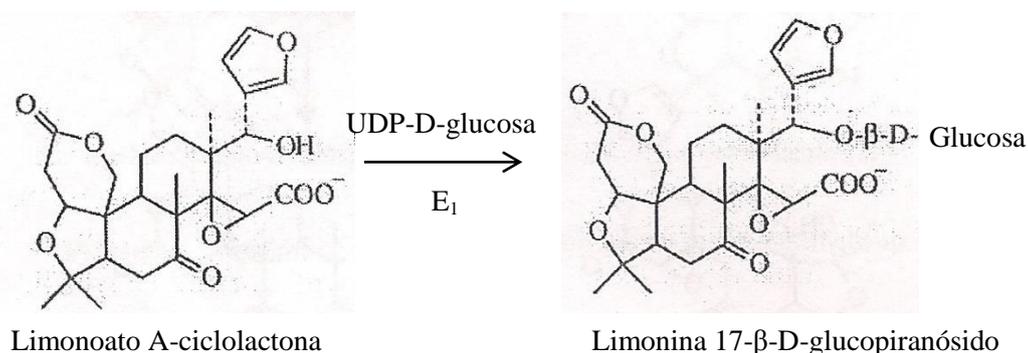


Fig 2.5. Glucosidación de las agliconas de limonoides. E₁: UDP-D-glucosa: limonoide glucosiltransferasa (Hasegawa, 2000).

Los glucósidos de limonoides se acumulan, por tanto, en cantidades significativas en

tejidos y semillas de los frutos maduros. Por ello, el zumo de naranjas Navel recolectadas antes de la maduración presenta sabores amargos, mientras que el zumo de naranjas recolectadas posteriormente no. Las naranjas dulces, en general, tienen niveles relativamente elevados de actividad glucosiltransferasa, por lo que contienen elevadas concentraciones de glucósidos de limonoides. En contraste, el pomelo y sus híbridos (Oroblanco y Melogold) presentan poca actividad de esta enzima, por lo que sus zumos tienen un problema severo de amargor debido a los limonoides y a las bajas concentraciones de glucósidos de limonoides (Hasewaga, 2000).

La 17- β -D-glucopiranosido β -glucosidasa cataliza la hidrólisis de los glucósidos de limonoides y libera glucosa y limonoides. Esta enzima está implicada en la biodegradación de glucósidos de limonoides y sólo se encuentra en semillas en estado latente y de germinación, por lo que no hay glucósidos de limonoides en las plántulas de cítricos debido a la actividad de esta enzima (Hasegawa, 2000).

Trabajos realizados con trazas radioactivas mostraron que los glucósidos de limonoides son estables en los tejidos de los frutos maduros, indicando, por tanto, que esta β -glucosidasa está ausente en los tejidos de la fruta por lo que la concentración de glucósidos de limonoides aumenta según progresa el estado de maduración de los frutos (Hasegawa y Miyake, 1996).

2.1.2.3. Bases bioquímicas y estructurales del desarrollo del amargor retardado o "delayed bitterness" en zumos de cítricos

Muchos frutos cítricos no resultan amargos si se comen en el momento o si el zumo exprimido se consume inmediatamente. Sin embargo, al cabo de unas pocas horas después de la extracción o, inmediatamente, cuando se somete a tratamientos térmicos, el zumo pasa a ser amargo. Este proceso, afecta especialmente a zumos obtenidos de frutas como pomelo, variedades de naranja Navel, Valencia, Shamouti, etc., lo que constituye un serio problema para las industrias procesadoras de cítricos, especialmente para las españolas, puesto que la variedad tipo Navel es de las más cultivadas en nuestro país. Este desarrollo del amargor gradual, o amargor retardado ("delayed bitterness") en estos zumos cítricos se debe a la formación de **limonina**. Este "delayed bitterness" diferencia el amargor producido por los limonoides del amargor debido a flavanonas neohesperidósido (naringina y neohesperidina), denominado "immediate bitterness" que se presentan en los cultivares de cítricos relacionados con el pomelo (Seguí y col., 1992; Hasegawa y Miyake, 1996).

El mecanismo bioquímico del "delayed bitterness" no se conoció hasta 1968 (Maier y col., 1968). Diversos estudios han mostrado que el limonoato A-ciclolactona, precursor no amargo

de la limonina (Fig. 2.6), se sintetiza en las hojas a partir de nomilina (ver apartado 2.1.1), y se transporta al fruto donde se acumula fundamentalmente en las semillas y membranas carpelares (Hasegawa y col., 1980; McIntosh y col., 1982; Ronnenberg y col., 1995). La limonoato A-ciclolactona es estable al pH fisiológico de los tejidos intactos, pero se lactoniza cuando el zumo de la propia fruta acidifica el medio donde se encuentra dicho precursor, al romperse los tejidos por la acción mecánica de la extracción. Como consecuencia de la lactonización se forma la limonina que proporciona el intenso sabor amargo (Seguí y col., 1992). Esta reacción es catalizada por la acción de la enzima limonoide D-ciclolactona hidrolasa (Fig. 2.6), que se encuentra presente de forma natural en los cítricos (Maier y col., 1968). No obstante, sigue sin estar suficientemente claro que el limonoato A-ciclo lactona sea el único compuesto precursor presente en los tejidos y que la limonina se forme sólo después de la extracción del zumo (McIntosh, 2000).

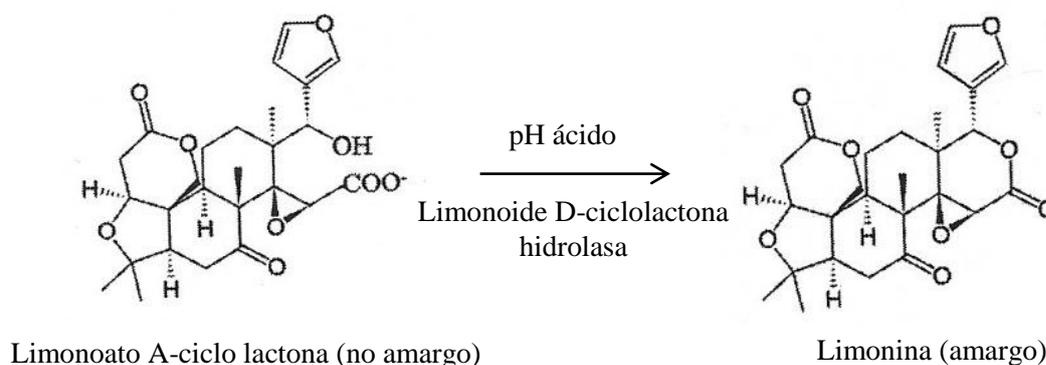


Fig 2.6. Mecanismo del “delayed bitterness” (Puri y col, 2008).

2.1.3. BIODEGRADACIÓN DE LIMONINA POR MICROORGANISMOS

Son numerosos los microorganismos que potencialmente poseen la capacidad de degradar limonoides (limonina, nomilina, ichangina, etc.) (Tabla 2.3). De hecho, la conversión bioquímica de los limonoides de cítricos fue estudiada primeramente en células microbianas. La investigación de estos microorganismos data aproximadamente de 1971 (Hasegawa y col., 1972). Entre los microorganismos que han presentado capacidad de degradar limonoides se pueden citar entre otros: *Aspergillus niger* (Hasegawa y col., 1972), *Arthrobacter globiformis* (Hasegawa y col., 1972), *Pseudomonas* 321-18 (Hasegawa y col., 1972), *Bacterium* 342-152-1 (Hasegawa y Kim, 1975), *Acinetobacter* sp. (Vaks y Lifshitz, 1981), *Cornyebacterium fascians* (Hasegawa y King, 1983; Hasewaga y col., 1985), *Rhodococcus fascians* (Hasewaga y col., 1985; Puri y col., 1996).

Hasegawa (2000) partiendo de especies bacterianas aisladas del suelo, aplicando métodos de enriquecimiento, comprobó que la limonina era metabolizada por al menos cuatro vías diferentes que generan productos no amargos como el 17-deshidrolimonoato A-ciclo lactona, desoxilimonina, limonol y trans-19-hidroxiobacunoato. Otros limonoides amargos, como la nomilina, se metabolizaba en el compuesto no amargo obacunona.

Tabla 2.3. Bacterias degradadoras de limonoides y rutas metabólicas (Puri y col., 1996).

<i>Bacteria</i>	<i>Ruta metabólica</i>	<i>Referencia</i>
<i>Arthrobacter globiformis</i> ^a	17-Deshidrolimonooides	Hasegawa y col., 1972
<i>Pseudomonas</i> 321-18 ^a	Desoxilimonoides, 17-deshidrolimonooides	Hasegawa y col., 1972, 1974
<i>Bacterium</i> 342-152-1 ^a	17-Deshidrolimonooides, desoxilimonoides	Hasegawa y Kim, 1975
<i>Acinetobacter</i> sp ^a	Desoxilimonoides	Vaks y Lifshitz, 1981
<i>Arthrobacter globiformis</i> II ^a	17-Deshidrolimonooides, 7-hidrolimonooides	Hasegawa y col., 1983
<i>Corynebacterium fascians</i> ^a	17-Deshidrolimonooides, trans-19-hidroxiobacunoico	Hasegawa y King, 1983; Hasegawa y col., 1985
<i>Rhodococcus fascians</i> ^b	----	Manjón y col., 1991; Martínez- Madrid y col., 1989
<i>R. fascians</i> ^b	----	Marwaha y col., 1994

^aFuente de enzimas inducidas degradadoras de limonina

^bFuente de enzimas constitutivas degradadoras de limonina

Dentro de las vías de metabolización de limonoides (Fig. 2.7) se incluye también la catalizada por la enzima desoxilimonina hidrolasa aislada de células de *Pseudomonas* 321-18, que hidroliza la desoxilimonina a ácido desoxilimonoico. Si bien, la enzima responsable de la formación de desoxilimonina no ha sido caracterizada, el aislamiento de desoxilimonina hidrolasa confirmó que el limonoato se metaboliza a través de desoxilimonina, en ácido desoxilimonoico (Hasegawa y col., 1974).

Uno de los pasos más estudiados en la conversión de limonina es la formación del compuesto 17-deshidrolimonoato A-ciclolactona, donde la enzima limonoato deshidrogenasa, juega el papel principal (Cánovas y col., 1998). Esta enzima ha sido detectada en diferentes especies de microorganismos, puede prevenir la producción de limonina catalizando la

oxidación de limonoato A-ciclolactona a la forma 17-deshidrolimonoato, un derivado no amargo, el cual no puede sufrir la lactonización enzimática y, por tanto, no dar lugar a limonina (Fig. 2.7). Esta enzima ha sido aislada de *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas sp*, *Corynebacterium fascians* y *Rhodococcus fascians* (Verma, 2010), presenta una masa molecular de 128.000 Da. y esta compuesta por cuatro subunidades similares de 30.000 Da cada una. El punto isoelectrico es de 4,9 (Humanes y col., 1997). Para su acción catalítica la limonoato deshidrogenasa requiere la presencia del cofactor NAD^+ , iones Zn y grupos sulfidrilo y su actividad es inhibida por iones Hg^{2+} y NaN_3 . El rango de pHs en el cual la enzima presenta una mayor actividad está entre 8-9, su temperatura óptima es de 40 °C, con una K_m de 0,9 μM (Munish y col., 2002).

De todos los microorganismos indicados anteriormente, las cepas de *Rhodococcus fascians* son las más ampliamente estudiadas debido a su capacidad de producir de manera constitutiva la enzima limonoato deshidrogenasa, el resto de microorganismos referenciados hasta el momento, requieren la presencia de un inductor sin el cual no sintetizan enzimas capaces de metabolizar los limonoides (Cánovas y col., 1998).

Rhodococcus fascians es una bacteria Gram +, clasificada como aeróbica (Cánovas y col., 1998), y perteneciente al grupo de los Actinomicetos nocardiformes, en el que se incluyen los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*.

Rhodococcus se caracteriza porque presenta morfología variable y diferentes coloraciones celulares, naranja, blanca o rosa, dependiendo de la composición del medio y las condiciones de crecimiento. Si bien han sido clasificados solamente como aerobios estrictos, Cánovas y col. (1998) comprobaron la capacidad de *R. fascians* de metabolizar limonina bajo condiciones extremas de pH y en ausencia de aireación. Según estos autores parece ser que la presencia de oxígeno y el tipo de fuente de carbono puede ser de significación considerable para el metabolismo de la bacteria y podría determinar no solo la morfología celular y color sino también la capacidad para el consumo de limonina y azúcares.

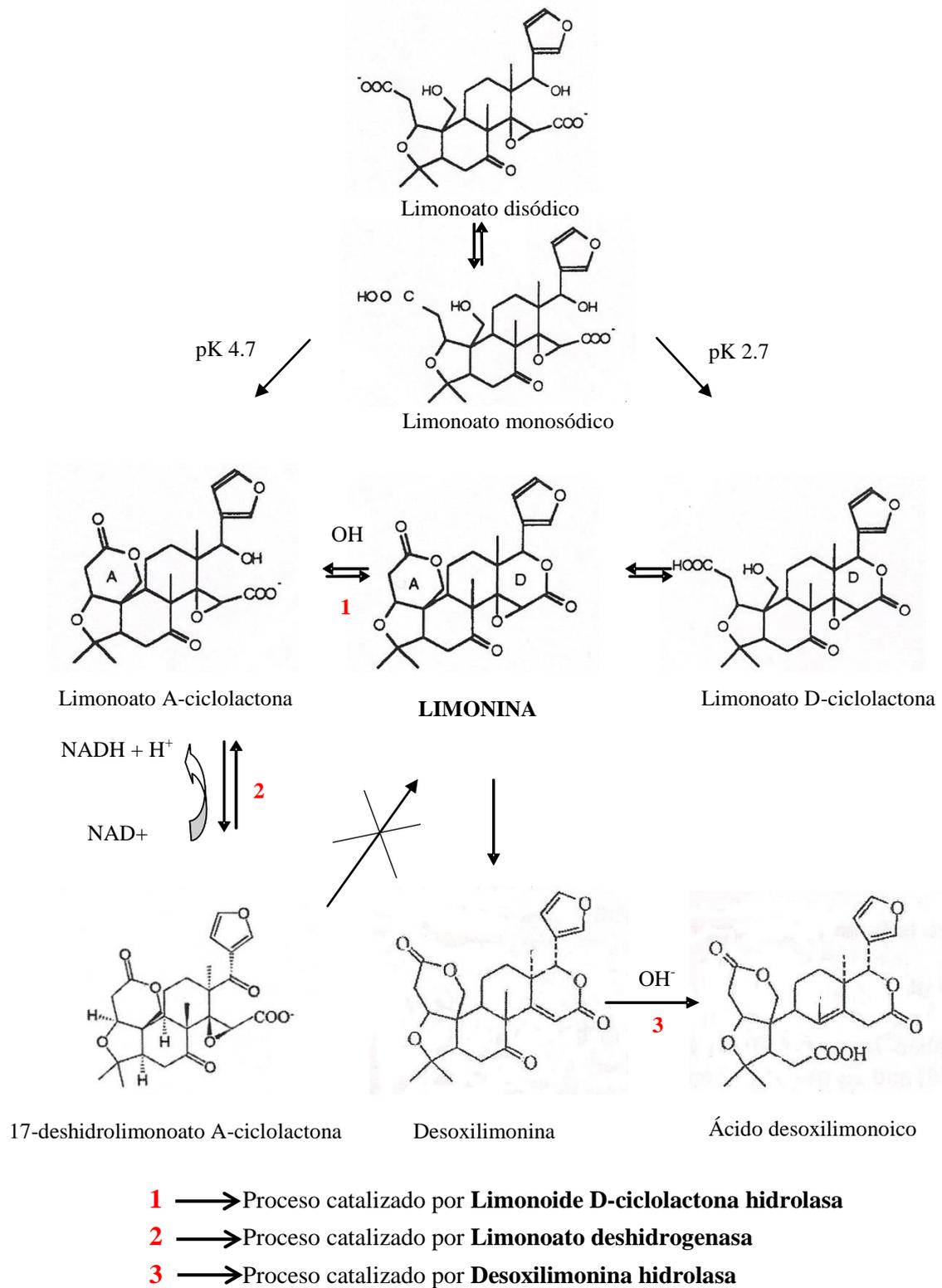


Fig. 2.7. Posibles vías de metabolización de limonina en microorganismos (Cánovas y col., 1998).

**2.2. DESAMARGADO DE ZUMOS DE
CÍTRICOS. PROCESOS FÍSICO-
QUÍMICOS Y BIOTECNOLÓGICOS**

Las industrias agroalimentarias dedicadas a la elaboración de zumos de frutas se enfrentan a diversos problemas derivados de la composición natural de la materia que emplean. Mantener la calidad del zumo depende en gran medida del conocimiento de la composición, variedad, madurez y condición del fruto junto con el método de extracción utilizado, concentración, mezcla, homogenización y almacenamiento del zumo.

El Boletín Oficial del Estado (BOE del 20-11-1991) define el zumo o jugo de fruta como *“el obtenido a partir de frutas por procedimientos mecánicos, susceptibles de fermentación pero sin fermentar, que posea el color, el aroma y el sabor característico de los zumos de frutas de las que proviene”*. Asimismo, *“por zumo de frutas, o jugo se entenderá igualmente el producto obtenido a partir de zumos de frutas concentrados, restituyendo la proporción de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y/o el aroma por medio de sustancias aromatizantes recuperadas al concentrar el zumo de fruta”*. Esta definición general del zumo ha permitido el desarrollo de varios métodos de procesado de cítricos tomando en cuenta el criterio de calidad del consumidor que percibe que un buen zumo de naranja posee un atractivo aroma, sabor, color, una turbidez estable y una acidez, viscosidad, grado de amargor y dulzor determinado (Cook, 1983).

La elaboración industrial del zumo de cítricos (Fig. 2.8) se inicia con el lavado y clasificación de la fruta (operación que permite eliminar las impurezas que llegan con los frutos), procediéndose a continuación a la extracción del zumo con una prensa, a la separación posterior de los residuos sólidos homogeneizando la concentración de pulpa, eliminando los aceites y ceras y filtrando, posteriormente, para homogeneizar el zumo. Por último, se pasteuriza y se almacena a baja temperatura. En algunos casos, la pulpa puede ser separada por completo, añadida posteriormente y homogenizada o puede ser usada como base para purés de cítricos. Además, en otros procesos después de la extracción, se somete al zumo a una evaporación para la recuperación de aromas y, en otros casos, después de la pasteurización se concentra para obtener zumo que sirve de base para la reconstitución del zumo natural o para la elaboración de bebidas cítricas (Rothschild y Karsenty, 1974; Cook, 1983).

La pasteurización juega un papel importante en la obtención del zumo de cítricos, porque permite mantener estable la turbidez propia del mismo ya que evita que la enzima pectina esterasa hidrolice la pectina, produciendo ácido poligalacturónico que combinado con el calcio del medio precipita y produce una separación de fases en el zumo (Navarro y col., 1979).

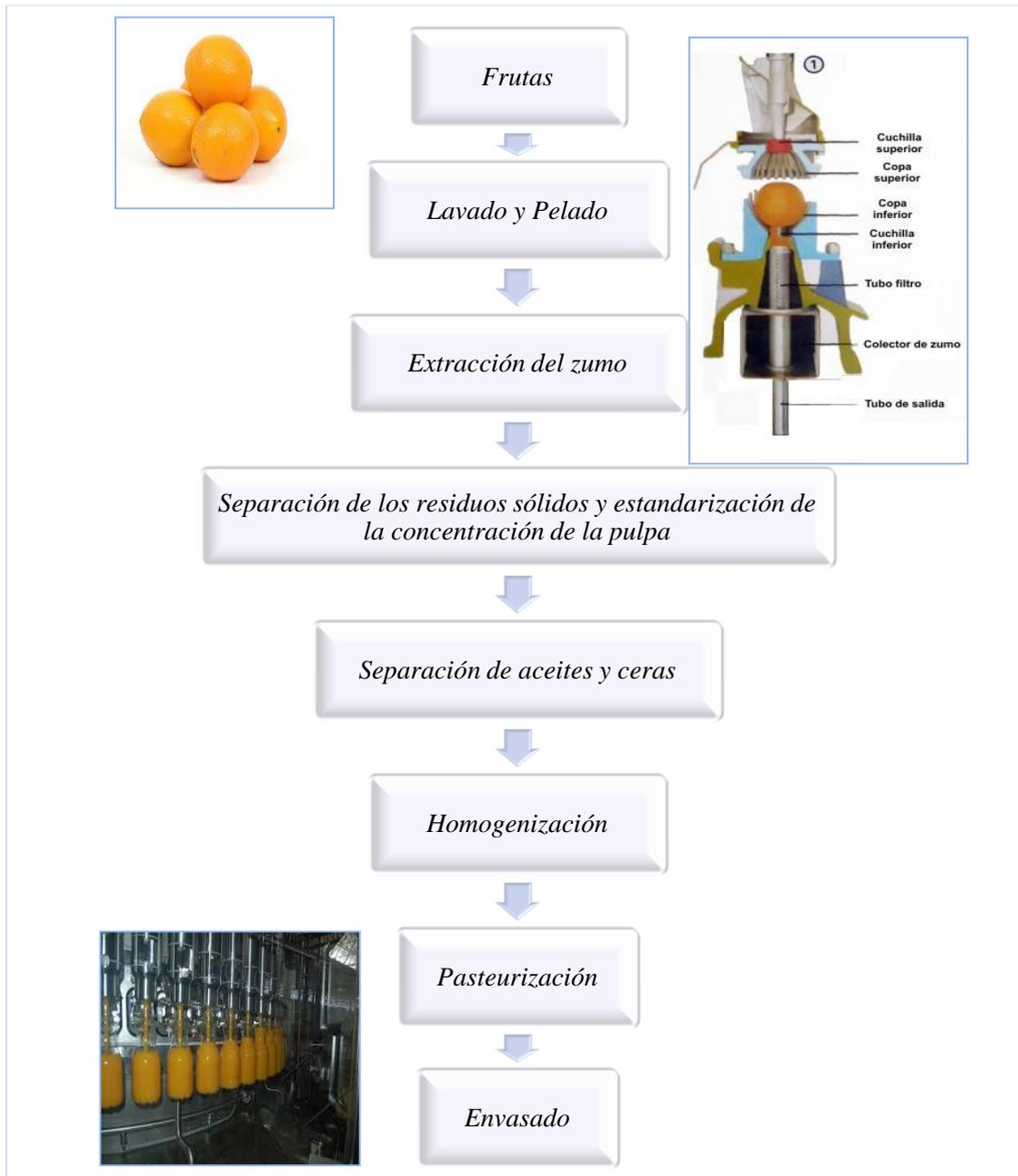


Fig. 2.8. Esquema general del proceso de elaboración de zumo.

Como ya se ha especificado, apdo. 2.1.2.3, el amargor de los zumos de cítricos se debe a dos clases de compuestos denominados **flavonoides** (naringina y neohesperidina) y **limonoides** (limonina nomilina, ichangina y ácido nomilínico). Entre los flavonoides la naringina es el principio amargo más importante y más ampliamente estudiado. Del total de 36 limonoides identificados en cítricos y sus híbridos, la limonina es la principal causante del amargor.

El nivel umbral de naringina en el zumo de pomelo es de 600 ppm (Guadagni y col., 1973), aunque una cantidad moderada de este compuesto es deseable en estos zumos. El nivel umbral

de la limonina es de 4-6 ppm en zumo de naranja (Guadagni y col., 1973). Los zumos de naranja Navel pueden presentar una cantidad de limonina de 40 µg/g que se corresponde con una sensación intensa de amargor en la parte posterior de la lengua, incluso una hora después de enjuagues frecuentes (Fayoux, 2007).

Para reducir los niveles de amargor, por debajo del umbral que el consumidor es capaz de aceptar, se han considerado numerosas estrategias, tanto antes de la recolección como una vez recolectado el cítrico (Singh y col., 2003; Puri y col., 2008). Entre los procedimientos **pre-recolección** se pueden indicar, fundamentalmente, el tratamiento de la planta con hormonas vegetales (auxinas) para inhibir la biosíntesis de limonina, la estimulación de la biosíntesis de glucósidos de limonoides o la aplicación de ingeniería genética para la creación de variedades de frutas exentas de compuestos amargos (Hasegawa y Miyake, 1996). Por ejemplo, un incremento mediante ingeniería genética en la actividad de la enzima limonoide UDP-D-glucosa transferasa, que cataliza el desamargado natural mediante la conversión de limonoides en sus correspondientes glucósidos, podría reducir la concentración de agliconas, lo que a su vez, reduciría la cantidad de compuestos amargos (Suhayda y col., 1995). La nomilina diacetilasa al catalizar la conversión de nomilina a diacetilnomilina, desvía la biosíntesis de limonina y se acumula en los cítricos diacetilnomila que es un compuesto no amargo (Hasegawa y Miyake, 1996). Por consiguiente, la manipulación genética para potenciar la presencia de esta enzima en cítricos redundaría en una reducción del amargor en los zumos.

Las estrategias **post-recolección** son, no obstante, las más frecuentemente aplicadas y también las más versátiles, como son la selección del tiempo de recolección y el método de extracción del zumo, que juegan un importante papel en el contenido de principios amargos. De hecho, el procedimiento más simple para lograr bajos niveles de flavonoides en el zumo de cítricos consiste en emplear frutos poco maduros y presiones de extracción de zumo reducidas, ya que una presión excesiva libera compuestos amargos de la cáscara (Pino, 1997). Otras alternativas se basan en la adición de agentes supresores del amargor, el aumento del pH o la adición de azúcares para elevar la relación °Brix/acidez. Sin embargo, estos procedimientos suelen generar problemas de contaminación o generación de productos secundarios no deseados (Puri, 2000).

La eliminación o reducción directa en zumo de los compuestos responsables del amargor (Singh y col, 2003) es otra alternativa post-recolección, que puede implicar la utilización de procesos de **separación física**, **procedimientos químicos** o **estrategias biotecnológicas**. Algunos ejemplos de estas técnicas se incluyen en la Tabla 2.4 y se describen más

detalladamente en los siguientes apartados.

Tabla 2.4. Principales procedimientos para eliminar compuestos amargos de zumos (Puri y col., 2008).

<i>Compuesto</i>	<i>Proceso de desamargado</i>	<i>Procedimiento</i>
Naringina ^a	Adsorción a polímeros	Físico
Tangeretina ^b	Paso por una matriz enzimática	Biotecnológico
Nobiletina ^b	Paso por una masa microbiana	Biotecnológico
Sinensetina ^b	Uso de etileno	Químico
Limonina ^c	Uso de polimeros como ciclodextrinas	Químico

^aFlavanonas

^bFlavonas

^cTriterpenos-Limonoides

2.2.1. PROCESOS DE SEPARACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS

Los *métodos físicos y físico-químicos*, para la eliminación de los compuestos amargos en zumos, incluyen el uso de etileno y dióxido de carbono en condiciones supercríticas (Miyake y col., 2000), técnicas de ultrafiltración (Tallarico y col., 1998), diafiltración (Liotus y Chu, 2000) y extracción por solvente y adsorción (Ribeiro y col., 2002; Singh y col., 2003).

La tecnología industrial actual emplea convencionalmente procesos de adsorción en acetato de celulosa, resinas macroporosas o resinas de estireno-divinilbenceno (Shaw y col., 2000; Kranz y col., 2011). Estos procesos se basan en la capacidad de adsorción específica del compuesto amargo a polímeros sintéticos de distinta naturaleza, tales como poliamidas, acetato de celulosa, tierra de diatomeas, resinas de intercambio iónico o polímeros porosos del tipo Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-16, Amberlite IR-400, Amberlite IR-120, NPA-1 o Duolite S-861 (Ribeiro y col., 2002; Lee y Kim, 2003; Singh y col., 2003). La efectividad de las diferentes resinas adsorbentes para reducir el contenido de limonina ha sido probada en diferentes investigaciones (Lee y Kim, 2003; Kola y col., 2010) siendo especialmente eficaces las resinas S861 y Amberlite XAD-7 (Ribeiro y col., 2002).

Aunque son técnicas de gran aceptación por la industria alimentaria tienen una serie de

limitaciones intrínsecas (Kola y col., 2010; Stinco y col., 2013):

- Se requiere el uso de equipos costosos (centrifugadoras) para la clarificación previa del zumo, ya que debe de estar libre de aceites, ceras y pulpa antes de ser bombeado a través de la columna de resina. Posteriormente, se debe de reconstituir el zumo clarificado desamargado con todos estos elementos y componentes para recuperar sus cualidades.
- Las columnas de adsorción suelen ser generadas con soluciones alcalinas diluidas y esto puede afectar a las propiedades organolépticas y a la calidad final del zumo.
- Los productos químicos usados no se pueden reciclar, así el desamargado y la eliminación de los contaminantes tienen un coste muy elevado.
- Los adsorbentes pueden alterar la composición del zumo por reacciones químicas directas con alguno de los compuestos presentes en el zumo o por la eliminación de nutrientes, aromas, color, etc.
- Los métodos son inespecíficos, no solo se adhieren compuestos amargos sino también otros componentes que suponen un detrimento de la calidad del zumo.

Investigaciones recientes constatan que además de la sorción de compuestos amargos, los polímeros adsorbentes retienen compuestos volátiles, que afectan al aroma y sabor del zumo procesado, y pigmentos dando lugar a zumos más rojizos y oscuros que los zumos frescos (Fernández Vázquez y col., 2013). También se ha observado una disminución significativa del contenido en ácido ascórbico y compuestos fenólicos, lo que implica una reducción en la calidad nutricional y actividad antioxidante de los zumos tratados (Stinco y col., 2013). Sin embargo, estos procesos no parecen afectar a los compuestos lipófilos ni al contenido en provitamina A (Stinco y col., 2013).

Se ha planteado, también, el uso de β -ciclodextrinas para la eliminación de compuestos amargos en zumos. Las ciclodextrinas (CDs) son una familia de oligopolímeros cíclicos quirales de (1-4)- α -glucosa con seis, siete u ocho unidades de glucosa, lo que corresponde a los homólogos α -, β - y γ -. Debido a la orientación anterior de los grupos hidroxilo en ambos lados de la cavidad, la periferia de la CD es hidrofílica, lo que favorece la hidratación y solubilidad en soluciones acuosas (Faugeras y col., 2012). Por otro lado, el interior de la cavidad puede ser más hidrofóbica por la presencia de los pares de electrones no enlazantes del oxígeno glucosídico junto con una alta densidad de electrones y de las propiedades de base de Lewis. Una de las características más notables de CD es su capacidad para formar complejos de inclusión con una amplia gama de moléculas. Estos compuestos se han recomendado para aplicaciones en el procesamiento de alimentos y como aditivos con diversidad de aplicaciones en

alimentos, como agentes protectores de componentes lipofílicos, solubilizantes y estabilizantes de fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales, para suprimir malos olores y sabores y para una liberación controlada de ciertos componentes (Cravotto y col., 2006). Los primeros estudios sobre el uso de ciclodextrinas para la eliminación de sabores amargos data de 1979 sobre extractos de ginseng (Binello y col., 2007). También hay trabajos sobre la utilización de polímeros de ciclodextrinas para el desamargado de zumos, habiéndose determinado que la adición de 0,2 a 0,5% de estos compuestos al jugo de pomelo reducía, aproximadamente, un 50% el amargor del producto (Konno y col., 1982) por la formación de un complejo en la α -ciclodextrina y la naringina ó limonina.

La búsqueda de un proceso biotecnológico, como la aplicación de biocatalizadores, enzimas o células microbianas, que actúen de manera específica sobre los compuestos amargos, causando, por tanto, la mínima alteración de las características nutricionales y saludables de los zumos, que permita un tratamiento simultáneo del zumo y de la pulpa en condiciones moderadas y sin producción de contaminantes, puede ser considerada una interesante alternativa a los procesos convencionales por adsorción física.

2.2.2. PROCEDIMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS

Hoy en día, la biotecnología juega un papel importante en la industria alimentaria como una parte integral del procesado. El campo de los biocatalizadores (enzimas y células completas) de aplicación en la industria alimentaria se ha expandido rápidamente, sobre todo en las dos últimas décadas, con el objetivo de optimizar los parámetros de producción, nuevos diseño de alimentos funcionales, proporcionar aplicaciones alternativas y, o mejorar la seguridad, el impacto en la salud y la calidad de los alimentos.

En el sector de producción de zumos de frutas, las enzimas se utilizan ampliamente y de manera específica para la maceración de fruta y mejora de rendimiento de extracción, la clarificación y la estabilidad del producto final. Además, de estas aplicaciones industriales, bien establecidas, son numerosos los estudios que han demostrado el potencial de algunas enzimas para la eliminación del amargor de zumos de cítricos.

El empleo de la tecnología enzimática para el desamargado de zumos de cítricos se ha centrado en **la naringinasa**. La naringinasa, es un complejo enzimático formado por α -ramnosidasa (CE 3.2.1.40) responsable de la hidrólisis de **naringina** (compuesto amargo) a prunina (4,5,7-trihidoxi flavonone-7-glucósido) y ramnosa, y por β -glucosidasa (CE 3.2.1.21) que hidroliza la prunina en naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) y glucosa. La prunina, es

un 33% menos amarga que la naringina, y la naringenina es insípida (Prakash y col., 2002). Las características de esta enzima, varían dependiendo del origen microbiano, de los nutrientes y compuestos empleados como inductores de su biosíntesis y de las condiciones externas de pH y temperatura que se utilizan para su producción (Ni y col., 2012; Yadav, 2013; Mukund y col 2014). A este respecto el interés biotecnológico de la naringinasa reside, además de en la aplicación para el desamargado de zumos cítricos, en otros procesos industriales como la obtención de prunina, ramnosa, antibióticos, envases inteligentes, incremento del aroma de vinos y transformación de esteroides (Thirkettle, 2000; Gallego y col., 2001).

En relación al compuesto amargo **limonina**, la **limonoide glucosil transferasa** (LGTasa) y la **limonoato deshidrogenasa** (LDasa) son las enzimas sobre las que se ha focalizado la atención. LGTasa ha sido aislada y purificada del albedo de naranjas Navel y de pomelo (Hasegawa y col., 1997; Karim y Hasinaga., 2002).

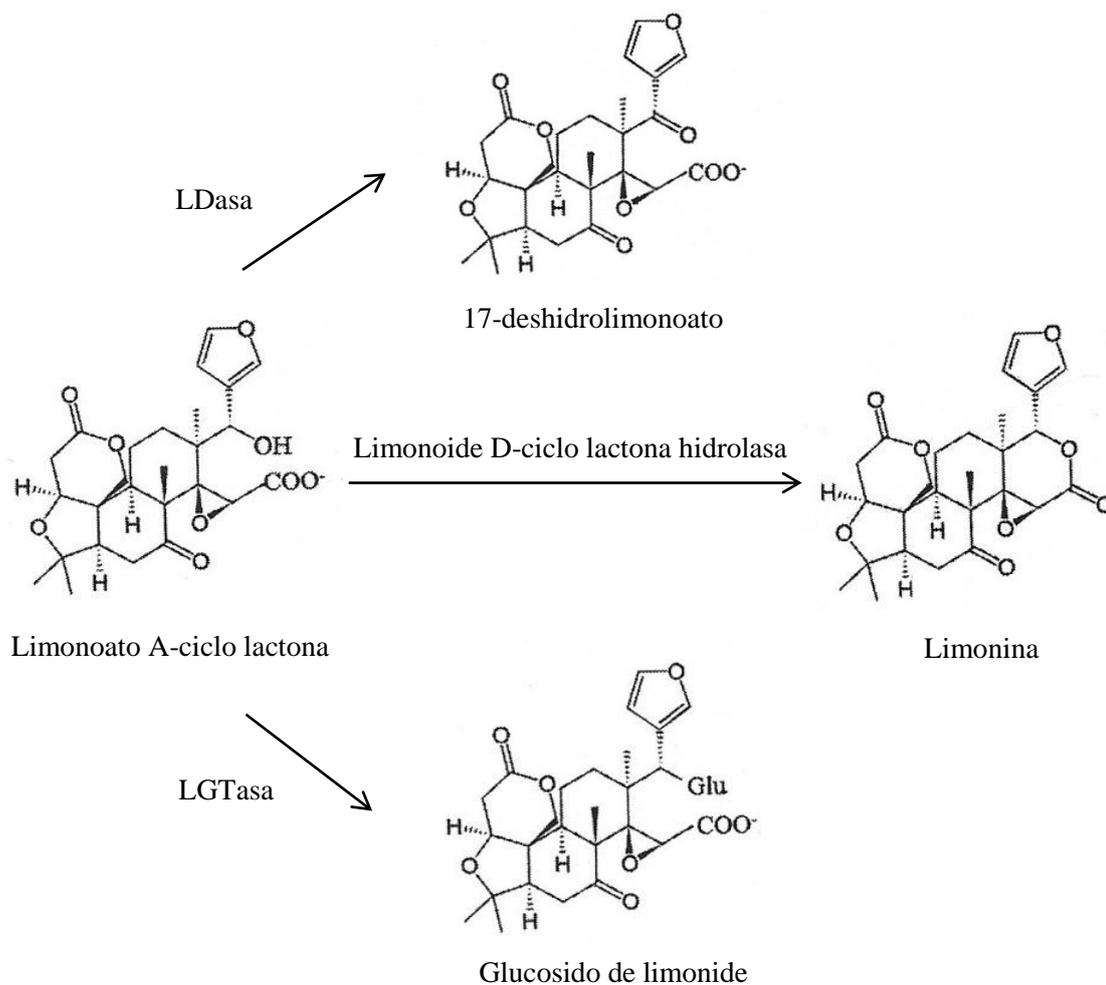


Fig. 2.9. Desamargado enzimático de zumos de cítricos (Busto y col., 2014).

La limonoato deshidrogenasa puede prevenir la producción de limonina por catalizar la

oxidación del limonoato A-ciclolactona a la forma 17-deshidrolimoato, derivado no amargo, que no puede convertirse en limonina (Fig. 2.9).

Esta enzima ha sido aislada a partir de cultivos de *Arthrobacter globiformis* (Hasewaga y col., 1972), *Pseudomonas sp.* (Hasewaga y col., 1974) y *Rhodococcus fascians* (Puri y col., 2002; Humanes y col., 1997). La aplicabilidad de la enzima en el desamargado de zumos está limitada por su carácter intracelular e inactivación al pH ácido del zumo (Hasewaga y col., 1983).

Una alternativa a la utilización directa de enzimas para el desamargado de zumos cítricos es la aplicación de células microbianas completas que posean la capacidad de degradar limonoides (apdo 2.3.3). De esta manera, se eliminan o minimizan los inconvenientes de la utilización de enzimas aisladas, como en el caso anterior, y se aprovecha el “pool” completo de enzimas que participan en el metabolismo microbiano de degradación de limonoides (Malik, 2012).

Dentro de los procedimientos biotecnológicos, tanto a la hora de aplicar enzimas como células microbianas, la tecnología de la inmovilización presenta muchas ventajas en los procesos a gran escala. Fundamentalmente debido a la fácil separación de los biocatalizadores del medio de reacción, se pueden usar altas concentraciones de enzimas, previenen de la contaminación del proceso de elaboración y la reutilización del biocatalizador, la modificación de propiedades catalíticas, un mejor control de las reacciones y un diseño de biorreactores que puede incorporarse fácilmente en una línea de procesamiento continuo (Karim y Hasinaga., 2002; Puri, 2008).

La inmovilización de naranginasa ha sido ampliamente estudiada, de hecho, hay numerosos soportes de inmovilización utilizados como, por ejemplo, fibras huecas (Gray y Olson., 1981), celite (Sekeroglu y col., 2006), criogeles de alcohol polivinílico (Busto y col., 2007), perlas de K- carragenato (Ribeiro y col., 2008), perlas de alginato de calcio (Puri y col., 2010), tamiz molecular mesoporosa MCM-41 (Lei y col., 2011), partículas magnéticas (Soria y col., 2012) y películas recubiertas de polivinilalcohol (PVA) con glutaraldehído para envases activos (Del Nobile y col., 2003).

A diferencia de la enzima anterior sólo se ha encontrado en bibliografía la inmovilización de la enzima LGTasa en carbonato de celulosa, quitosano y en un intercambiador aniónico, pero sin resultados concretos de aplicación en el desamargado de zumos (Karim y Hashinaga, 2002).

En cuanto a microorganismos degradadores de limonoides se han realizado, hasta la fecha,

algunos intentos de inmovilización para su aplicación en el desamargado de zumos. En concreto, en la Tabla 2.5 se recogen los microorganismos, soportes de inmovilización, tipo de zumo y eficacia de desamargado obtenidas en estas experiencias.

Tabla 2.5. Células microbianas inmovilizadas en el desamargado de zumos cítricos (Busto y col., 2014).

<i>Microorganismo</i>	<i>Soporte de inmovilización</i>	<i>Zumo/eficiencia de desamargado</i>	<i>Referencias</i>
<i>A. globiformis</i> II	Gel de acrilamida	Suero de zumo de naranja/ 81%	Hasegawa y col., 1983
<i>C. fascians</i>	Gel de acrilamida	Suero de zumos de cítricos	Hasegawa y col., 1985
<i>R. fascians</i>	Alginato, K-carragenato, agarosa y geles de poliacrilamida	----	Martínez-Madrid y col., 1989
<i>R. fascians</i>	k- carragenato	----	Manjón y col., 1991
<i>A. globiformis</i> II	Alginato	Zumo de mandarina	Premi y col., 1998
<i>R. fascians</i>	Espumas de poliuretano	Zumo de cítricos sintético/ 85%	Cánovas y col., 1998
<i>R. fascians</i>	PVA-PEG criogeles	Zumo de naranja	López-Fouz y col., 2007

2.3. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS

2.3.1. FUNDAMENTOS DE LA INMOVILIZACIÓN CELULAR

La inmovilización de biocatalizadores en general se define como “el proceso por el cual el movimiento de los mismos en el espacio se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma insoluble en agua” (Cheetham, 1985).

La inmovilización de células completas es necesaria cuando la enzima no puede ser extraída en forma estable, se inactiva fácilmente durante la inmovilización o se requieren mecanismos de regulación asociados con su patrón metabólico.

El uso de células inmovilizadas evita la separación enzima-célula por lo que no se requieren procesos previos de extracción y purificación con posibles pérdidas de rendimiento. Al mantenerse la enzima en su medio ambiente natural, dentro de las células, no están sujetas a las modificaciones químicas o conformacionales que se pueden producir durante el proceso de inmovilización. La membrana celular también protege a la enzima de desnaturalizaciones mecánicas como fuerzas de cizalla, etc. En la mayoría de las preparaciones de células inmovilizadas, las células son inaccesibles a los microorganismos potencialmente invasores, de manera que no hace falta mantener unas condiciones de operación estériles (Westman y col., 2012).

La inmovilización de microorganismos en soportes adecuados presenta numerosas ventajas en cuanto a control y eficacia del sistema en procesos industriales y aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, así como en aplicaciones medioambientales. Sin embargo, a pesar de los estudios publicados, aún no se han establecido métodos de inmovilización ni soportes estándar adecuados de manera genérica para diferentes tipos de inmovilización. Todavía sigue siendo necesario estudiar, en cada caso, las características, propiedades y limitaciones concretas de cada aplicación. Hoy en día se reconoce cada vez más la importancia del soporte y del método de inmovilización, porque de ellos depende el microambiente que se genera en torno al biocatalizador y determina su efectividad.

La primera consideración a la hora de inmovilizar células, es elegir bien el soporte de inmovilización, teniendo en cuenta diferentes propiedades del mismo (Tabla 2.6). Una vez decidido el soporte hay que considerar el método de inmovilización evaluando previamente el uso y aplicación de las células inmovilizadas.

En la última década se han desarrollado y evaluado numerosas técnicas y soportes de inmovilización para células microbianas de aplicación en sectores muy diversos, que van desde la industria química, farmacéutica o alimentaria (Ibrahim y col., 2009; Cheng y col., 2014;

Rajam y Anandharamakrishnan, 2015), al tratamiento de aguas residuales (Magrí y col., 2012) o de efluentes para la obtención de biocombustibles (Singh y col., 2015).

Tabla 2.6. Consideraciones fundamentales a la hora de seleccionar el soporte de inmovilización (Bickerstaff, 1997).

<i>Propiedades</i>	<i>Puntos a tener en cuenta</i>
FÍSICAS	Grado de porosidad, volumen de poro, permeabilidad, densidad, área superficial viable, etc.
QUÍMICAS	Regeneración del soporte, hidrofobicidad, grupos funcionales disponibles para modificarse, etc.
ESTABILIDAD	Actividad enzimática residual, estabilidad al almacenamiento, regeneración de la actividad enzimática, estabilidad mecánica del soporte, etc.
SEGURIDAD	Biocompatibilidad, toxicidad de los componentes, etc.
ECONÓMICAS	Coste del soporte, de los reactivos químicos necesarios, impacto medioambiental, preparación a escala industrial, etc.
REACCIÓN	Radio de flujo, productividad catalítica, cinéticas de reacción, limitaciones difusionales de transferencia de masa de cofactores, sustratos o productos, etc.
RESISTENCIA	Temperatura, pH, mecanismos de defensa de las células al ataque bacteriano, etc.

2.3.2. PRINCIPALES TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

Entre los procedimientos utilizados para inmovilizar células se encuentra la floculación celular (Groboillot y col., 1994), la unión a un soporte (Chibata, 1978), el entrecruzamiento (Chibata, 1978), el atrapamiento en una matriz (Trevan, 1990) y encapsulación (Rathore, 2013) (Fig. 2.7).

Entre las ventajas en común de todas estas técnicas se incluye la posibilidad de recuperación y reutilización de las células al final del proceso y que se pueden aplicar en procesos en continuo, lo que puede redundar en un incremento de la productividad y reducción del coste global.

Seguidamente se pasan a describir de manera más detallada cada una de las técnicas de inmovilización anteriormente enumeradas.

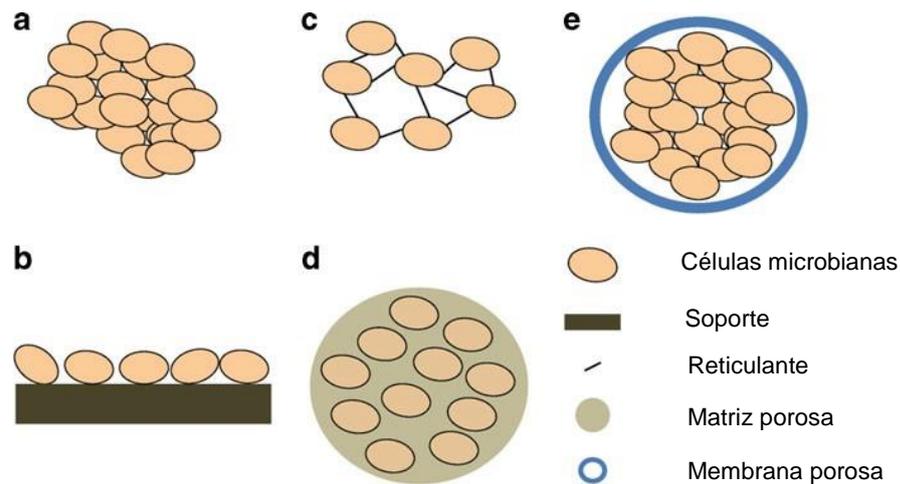


Fig. 2.7. Técnicas de inmovilización para células microbianas. (a) floculación, (b) unión a soporte, (c) entrecruzamiento, (d) atrapamiento en una matriz porosa y (e) encapsulación (Westman y col., 2012).

- **Unión a un soporte:** Se basa en la formación de enlaces entre las células microbianas y un soporte insoluble en disoluciones acuosas. Este método fue aplicado por primera vez para la inmovilización de células de *Echerichia coli* y *Azotobacter agile* en Dowex-1 (Chibata, 1978).

Dependiendo del tipo de unión de la célula al soporte, pueden llevarse a cabo procesos de inmovilización por adsorción física, enlace iónico, quelación (o unión metálica) y unión a través de enlaces covalentes (Kennedy y Roig, 1995). Sin embargo, no es un método apropiado para la inmovilización de células enteras.

La *adsorción física* requiere interacciones reversibles entre las células y el material de soporte. Las fuerzas implicadas en estos procesos suelen ser de tipo fuerzas de Van der Waals, interacciones por puentes de hidrógeno e hidrofóbicas. El procedimiento consiste en mezclar los componentes biológicos con el soporte con las propiedades de adsorción, bajo las condiciones adecuadas de pH, fuerza iónica, etc, durante un periodo de incubación, posteriormente se recogen las células inmovilizadas y se procede a un lavado intensivo de las mismas para eliminar restos biológicos (Bickerstaff, 1997). Este procedimiento de inmovilización celular es simple y barato, la principal desventaja se encuentra en la debilidad de la unión célula-soporte. Esta técnica se utiliza principalmente para el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, las técnicas de adsorción no son comunes en la producción de alimentos (Groboillot y col., 1994).

La inmovilización mediante *enlaces iónicos* se basa, principalmente, en la unión iónica de las células a soportes sólidos que contienen restos cambiadores de iones. La fuerza de unión

entre la célula y el soporte es mucho más alta que en el enlace covalente (Fernández, 2002).

La inmovilización por *enlace covalente* implica la unión covalente entre la célula y el soporte. La unión, normalmente, se produce entre grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y grupos funcionales no esenciales presentes en la superficie del biocatalizador. Primero, los grupos funcionales del material soporte son activados con reactivos específicos y, posteriormente, el biocatalizador es añadido para formar la unión covalente con el soporte ya activado (Bickerstaff, 1997). La principal desventaja comparando esta técnica con la adhesión sobre un soporte inerte es el riesgo de que se produzca daño celular, ya que la membrana de la célula está implicada en la unión con el soporte (Groboillot y col., 1994) y puede producirse una autólisis durante la reacción dando lugar a la salida y pérdida de las enzimas (Chibata, 1978).

La *quelación o unión metálica* es una técnica que implica el uso de compuestos de metales de transición como una forma de activar la superficie del soporte, permitiendo el acoplamiento directo del biocatalizador sin transformación previa del soporte, a través de la formación de quelatos. Entre los soportes usados se encuentra el vidrio, la quitina, la celita, el ácido algínico, la gelatina, los poli-(ácidos 4 y 5-acrilaminosalicílicos) y la celulosa. Con este procedimiento pueden producirse también deserciones, aunque los avances más recientes en el campo de la quelación permiten conseguir un alto grado de estabilidad operacional (Kennedy y Kalogerakis, 1984).

La *unión célula-célula* es una técnica basada en la floculación, la agregación celular se produce de forma natural, normalmente estos agregados son sensibles a las fuerzas de cizalla, por lo que la agregación es promovida por la adición de agentes de entrecruzamiento (Groboillot y col., 1994).

- **Entrecruzamiento:** Las células microbianas pueden ser inmovilizadas por entrecruzamiento con reactivos bi o multifuncionales. Este método fue usado en 1974 para la inmovilización de células de *Echerichia coli* dando una actividad aspartasa elevada. No hay muchos estudios en los que se use este tipo de inmovilización, sin embargo, se han obtenido buenos resultados siempre que se ha encontrado el reactivo adecuado para las células que se quieren inmovilizar (Chibata, 1978).

- **Atrapamiento:** Los métodos de inmovilización más usados para la inmovilización de células viables suelen consistir en alguna forma de atrapamiento utilizando una matriz porosa (Trevan, 1990). Dentro de los materiales más frecuentemente utilizados para el atrapamiento de células microbianas se incluyen; el colágeno, gelatina, agar, triacetato de celulosa, alginato,

poliacrilamida y poliestireno (Chibata, 1978).

Dentro de los procesos de inmovilización por atrapamiento se pueden diferenciar las técnicas de atrapamiento en geles, en fibras y la microencapsulación.

Atrapamiento en geles - En este método, las células se recluyen en el interior de los espacios intersticiales de geles poliméricos insolubles en agua. En la mayoría de los casos se requiere un elevado grado de entrecruzamiento en la matriz para optimizar la inmovilización y disminuir las pérdidas de biomasa activa. Sin embargo, un tamaño de poro excesivamente reducido podría limitar la difusión del sustrato, hacia el interior, o del producto, hacia el exterior, de la matriz (Trevan, 1990).

Atrapamiento en fibras - Esta técnica consiste en inmovilizar células en las microcavidades de fibras sintéticas. Es necesario disolver el polímero formador de fibras en un solvente orgánico inmiscible en agua para formar una emulsión con la solución acuosa del biocatalizador. Esta emulsión se extrusiona en un líquido de coagulación (tolueno o éter de petróleo), con lo que precipita el polímero en forma de filamentos con microgotas de la solución de células atrapadas dentro de las microcavidades del polímero (Dinelli y col., 1976).

El uso de fibras de celulosa es de los más estudiados en la inmovilización de células microbianas, se ha demostrado que es un método muy estable. El triacetato de celulosa se disuelve en cloruro de metileno y la suspensión de células microbianas que contienen glicerol se añaden a la celulosa, la mezcla se extrusiona a un baño que contiene tolueno. Las fibras resultantes se secan a vacío (Chibata, 1978).

La *encapsulación* de células, consiste en el atrapamiento mediante recubrimiento con un material polimérico para producir partículas que sean permeables a los gases, nutrientes y metabolitos (Kennedy y Roig, 1995; Rathore, 2013). En este método se encapsulan físicamente los biocatalizadores dentro de una membrana de manera tal que las moléculas de producto y sustrato puedan difundir a su través libremente, siempre que sus tamaños sean lo suficientemente pequeños para que esto sea factible). Los primeros trabajos de inmovilización de biocatalizadores con este tipo de soportes datan de comienzos de los años 60 (Chang, 1964).

Con estas técnicas se consigue aumentar la densidad celular, un mayor rendimiento de productos y la retención de la actividad por un periodo más largo de tiempo, así como una fácil recuperación de las células, sin embargo, la transferencia de masa a través de la membrana de la cápsula y la robustez de las mismas, son todavía un problema a la hora de usar células encapsuladas (Westman y col., 2012).

En la tabla 2.7 se incluyen algunas de las aplicaciones de células microbianas encapsuladas.

Tabla 2.7. Aplicaciones de células microbianas encapsuladas (Westman y col., 2012).

<i>Organismo</i>	<i>Enzima/actividad catalítica</i>	<i>Producto</i>	<i>Referencia</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	Benzoylformato descarboxilasa	Benzaldehído	Park y Jung , 2002
<i>S. cerevisiae</i> recombinante	Invertasa	Glucosa	Chang y col., 1996
<i>E.coli</i>	β - galactosidasa	Galactosa	Lee y Park., 1996; Park y col., 1997a; Oh y Park, 1998.
Levaduras	Reducción de 1-fenil-1- propanodiona	2-hidroxil-1-fenil- 1-propano	Green y col., 1996
<i>Bacillus macerans</i>	CGTasa	Glucosil-xilitol y ciclodextrina	Park y col., 2000, 2001
<i>E. coli</i> recombinante	Ciclohexanona monooxigenasa	Oxidación de cetonas a ésteres	Hucik y col., 2010; Bucko y col., 2011; Schenk Mayerová y col., 2012
<i>E. coli</i> recombinante	Citocromo P450 BM3 monooxigenasa	Índigo	Lu y Mei, 2007
<i>Nocardia tartaricans</i>	<i>cis</i> -Epoxisuccinato hidrolasa	L-(+)-tartrato	Bucko y col., 2005, 2006

La encapsulación celular se puede dividir, a su vez, en dos técnicas: micro y macroencapsulación en función del tamaño de las partículas; la macroencapsulación es el atrapamiento de células en perlas poliméricas del tamaño de unos pocos mm o cm y la microencapsulación produce perlas del rango de 1-1000 μ m. Para la microencapsulación de células microbianas es esencial que el proceso de encapsulación se lleve a cabo bajo condiciones que aseguren la viabilidad de las células, también es importante que las microsferas presenten buena estabilidad para soportar el crecimiento celular a largo plazo (Rathore, 2013).

2.3.3. INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO

Para el desarrollo de esta técnica se han utilizado fundamentalmente dos tipos de polímeros dependiendo de la aplicación y características requeridas: geles derivados de materias naturales (triacetato de celulosa, agar, agarosa, almidón, colágeno, carragenato, alginato, etc.) y geles derivados de polímeros sintéticos (poliacrilamida, polietilenglicol, metilacrilato, uretano, silicona, resinas elásticas, etc.) (Trevan, 1990; Adlercreutz, 1993; Busto y Pérez-Mateos, 1997).

Tanto la elección del material como la técnica de atrapamiento tienen un impacto muy importante en las propiedades de los inmovilizados, como son la rigidez, permeabilidad y estabilidad química. Los materiales de la matriz deben formar geles en condiciones suaves, de modo que, la viabilidad celular no disminuya significativamente. También deben ser lo suficientemente robustos mecánicamente con el fin de que no se rompan durante su uso y deben tener buena permeabilidad para permitir el transporte de compuestos de bajo peso molecular, tales como nutrientes y metabolitos, a través de la membrana (Uludag y col., 2000). En general los polímeros orgánicos dan como resultado partículas flexibles y elásticas, mientras que sustancias inorgánicas y sintéticas confieren una mayor rigidez y resistencia química, pero menor biocompatibilidad. La formación de los geles suele llevarse a cabo bajo condiciones estériles con el fin de evitar la presencia de elementos contaminantes en la matriz de inmovilización (Talebnia y Taherzacheh, 2006).

La inmovilización por atrapamiento en geles presenta algunos problemas derivados de los soportes. Por ejemplo, algunos geles de poliacrilamida pueden resultar tóxicos por lo que no son aptos para su aplicación en la industria alimentaria. Por otra parte, el mantenimiento de los geles de un tamaño medio de poro, que no limite excesivamente la difusión de solutos, causa gran variabilidad que puede ocasionar la pérdida de los biocatalizadores. Sin embargo, la sencillez y la suavidad de la preparación de la enzima permite maximizar su empleo en numerosos procesos industriales (Trevan, 1990).

En los últimos años, se ha recogido el uso de una nueva generación de polímeros sintéticos como soportes de inmovilización: entre ellos, se encuentra el alcohol polivinílico (PVA), el cual carece de toxicidad, es muy estable y presenta un tamaño de poro bastante controlable (Ariga y col., 1994; Lozinsky y Pliega, 1998).

Se han utilizado también materiales inorgánicos para encapsular bacterias, hongos, plantas y células animales en silica, óxido de metales, organosiloxano... (Gill y Ballesteros, 2000). Los materiales inorgánicos a veces muestran propiedades como la baja hinchazón en disolventes,

inercia química y dureza (Sakai y col., 2002; Zou y col., 2008). Algunos obstáculos, sin embargo, restringen su uso en la encapsulación celular, como es la formación de alcohol durante la polimerización, la necesidad de catalizadores ácidos o básicos, el riesgo de contracción de la cápsula y el colapso de los poros (Gill y Ballesteros, 2000; Sakai y col., 2002). También es posible preparar cápsulas usando materiales híbridos orgánico-inorgánico donde se cambian propiedades de polímeros orgánicos y materiales inorgánicos, resultando ser más estables químicamente y con buena resistencia a la abrasión (Ylittero y col., 2012).

Para el atrapamiento de células microbianas, es esencial que el proceso de inmovilización se lleve a cabo bajo condiciones que aseguren la viabilidad de las células atrapadas. Es necesario que los inmovilizados posean buena estabilidad mecánica con el fin de soportar el crecimiento a largo plazo del cultivo celular. Varias técnicas de atrapamiento de células microbianas se han estudiado en los últimos años para mejorar la protección y la viabilidad de los microorganismos, algunas de las técnicas más comúnmente usadas son la extrusión, spray-drying, emulsificación y coacervación (de Vos y col., 2010). Cada metodología tiene sus propias características y su elección depende en gran parte de su aplicación posterior.

La **extrusión** es el método más comunmente usado para el atrapamiento de células microbianas, en esta técnica una solución polimérica se mezcla con las células microbianas y luego esta se extruye a través de un orificio sobre una solución que contiene el agente entrecruzante. La gelificación ocurre por contacto entre el polímero de la solución con el agente entrecruzante, por enfriamiento o por una combinación de ambas. Los factores que afectan al tamaño de la partícula son el diámetro del orificio, la viscosidad, la velocidad de flujo de la solución polimérica, la distancia entre el orificio a la solución reticulante y la temperatura de la solución polimérica (Brun-Graeppi y col., 2011). La formación de las partículas se lleva a cabo de manera controlada usando diferentes técnicas como son la formación por fuerzas electrostáticas, por cortador de chorro, por frecuencia de vibración o por co-extrusión coaxial (Rathore y col., 2013).

Las mayores ventajas de la extrusión son la simplicidad de la operación, el bajo coste y las condiciones operativas suaves que aseguran una elevada viabilidad celular (de Vos y col., 2010). Sin embargo, su uso a escala industrial es generalmente difícil debido a la lenta producción de las partículas (Burgain y col., 2011).

La técnica de **dispersión y secado (spray-drying)** implica la atomización de una suspensión de células microbianas en una solución polimérica en el aire de secado caliente, seguido por la rápida evaporación del agua (Corcoran y col., 2004; Zhao y col., 2008), el

producto se separa a continuación como un polvo seco del aire de transporte en un ciclón. Comparando esta técnica con otras, ofrece la ventaja de producir partículas en procesos continuos con relativa facilidad (Gouin, 2004; Brun-Graeppi y col., 2011), sin embargo, a gran escala, el elevado coste tanto de instalación como operacional y la gran superficie requerida por el equipo presenta uno de los retos de su uso (John y col., 2011).

La técnica de **emulsificación** se trata de la dispersión de la suspensión celular/polímero en una fase orgánica/aceite. La mezcla se homogeneiza a partir de una emulsión de agua en aceite con la ayuda de un agente tensioactivo y agitación. La congelación de la fase dispersa se inicia por enfriamiento o adición de un agente de reticulación a la emulsión. Las partículas producidas se recogen posteriormente por centrifugación o filtración. El tamaño depende de la velocidad de agitación y de la velocidad de adición de la solución entrecruzante. La concentración del tensioactivo utilizado también tiene un efecto sobre el tamaño de las gotitas de la fase dispersa que finalmente afecta al tamaño de las partículas (Shah y Ravula, 2000).

El principal inconveniente de esta técnica es la potencial toxicidad de los disolventes orgánicos sobre las células. Aunque los aceites son menos tóxicos que los disolventes orgánicos, la eliminación de aceite de los inmovilizados puede ser más difícil. Además, su uso en la emulsificación también aumenta el coste global de proceso (Krasaekoopt y col., 2003).

La **coacervación** se ha utilizado para encapsular aceites saborizantes, conservantes, enzimas, así como células microbianas (John y col., 2011; Oliveira y col., 2007a,b; Park y Chang, 2000). Esta técnica utiliza la separación de fases de uno o más polímeros incompatibles de la solución de polímero de recubrimiento inicial bajo condiciones de un pH específico, temperatura o composición de la solución. El polímero incompatible se añade a la solución de polímero de recubrimiento y la dispersión es agitada (Rathore y col., 2013). Es una tecnología altamente prometedora en vista de su buena capacidad de encapsulación y la buena resistencia mecánica a la temperatura y los cambios de pH (Oliveira y col., 2007a).

2.3.3.1. Inmovilización en geles de alcohol polivinílico

El PVA es el polímero soluble con una mayor producción a nivel mundial, lo que conlleva que su coste sea reducido. El PVA se produce por polimerización radicalaria de acetato de vinilo a acetato de polivinilo, seguido de la hidrólisis parcial de los grupos acetato a grupos alcohol. Esta conversión no es completa, por lo que es necesario determinar el grado de hidrólisis alcanzado (por lo general entre 85 y 100%), ya que el contenido de grupos acetato residuales puede tener efectos en sus propiedades químicas, la solubilidad y el grado de

cristalinidad del polímero. La estructura química del PVA se muestra en la Fig. 2.8.

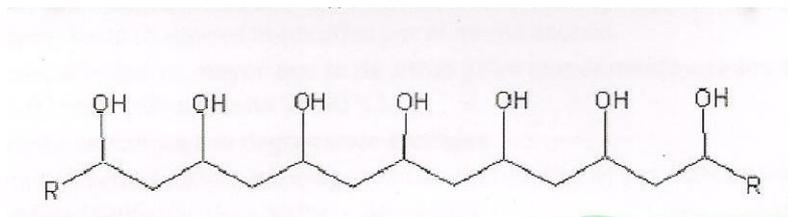


Fig. 2.8. Estructura química del polivinilalcohol (PVA). (Monopoli y col., 2008).

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético y no tóxico (Zain y col., 2011) descrito por primera vez a comienzos de los años 70, debido a su naturaleza hidrofílica es capaz de gelificar formando hidrogeles en soluciones acuosas concentradas. Estos hidrogeles se forman por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las cadenas vecinas y, en menor medida, interacciones de Van der Waals entre los hidrocarburos de las cadenas poliméricas. Los polímeros resultantes poseen dominios sindiotácticos (secuencias de 6 a 8 unidades en las cuales los grupos hidroxilos se encuentran enlazados de forma alternante al carbono quiral de la cadena principal) responsables de la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y dominios isotácticos (secuencias en las que los grupos hidroxilo se distribuyen de manera aleatoria a lo largo de la cadena polimérica) que participan principalmente en las interacciones intramoleculares (Fig. 2.9).

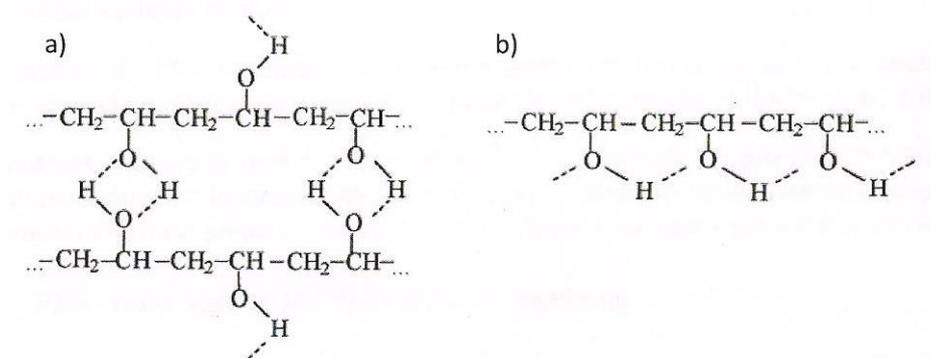


Fig. 2.9. Estructura sindiotáctica (a) e isotáctica (b) en geles de PVA (Lozinsky y Pliega, 2008).

El PVA ha sido usado ampliamente en biotecnología para la inmovilización de enzimas y células, puesto que no afecta a la estabilidad estructural de los inmovilizados (Ariga y col., 1993; Bonine y col., 2014). Otras ventajas de los hidrogeles de PVA es su bajo coste, su elevada durabilidad y la estabilidad química que poseen (Zain y col., 2011).

Los geles de PVA muestran un elevado grado de hinchamiento en agua (o en fluidos

biológicos), y también son correosos y elásticos en la naturaleza. Debido a la elevada hidrofiliidad del PVA este debe ser entrecruzado química o físicamente para que sea insoluble. Se han estudiado varios métodos para conferir hidrofiliidad al PVA y producir su gelificación, si bien la gelificación se puede conseguir mediante tres procesos diferenciados (Gholap y col., 2004):

- por radiación ultravioleta con un PVA fotosensible
- por acción del ácido bórico
- por congelación y descongelación del polímero

Wu y Wisecarver (1992), usaron PVA-alginato como matriz de inmovilización de *Pseudomonas* goteando la solución dentro de otra saturada de ácido bórico y cloruro de calcio al 2% donde el ácido bórico actuaba de agente entrecruzante. Hashimoto y Furukama (1987), aplicaron un método más simple para fabricar perlas de PVA para la inmovilización de lodos activados, entrecruzaban PVA usando una solución de ácido bórico y produciendo un tipo de celosía de gel activo PVA-Bórico, el lodo activado se inmovilizó con éxito sin pérdida evidente de actividad biológica.

El método de congelación-descongelación es el que presenta mayor número de ventajas, ya que en la gelificación no se usa ningún compuesto químico para generar la polimerización. A la matriz polimérica resultante se la llama criogel o hidrogel de PVA y tiene una gran aplicación en la inmovilización de biocatalizadores (Ariga y col., 1993). Monopoly y col. (2008) definen un hidrogel como un polímero reticulado, es decir, una red tridimensional de cadenas poliméricas entrecruzadas por asociaciones físicas y químicas, obtenido a partir de una solución acuosa, que presenta carácter hidrofílico y al mismo tiempo puede ser hinchado por inmersión en agua a través de los residuos insolubles.

Es necesario, en primer lugar, elegir el PVA adecuado para la formación del hidrogel, ya que existe un gran número de clases de PVA, con diferentes grados de polimerización (DP) y de hidrólisis (DH). Grados de polimerización muy bajos no son adecuados ya que la viscosidad de la solución no será suficiente para formar la perlas de hidrogel, incluso a concentraciones de PVA elevadas. Por otro lado, grados de polimerización elevados van a dar lugar a soluciones muy viscosas que generan problemas a la hora de la formación de las perlas. En lo referente al grado de hidrólisis, soluciones de alcohol polivinílico con DH bajos (88%) dan lugar también a soluciones muy viscosas (Ariga y col., 1994). Por otra parte, la hidrofobicidad del gel está regulada por el grado de hidrólisis, de manera, que para DH superiores al 70%, el polímero es

soluble en agua (Hertzberg y col., 1995).

Para la formación de criogeles se pueden usar a su vez diferentes agentes congelantes como: parafina a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ariga y col., 1993), enfriamiento lento con metanol (-15 a $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$) o por enfriamiento rápido con N_2 líquido (Ariga y col., 1994; Lozinsky y Pliega, 1998). Otros medios de congelación empleados son el aceite de naranja a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Prübe y col., 1998) y el aceite de silicona a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Leidig y col., 1999).

En este trabajo se utilizó como medio de congelación N_2 líquido ($-146\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tras la rápida congelación de las perlas éstas se descongelan lentamente en dicho medio obteniéndose de este modo, un hidrogel de elevada elasticidad, estable mecánicamente, no tóxico y escasamente biodegradable (Leidig y col., 1999). La formación del gel a partir de la solución acuosa de PVA se atribuye principalmente a los enlaces de hidrógeno que se forman durante el proceso de congelación-descongelación entre las moléculas del polímero, debido a la mayor proximidad existente entre dichas moléculas (Fig. 2.10).

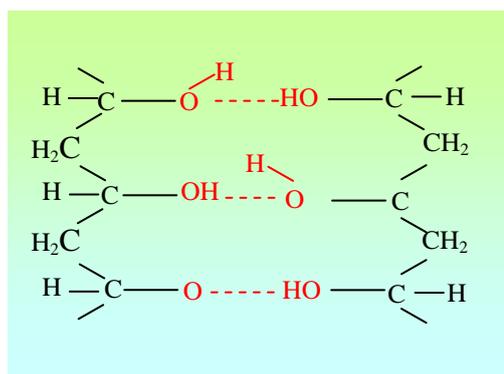


Fig. 2.10. Enlaces de hidrógeno en el hidrogel de alcohol polivinílico (Leidig y col., 1999).

Existen numerosas ventajas, recogidas por varios autores, del empleo del PVA como matriz de inmovilización (Fernandes y col., 2009; Bieler y col., 2010; Poraj-Kobielska y col., 2015):

- El método de inmovilización es sencillo y relativamente barato, ya que el PVA es un polímero sintético fácilmente disponible a un precio razonable.
- Posee una elevada estabilidad en gran variedad de disolvente, proporcionando un medio para superar las limitaciones implicadas por el medio acuoso.
- Su termoestabilidad es mayor que la de otros geles comúnmente usados como soportes de inmovilización (resiste hasta $70-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Es altamente resistente a la degradación biológica.
- Tiene una estructura porosa heterogénea con un tamaño de poro fácilmente controlable,

lo cual facilita la difusión de sustrato y productos.

- Se trata de un polímero biocompatible y no tóxico.
- Posee propiedades físico-químicas muy adecuadas para el proceso de inmovilización, como una buena elasticidad, bajo coeficiente de fricción, resistencia al cizallamiento y alta estabilidad mecánica. Estas propiedades son muy ventajosas para un soporte de inmovilización utilizado en una amplia gama de tipos de reactor, donde la agitación vigorosa suele ser común.

La adición de agentes crioprotectores como glicerol y polietilenglicol ayudan a aumentar la estabilidad de la actividad enzimática en estos inmovilizados (Groboillot y col., 1994).

El polietilenglicol (PEG) es un polímero lineal, hidrosoluble, que se usa como aditivo estabilizante en la inmovilización de enzimas. Es biocompatible, biodegradable y no tóxico. Los hidrogeles de PEG, $[H(OCH_2 CH_2)_nOH]$, han recibido mucha atención en el campo de los sistemas de administración de fármacos y la regeneración de tejidos debido a que tiene propiedades altamente deseables tales como la buena biocompatibilidad, la no-immunogenicidad y la resistencia a la adsorción de proteínas. Los hidrogeles de PEG pueden ser fácilmente sometidos a tratamientos de funcionalización, tales como la adhesión celular y la degradación proteolítica mediante la incorporación de péptidos y proteínas bioactivas en la red del polímero (Moriyama y col., 2015).

Las mezclas de polímeros a menudo presentan propiedades superiores a las de cada polímero por separado (Reddeppa y col., 2009; Rao y col., 2012). La mezcla de polímeros PVA-PEG es muy importante debido a sus propiedades mejoradas, el PEG interacciona con el PVA a través de sus grupos hidroxilo terminales modificando su estructura de forma que altera el tamaño de los poros y el grado de porosidad de las perlas poloméricas. De esta manera, el uso de PEG disminuye los problemas difusionales debido a la mayor porosidad que aporta en el sistema (Buwalda y col., 2014; Cheng y col., 2014). En la inmovilización celular, usando PEG como agente porógeno se ha mejorado mucho la tolerancia medioambiental y la eficiencia de la reacción biocatalizadora de las células encapsuladas, por ejemplo, células inmovilizadas en alginato de Ca-PEG tienen mejor tolerancia a la temperatura y a la concentración de sustrato que las células inmovilizadas solamente en alginato de calcio (Cheng y col., 2014).

2.3.3.2. Encapsulación en geles de alginato de calcio (*hollow-beads*)

Los geles de alginato de calcio se han utilizado ampliamente para la inmovilización por atrapamiento de células enteras (Busto y col., 1995; García, 2000). El alginato es

particularmente el material más popular, ya que permite un proceso de encapsulación sencillo que se puede realizar a pH neutro y a temperatura ambiente y no requiere el uso de productos químicos agresivos, es una técnica que se lleva fácilmente a cabo por la adición de gotas de CaCl_2 , que contiene la suspensión celular, dentro de una solución de alginato de sodio (Talebnia y Taherzadeh, 2006). Con la estructura de un corazón líquido dentro de una membrana semipermeable, la cápsula puede encerrar células en solución acuosa para que el contacto entre el sustrato y el biocatalizador pueda llevarse a cabo. Este método de inmovilización celular presenta numerosas ventajas debido a la buena biocompatibilidad de los encapsulados, su sencillez en el proceso de elaboración y su bajo coste (Chai y col., 2004).

La encapsulación en perlas huecas (*hollow-beads*) de alginato de calcio ha sido usada para la inmovilización de enzimas como la invertasa (Tanriseven y Doan, 2001), células microbianas como *Lactobacillus rhamnosus* (Dembczynski y Jankowski, 2000), encapsulación de *Sacharomyces cerevisiae* recombinante para la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa (Chang y col., 1996), Patel y col. (1996) propusieron la aplicación de geles de alginato para la encapsulación de fitomateriales (células, tejidos, embriones somáticos...), también se ha estudiado la encapsulación de semillas de cebada con fosfatasa para mejorar la biodisponibilidad del fósforo (Pilar-Izquierdo y col., 2013).

El alginato es un polisacárido estructural procedente de algas marinas, principalmente de *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* y *Eklonia cava*, aunque también puede ser secretado como polisacárido extracelular por algunas especies de bacterias como *Azotobacter vinelandii* y ciertas *Pseudomonas* (Cassidy y col., 1996).

El alginato contiene monómeros de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces (1 - 4) (Fig. 2.11). Existen diferentes secuencias y composiciones de estos monómeros en los distintos tipos de alginatos disponibles. Los monómeros se encuentran en la cadena de alginato en bloques, formando regiones homopoliméricas (bloques M y bloques G) entremezcladas con regiones heteropoliméricas (bloques MG) (Amsden y Turner, 1999).

Existen diferencias conformacionales entre los bloques M y G dentro de la cadena polimérica. Así, la sección del bloque M es plana mientras que la del bloque G está curvada (Fig. 2.11). Esta naturaleza seccional del polímero alginato confiere diferente flexibilidad del esqueleto de la cadena a los polímeros en solución. Estas diferencias en la flexibilidad no se deben a discrepancias en el enlace de hidrógeno, que está presente en la misma extensión en cada monómero, sino que provienen de una restricción mayor debida a los enlaces carbono-oxígeno que unen dichos monómeros. El enlace $\alpha(1 - 4)$ de los residuos de ácido gulurónico

introduce grandes impedimentos estéricos procedentes de los grupos carboxilo y por ello, las cadenas de alginato con alto contenido en ácido manurónico son más flexibles en solución que las de contenido elevado en ácido gulurónico (Amsden y Turner, 1999).

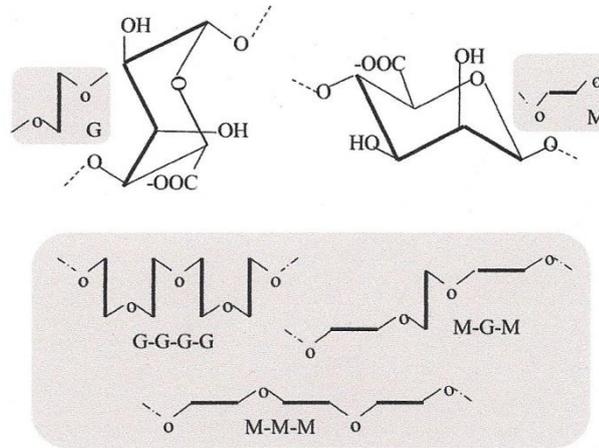


Fig 2.11. Estructura química de los alginatos (Corona-Hernández y col., 2013).

Este polisacárido en presencia de cationes monovalentes forma soluciones viscosas incluso a concentraciones bajas. En contraste, con soluciones de cationes divalentes (especialmente iones de calcio) (Serp y col., 2000) tiene lugar la formación del gel por reacción de dichos cationes con los bloques G de la cadena de alginato, enlazándose estrechamente los bloques G de dos cadenas diferentes, el Ca^{2+} encaja en los bloques G como “huevos en un cartón de huevos” (Fig. 2.12). En consecuencia, cuanto mayor es el contenido de monómeros de ácido gulurónico en el alginato, más fuerte y quebradizo es el gel (Amsden y Turner, 1999).

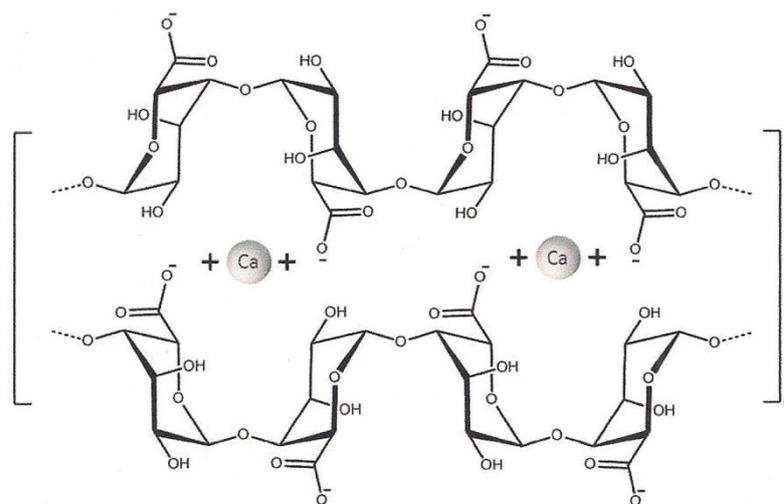


Fig 2.12. Modelo de “caja de huevos” (Corona-Hernández y col., 2013).

Los geles de alginato de calcio presentan numerosas ventajas; su elevada resistencia mecánica, buena estabilidad química, carencia de toxicidad, poca o ninguna capacidad para inactivar la enzima, elevada tasa de difusión de sustratos y productos y biocompatibilidad total en procesos alimentarios (Groboillot y col., 1994; Hertzberg y col., 1995) y muy buenas propiedades de transporte (Chai y col., 2004). Por otro lado, estos geles también presentan desventajas como: desestabilización del gel frente a fosfatos, citratos o lactatos (presentan afinidad por el Ca^{+2}), ablandamiento continuo del gel en presencia de iones no gelificantes como Na^+ o K^+ que se intercambian molecularmente con el Ca^{+2} . Además, sus aplicaciones están limitadas por el tiempo y la temperatura y, en condiciones no estériles, existe la posibilidad de la hidrólisis del alginato por efecto de enzimas producidas por bacterias (Hertzberg y col., 1995; Cassidy y col., 1996).

Con el fin de formar cápsulas esféricas, la viscosidad de la solución de la suspensión celular normalmente necesita ser aumentada añadiendo dextrano (Nigam y col., 1988), goma xantana (Cheong y col., 1993; Chang y col., 1996) o Carboximetilcelulosa (CMC) (Talebnia y col., 2005). La principal ventaja de esta metodología es que en un solo paso se consigue atrapar y recubrir las células con distintas sustancias. Esto es así porque se va a formar una cápsula en cuyo interior van a quedar encerradas las células en la fase líquida junto con los agentes deseados.

Son numerosos los factores que influyen en las características finales de las cápsulas de alginato de calcio, por ejemplo, una elevada concentración de alginato de sodio o una baja concentración de CaCl_2 pueden conducir a la formación de perlas de menor diámetro y mayor delgadez de la membrana de la cápsula. La intensidad de compresión aumenta con el aumento de la concentración de CaCl_2 y de alginato de sodio. Cuando la velocidad de goteo se incrementa, el diámetro y el grosor de la membrana de la cápsula disminuye pero la intensidad de compresión varía poco. Con el paso del tiempo de gelificación el diámetro de la cápsula también aumenta (Chai y col., 2004).

En la Fig. 2.13 se muestra de forma esquemática la técnica de encapsulación en perlas huecas (*hollow-beads*) desarrollada en esta Tesis doctoral.

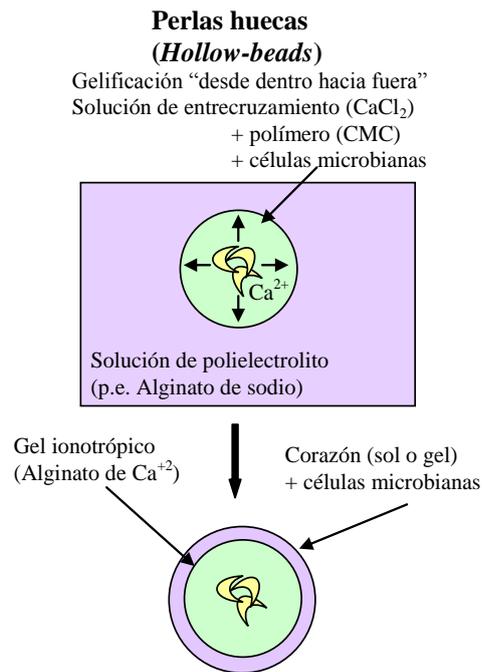


Fig. 2.13. Encapsulación de células microbianas en perlas huecas (*Hollow-beads*) (Patel y Vorlop, 2000).

2.3.4. EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN SOBRE LAS CÉLULAS MICROBIANAS

Poco puede decirse del efecto de la inmovilización sobre el comportamiento de las células viables. Sin embargo, se pueden hacer algunas observaciones generales.

Los métodos de inmovilización más frecuentes para la inmovilización de células viables suelen consistir en alguna forma de atrapamiento dentro de un polímero de gel acuoso. Es muy probable que la difusión limitada haga que el microambiente que rodea a la célula sea bastante diferente del grueso de la fase móvil.

El propósito de la microencapsulación de células microbianas es la de preservar la viabilidad de las células frente al medio ambiente que las rodea tales como cambios en el pH, la concentración de productos metabólicos perjudiciales, estrés osmótico y los cambios de temperatura, así como mejorar la estabilidad al almacenamiento. Por otro lado, la inmovilización celular a veces daña la eficiencia biocatalizadora, disminuye la velocidad de reacción inicial y se extiende el tiempo de reacción mediante la limitación de la transferencia de masa a través de la barrera de gel y, posiblemente, limitando el suministro de O₂ a las células y CO₂ fuera de la matriz, esto parece ser un problema común para la aplicación práctica de la inmovilización microbiana (Cheng y col., 2014). Por ejemplo, la

microencapsulación mediante secado por pulverización se sabe que afecta negativamente a la viabilidad celular debido a las altas temperaturas alcanzadas en el proceso de microencapsulación. Sin embargo otras técnicas como la microencapsulación por pulverización en refrigeración o la encapsulación de células en microperlas de PEG usando microfluidos no afectan negativamente a la viabilidad celular (Rathore, 2013).

En el caso de la encapsulación celular la retención de la viabilidad de las células durante el almacenamiento posee especial importancia sobre todo en la industria alimentaria, se ha encontrado que la temperatura de almacenamiento es indirectamente proporcional a la viabilidad de las células encapsuladas, una disminución de la temperatura conduce a un aumento de la estabilidad de almacenamiento (Rathore, 2013).

El intercambio de gases entre el microambiente del polímero y el grueso de la fase móvil puede estar limitado, sobre todo cuando las células tienen una intensa actividad metabólica. Así pues, los niveles de O₂ y CO₂ pueden ser sustancialmente diferentes dentro y fuera del microambiente de las células y esto puede afectar directamente a su metabolismo y al producto derivado de él. En el caso de organismos fotosintéticos, puede ocurrir también que se vean afectados por una disminución de la intensidad de la luz, causada no tanto por el polímero sino por la sombra que las células superficiales proyectan sobre las más profundas. En su metabolismo, las células producen a menudo ácidos o álcalis y, por tanto, el pH del microambiente puede diferir del existente en el grueso de la fase móvil. Esto puede también influir no sólo en la tasa metabólica, sino también en la productividad para un determinado metabolito. Tanto las hormonas como los reguladores o los enzimas extracelulares, tenderán a acumularse alrededor de la célula inmovilizada, causando múltiples efectos. Las células vegetales inmovilizadas que excreten hormonas endógenas, por ejemplo, se verán beneficiadas al proporcionarse a sí mismas un ambiente favorable. Los microorganismos inmovilizados que excreten un enzima digestivo extracelular, experimentarán una acumulación del mismo en su entorno, obteniendo con ello un aporte mayor de un nutriente esencial (que puede de todas formas estar presente en una concentración disminuida, debido a las restricciones para su movilidad y difusión que pueden existir en el seno del polímero) (Trevan, 1990). No obstante, la acumulación de metabolitos secundarios puede conducir a la represión de su propia síntesis en la célula, haciendo que las células inmovilizadas sean, por esta razón, menos productivas que las libres. Como contraste, la limitación del crecimiento causada por limitación de un nutriente puede determinar que las células pasen a una fase estacionaria en la que la producción de metabolitos secundarios sea mayor. Es por ello, poco sorprendente, que la limitación de

nutrientes o de luz, o la acumulación de productos inhibidores o tóxicos en el microambiente de las células, tengan como resultado que las células inmovilizadas de un preparado envejecido estén concentradas en la porción periférica de la matriz. Este efecto es probablemente debido más a la muerte celular en el centro de las partículas de soporte y al crecimiento celular en la periferia, que a la migración de las células en esa dirección (Trevan, 1990).

Se puede concluir, que las células encapsuladas están mejor protegidas de las sustancias tóxicas y otras tensiones por la membrana de la cápsula o a través de cambios fisiológicos inducidos por el proceso de la encapsulación y de la elevada densidad celular en el interior de la cápsula, esto junto con la posibilidad de lograr una elevada densidad celular en el bioreactor demuestra que las células encapsuladas son prometedoras para futuras aplicaciones industriales. Sin embargo, todavía hay retos que superar para la aplicación industrial de células encapsuladas, un ejemplo específico es la producción de encapsulados capaces de aguantar varios meses de uso en procesos continuos sin el deterioro de la actividad celular. El tamaño de las cápsulas es otro factor que necesita ser optimizado con el fin de obtener el mejor sistema posible, el cual puede ser muy diferente dependiendo de la aplicación y de los productos y sustratos usados. Antes de su aplicación a escala industrial, debe estudiarse su viabilidad económica (Westman y col., 2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LIMONINA

Los medios de cultivo se denominan “generales” si se diseñan para la proliferación (propagación, crecimiento o mantenimiento) de un grupo amplio de microorganismos o “específicos” si sólo permiten el crecimiento de un grupo reducido de microorganismos. Los medios de cultivo se denominan “de producción” si en su formulación se incluyen sustancias que inducen la biosíntesis de un metabolito por parte de los microorganismos.

En los siguientes apartados se presenta la metodología seguida para la selección de los medios de cultivo más adecuados para la producción y mantenimiento de los microorganismos aplicados en este trabajo.

Se ensayaron *Rhodococcus fascians* cepa CECT 3001 (NRRL-B-15096) (Colección Española de Cultivos Tipo) y *Microbacterium flavescens* (Laboratorio de Microbiología Marino Tabusso-Perú).

3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO GENERALES

3.1.1.1. Composición y preparación de los medios de cultivo líquidos

El medio de cultivo general utilizado para el crecimiento microbiano fue el medio Martínez-Madrid (MM) (Martínez-Madrid, 1989), referenciado ampliamente para los microorganismos objeto de estudio, cuya composición se detalla a continuación:

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
NaCl	0,1 g/l
NH ₄ Cl.....	2,0 g/l
FeCl ₃	0,001g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
Extracto de carne.....	1,0 g/l
Extracto de levadura.....	2,0 g/l
Peptona.....	5,0 g/l
Fructosa.....	4,0 g/l

Para preparar el medio se disolvían los compuestos referidos en agua destilada, se ajustaba el pH a 7 con HCl 0,1 M y se llevaba el volumen a 1 l. Se introducían 125 ml de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 ml, se tapaban con algodón hidrófobo y se esterilizaban en autoclave durante 20 min a 121 °C. Después, se dejaban enfriar y se inoculaban con *Rhodococcus fascians* o *Microbacterium flavescens*, procedentes de cepas liofilizadas (Colección Española de Cultivos Tipo y Laboratorio de Microbiología Marino Tabusso-Perú, respectivamente) ó, en su caso, de cultivos sólidos. A continuación, se sometían a incubación bajo agitación orbital a 25 °C, 150 rpm durante 48 h.

La preparación de los “precultivos” líquidos se llevaba a cabo inoculando dos asadas de un cultivo microbiano desarrollado en tubo inclinado de medio sólido MM (apdo 3.1.1.2) en 50 ml de medio líquido MM esterilizado. Se incubaban en un agitador orbital a 25 °C, 150 rpm durante 48 h. A continuación, se realizaban las diluciones oportunas con agua peptonada al 0,1% hasta conseguir la densidad óptica ($\lambda=600$ nm) necesaria para cada experiencia.

3.1.1.2. Preparación de los medios de cultivo sólidos

Para cultivar los microorganismos en medio sólido se utilizaba el medio líquido Martínez-

Madrid, descrito anteriormente, al que se añadían 20,0 g/l de agar-agar (calidad Sigma). A continuación, se calentaba en baño-maría para disolver el agar y, una vez disuelto el agente solidificante, se tapaba con algodón hidrófobo, esterilizándolo posteriormente en autoclave a 121 °C durante 20 min. A continuación, se dejaba enfriar hasta 50 °C y se repartía en placas Petri a razón de unos 15-20 ml, dejándolo en reposo hasta que el medio se solidificaba completamente. Posteriormente, se inoculaban a partir del cultivo líquido de *R. fascians* o de *M. flavescens* mediante siembra en estría con el objeto de obtener colonias aisladas. Una vez inoculadas las muestras se incubaban en estufa a 25 °C durante 48 h.

Se prepararon tubos inclinados de medio sólido MM, para lo que se disolvía el agar (20 g/l) en el medio de cultivo líquido MM en caliente. Una vez disuelto el agar se dejaba enfriar ligeramente (sin llegar a la solidificación), se llenaban los tubos, se tapaban y se esterilizaban en autoclave a 121 °C durante 20 min. Posteriormente, se dejaban enfriar a temperatura ambiente, en posición inclinada, hasta que el medio estaba totalmente solidificado.

Los tubos de agar inclinado se inoculaban con un asa de siembra a partir de colonias aisladas de las placas de medio MM. Una vez inoculadas las muestras se incubaban en estufa a 25 °C durante 48 h.

El cultivo en medio sólido en tubos de agar inclinado se realizaba con el fin de mantener y conservar la cepa de *R. fascians* o de *M. flavescens*. Para ello, se realizaban resiembras periódicas cada tres meses, asegurando así la supervivencia de las células en condiciones óptimas.

Para la propagación y mantenimiento de las cepas acondicionadas (apdo 3.1.2.3) de ambos inóculos microbianos, se realizaban resiembras periódicas cada tres meses, en tubos inclinados de medio MM modificado, sin fructosa, utilizando como fuente de carbono un 20% de extracto de cáscara de naranja (apdo 3.1.2.1) ó 60 ppm de limonina purificada.

3.1.2. ENSAYO DE LA TOLERANCIA Y ACONDICIONAMIENTO DE MICROORGANISMOS A LIMONOIDES

Como fuente asequible de limonoides se usó extracto de cáscara de naranja, que se utilizó como compuesto base en la formulación de medios de cultivo, esto implicó la evaluación de su inocuidad en el crecimiento de los microorganismos objeto de estudio: *R. fascians* y *M. flavescens*.

En los siguientes apartados, se incluyen los procedimientos experimentales que se usaron para determinar los parámetros óptimos para la preparación del extracto de cáscara de naranja,

y, finalmente, la evaluación del grado de tolerancia de los microorganismos como respuesta a la presencia del extracto de cáscara y limonina pura en el medio de cultivo.

3.1.2.1. Preparación y caracterización de extractos de cáscara de naranja

En el presente apartado se incluye el protocolo de obtención de extracto de cáscara de naranja, estandarizado en trabajos previos realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos (Meza, 2003) a partir de los resultados referidos por Larrauri y col. (1996), que se utilizó en la formulación de los medios de cultivo para el mantenimiento de *R. fascians* y *M. flavescens*.

Acondicionamiento de la cáscara.- La cáscara de naranja se dejaba secar en estufa durante 5 días a 50 °C (Fig. 3.1), se pesaba y se licuaba mecánicamente con una licuadora doméstica (Braun) a temperatura ambiente durante 5 min para obtener partículas de diámetro inferior a 0,1 mm (Fig. 3.1). Posteriormente, se homogeneizaba y para conseguir un tamaño uniforme se colaba el residuo a través del filtro de la licuadora. El tamaño de las partículas se determinaba con ayuda de un micrómetro adaptado a un microscopio esteroscópico (*Stemi 2000-C, Zeiss, Germany*). Finalmente, se almacenaba en un desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

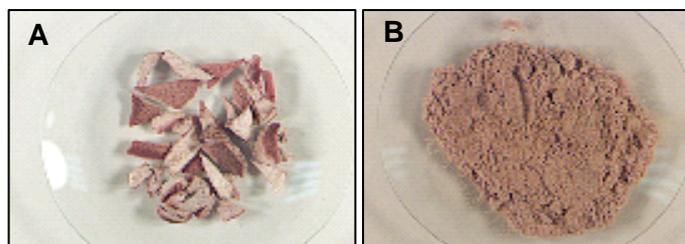


Fig. 3.1 Cáscara de naranja secada durante 5 días a 50 °C (A) y residuo de cáscara de naranja (partículas de 0,1 mm) (B).

Obtención del extracto.- Se pesaba el residuo de cáscara de naranja homogeneizada y se mezclaba con agua destilada en las proporciones 1/4; 1/5; 1/7 y 1/9 (p/v). Cada mezcla se homogeneizaba con ayuda de un agitador magnético, ajustando el pH a 5,5 por adición del volumen necesario de NaOH 2N. Posteriormente, se introducía en un baño maría a 90 °C durante 5 min. Seguidamente, se filtraba en caliente a presión reducida a través de un filtro de papel (Whatman N°1).

Caracterización del extracto.- Las determinaciones analíticas (apdo 3.4.2) realizadas para la caracterización del extracto de cáscara de naranja fueron: acidez titulable, color, turbidez, pH, concentración sólidos solubles (°Brix), proteínas y azúcares reductores.

3.1.2.2. Tolerancia de *Rhodococcus fascians* y *Microbacterium flavescens* al extracto de cáscara de naranja

Para ensayar la tolerancia de *R. fascians* y *M. flavescens* al extracto de cáscara de naranja, se preparó medio MM sin fructosa (apdo 3.1.1.1).

Después de obtener el extracto de cáscara de naranja (preparado con una proporción cáscara/agua de 1/7, ver apartado 3.1.2.1), se preparaban 100 ml de medio de cultivo incluyendo las cantidades necesarias para obtener concentraciones finales de extracto de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100% (v/v). Posteriormente, se regulaba el pH a 7,0 con NaOH 1N y se distribuían en volúmenes de 20 ml en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Los matraces se taparon con algodón hidrófobo y se autoclavaron durante 20 min a 121 °C. Se tomaban muestras de cada uno de los matraces y se determinaba la concentración de limonoides y de azúcares reductores.

Seguidamente, y de forma estéril, se tomaba 1 ml de precultivo de *R. fascians* o *M. flavescens* de 1,2 DO (apdo 3.1.1.1) y se inoculaban en los medios con extracto de cáscara de naranja a diferentes concentraciones. Los cultivos se mantenían en un agitador orbital a 25 °C, 150 rpm durante 48 h. Pasado este tiempo se retiraban los matraces del incubador y se determinaba el crecimiento microbiano (Biomasa) por lectura de la Absorbancia a una λ de 600 nm en un espectrofotómetro (Cánovas y col., 1998). Los resultados de absorbancias de las muestras se compararon con la del control, determinando la tolerancia de ambos microorganismos a estos medios.

3.1.2.3. Acondicionamiento de los microorganismos al extracto de cáscara de naranja

Para incrementar la tolerancia de *R. fascians* y *M. flavescens* a la presencia de limonoides en el medio de cultivo se preparó una batería de matraces de 100 ml, añadiendo en cada uno 20 ml de medio de cultivo MM (sin fructosa) esterilizado con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de naranja (5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100% (v/v)) y matraces control sin extracto de cáscara de naranja. Se partía de las muestras control que se inoculaban con 1 ml de un precultivo de 48 h de *R. fascians* o *M. flavescens* de 1,2 DO (ver apdo 3.1.1.1), y se sometían a incubación en un agitador orbital a 25 °C, 150 rpm durante 96 h. Pasado este tiempo, se tomaban muestras para estimar el crecimiento microbiano midiendo la absorbancia a 600 nm. Seguidamente, y de estos mismos matraces, se tomaba 1 ml que se inoculaba en otros matraces que contenían un 5% de extracto de cáscara de naranja. Se llevaban de nuevo a incubar en un agitador orbital a 25 °C, 150 rpm durante 96 h y, de igual forma, se evaluaban las

absorbancias a 600 nm. Con esta sistemática, se proseguía trasvasándose inóculos microbianos a nuevos medios de cultivos incrementados de forma creciente en la concentración de extracto de cáscara de naranja. Todas las muestras a las diferentes concentraciones se realizaban por triplicado.

3.1.2.4. Tolerancia de los microorganismos a la limonina

Para la evaluación de la tolerancia de *R. fascians* y *M. flavescens* a la presencia de limonina purificada en los medios de cultivo MM, se usó limonina extraída de semillas de cítricos aplicando la metodología propuesta por Pifferi y col. (1993).

Para ello, se recolectaban las semillas y se secaban en estufa a 60 °C durante 6 días, posteriormente se molían en una licuadora (Braun) y se introducían 400 g de estas semillas molidas en un Soxhlet con 3 l de éter de petróleo para extraer las grasas, se mantenía durante aproximadamente 10 h a 70 °C, reciclando continuamente el éter sobre las semillas hasta obtener una solución amarilla, que se sometía a evaporación en rotavapor a 50 °C para recuperar el éter (1,6 l de éter recuperado) (Fig. 3.2). Posteriormente, se introducían en el Soxhlet 3 l de acetona para extraer la limonina presente en las semillas, se mantenía durante aproximadamente 12 h a 60 °C, obteniéndose al final una solución ligeramente amarilla. El extracto se concentraba en el rotavapor hasta 100 ml a 30 °C para evitar reacciones de pardeamiento (Fig. 3.2). A este extracto concentrado se le añadían tres volúmenes iguales de éter de petróleo y se ponía en agitación a 20 °C durante 1 h para causar la precipitación de la limonina. Se obtenía una solución amarilla, que principalmente contiene carotenoides, grasas y aceites esenciales, y un precipitado que está compuesto de una fase blanca cristalina (limonoides) y una fase amorfa amarilla (flavonoides, fosfolípidos, trazas de grasas...).

El extracto obtenido se repartía en 4 tubos de centrifuga y se sometía a centrifugado (12.000 rpm durante 15 min) (*Kubota 6700*). El sobrenadante se llevaba a rotavapor para recuperar el éter de petróleo, y el sedimento se lavaba con 20 ml de etanol al 95%. Los cuatro tubos se volvían a centrifugar (12.000 rpm, 15 min), se eliminaba el sobrenadante y se repetía la operación tres veces. Una vez lavado se redisolvió el sedimento en 25 ml de diclorometano a baño María a 25 °C, posteriormente se añadían 50 ml de isopropanol gota a gota mientras se agitaba lentamente, para hacer precipitar de nuevo la limonina, apareciendo un precipitado blanco en el fondo del vaso de precipitados. Tras un reposo de 1 h, se centrifugaba (12.000 rpm, 15 min), se eliminaba el sobrenadante y el polvo obtenido se dejaba en estufa a 50 °C durante tres días. Posteriormente, se conservaba a 4 °C herméticamente cerrado (Fig. 3.3).



Fig. 3.2. Proceso de extracción de limonina.

La pureza de la limonina extraída (Fig. 3.3) se determinó de manera cualitativa por cromatografía en capa fina (Tatum y Berry, 1973) y de manera cuantitativa a través de la determinación de la concentración de limonina por el método colorimétrico propuesto por Martínez Madrid (1989) (apdo 3.4.1). El grado de pureza se expresaba en porcentaje a partir de la siguiente relación:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Concentración de limonina cuantificada (mg ml}^{-1}\text{)} \times 100}{\text{Concentración teórica en mg ml}^{-1}}$$



Fig. 3.3. Limonina en polvo extraída de semillas de cítricos

Para evaluar la tolerancia de los microorganismos a la limonina se esterilizaban a 121 °C durante 20 min Erlenmeyers con 20 ml de medio MM (apdo 3.1.1.1), sin fructosa, con 100 y 200 ppm de limonina, y muestras control sin limonina.

En las muestras esterilizadas se añadían inóculos del 5 y 2% para *R. fascians* y *M. flavescens*, respectivamente, procedentes de precultivos (apdo 3.1.1.1) que habían sido diluïdos previamente con agua peptonada al 0,1% para obtener una DO ($\lambda=600$ nm) de 0,6.

Se sometían a incubación a 25 °C, 150 rpm durante 96 h. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de cada matraz para valorar la biomasa (apdo 3.1.2.2), el contenido de azúcares reductores (apdo 3.4.2.5) y la concentración de limonina residual (apdo 3.4.1).

3.1.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Para el estudio de la cinética de crecimiento se partía de medio líquido MM (sin fructosa) con limonina (60 ppm), previamente esterilizado, en el que se incluía un inóculo de 0,6 DO, procedente de precultivos anteriores (apdo 3.1.1.1) y diluïdos con agua peptonada del 0,1%. Estas muestras se sometían a incubación bajo agitación orbital a 25 °C y 150 rpm, evaluando la biomasa (DO a 600 nm), pH y degradación de limonina a lo largo del periodo de cultivo (24, 48, 72 y 96 h).

El precultivo líquido se producía en medio MM con limonina (60 ppm) como única fuente de carbono y utilizando como inóculos *R. fascians* acondicionado y no acondicionado en medios MM de agar inclinado (apdo 3.1.1.2).

3.2. INMOVILIZACIÓN DE *R. fascians* POR ATRAPAMIENTO EN MATRICES POLIMÉRICAS

3.2.1. ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE ALCOHOL POLIVINÍLICO

La técnica de preparación del soporte de alcohol polivinílico (PVA) seleccionada en este trabajo ha sido la formación de hidrogeles por congelación-descongelación (Ariga y col., 1993; Busto y col., 2007).

Se ensayaron las variables (i) concentración de PVA (8 y 10%, p/v) y (ii) concentración de inóculo (0,2; 0,4; 0,6; 0,9 y 1,2 DO).

3.2.1.1. Reactivos

R.1. *Alcohol polivinílico* (FLUKA) de peso molecular estimado 72.000 Da, con un grado de polimerización de 1600 y un grado de hidrólisis de 97,5-99,5%.

R.2. *Hidróxido sódico (NaOH) al 0,2%*: se disolvían 2 g de NaOH en 1 l de agua destilada.

R.3. *Ácido clorhídrico (HCl) 35% (p/p)*.

R.4. *Nitrógeno líquido*.

R.5. *Tampón fosfato pH 7*: 41,3 ml de solución A + 58,7 ml de solución B

Solución A: fosfato monopotásico 1/15 M (9,073 g de KH_2PO_4).

Solución B: fosfato disódico 1/15 M (11,87 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

R.6. *Hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,06%*: se disolvían 1,8 ml de NaOCl 10% (v/v) en 300 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se tapaba con algodón hidrófobo y se autoclavaba a 121 °C durante 15 min.

3.2.1.2. Protocolo experimental

Para la inmovilización de células de *R. fascians* con PVA, se preparaba una disolución del polímero en la que se añadían las células de *R. fascians*. Para ello, se disolvían 1,6 g de PVA en 18,5 ml de hidróxido sódico (R.2). Esta solución alcalina de PVA (25 mg de NaOH/g de PVA), contenida en un frasco de cristal herméticamente cerrado, se autoclavaba a 121 °C durante 20 min para obtener la total disolución del PVA. Posteriormente, se enfriaba la solución en baño de agua al mismo tiempo que se agitaba y, finalmente, se neutralizaba con unas gotas de HCl (R.3).

Para la preparación del inóculo, se prepararon dos matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo MM (apdo 3.1.1.1) sin fructosa, utilizando como fuente de carbono 60 ppm de limonina, se autoclavaron a 121 °C durante 20 min y se enfriaron hasta temperatura ambiente. Uno de los matraces se inoculaba con dos asadas de *R. fascians* cultivado en tubo

inclinado, se llevaba a incubar a un agitador orbital a 25 °C, 150 rpm durante 48 h. Posteriormente, se inoculaba el otro matraz con un 2% (v/v) del cultivo de 48 h, y se llevó a incubar a 25 °C, 150 rpm y 18 h. Transcurrido este tiempo, se medía la DO a 600 nm y se realizaban las correspondiente diluciones con agua peptonada al 0,1% hasta obtener DO de 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 y 1,2. A continuación, se centrifugaban 30 ml de medio de cada una de las DO a 9000 rpm durante 15 min. Una vez centrifugados, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1,5 ml de tampón fostato a pH 7 (R.5). La suspensión celular así obtenida se mezclaba con los 18,5 ml de solución de PVA, preparada previamente, para obtener una concentración final de soporte del 8%. Se procedía de la misma manera pero modificando la cantidad de PVA al inicio de la operación, para obtener concentraciones finales de PVA del 10%.

La mezcla de células de *R. fascians* y PVA se extruyeron gota a gota sobre 1 l de N₂ líquido (en un vaso Dewar de 1,5 l) con ayuda de una bomba peristáltica (*Minipuls 3 Gilson*) situada a unos 60 cm de altura del Dewar. Una vez formadas las perlas se mantenían en el N₂ líquido durante una hora. Posteriormente, se decantaba el N₂ líquido sobrante junto con el PVA que no había sido polimerizado. Las perlas se dejaban en el Dewar en refrigeración para que alcanzasen lentamente una temperatura de 5 °C. Una vez alcanzada esa temperatura, se lavaban con 1000 ml de agua destilada bajo agitación magnética durante 2 h. Luego se eliminaba la mayor cantidad de agua (con papel de filtro estéril y libre de humedad), se contaban las perlas y se almacenaban a 4 °C en tampón fosfato a pH 7 (R.5) hasta su uso. Previamente a su utilización, se lavaban con NaOCl (R.6) y se aclaraban bien con agua destilada y autoclavada.

La efectividad de los inmovilizados en la degradación de limonina se realizaba en matraces Erlenmeyers de 50 ml con 35 ml de medio de cultivo MM a pH 7, sin fructosa, y con 60 ppm de limonina, en los que se incluía 1/10 de las perlas obtenidas en la etapa anterior para cada concentración de inóculo. Se incluyeron por triplicado matraces control sólo con limonina y controles que incluían junto con la limonina el soporte de inmovilización (perlas) pero sin inóculo microbiano. Todas las muestras se sometieron a agitación orbital de 100 rpm durante 168 h y a 25 °C, tomando alícuotas a intervalos de 24 h para evaluar la biomasa (apdo 3.1.2.2) la variación de pH y la degradación de limonina (apdo3.4.1).

3.2.2. ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE ALCOHOL POLIVINÍLICO-POLIETILENGLICOL

La técnica de preparación del soporte de alcohol polivinílico con polietilenglicol (PVA-PEG), seleccionada en este trabajo, ha sido la formación de hidrogeles por congelación-descongelación, siguiendo el procedimiento de Ariga y col. (1993). Debido a que las condiciones ambientales más adecuadas para el crecimiento óptimo de *R. fascians* están en un rango de pH 7-8 (Cánovas y col., 1998), se procedió a preparar la disolución de PVA-PEG en tampón fosfato a pH 8.

Se ensayaron las variables (i) concentración de inóculo (0,2; 0,4; 0,6; 0,9 y 1,2 DO), (ii) concentración de PVA (6, 7 y 8%) y (iii) concentración de PEG (8 y 10%).

3.2.2.1. Reactivos

R.1. *Alcohol polivinílico* (FLUKA) de peso molecular estimado 72.000 Da, con un grado de polimerización de 1600 y un grado de hidrólisis de 97,5-99,5%.

R.2. *Polietilenglicol 600* (FLUKA).

R.3. *Nitrógeno líquido*.

R.4. *Hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,06%*: se disolvían 1,8 ml de NaOCl 10% (v/v) en 300 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se tapaba con algodón hidrófobo y se autoclavaba a 121 °C durante 20 min.

R.5. *Agua destilada*: se esterilizaban 300 ml de agua destilada en autoclave durante 20 min a 120 °C.

R.6. *Agua de peptona al 0,1%*: se disolvían 0,1 g de agua de peptona (PANREA C) en 100 ml de agua destilada y se esterilizaba en autoclave durante 20 min a 121°C.

R.7. *Tampón fosfato pH 8*: 3,7 ml de solución A + 96,3 ml de solución B

Solución A: fosfato monopotásico 1/15 M (9,073 g de KH_2PO_4).

Solución B: fosfato disódico 1/15 M (11,87 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

3.2.2.2. Protocolo experimental

Para la inmovilización de células de *R. fascians* con PVA-PEG, se preparaba una disolución del polímero en la que se añadían las células de *R. fascians*. Para ello, se disolvían 1,6 g de PVA y 1,6 g de PEG en 18,5 ml de tampón fosfato a pH 8 (R.7). Esta solución

contenida en un frasco de cristal, se autoclavaba a 121 °C durante 20 min para obtener la total disolución del PVA. Posteriormente, se enfriaba la solución hasta temperatura ambiente en agitación.

Para la preparación del inóculo, se procedió de la misma manera que en el apdo 3.2.1.2 realizando las correspondientes diluciones con agua peptonada al 0,1% (R.6) hasta obtener DO de 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 y 1,2. A continuación, se centrifugaban 15 ml de cultivo microbiano a cada una de las DO a 9000 rpm durante 15 min. Una vez centrifugados, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1,5 ml de agua de peptona (R.6). La suspensión celular así obtenida se mezclaba con los 18,5 ml de solución de PVA-PEG, preparada previamente, para obtener una concentración final de soporte del PVA(8%)-PEG(8%). Se procedió de la misma manera pero modificando la cantidad de PVA y PEG al inicio de la operación, para obtener concentraciones finales de PVA del 6, 7 y 8% (p/v) y de PEG del 8 y 10% (p/v).

La mezcla de células de *R. fascians* y PVA se extruyeron sobre 1000 ml de N₂ líquido (contenido en un vaso Dewar de 1,5 l) gota a gota con ayuda de una bomba peristáltica (*Minipuls 3 Gilson*) situada a unos 60 cm de altura del Dewar. Una vez formadas las perlas, éstas se mantenían en el N₂ líquido hasta que éste se evaporaba (como mínimo una hora). Posteriormente, las perlas se dejaban en el Dewar en refrigeración para que alcanzasen lentamente una temperatura de 5 °C. Una vez alcanzada esta temperatura, se sacaban las perlas del Dewar con ayuda de agua destilada autoclavada, se contaban las perlas y se almacenaba a 4 °C, en agua destilada autoclavada, hasta su utilización. Antes de su utilización se lavaban las perlas con NaOCl (R.4) y se aclaraban bien con agua destilada y autoclavada.

La efectividad de los inmovilizados en la degradación de limonina se realizaba en matraces Erlenmeyers de 50 ml con 35 ml de medio de cultivo MM a pH 7, sin fructosa, y con 60 ppm de limonina, en los que se incluía 1/10 de las perlas obtenidas en la etapa anterior para cada concentración de inóculo. Se incluyeron por triplicado matraces control sólo con limonina y controles que incluían junto con la limonina el soporte de inmovilización (perlas) pero sin inóculo microbiano. Todas las muestras se sometieron a agitación orbital de 100 rpm durante 168 h a 25 °C, tomando alícuotas a intervalos de 24 h para evaluar la biomasa microbiana (apdo 3.1.2.2), la variación del pH y la degradación de limonina (apdo 3.4.1).

3.2.3. ATRAPAMIENTO POR MICROENCAPSULACIÓN EN PERLAS HUECAS (“HOLLOW-BEADS”) DE ALGINATO DE CALCIO

La aplicación de este método se basa en la técnica descrita por Patel y col. (1996) y desarrollada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos (Pilar-Izquierdo y col., 2013).

3.2.3.1. Reactivos

- R.1. *Agua de peptona al 0,1%*: se disolvían 0,1 g de agua de peptona (PANREAC) en 100 ml de agua destilada y se esterilizaba en autoclave durante 20 min a 120 °C.
- R.2. *Carboximetilcelulosa (CMC) al 4 ó 5% y CaCl₂ al 2, 3 y 4%*: se disolvían 0,4 g ó 0,5 g de CMC y 0,2; 0,3 ó 0,4 g de CaCl₂ en 8,5 ml de agua destilada. Se esterilizaba la disolución en autoclave a 120 °C durante 20 min. A continuación, se añadían 1,5 ml de agua peptonada (R.1).
- R.3. *Alginato de sodio al 2%*: se disolvían 6 g de alginato de sodio (SIGMA) en 300 ml de agua destilada. Se agitaba hasta su total disolución y se esterilizaba en autoclave durante 20 min a 121 °C.
- R.4. *Cloruro de calcio al 2%*: se pesaban 20 g de CaCl₂, disolviéndose en agua destilada y se enrasaba a 1 l en un matraz aforado, se usaba para lavar las perlas y almacenarlas.
- R.5. *Agua Milli-Q*: se esterilizaban 300 ml de agua Milli-Q durante 20 min a 121 °C.
- R.6. *Hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,06%*: se disolvían 1,8 ml de NaOCl 10% (v/v) en 300 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se tapaba con algodón hidrófobo y se autoclavaba a 121 °C durante 20 min.

3.2.3.2. Protocolo experimental

Para llevar a cabo el proceso de inmovilización de *R. fascians* mediante encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio, se preparó el inóculo microbiano de la misma manera que se indica en el aptdo 3.2.2.2.

Para la inmovilización de *R. fascians* en perlas huecas de alginato de calcio se añadía a la disolución de CMC-CaCl₂ (R.2) (8,5 ml) el agua peptonada con los microorganismos (1,5 ml). Posteriormente, se extruía por goteo esta disolución sobre 300 ml de alginato de sodio al 2% (R.3) utilizando una bomba peristáltica (*Minipuls 3 Gilson*) con un tubo de un diámetro de 2,05 mm. A medida que las gotas caían sobre la solución de alginato, se formaban esferas de gel

(perlas), que se mantenían en agitación continua a 100 rpm. Finalizada la inmovilización, se dejaban las perlas en reposo en la solución de alginato de sodio durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantaba el alginato de sodio y se lavaban las perlas tres veces con agua milli-Q (R.5). Se realizaba un último lavado con CaCl_2 al 2% (R.4) y se dejaban en agitación durante 20 min (ROTABIT). Finalmente, se almacenaban en CaCl_2 al 2% a 4 °C hasta su utilización.

Previo a su utilización se realizaba un lavado con NaOCl (R.6) y se aclaraban bien con agua destilada y autoclavada.

Se prepararon matraces con 35 ml de medio MM a pH 7, sin fructosa, con 60 ppm de limonina y con 18 perlas (1 perla por cada 2 ml de medio). Se prepararon matraces control sólo con limonina y matraces control que incluían junto con la limonina el soporte de inmovilización (perlas huecas) pero sin inóculo microbiano. Los matraces se llevaron a incubar a un agitador orbital a 25 °C durante 168 h a 100 rpm, tomando muestras cada 24 h para determinar el pH, la biomasa (apdo 3.2.1.2) y el contenido en limonina (apdo 3.4.1).

3.2.4. ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LOS INMOVILIZADOS

Los biocatalizadores inmovilizados en criogeles de PVA-PEG y encapsulados en perlas huecas, se sometían a un proceso de recuperación para su reutilización en sucesivas etapas de degradación de limonina con el fin de valorar su estabilidad operacional.

Para los inmovilizados en PVA-PEG, transcurrida una primera etapa de utilización de 24 h en 35 ml de medio de cultivo MM a pH 7, sin fructosa y con 60 ppm de limonina, se filtraban los inmovilizados y se lavaban con NaOCl al 0,06% autoclavado, se aclaraban bien con agua destilada y autoclavada y se introducían de nuevo en 35 ml del medio MM ya indicado. Los biocatalizadores inmovilizados se usaban en ciclos sucesivos de 24 h de duración a 25 °C y 100 rpm. Al final de cada ciclo se evaluaba la concentración de limonina residual.

Para los encapsulados en perlas huecas con concentraciones de alginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl_2 de 3 y 4% se estudió también la reutilización en ciclos de 24 h, lavando los encapsulados entre ciclo y ciclo con NaOCl al 0,06% y aclarando bien con agua destilada y autoclavada.

3.3. APLICACIÓN DE LOS INMOVILIZADOS EN ZUMOS

En este apartado se evaluaba el efecto que ejercía la aplicación de los biocatalizadores inmovilizados en PVA-PEG y en perlas huecas sobre la degradación del compuesto amargo (limonina) en zumo sintético y zumo natural de naranja.

3.3.1. DEGRADACIÓN DE LIMONINA EN ZUMO SINTÉTICO

Para determinar la actividad catalítica de los inmovilizados en criogeles de PVA-PEG y encapsulados en perlas huecas de alginato de calcio en condiciones similares al zumo natural de cítricos, se preparó zumo sintético según Cánovas y col. (1998) cuya composición se detalla a continuación:

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
NaCl.....	0,1 g/l
NH ₄ Cl	2,0 g/l
FeCl ₃	0,001g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
Glucosa	23 g/l
Ácido cítrico	10 g/l
Tiamina.....	1 mg/l

Los valores de pH se ajustaban con ácido cítrico 0,1 N ó NaOH 0,1 N a valores ácidos de 2, 3, 4 y/ó 5.

Los ensayos se realizaban en matraces Erlenmeyer de 50 ml conteniendo 35 ml de zumo sintético para cada valor de pH, con 60 ppm de limonina. En los matraces se añadía 1/10 de las perlas de PVA-PEG ó 18 perlas huecas (*hollow-beads*) a diferentes concentraciones de inóculo microbiano 0,6; 0,9 y/ó 1,2 DO.

Los matraces se llevaron a incubar a un agitador orbital a 25 °C durante 96 h a 100 rpm, tomando muestras cada 24 h para determinar el pH, la biomasa (apdo 3.1.2.2) y el contenido en limonina (apdo 3.4.1).

En el caso de los inmovilizados en perlas huecas, se realizó previamente un estudio de la integridad de las perlas sin microorganismo. Para ello, se prepararon cuatro matraces Erlenmeyers de 250 ml a pH 2, 3, 4 y 5, conteniendo cada uno 50 ml de zumo sintético. En

cada matraz se incluían 28 perlas huecas obtenidas con alginato de sodio 2%, CMC al 4% y CaCl_2 al 2% y se sometían la mitad de los matraces a incubación en un agitador orbital a 100 rpm a 25 °C durante 90 h, la otra mitad se sometían a condiciones de almacenamiento de 4 °C. Se hizo un seguimiento de la integridad física de los inmovilizados durante todo el periodo de estudio.

3.3.2. DEGRADACIÓN DE LIMONINA Y REUTILIZACIÓN DE LOS INMOVILIZADOS EN ZUMO DE NARANJA NATURAL

En primer lugar, se procedió a extraer el zumo de naranja siguiendo las recomendaciones proporcionadas por los fabricantes con vista a su aplicación industrial, aunque las operaciones se realizaron a escala de laboratorio.

Las naranjas Valencia late se adquirían en el comercio en estado maduro, en condiciones asépticas, se cortaba por la mitad y se extraía el zumo con un exprimidor manual. Luego se filtraba a través de un filtro de lana de vidrio (tipo A/E, Gelman Sciences) para separar la pulpa y semillas del zumo. Posteriormente el zumo se llevaba a ebullición durante 5 min para inactivar las enzimas propias de la naranja (pectina esterasa) que pueden alterar la nube del zumo. Finalmente, se enfriaba hasta temperatura ambiente y se almacenaba hasta su uso (Tatum y Berry, 1973).

En el tratamiento del zumo natural de naranja, se utilizaron matraces a los que se les añadía 35 ml de zumo junto con los inmovilizados (25 perlas en el caso de PVA-PEG y 18 en el caso de las perlas huecas). Los matraces se mantuvieron bajo agitación orbital continua a 100 rpm y 25 °C durante 24 h (Fig. 3.4). Transcurrido el tiempo de tratamiento, se filtraban las perlas (Fig. 3.5), se lavaban, las de PVA-PEG con tampón fosfato a pH 8 y las perlas huecas con CaCl_2 al 3 ó 4%, y se aclaraban bien con agua destilada y autoclavada.

Los inmovilizados recuperados se incorporaban a muestras nuevas de zumo en ciclos sucesivos de 24 h. Al final de cada ciclo se evaluaba en el zumo tratado el contenido en limonoides (apdo 3.4.2.6), también se determinó el contenido en flavonoides y se analizaron las principales características físico-químicas (color, pH, turbidez...) (apdo 3.4.2).

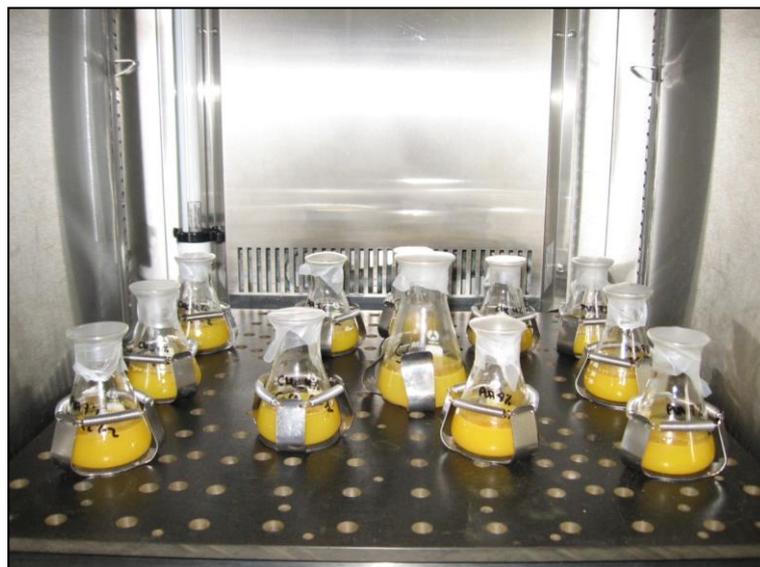


Fig. 3.4. Matracas con zumo natural de naranja y células de *R. fascians* inmovilizadas por atrapamiento en criogeles de PVA-PEG y perlas huecas de alginato de calcio bajo agitación orbital continua a 100 rpm y 25 °C.

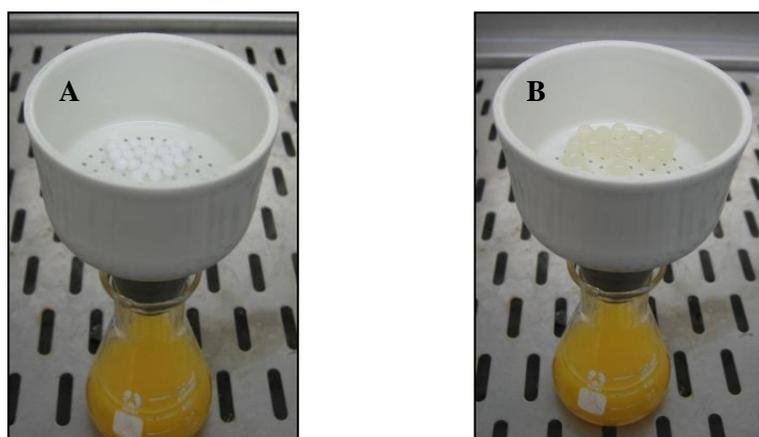


Fig. 3.5. Recuperación de los inmovilizados de *R. fascians* en perlas de PVA-PEG (A) y cápsulas de alginato de calcio (B) aplicados a zumo natural de naranja.

3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.4.1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LIMONINA

Para la determinación de limonina en medios de cultivo y zumo sintético se utilizó la metodología de Vaks y Lifshitz (1981) modificada por Martínez-Madrid (1989) para la determinación de limonina en medios acuosos.

3.4.1.1. Reactivos

R.1. *Reactivo de Burnham*: p-dimetilaminobenzaldehído 1,5% (p/v); ácido acético 55,6% (v/v) y ácido perclórico 44,4% (v/v).

3.4.1.2. Protocolo experimental

Se centrifugaban las muestras a 5000 rpm durante 5 min y se tomaban 0,365 ml del sobrenadante. A continuación, se añadían 2,365 ml de R.1, se agitaba vigorosamente, y se incubaban las muestras durante 30 min. Posteriormente, se leía la Absorbancia de las muestras a 503 nm.

3.4.1.3. Curva de calibrado

Para la curva de calibrado se preparaba una solución madre de 100 ppm de limonina (solución A) disuelta en medio de cultivo MM a pH 7 (apdo 3.1.1.1) (solución B) y se tomaban las alícuotas incluidas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Curva de calibrado de limonina.

Solución A (ml)	Solución B (ml)	R.1 (ml)	Limonina (ppm)
0,000	0,365	2,635	0
0,060	0,305	2,635	2
0,120	0,245	2,635	4
0,180	0,185	2,635	6
0,240	0,125	2,635	8
0,300	0,065	2,635	10

Un ejemplo de recta de calibrado se muestra en la Fig. 3.5.

Para la determinación de limonina en zumo sintético a diferentes pHs se calcularon las siguientes rectas de calibrado (Fig. 3.6; 3.7 y 3.8). Para ello el zumo sintético se elaboró de la misma manera descrita en el apartado 3.3.1.

STD	Limonina (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	2	0,013
STD3	4	0,030
STD4	6	0,053
STD5	8	0,067
STD6	10	0,083

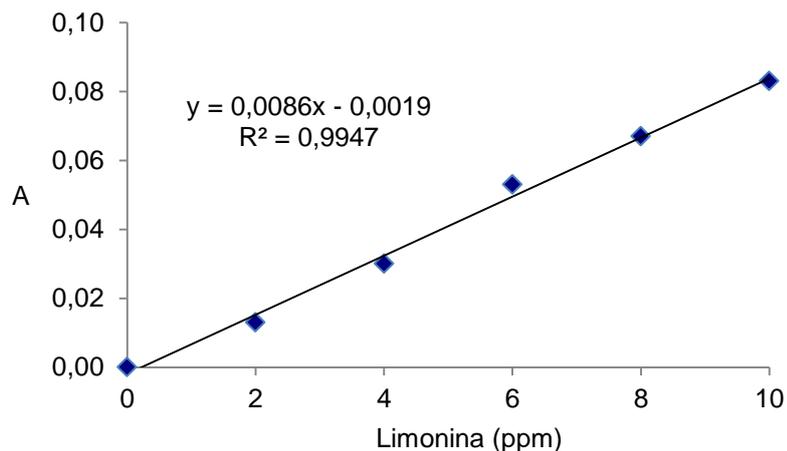


Fig. 3.5. Recta patrón de limonina en medio MM.

STD	Limonina (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	2	0,016
STD3	4	0,033
STD4	6	0,049
STD5	8	0,066
STD6	10	0,080

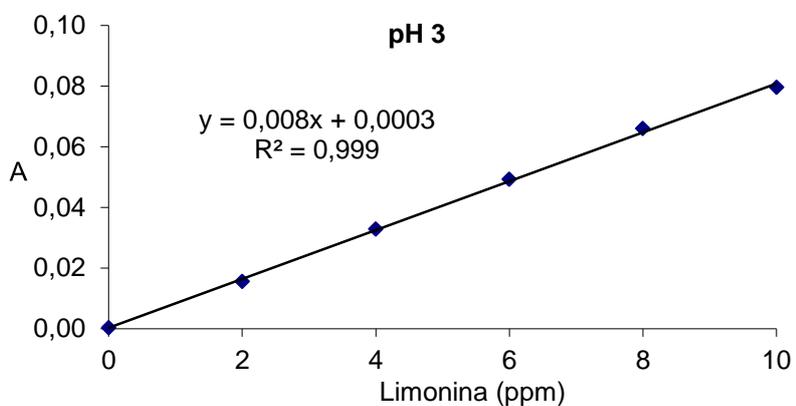


Fig. 3.6. Recta patrón de limonina en zumo sintético a pH 3.

STD	Limonina (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	2	0,016
STD3	4	0,033
STD4	6	0,049
STD5	8	0,065
STD6	10	0,081

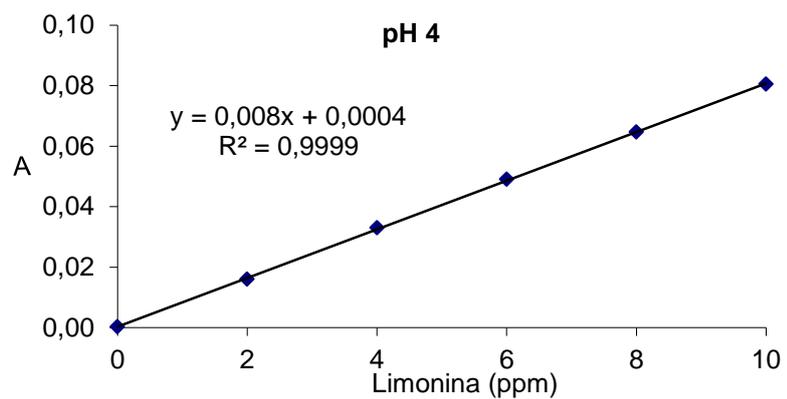


Fig. 3.7. Recta patrón de limonina en zumo sintético a pH 4.

STD	Limonina (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	2	0,023
STD3	4	0,043
STD4	6	0,063
STD5	8	0,081
STD6	10	0,099

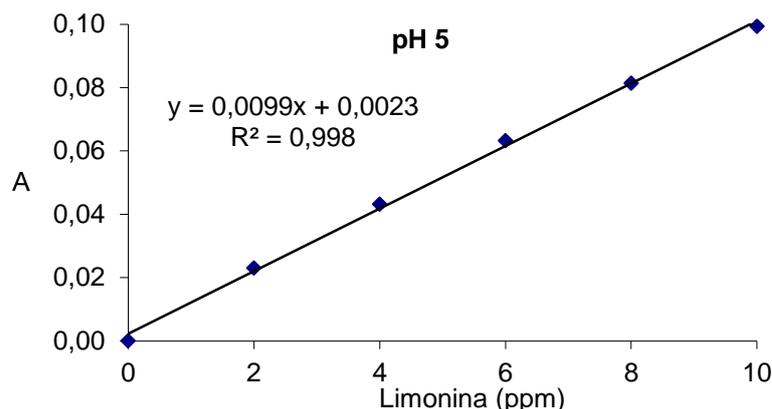


Fig. 3.8. Recta patrón de limonina en zumo sintético a pH 5.

3.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE NARANJA Y ZUMO DE NARANJA NATURAL

Las determinaciones analíticas realizadas para la caracterización del extracto de cáscara de naranja fueron: acidez titulable, color, turbidez, pH, concentración de sólidos solubles (°Brix), proteínas y azúcares reductores. Para el zumo de naranja natural se evaluó también, el contenido en limonoides y en flavonoides totales. En los apartados siguientes se describe la metodología seguida para llevar a cabo estas determinaciones analíticas.

3.4.2.1. Determinación de la acidez titulable

La acidez titulable se ensayaba valorando 25 ml de muestra con una solución de NaOH (0,1 N), usando fenoftaleína al 1% (p/v) como indicador. Los resultados se expresaban en g de ácido cítrico 100 ml^{-1} , aplicando un factor de conversión de 0,070 (AOAC, 1995).

3.4.2.2. Determinación del pH y sólidos solubles (°Brix)

El pH de las muestras se determinaba directamente, utilizando un pHmetro digital a 25 °C. La concentración de sólidos solubles en solución se medía a 25 °C por refractometría, utilizando un refractómetro Atago 3T. Los resultados se expresaban en °Brix (Montenegro y col., 1995).

3.4.2.3. Determinación del color y la turbidez

El color y la turbidez se ensayaban a una longitud de onda de 420 nm y a 660 nm, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro Unicam 5625 (Montenegro y col., 1995).

3.4.2.4. Determinación cuantitativa de proteínas

La concentración de proteínas presentes en el extracto de cáscara de naranja se determinó mediante el uso del método descrito por Lowry y col. (1951).

3.4.2.4.1. Reactivos

- R.1. Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N: se pesaban 2 g de NaCO_3 y se disolvían en 100 ml de una solución de NaOH 0,01 N.
- R.2. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en tartrato sódico-potásico al 1%: se disolvían 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de una solución de tartrato sódico-potásico al 1%.
- R.3. *Reactivo alcalino*: se mezclaban 50 ml de R.1 con 1 ml de R.2. Este reactivo debía almacenarse refrigerado y desecharse pasadas 24 h.
- R.4. *Reactivo de Folin-Cicalteau*: llevar 20 ml de reactivo de Folin a 50 ml con agua destilada.
- R.5. *Tampón acetato a pH 5*: 67,8 ml de solución A + 32,2 ml de solución B
Solución A: acetato sódico 0,1 N (8,204 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \text{Na}$ /l).
Solución B: ácido acético 0,1 N (6,005 g/l).

3.4.2.4.2. Protocolo experimental

En un tubo de ensayo se mezclaban 0,2 ml de muestra (ó un volumen menor diluído a 0,2 ml con R.5) con 3 ml de carbonato sódico (R.1), dejándolos reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadían 0,3 ml de reactivo de Folin (R.4), se agitaban los tubos y se dejaban reposar nuevamente durante 30 min. A continuación, se medía la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteínas se expresaba en μg proteína ml^{-1} .

3.4.2.4.3. Curva de calibrado

La curva patrón de proteína se preparaba a partir de una solución original de seroalbúmina bovina (SAB), de 1000 ppm de concentración disuelta en NaCl 0,15 N. De esta solución madre se tomaban las alícuotas incluídas en la Tabla 3.2.

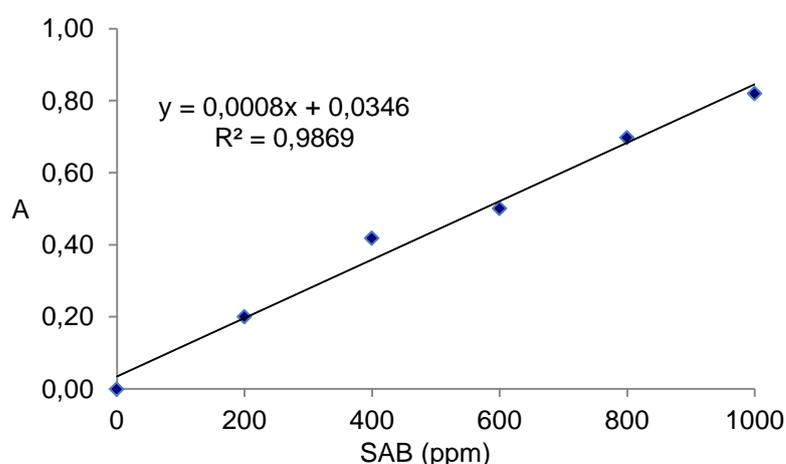
Una vez preparadas las disoluciones de la curva patrón en sendos tubos de ensayo, se seguía el procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 3.2. Curva de calibrado de proteínas.

SAB (1000 ppm)	R.5 (ml)	SAB (ppm)
0,00	0,20	0
0,04	0,16	200
0,08	0,12	400
0,12	0,08	600
0,16	0,04	800
0,20	0,00	1000

Un ejemplo de ajuste de la recta de calibrado se muestra en la Fig 3.9.

Standard	SAB (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	200	0,201
STD3	400	0,419
STD4	600	0,501
STD5	800	0,698
STD6	1000	0,820

**Fig. 3.9.** Recta patrón de proteínas.

3.4.2.5. Ensayo de azúcares reductores

El método de ensayo seguido para la determinación de azúcares reductores ha sido descrito por Rosson y Chirpich (1989), basado en el desarrollo de un color por efecto de la reducción de los azúcares en presencia de hidróxido de sodio y ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) sometidos al efecto del calor (Miller, 1959). El DNS fue sugerido por Summer y col. (1921) para la evaluación de azúcares reductores.

3.4.2.5.1. Reactivos

R.1. *Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)*: Se disolvían por separado 5 g de DNS en 100 ml de NaOH 2 M en baño-maría a 50 °C y 150 g de tartrato sódico potásico en 250 ml de agua destilada. Posteriormente se mezclaban las disoluciones y se enrasaba a un volumen final de 500 ml con agua destilada.

R.2. *Solución de glucosa estándar*: Se disolvían 90,08 mg de glucosa en 10 ml de agua

destilada para obtener una solución estándar 0,05 M.

3.4.2.5.2. Protocolo experimental

Para la determinación de la concentración de azúcares reductores se mezclaban 2 ml de la muestra en un tubo de tapa roscada con 1 ml de DNS (R.1). La mezcla se colocaba posteriormente en un baño de agua hirviendo durante 5 min y se dejaba enfriar hasta temperatura ambiente, una vez enfriada se añadían 10 ml de agua destilada. Finalmente se agitaba para evaluar a continuación la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 540 nm (*Hitachi U-2000*).

Los resultados de concentración de azúcares reductores se expresaron en μg de glucosa ml^{-1}

3.4.2.5.3. Curva de calibrado

La curva de calibrado se calculaba a partir de una solución de glucosa (R.2), mediante las siguientes diluciones:

Tabla 3.3. Curva de calibrado de glucosa.

R.2 (ml)	Agua destilada (ml)	Glucosa ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
0,0	2,0	0,0
0,1	1,9	450,4
0,2	1,8	900,8
0,3	1,7	1351,0
0,4	1,6	1802,0
0,5	1,5	2252,0

Una vez preparadas las diluciones, se continuaba el protocolo descrito anteriormente. Un ejemplo de ajuste de recta de calibrado se muestra en la Fig 3.10.

STD	Glucosa (ppm)	A
STD1	0	0,000
STD2	450	0,371
STD3	901	0,688
STD4	1351	1,141
STD5	1802	1,482
STD6	2252	1,929

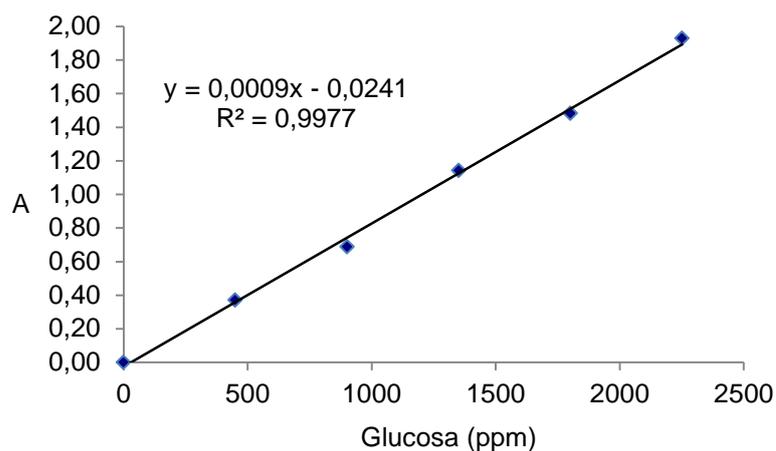


Fig. 3.10. Recta patrón de azúcares reductores.

3.4.2.6. Determinación cuantitativa de limonoides en zumos naturales de naranja

Para la determinación cuantitativa de limonoides en zumos naturales de cítricos se utilizó la metodología propuesta por Abbasi y col. (2005).

3.4.2.6.1. Reactivos

R.1. *Reactivo de Burnham*: p-dimetilaminobenzaldehído 1,52% (p/v); ácido acético 55,55% (v/v) y ácido perclórico 44,44% (v/v).

R.2. *Cloroformo* (PANREAC).

3.4.2.6.2. Protocolo experimental

Se tomaban 2 ml de zumo de naranja en tubos de ensayo (previamente se centrifugaban las muestras a 3000 rpm durante 10 min). A continuación, se añadían 4 ml de R.2, se agitaba vigorosamente durante 2 min, y se centrifugaban los tubos de ensayo a 3000 rpm durante 5 min, una vez centrifugadas las muestras se tomaban 2 ml de la fase clorofórmica (fase inferior) y se añadían 3 ml de R.1, se agitaban vigorosamente los tubos y se incubaban las muestras durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomaban 2,5 ml de la fase superior y se leía la Absorbancia de las muestras a 503 nm.

3.4.2.6.3. Curva de calibrado

Para la curva de calibrado se preparó una solución standard de 50 ppm (Solución A) de limonina disuelta en cloroformo (Solución B) y se tomaban las siguientes alícuotas.

Tabla 3.4. Curva de calibrado.

Solución A (ml)	R.2 (ml)	R.1 (ml)	Limonina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
0,0	2,0	3	0
0,2	1,8	3	2
0,4	1,6	3	4
0,6	1,4	3	6
0,8	1,2	3	8
1,0	1,0	3	10

Una vez preparadas las diluciones, se continuaba el protocolo descrito anteriormente. Un ejemplo de ajuste de recta de calibrado se muestra en la Fig 3.11.

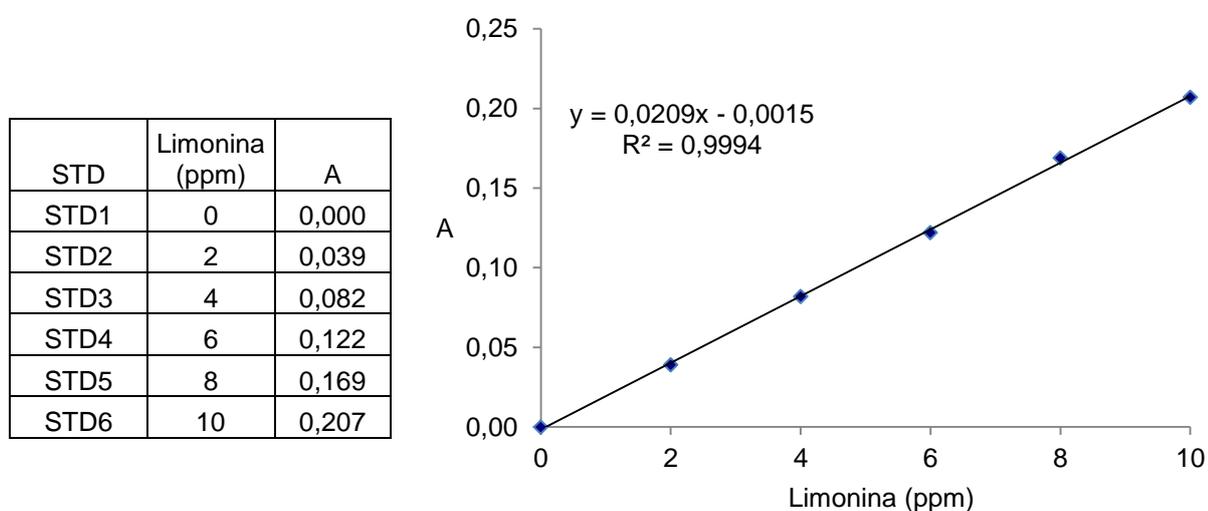


Fig 3.11. Recta patrón de limonina.

3.4.2.7. Determinación cuantitativa de flavonoides totales

Para la evaluación de la concentración de flavonoides totales en zumo de naranja se utilizaba el procedimiento descrito por Davis (1947). Este método colorimétrico no específico se fundamenta en que cuando se mezclan flavanonas y dietilenglicol en medio básico se produce una reacción que genera un cambio de color cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de flavanonas. El test de Davis es el único método reconocido para la determinación cuantitativa de naringina en zumo (Johnson y Chandler, 1982).

3.4.2.7.1. Reactivos

R.1. *Dietilenglicol* (Sigma) al 90% (v/v) en agua destilada.

R.2. *Solución de hidróxido de sodio* (Merk) 4N.

R.3. *Tampón acetato 0,2M a pH 5*.

3.4.2.7.2. Protocolo experimental

El procedimiento seguido consistía en mezclar en un tubo de ensayo 60 µl de la muestra con 60 µl de la solución de hidróxido de sodio (R.2), añadir 2,88 ml de dietilenglicol (R.1), agitar intensamente con el Vortex durante 30 s y dejar reposar durante 15 min a temperatura ambiente, momento en el cual se alcanzaba la máxima coloración. Finalmente, se evaluaba la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 420 nm (Hitachi U-2000).

Los resultados de la concentración se expresaron en µg de naringina ml⁻¹.

3.4.2.7.3. Curva de calibrado

La curva de calibrado se preparó a partir de una solución estándar de naringina de 1000 ppm en tampón acetato a pH 5 que se llevaba a baño-maría a 50 °C durante 5 min para facilitar la disolución del reactivo (Solución A). Las alícuotas de esta solución junto con los valores de concentración de naringina se detallan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Curva de calibrado

Solución A (µl)	H ₂ O destilada (µl)	Naringina (ppm)
0	60	0
6	54	100
12	48	200
18	42	300
24	36	400
30	30	500
36	24	600
42	18	700
48	12	800
54	6	900
60	0	1000

Una vez preparadas las diluciones, se continuaba el protocolo descrito anteriormente. Un ejemplo de ajuste de recta de calibrado se muestra en la Fig 3.12.

STD	Naringina (ppm)	A
STD1	0	0,003
STD2	100	0,095
STD3	200	0,187
STD4	300	0,309
STD5	400	0,367
STD6	500	0,461
STD7	600	0,547
STD8	700	0,623
STD9	800	0,707
STD10	900	0,799
STD11	1000	0,886

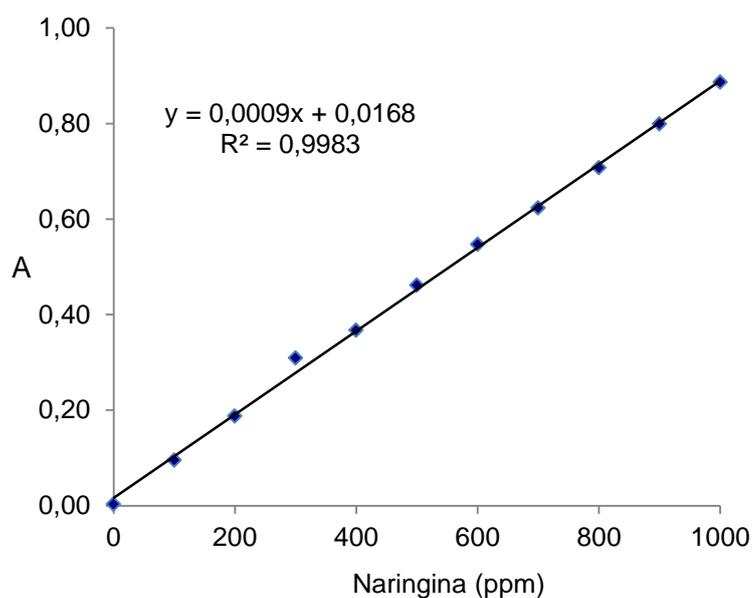


Fig 3.12. Recta patrón de naringina.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para controlar la precisión y exactitud de los resultados experimentales se calculó la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar muestral (S) de los valores obtenidos en todos los análisis efectuados con cada muestra, de acuerdo con las expresiones siguientes:

Media aritmética (\bar{X}) como el valor medio de los resultados obtenidos al analizar la muestra n veces:

$$\bar{X} = \sum X/n$$

Desviación estándar muestral (S) como la medida de la dispersión de los valores respecto de la media (valor promedio):

$$S = [(n \sum x^2 - (\sum x)^2)/n(n-1)]^{1/2}$$

Para la significación estadística de los resultados se realizaron cálculos de los coeficientes de variación (CV) mediante la siguiente expresión:

$$CV(\%) = (S/\bar{X}) \times 100$$

Este coeficiente es adimensional e independiente de la unidad de medida por lo que resulta suficientemente adecuado para conocer semicuantitativamente la dispersión de los valores de medida de la misma magnitud, cuando las medias se refieren al mismo origen de medida.

Adicionalmente, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con objeto de estudiar variaciones entre las medias. El ANOVA se llevó a cabo estudiando la variación entre medias con una sola variable (análisis monofactorial) y analizando su efecto sobre una respuesta variable (análisis multifactorial). Para este análisis se asumió que las poblaciones evaluadas eran normales, independientes y con el mismo tipo de varianza.

Para realizar este análisis de la varianza se utilizó el paquete estadístico *Statgraphics 4.0 plus* para Windows, que proporcionaba tablas de la distribución F de Snedecor. Cuando la F de Snedecor resultaba significativa, se establecía una comparación múltiple de medias para determinar que media era significativamente diferente. Para ello se aplicaba el test de Tukey, que permite realizar múltiples comparaciones y donde el error tipo I (el que se comete cuando se rechaza la hipótesis nula siendo verdadera) es muy pequeño (Galindo, 1984)

Para estos tratamientos se calcularon los parámetros que se indican a continuación:

1. *Estadístico F de Snedecor* (F) relativo al análisis de varianza ANOVA para dos o más factores y su interacción. La F de Snedecor se incluye al final de la tabla para la variable ensayada y para la interacción entre varias variables a un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).
2. *Nivel de significación* (p) del análisis de varianza ANOVA para la variable y para

la interacción entre varias variables, que a un nivel de confianza del 95% indica que hay una variación significativa entre medias si $p < 0,05$ y que no hay variación significativa si $p \geq 0,05$.

3. *Letras del Test de Tukey* (en forma de superíndices) que indican, si son iguales, que no hay diferencias significativas entre los valores y, si son distintas, que sí hay diferencias entre dichos valores para un $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA ACTIVA
EN ENZIMAS QUE DEGRADAN
LIMONINA**

4.1.1. ESTUDIOS DE TOLERANCIA Y ACONDICIONAMIENTO DE MICROORGANISMOS A LIMONOIDES

Para la producción de microorganismos capaces de degradar limonina fue necesario seleccionar previamente el microorganismo más idóneo así como los medios de cultivo más adecuados. Los medios de cultivo van a condicionar que los microorganismos mantengan de manera óptima su velocidad de crecimiento, sus funciones metabólicas, producción de metabolitos primarios (enzimas, vitaminas, aminoácidos, etc.) y secundarios (antibióticos, toxinas, etc.), ciclo de vida, etc.

La elección de la composición del medio de cultivo óptimo para el crecimiento de un microorganismo permite obtener resultados repetitivos en la producción de metabolitos y biomasa, permitiendo una población microbiana fisiológicamente homogénea. De manera, que permite un mejor diseño de experimentos, facilita la manipulación de los microorganismos y estandariza los procedimientos.

Una de las razones principales por las que resulta especialmente atractivo el uso de microorganismos como fuente de enzimas es la facilidad con la que sus niveles de actividad enzimática pueden manipularse por variaciones del entorno (temperatura, pH, transferencia de oxígeno, composición del medio, estado del ciclo de crecimiento, etc.) o de su material genético (inducción, represión catabólica, mutaciones, etc.).

Diversas investigaciones (Negi y Jayaprakasha, 2001; Richard y col., 2002) sugieren que algunos compuestos presentes en los cítricos poseen actividad antimicrobiana y antifúngica. En concreto, se ha observado que el extracto de semillas de pomelo, consideradas como el principal almacén de limonoides, posee actividad bactericida, siendo las bacterias Gram +, como es el caso de *Rhodococcus fascians*, las más seriamente afectadas (Tirillini, 2000).

Debido al posible efecto antimicrobiano de los limonoides presentes en los cítricos y en sus productos procesados como los zumos, interesa estudiar en primer lugar la tolerancia de los microorganismos a estos compuestos y, en su caso, llevar a cabo su acondicionamiento para conseguir un crecimiento adecuado en estos medios.

Rhodococcus fascians es la única bacteria descrita capaz de producir de manera constitutiva enzimas degradadoras de limonina (apdo. 2.1.3) por lo que ha sido una de las cepas seleccionadas para esta fase de la investigación, en concreto la cepa NRRL-B-15096 (Colección Española de Cultivos Tipo).

De estudios previos realizados por el equipo de investigación de Bioquímica y Biología

molecular (Meza y col., 2001) se identificaron las cepas de *Microbacterium flavescens* y *Enterobacter cloacae*, a partir de un conjunto de cepas aisladas y seleccionadas, por su capacidad de crecimiento en una mezcla de suelo y compost de residuos de cítricos enriquecido con 120 ppm de limonina, como única fuente de carbono, en caldo FCH (Ccoriñuapa, 1999). Con estos antecedentes se seleccionó para el presente estudio la cepa de *Microbacterium flavescens* ya que *Enterobacter cloacae* es un microorganismo patógeno.

El procesamiento de cítricos es una de las actividades más importantes de las industrias de alimentos, este tipo de industrias generan una gran cantidad de residuos que constituyen cerca del 50% del peso del fruto procesado. El secado de la cáscara y su posterior comercialización como alimento para ganado vacuno ha sido una práctica muy habitual para el aprovechamiento de este residuo. No obstante, esta actividad ha quedado reducida puesto que el precio de venta del producto no cubre los gastos generados por la evaporación del agua que supone el consumo de grandes cantidades de energía. Por todas estas razones, la producción de cáscara de naranja seca como alimento animal se ha convertido en una actividad sin beneficios marginales (Forage, 1979). En consecuencia, la selección de microorganismos que toleren las sustancias inherentes a la cáscara, como fuente de energía para el cultivo de microorganismos beneficiosos, se considera una alternativa viable para el procesado de desechos de cítricos.

Dentro del siguiente bloque, se incluyen los estudios preliminares realizados sobre la obtención y caracterización de extractos de cáscara de naranja como fuente de limonoides, evaluando posteriormente su efecto sobre el crecimiento de los microorganismos seleccionados y el grado de tolerancia que éstos presentan frente a diversas concentraciones del extracto, para su posterior aplicación como componente base en la formulación de los medios de producción y mantenimiento de biomasa activa en la degradación de limonina.

4.1.1.1. Tolerancia a medios de cultivo suplementados con extracto de cáscara de naranja

Siguiendo el protocolo desarrollado por Larrauri y col. (1996) (apdo 3.1.2.1), se procedió al estudio de la proporción más adecuada de residuo en polvo de cáscara de naranja y agua para la extracción óptima de limonoides. Se tomaron como condiciones de extracción un pH 5,5, temperatura de 90 °C y tiempo de tratamiento de 5 min (Meza, 2003). Tras la recuperación de los extractos se evaluaron las concentraciones de limonoides, azúcares reductores y sólidos solubles obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 4.1. En esta tabla puede observarse que la proporción 1/4 (cáscara/agua), permitió obtener las mayores concentraciones de limonoides, seguido de las proporciones 1/5, 1/7 y 1/9. Por el contrario, los rendimientos de

limonoides por gramo de cáscara en polvo se obtenían en orden inverso, esto es, 1/9, 1/7, 1/5 y 1/4, sugiriendo que en las preparaciones con mayor concentración de cáscara no se conseguían extraer todos los limonoides y que, probablemente, era necesario realizar una segunda extracción.

En la Tabla 4.1 se recoge también el contenido en azúcares reductores y contenido en sólidos solubles (°Brix) medidos en los extractos. Se observó que la concentración de azúcares y sólidos solubles estaba en relación directa con la proporción de residuo empleada en la extracción, de tal manera que se obtenían los valores mayores en la dilución 1/4 seguida de las diluciones 1/5, 1/7 y 1/9. Los azúcares reductores presentes en los extractos pueden servir como fuente de energía para que los microorganismos se desarrollen en los medios de cultivo formulados a partir de ellos.

Tabla 4.1. Rendimiento en limonoides, azúcares reductores y sólidos solubles de diferentes proporciones de extracto de cáscara de naranja/agua.

Cáscara/agua (p/v)	Limonoides totales ^a	Azúcares reductores ^b	Sólidos solubles ^c
1/4	95,06	132,0	13,5
1/5	91,76	107,6	10,0
1/7	89,33	75,7	7,5
1/9	82,61	59,0	7,8

^aµg de limonina ml⁻¹

^bµg de glucosa ml⁻¹

^c°Brix

El análisis de las principales características físico-químicas (aptdo 3.4.3) del extracto de cáscara de naranja *Valencia-late* obtenido tras la extracción a una proporción 1/7 (cáscara/agua), seleccionada como óptima dio los siguientes resultados: pH 5,50; sólidos solubles - 8,82 °Brix; índice de refracción - 1,35; acidez - 0,43(g de ácido cítrico 100 ml⁻¹); azúcares reductores - 82,09 (µg de glucosa ml⁻¹); limonoides - 68,69 (µg de limonina ml⁻¹); proteínas - 12,11 (mg de proteína ml⁻¹); color - 1,35 A (λ=420 nm); turbidez - 1,30 A (λ=660 nm).

Con estos datos, se seleccionó para las pruebas siguientes la proporción 1/7 por su elevado contenido en limonoides y su no despreciable nivel en azúcares.

Se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento de los microorganismos *R. fascians* y *M. flavescens* en medio líquido MM a pH 7 a concentraciones de extracto de cáscara de naranja entre 0 y 100% (v/v) (apdo 3.1.2.2).

En la Tabla 4.2 y la Fig. 4.1 se pueden observar los resultados de la tolerancia de *R.*

fascians a las diferentes concentraciones de extracto de cáscara de naranja en el medio de cultivo. En relación con la muestra control, los cultivos a los que se adicionaba extracto de naranja presentaban una disminución notable del crecimiento, de tal manera que, por encima del 60% de extracto de cáscara de naranja, el crecimiento microbiano se inhibía completamente.

De hecho, se confirmó que el crecimiento de este microorganismo se veía seriamente afectado a mínimas concentraciones de extracto (5%), presentando a estos valores un 85,8% de inhibición del crecimiento (Tabla 4.2).

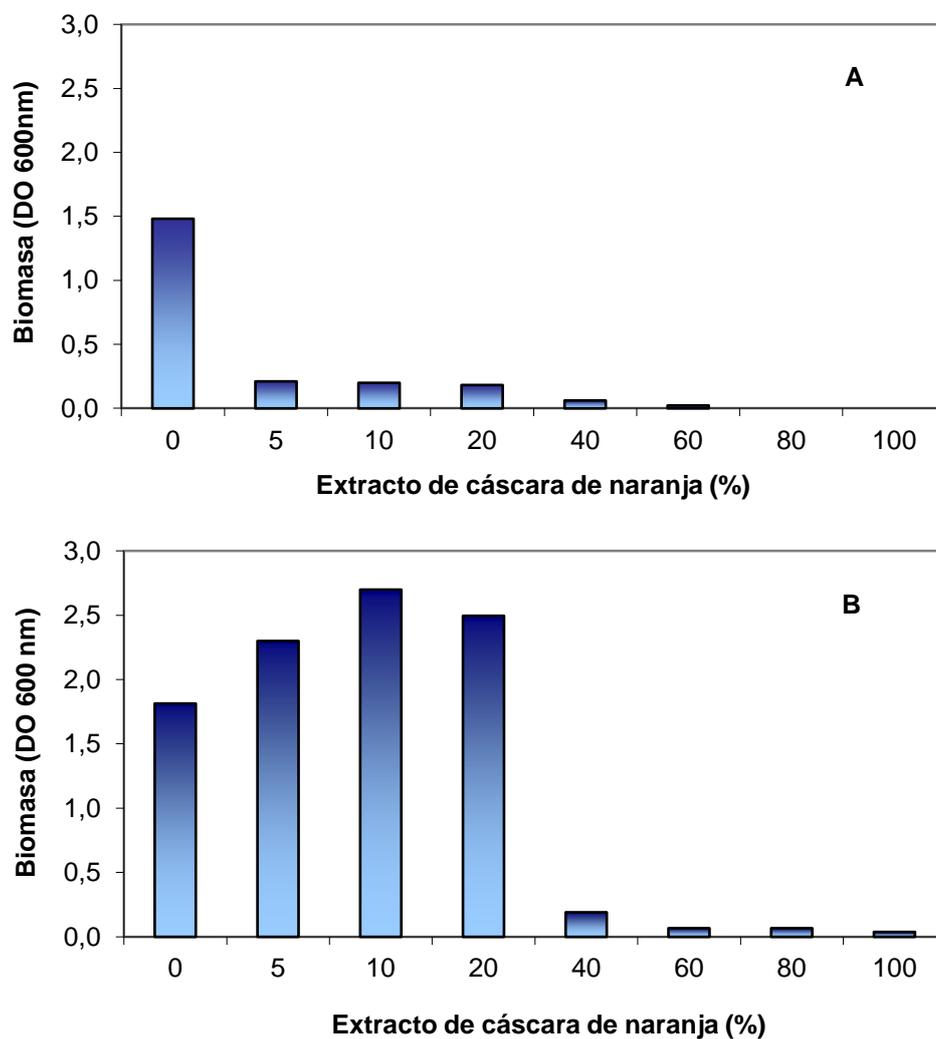


Fig. 4.1. Efecto del extracto de cáscara de naranja sobre el crecimiento de *R. fascians* (A) y *M. flavescens* (B).

Estos resultados indican que *R. fascians* NRRL-B-15096 era muy sensible a los compuestos presentes en el extracto de cáscara de naranja (limonoides) y que no toleraba concentraciones por encima del 5%.

Tabla 4.2. Producción de biomasa de *R. fascians* y *M. flavescens* suplementado con extracto de cáscara de naranja.^a

Extracto de cáscara de naranja ^b			Producción de Biomasa (%)	
Concentración (%, v/v)	Limonoides ^c	Azúcares reductores ^d	<i>R. fascians</i>	<i>M. flavescens</i>
0	0,00	0,00	100,00 ^e	100,00 ^e
5	0,24	0,33	14,24	126,78
10	0,97	1,21	13,50	148,82
20	3,89	4,83	12,35	137,58
40	15,55	19,32	9,19	10,52
60	34,99	43,47	1,55	3,69
80	62,21	77,28	0,00	3,69
100	97,20	120,75	0,00	2,09

^aMedio de cultivo MM, 48 h a 25 °C y 150 rpm

^bProporción cáscara/agua de 1/7 (p/v)

^cµg de limonina ml⁻¹

^dµg de glucosa ml⁻¹

^eMuestra control sin extracto de cáscara: Biomasa (DO a 660 nm) = 1,482 (*R. fascians*) y 1,815 (*M. flavescens*)

Por el contrario, con la cepa de *M. flavescens*, se pudo constatar que este microorganismo toleraba hasta un 20% de extracto sin que se afectase su crecimiento y concentraciones superiores de extracto inhibían completamente su proliferación (Fig. 4.1). En concreto, con concentraciones del 5, 10 y 20%, no sólo no se inhibía el crecimiento del microorganismo, sino que se obtenían valores incrementados en la biomasa que superaban al control en un 26,8; 48,8 y 37,6%, respectivamente. El comportamiento de *M. flavescens*, frente a la presencia de extracto de cáscara en el medio de cultivo, podría explicarse en base a sus propias condiciones de obtención, ya que como se había indicado al inicio del bloque, se trata de una cepa aislada a partir de una mezcla de suelo y compost de residuos de cítricos, con lo que no resulta extraño que el microorganismo sea capaz de metabolizar y transformar en biomasa celular componentes presentes en estos frutos. No obstante, era constatable (Tabla 4.3) que por encima del 20%, en contenido en extracto de cáscara de naranja del medio de cultivo, se producían inhibiciones del 89,4-97,9% en el crecimiento microbiano.

En las tablas 7.1 y 7.2 se incluyen los resultados del tratamiento estadístico de la varianza que muestra, para ambos microorganismos, que hay diferencias significativas entre los tratamientos ya que el nivel de significación es menor de 0,05 ($p < 0,05$) para la variable de estudio.

Debido al efecto de inhibición observado sobre el crecimiento microbiano, especialmente acentuado para *R. fascians*, se procedió en el siguiente apartado a un intento de adaptación y

acondicionamiento de los microorganismos a los componentes presentes en los cítricos, para incrementar su tolerancia a estos compuestos.

4.1.1.2. Acondicionamiento microbiano al extracto de cáscara de naranja

El acondicionamiento de *R. fascians* y *M. flavescens* se llevó a cabo mediante un procedimiento de cultivo en etapas, incrementando sucesivamente y de manera creciente la concentración de extracto de cáscara de naranja en los medios de proliferación (apdo 3.1.2.3). Cada etapa implicaba un tiempo de incubación de 96 h incrementándose, en cada paso, la concentración de extracto de cáscara de naranja desde el 5; 10; 20; 40; 60; 80 al 100% (v/v).

Con estas condiciones de trabajo pudo constatar una mejora notable en la producción de biomasa para ambos microorganismos. *R. fascians*, no sólo no sufría ya inhibición a valores del 5% de extracto de cáscara, sino que presentaba un incremento de biomasa del 109%, en comparación con la muestra control, a concentraciones de extracto del 20% (Tabla 4.3 y Fig. 4.2).

Tabla 4.3. Efecto del proceso de acondicionamiento de *R. fascians* y *M. flavescens* a concentraciones crecientes de extracto de cáscara de naranja sobre el crecimiento celular^a.

Extracto de cáscara de naranja ^b	Biomasa ^c	
	Concentración (% , p/v)	<i>R. fascians</i>
0	1,003	1,529
5	1,517	1,769
10	1,684	1,863
20	2,098	2,245
40	0,747	2,140
60	0,203	2,004
80	0,154	1,502
100	0,045	0,956

^aMedio de cultivo MM, 96 h a 25 °C y 150 rpm

^bProporción cáscara/agua de 1/7 (p/v)

^cDO a λ=600 nm

Los cultivos de *M. flavescens*, también mejoraban su crecimiento al sufrir el proceso de acondicionamiento, si bien, los resultados no son tan espectaculares como los obtenidos con *R. fascians*. Para este microorganismo se mantenían, aproximadamente, los mismos rangos de incremento de biomasa para el 5; 10 y 20% de extracto, en comparación con los cultivos sin acondicionar, y los incrementos de biomasa observados a concentraciones de extracto del 40 y 60% eran sólo del 39,9 y 37,7%, respectivamente, con respecto de las muestras control

(Tabla 4.4 y Fig. 4.2).

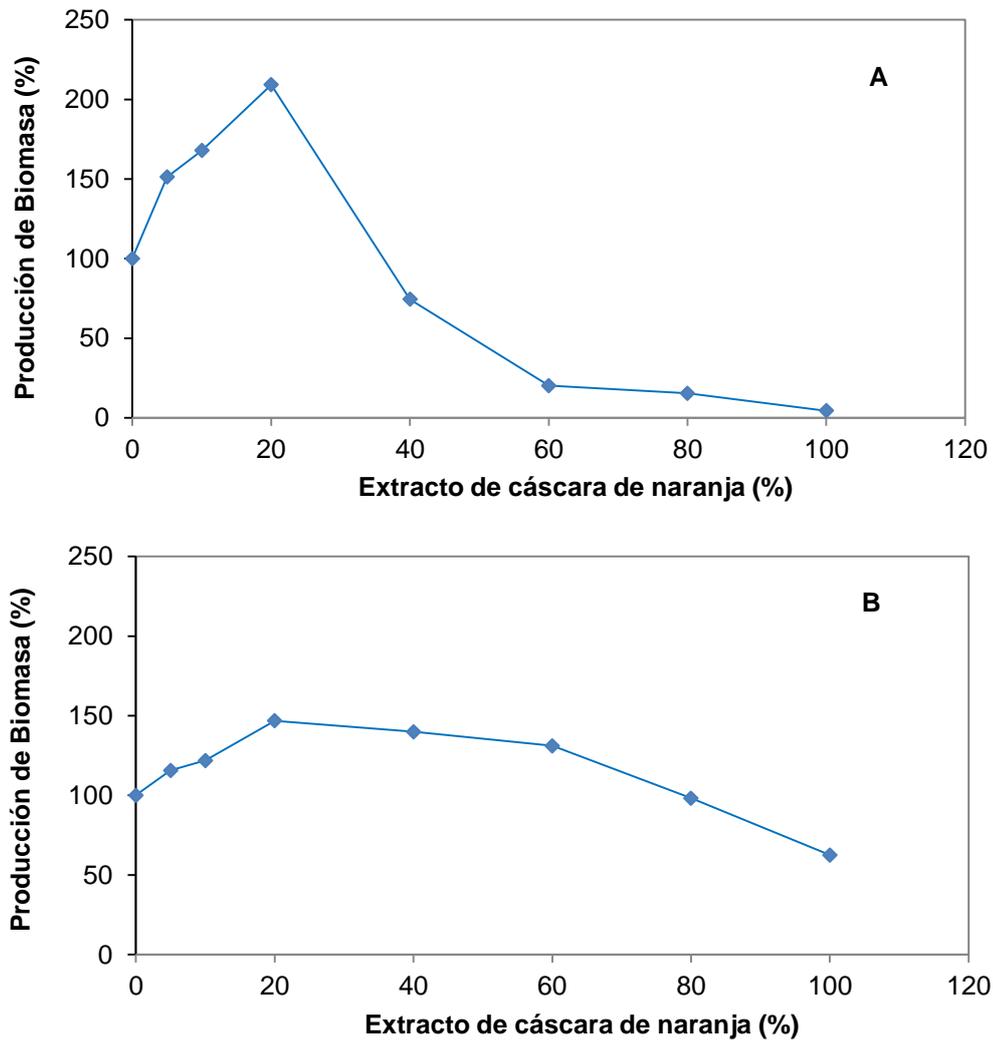


Fig. 4.2. Efecto del proceso de acondicionamiento en con concentraciones crecientes de extracto de cáscara de naranja sobre el crecimiento de *R. fascians* (A) y *M. flavescens* (B).

Para estas condiciones se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, para ambos microorganismos, con un nivel de significación inferior al 0,05 ($p < 0,05$) para la variable de estudio (Tabla 7.3 y 7.4 del anexo).

De los resultados expuestos, se puede concluir que las cepas acondicionadas, tanto *R. fascians* como *M. flavescens*, mejoraban notablemente su tolerancia a los componentes presentes en los extractos de cáscara de naranja, obteniéndose los niveles de biomasa más elevados con la concentración de extracto de cáscara de naranja del 20% en el medio de cultivo.

4.1.1.3. Tolerancia de las cepas acondicionadas de *R. fascians* y *M. flavescens* a limonina purificada

La producción de biomasa activa en enzimas que degraden limonina es el primero de los objetivos a desarrollar en el presente trabajo de investigación, por lo que una vez acondicionadas las cepas microbianas a la presencia de extracto de cáscara de naranja, que además de limonoides contienen una gran variedad de otros compuestos (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos...), era necesario comprobar la capacidad de crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo cuya única fuente de carbono fuese limonina purificada.

Debido al precio elevado de la limonina pura disponible en el mercado, se procedió, en primer lugar, a la obtención de limonina purificada en el laboratorio, mediante el procedimiento de extracción a partir de semillas de cítricos desarrollado por Pifferi y col. (1993). Los cristales de limonina obtenidos con este proceso (apdo 3.1.2.4) mostraban un color blanco lechoso, con una apariencia muy similar a los cristales de limonina de origen comercial (Sigma). Se comprobó esta similitud por cromatografía en capa fina, aplicando como eluyente una mezcla de benceno, metanol y ácido acético (Tatum y Berry, 1973). En la Fig. 4.3 se puede comprobar que la limonina extraída de semillas de cítricos no estaba contaminada con otros limonoides ya que se observaba claramente una única banda bien definida e idéntica a la muestra sintética.

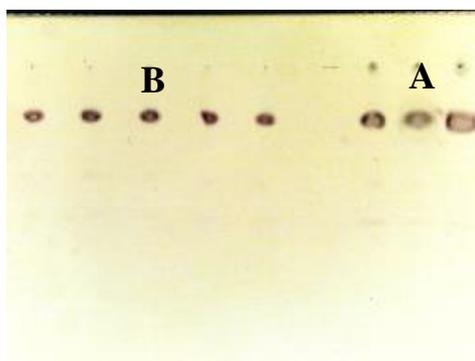


Fig. 4.3. Cromatografía en capa fina de limonina comercial (A) y limonina extraída de semillas de cítricos (B).

Los factores de retención (R_f) obtenidos para la limonina extraída en nuestro laboratorio y la limonina comercial (Sigma) eran de 0,133 y 0,141, respectivamente, lo que permitía afirmar que se trataba de la misma molécula.

Por otra parte, los resultados cuantitativos de la evaluación del grado de pureza de la

limonina obtenida a partir de semillas de cítricos indicaban un 84% de pureza para la limonina obtenida en nuestro laboratorio. Esto permitía confirmar los resultados mostrados en la cromatografía en capa fina. El 16% restante se correspondía con otros compuestos de naturaleza diferente a la de los limonoides ya que en la cromatografía en capa fina no quedaban plasmados. Aún así, el grado de pureza obtenido se podía considerar como óptimo debido a la complejidad del proceso de extracción.

Para el estudio de tolerancia a la limonina, se procedió al inóculo de cultivos de *R. fascians* y *M. flavescens*, previamente acondicionados con extracto de cáscara de naranja, en un medio MM a pH 7, sin fructosa, con concentraciones elevadas de limonina de 100 y 200 ppm.

Los resultados obtenidos para *R. fascians* y *M. flavescens*, en relación a producción de biomasa, limonina residual y concentración de azúcares reductores a tiempo 0 y después de las 96 h de tratamiento, 25 °C y 150 rpm, se engloban en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Efecto de la concentración de limonina en la producción de biomasa de cepas acondicionadas de *R. fascians* y *M. flavescens*.^a

Tiempo cultivo (h)	Limonina (ppm)	<i>R. fascians</i>			<i>M. flavescens</i>		
		Biomasa ^b	Limonina ^c	Azúcares reductores ^d	Biomasa ^b	Limonina ^c	Azúcares reductores ^d
0	0	0,058	0,0	3,0	0,023	0,0	3,0
	100	0,036	75,4	120,0	0,023	90,8	120,0
	200	0,075	179,9	189,0	0,017	171,1	189,0
96	0	0,782	0,0	1572,0	0,643	0,0	1059,0
	100	0,855	18,8	1619,0	0,693	80,6	1223,0
	200	0,988	7,6	1842,0	0,757	116,3	1334,0

^a Medio de cultivo MM, pH 7, sin fructosa, 25 °C y 150 rpm

^b Absorbancia a $\lambda=600$ nm

^c μg de limonina ml^{-1}

^d μg de glucosa ml^{-1}

Se pudo observar, como ambos microorganismos toleraban muy bien la limonina adicionada en el medio de cultivo, siendo de destacar el incremento del crecimiento microbiano para *R. fascians* a la concentración de limonina más elevada de 200 ppm, con rendimientos que superaban al control en un 26,1%, mientras que *M. flavescens* presentaba para la misma concentración del limonoide amargo un 19,3% de rendimiento (Fig. 4.4). El incremento biomásico observado venía acompañado a su vez, de un incremento en el contenido de azúcares reductores en el medio de fermentación resultado del metabolismo celular (Tabla 4.4).

Del análisis de los datos referidos a limonina residual en el medio de proliferación celular (Tabla 4.5), se comprobó la mayor capacidad degradativa de limonina para el cultivo de *R.*

fascians, ya que en medios con 200 ppm de limonina inicial y tras 96 h de tratamiento este microorganismo había consumido un 95,8% de la limonina adicionada, mientras que los cultivos de *M. flavescens* sólo presentaban un 32,03%.

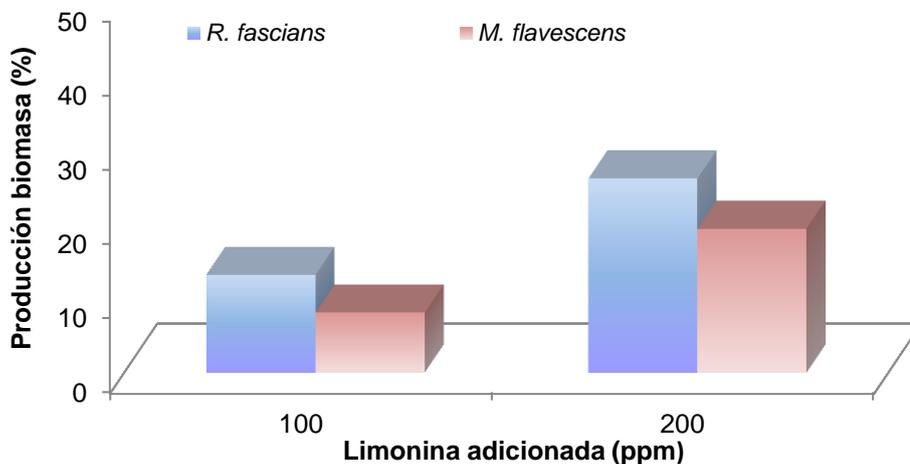


Fig. 4.4. Crecimiento de *R. fascians* y *M. flavescens* a las 96 h de cultivo en medio suplementado con limonina purificada a diferentes concentraciones.

El análisis de la varianza incluido en las Tablas 7.5 y Tabla 7.6 muestra que existen diferencias significativas para ambos microorganismos en el crecimiento a diferentes concentraciones de limonina y la Tabla 7.9 del anexo, confirma la capacidad de degradación de limonina, significativamente diferente entre ambas cepas.

De las experiencias realizadas se puede concluir que aunque ambos microorganismos, una vez acondicionados, crecen bien en medios de cultivo suplementados con limonina, la cepa de *R. fascians* NRRL-B-15096 era la que presentaba una mayor capacidad de crecimiento con un metabolismo enzimático más activo en la degradación de limonina.

4.1.2. DEGRADACIÓN DE LIMONINA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA ACONDICIONADA DE *R. fascians*

Una vez seleccionada la cepa de *R. fascians* frente a *M. flavescens* como la más activa en la degradación de limonina y proliferación celular para altas concentraciones de este limonoide, se procedió al seguimiento de la cinética de crecimiento de *R. fascians* en un medio suplementado con limonina con vistas a su posterior inmovilización.

Aunque un medio de cultivo determinado puede ser adecuado para la iniciación del crecimiento microbiano, el desarrollo posterior de una población bacteriana puede estar limitado por los cambios químicos que se producen durante el crecimiento como consecuencia de la actividad metabólica de los propios microorganismos. Así, por ejemplo, en los medios que contienen glucosa, los ácidos orgánicos producidos como resultado de la fermentación pueden inhibir el crecimiento. Por el contrario, la descomposición microbiana o el uso de componentes aniónicos pueden alcalinizar el medio. Por todas estas razones, se procedió junto con el ensayo del contenido biomásico y degradación de limonina al estudio de evolución del pH a lo largo del tiempo de cultivo. Paralelamente, se incluyeron cepas control del microorganismo que no había sido acondicionado previamente con extracto de cáscara de naranja.

Se decidió utilizar una cantidad de limonina inicial de 60 ppm, ya que el contenido medio de limonina de la naranja Navel al inicio de campaña se sitúa entre 20-25 ppm y el umbral de percepción se sitúa en 6 ppm.

En la Tabla 4.5 se muestra el perfil de evolución de la biomasa observando que presentaba una cinética de crecimiento típica de procesos discontinuos (“batch cultures”), en los que los nutrientes no se renuevan y, por consiguiente, el crecimiento se mantiene exponencial sólo durante unas pocas generaciones. De hecho, bajo las condiciones de ensayo, se observaba una fase de crecimiento en las primeras 24 h de cultivo, disminuyendo la velocidad de crecimiento a partir de este tiempo para alcanzar la fase estacionaria tras 48 h.

El incremento de pH del medio de 6,7 a 8,4 observado durante la las 96 h de incubación, puede ser consecuencia de la secreción de compuestos de amonio y consumo de ácidos durante el ciclo de crecimiento (Tabla 4.5).

Los resultados obtenidos en el seguimiento de la degradación de limonina durante la proliferación celular se reflejan en la Tabla 4.5 y Fig 4.5, donde se constata, especialmente en la cepa acondicionada, la elevada capacidad de *R. fascians* para la utilización como nutriente

de limonina y, por tanto, su degradación, llegando a asimilar en las primeras 24 h de cultivo hasta un 67,7% de la limonina adicionada como única fuente carbonada, en comparación con el 39% de degradación que exhibía la cepa no sometida a proceso de acondicionamiento.

Tabla 4.5. Degradación de limonina y cinética de crecimiento de cepas de *R. fascians* acondicionadas con extracto de cáscara de naranja y sin acondicionar.^a

Tiempo de cultivo (h)	Cepa sin acondicionar			Cepa acondicionadas ^b		
	Biomasa ^c	pH	Limonina ^d	Biomasa	pH	Limonina
0	0,016	6,77	58,01	0,016	6,74	55,81
24	1,165	7,15	35,36	1,240	7,02	18,06
48	1,691	7,67	9,49	1,708	7,49	1,82
72	1,713	8,05	4,87	1,946	8,10	1,24
96	1,567	8,28	4,68	1,925	8,35	1,82

^aMedio de cultivo MM, pH 7, con limonina (60 ppm) y sin fructosa

^bCon extracto de cáscara de naranja (proporción cáscara/agua de 1/7 (p/v)) al 20% (v/v)

^cDO a $\lambda=600$ nm

^d μg limonina ml^{-1}

Comentar que a las 48 h la cepa acondicionada había degradado prácticamente el 100% de la limonina adicionada y la cepa sin acondicionar llegaba a una reducción del 83,64%. No se observaron diferencias significativas entre ambas cepas al incrementar los tiempos de cultivo a 72 y 96 h (Tabla 7.10 del anexo). A este respecto, recalcar, que a diferencia de la cepa no acondicionada, a las 96 h los cultivos de *R. fascians* acondicionado con extracto de cáscara de naranja habían demostrado su eficacia de degradación a concentraciones 1,6 y 3,3 veces superiores a las de este ensayo (apdo 4.1.1.3).

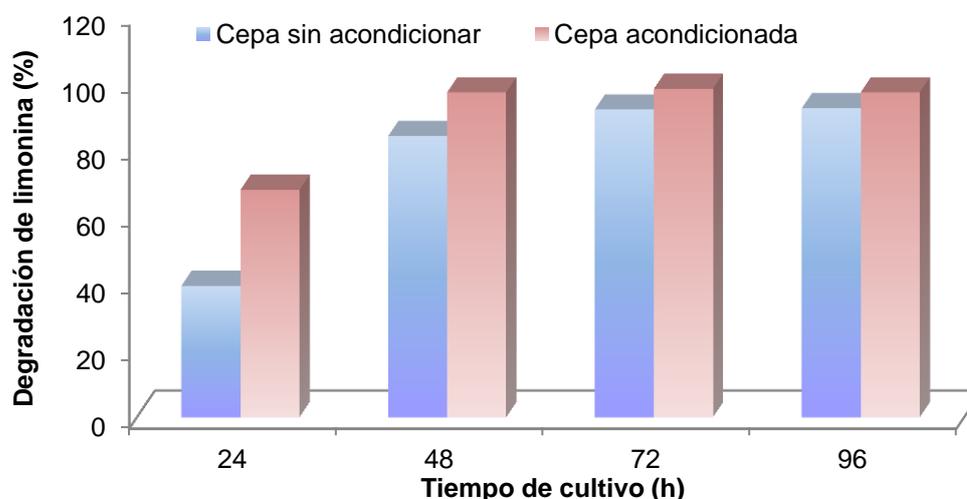


Fig. 4.5. Degradación de limonina por cepas de *R. fascians* acondicionadas con extracto de cáscara de naranja y sin acondicionamiento (medio de cultivo MM con limonina (60 ppm) y sin fructosa).

En comparación con los resultados obtenidos en esta experiencia, estudios realizados por otros investigadores con *Pseudomonas putida* en medios de cultivo utilizando como única fuente de carbono limonina, presentaron niveles de degradación de limonina del 64% tras 48 h de cultivo (Verma y col., 2009) y del 70,3% en condiciones optimizadas a las 34 h (Malik y col., 2012). Más recientemente, con la aplicación de *Clavispora lusitaniae* se han obtenido rendimientos de degradación de limonina del 54% (Sahota, 2013).

**4.2. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS
ACONDICIONADAS DE *R. fascians*
NRRL-B-15096 POR ATRAPAMIENTO
EN CRIOGELES Y ENCAPSULACIÓN**

Se ha constatado en los bloques anteriores la efectividad de la cepa de *Rhodococcus fascian* NRRL-B-15096, acondicionada con extracto de cáscara de naranja, en la degradación de limonina y, por tanto, la capacidad de este microorganismo en producir enzimas para la degradación del limonoide amargo. No obstante, la naturaleza intracelular de las enzimas implicadas y la imposibilidad constatada de obtención de extractos celulares con enzimas activos, conlleva la utilización de las células completas para el desamargado de zumos.

Las próximas experiencias se centran en el estudio de la viabilidad de la inmovilización como técnica para mantener la capacidad catalítica del microorganismo frente al limonoide amargo en condiciones controladas en el laboratorio. Para ello, se seleccionaron distintos soportes y métodos de inmovilización, ya que de ellos depende el microambiente que se genera entorno a la célula y que, a la postre, determina la efectividad del proceso y su potencial estabilidad en la reutilización. En concreto, se procedió a inmovilizar las células de *R. fascians* por dos técnicas atrapamiento: a) en la matriz de un gel y b) por encapsulación. Como materiales soportes se seleccionaron los geles de alcohol polivinílico (PVA) y de alginato de calcio por sus ya demostradas buenas cualidades para la inmovilización de biocatalizadores, por su disponibilidad, biocompatibilidad y relativa simplicidad en el procedimiento (apdo 2.3.3).

En todas las pruebas se utilizaron células de *R. fascians* acondicionadas previamente con extracto de cáscara de naranja (apdo 3.1.2.3) y limonina extraída a partir de semillas de cítricos (apdo 3.1.2.4).

4.2.1. INMOVILIZACIÓN DE *R. fascians* EN CRIOGELES DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

4.2.1.1. Optimización del proceso de inmovilización en criogeles

Se procedió al atrapamiento de las células microbianas por formación de hidrogeles de PVA en forma de perlas, mediante la técnica de congelación-descongelación con N₂ líquido (apdo 3.2.1.1). Como variables para la formación de las perlas se seleccionaron para esta primera experiencia dos concentraciones de PVA al 8 y 10% (p/v), en base a estudios previos realizados por otros investigadores (Busto y col., 2007), y concentraciones crecientes de inóculo microbiano desde 0,2 hasta 1,2 DO. Los inmovilizados se sometían a 25 °C, con agitación a 100 rpm en medio MM a pH 7 suplementado con limonina (60 ppm) (apdo 3.2.2), evaluando a diferentes intervalos de tiempo los niveles de degradación del compuesto amargo, el pH y la biomasa del medio.

Hay que indicar que los resultados obtenidos con la concentración de PVA del 10% no se incluyen en esta memoria debido a que las perlas no resultaban estables, rompiéndose y liberando el microorganismo al medio de cultivo. Por el contrario, los inmovilizados formados con PVA al 8% permanecían íntegros durante parte del periodo de estudio. No obstante, para esta concentración de PVA y con inóculos de 0,2 y 0,4 DO se presentaron también problemas de contaminación por lo que no se pudieron incluir en los resultados finales (Fig. 4.6).

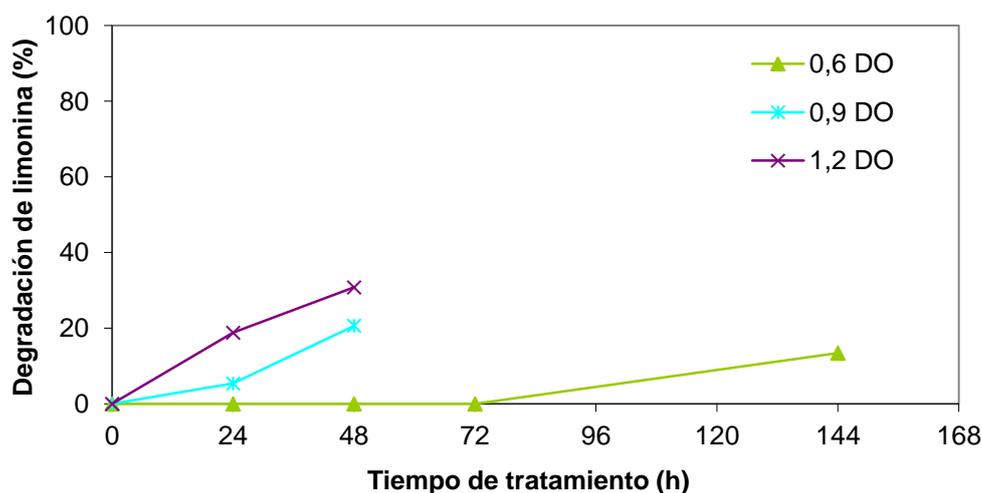


Fig. 4.6. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA al 8% a diferentes concentraciones de inóculo microbiano (DO a $\lambda = 600$ nm).

Para el resto de inóculos se pudo observar, que las células de *R. fascians* inmovilizadas no

poseían apenas capacidad de degradación de limonina. Perlas de PVA al 8% con un inóculo de 0,6 DO no presentaban una mínima actividad hasta las 100 h de tratamiento. Los mismos inmovilizados con cantidades incrementadas de inóculo de 0,9 y 1,2 DO, provocaban una disminución del 5,4 y 18,8%, respectivamente, de la limonina presente en el medio en las primeras 24 h de tratamiento. No obstante, a partir de las 48 h se producía la rotura de las perlas con la consecuente liberación del microorganismo al medio de cultivo.

A la vez que se evaluó la degradación de limonina del medio, también se estudió la variación del pH y biomasa del mismo (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA.

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^a (h)	Inóculo microbiano ^b				
		Control ^c	0,6	0,9	1,2	
8	Biomasa ^d	0	0,053	0,052	0,054	0,052
		24	0,053	0,052	0,055	0,053
		48	0,052	0,052	0,053	0,054
		72	0,053	0,053	ne	ne
		144	0,053	0,052	ne	ne
	pH	0	6,72	6,80	6,73	6,61
		24	6,68	6,95	7,18	7,34
		48	6,58	7,35	7,50	7,18
		72	6,45	7,37	ne	ne
		144	6,50	7,41	ne	ne

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm

^bDO a $\lambda=600$ nm

^cPerlas de PVA (8%) sin microorganismo

^dAbsorbancia a $\lambda=600$ nm

ne- no evaluado por rotura de las perlas

Se observó que durante el periodo de tratamiento donde los inmovilizados se mantenían íntegros los valores de biomasa se mantenían consecuentemente estables, no apreciándose un aumento de la misma, sin embargo, si se observó un ligero aumento de los valores de pH, superando el valor de 7 a las 24 h de tratamiento, esto pudo deberse a que en la preparación de los criogeles el PVA se disolvía en NaOH al 0,2% (apdo 3.2.1) lo que pudo provocar una ligera basificación del medio.

Como ya se ha indicado en el apdo 2.3.3.1 de esta memoria, la inmovilización por atrapamiento en geles de PVA es una técnica ampliamente estudiada para la estabilización de

biocatalizadores en general y células completas en particular, ya que forman perlas estables con una gran área superficial y posibilidad de control del tamaño de poro del soporte. Se encuentran numerosas referencias sobre la inmovilización por atrapamiento de biocatalizadores en geles de PVA con resultados más o menos satisfactorios. Ichijo y col. (1990) observaron que levaduras inmovilizadas en PVA mantenía una elevada actividad y estabilidad térmica; Ariga y col. (1994) inmovilizaron en PVA células permeabilizadas con actividad β -galactosidasa, observando que la eficacia de los inmovilizados disminuía a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento; Szczesna-Antczak y col. (2001) inmovilizaron células de *Bacillus subtilis* en PVA por el método de congelación-descongelación demostrando que tanto la concentración de PVA como el número de ciclos de congelación-descongelación afectaban a la estabilidad del gel. Más recientemente, Magrí y col. (2012) aplicaron criogeles de PVA con bacterias anaeróbicas (*Candidatus Brocadia caroliniensis*) para el tratamiento de aguas residuales, manteniendo su actividad durante más de cinco meses en condiciones no estériles.

En relación al microorganismo objeto de estudio, *R. fascians*, se describen en bibliografía diferentes soportes y métodos de inmovilización de células completas, como el atrapamiento en geles de alginato, k-carragenato y agarosa, en geles de poliacrilamida no permitidos para consumo humano (Hasegawa y col., 1985) o en espumas de poliuretano (Cánovas y col., 1998), con resultados muy diversos. Desde una buena estabilidad estructural y una gran capacidad de retención de la biomasa para el caso de las espumas a la desestabilización de los inmovilizados en geles de alginato y k-carragenato en medios ácidos (Martínez-Madrid y col., 1989; Iborra y col., 1994). En cuanto a los geles de PVA como soporte de inmovilización no hay, por el momento, referencias sobre su utilización con células de *R. fascians*.

De los resultados obtenidos en esta primera experiencia se deducía que el atrapamiento con PVA en las condiciones de estudio aplicadas, no era apto para la inmovilización de las células viables de *R. fascians*, por lo que se procedió a buscar otras alternativas.

Se ha comprobado que las mezclas de polímeros presentan, a menudo, propiedades superiores a las de cada polímero individualizado a la hora de formar geles (Reddeppa y col., 2009; Rao y col., 2012). Además, los sistemas de mezcla presentan la ventaja de la facilidad de control de las propiedades físicas por el cambio de composición. El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado también por sus buenas propiedades para la inmovilización celular de manera aislada, Singh y col. (2015) inmovilizaron *Clostridium* sp. para la mejora en la producción de hidrógeno en procesos de fermentación. El PEG actúa como agente crioprotector aumentando la estabilidad de los inmovilizados estructural (Groboillot y col., 1994) y funcionalmente en la

formación de tamaño de poro (Buwalda y col., 2014; Cheng y col., 2014) en los procesos de inmovilización. Se ha comprobado también, que la incorporación de PEG incrementa la eficacia de células inmovilizadas en geles de alginato de calcio (Cheng y col., 2014), en concreto, la mezcla de PVA y PEG es una de las más utilizadas por sus propiedades mejoradas (Rao y col., 2013).

Una de las variables que afecta a las características del gel en estos sistemas de mezcla es el peso molecular del PEG ya que influye en el tamaño de poro y las propiedades mecánicas de los inmovilizados (Moriyama y col., 2015). Cheng y col. (2014) observaron en un estudio en el que usaron PEG de diferentes pesos moleculares (400, 1000 y 6000) para inmovilizar *Pseudomonas putida* XY4 en perlas de Ca-alginato que el tamaño y el número de poros aumentaba al aumentar el peso molecular y, además, los poros se distribuían más uniformemente, por lo que consideraron que pesos moleculares mayores daban mejores propiedades de permeabilidad a las perlas. Sin embargo estos mismos autores en estudios anteriores vieron que esto podía dar lugar a una mayor facilidad de fugas celulares.

Por todo lo expuesto y debido a la poca efectividad y estabilidad de las perlas de PVA, observadas en la prueba precedente, se procedió al atrapamiento de las células microbianas acondicionadas por criogeles de PVA pero incorporando polietilenglicol (PEG₆₀₀). Como variables para la formación de las perlas, en base a estudios previos, se seleccionaron tres concentraciones de PVA al 6, 7 y 8% (p/v), dos concentraciones de PEG 8 y 10% (p/v) y concentraciones crecientes de inóculo microbiano desde 0,2 a 1,2 DO (apdo 3.2.2.2). Los inmovilizados se sometían a incubación a 25 °C, con agitación a 100 rpm en medio MM a pH 7 suplementado con limonina (60 ppm), evaluando a diferentes intervalos de tiempo los niveles de degradación de la limonina adicionada, el pH y la biomasa del medio.

La inmovilización con la mezcla PVA-PEG era más efectiva que sólo con PVA, como se desprende de los datos recogidos en la Tabla 4.7. En general, la integridad de los inmovilizados era mayor con PEG del (10%) a las concentraciones más altas de PVA del 7 y 8%, y los menores valores de inóculo microbiano de 0,2; 0,4 y 0,6 DO. No obstante, aunque la estabilidad de las perlas aumentaba con la mayor concentración de PEG, la efectividad en la degradación de limonina disminuía para todas las concentraciones de PVA evaluadas. Así, concentraciones de inóculo de 0,6 DO en PVA(6%)-PEG(8%) degradaban un 82,22% de limonina después de 72 h (Fig. 4.7), frente al 39,95% de inmovilizados en PVA(6%)-PEG(10%) (Fig. 4.8). Igualmente, después de 92 h de tratamiento, inmovilizados de 0,6 DO en PVA(7%)-PEG(8%) reducían el contenido en limonina del medio en un 37,36% en

comparación con el 34,99% de los inmovilizados en PVA(7%)-PEG(10%). Con PVA(8%)-PEG(8%) se obtuvo una degradación del 100%, después de 168 h, frente al 66,14% con PVA(8%)-PEG(10%) (Fig. 4.7 y 4.8).

Al comparar las variaciones en la concentración de PVA (6, 7 y 8%), se pudo constatar que a mayor concentración de PVA la consistencia de los inmovilizados era mayor, en detrimento de la degradación de limonina, que se veía reducida. Así, para un inóculo de 0,6 DO y PEG(8%), la degradación de limonina con PVA al 6, 7 y 8%, después de 24 h, era del 36,21, 18,82 y 12,45%, respectivamente (Fig. 4.7). Con las mismas variables y condiciones, pero con PEG al 10%, la degradación para PVA del 6, 7 y 8% fue del 14,95, 26,17 y 17,61%, respectivamente (Fig. 4.8). Estos resultados pueden explicarse en base a que el incremento en la concentración de PVA, conlleva una mayor compactación del gel con poros de menor tamaño, con lo que se reduce la difusión de la limonina y, por tanto, la interacción con el biocatalizador.

El ANOVA multifactorial recogido en la tabla 7.12 del anexo permite confirmar que tanto la concentración de PVA, como la concentración de PEG y el tiempo de tratamiento afectaban significativamente a la degradación de limonina. Además, el análisis demuestra que la interacción entre el tiempo de tratamiento y la concentración de PEG así como la interacción entre la concentración de PVA y la concentración de PEG también eran significativas.

En relación a las concentraciones de inóculo microbiano utilizadas, los inóculos más concentrados de 0,9 y 1,2 DO, eran los que daban lugar a una mayor ruptura de los inmovilizados a menores tiempos de tratamiento. Los inóculos menores de 0,2 y 0,4 DO presentaban en general una menor efectividad en la degradación de limonina, en comparación con el inóculo de 0,6 DO. Inmovilizados en PVA(6%)-PEG(8%) con una carga de inóculo de 0,2 y 0,4 DO después de 24 h tuvieron una degradación nula de limonina, mientras la de 0,6 DO alcanzó el 32,21% (Fig. 4.7). Al incrementar el PEG al 10% los inmovilizados de 0,6 DO degradaron un 14,95%, mientras los de 0,2 y 0,4 DO degradaron el 5,65 y 5%, respectivamente. También se observaba que las diferencias en la degradación de limonina entre los distintos inóculos se veía reducido al aumentar la concentración de PVA al 8%. En las tablas 7.15 y 7.18 del anexo los resultados del ANOVA confirman que para esta concentración de PVA no hay diferencias significativas entre los inóculos microbianos estudiados.

Tabla 4.7. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA-PEG.

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^a (h)	Limonina (ppm)									
		PEG 8% (p/v)					PEG 10% (p/v)				
		Inóculo microbiano ^b					Inóculo microbiano ^b				
		0,2	0,4	0,6	0,9	1,2	0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
6	0	62,62	69,76	61,08	61,41	61,17	55,45	56,11	60,74	57,22	60,96
	24	62,62	69,68	38,96	47,79	39,02	52,32	53,31	51,66	40,44	42,42
	48	38,64	57,88	19,28	26,21	ne	48,69	49,84	48,69	39,45	ne
	72	31,62	21,29	10,86	ne	ne	45,06	44,23	36,47	ne	ne
	96	31,62	15,77	ne	ne	ne	43,70	44,36	27,20	ne	ne
	168	ne	ne	ne	ne	ne	44,73	41,59	ne	ne	ne
7	0	53,47	52,04	56,11	53,50	58,59	58,59	57,11	59,91	65,63	58,37
	24	52,28	52,15	45,55	44,16	49,73	51,16	53,80	44,23	48,77	37,96
	48	50,28	48,63	38,95	33,01	46,21	51,49	53,14	43,24	43,90	32,68
	72	45,06	44,23	34,66	28,89	ne	47,86	48,85	41,92	34,49	29,38
	96	45,55	43,27	35,15	28,68	ne	51,74	49,48	38,95	29,38	27,40
	168	45,39	43,41	ne	ne	ne	50,17	48,19	ne	ne	ne
8	0	53,50	52,68	59,69	53,09	52,26	56,69	58,80	60,70	63,59	56,66
	24	50,34	47,04	52,26	44,43	41,95	50,75	54,71	50,01	51,08	43,91
	48	39,34	40,64	44,98	36,10	ne	51,50	53,23	52,73	46,30	44,10
	72	36,31	27,51	35,08	23,94	ne	51,12	51,62	47,41	43,70	41,96
	96	37,14	25,59	40,44	28,48	ne	47,04	43,08	39,36	36,89	33,92
	168	15,68	2,48	0,00	ne	ne	24,51	20,80	20,55	ne	ne

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm^bDO a $\lambda=600$ nm

ne- no evaluado por rotura de las perlas

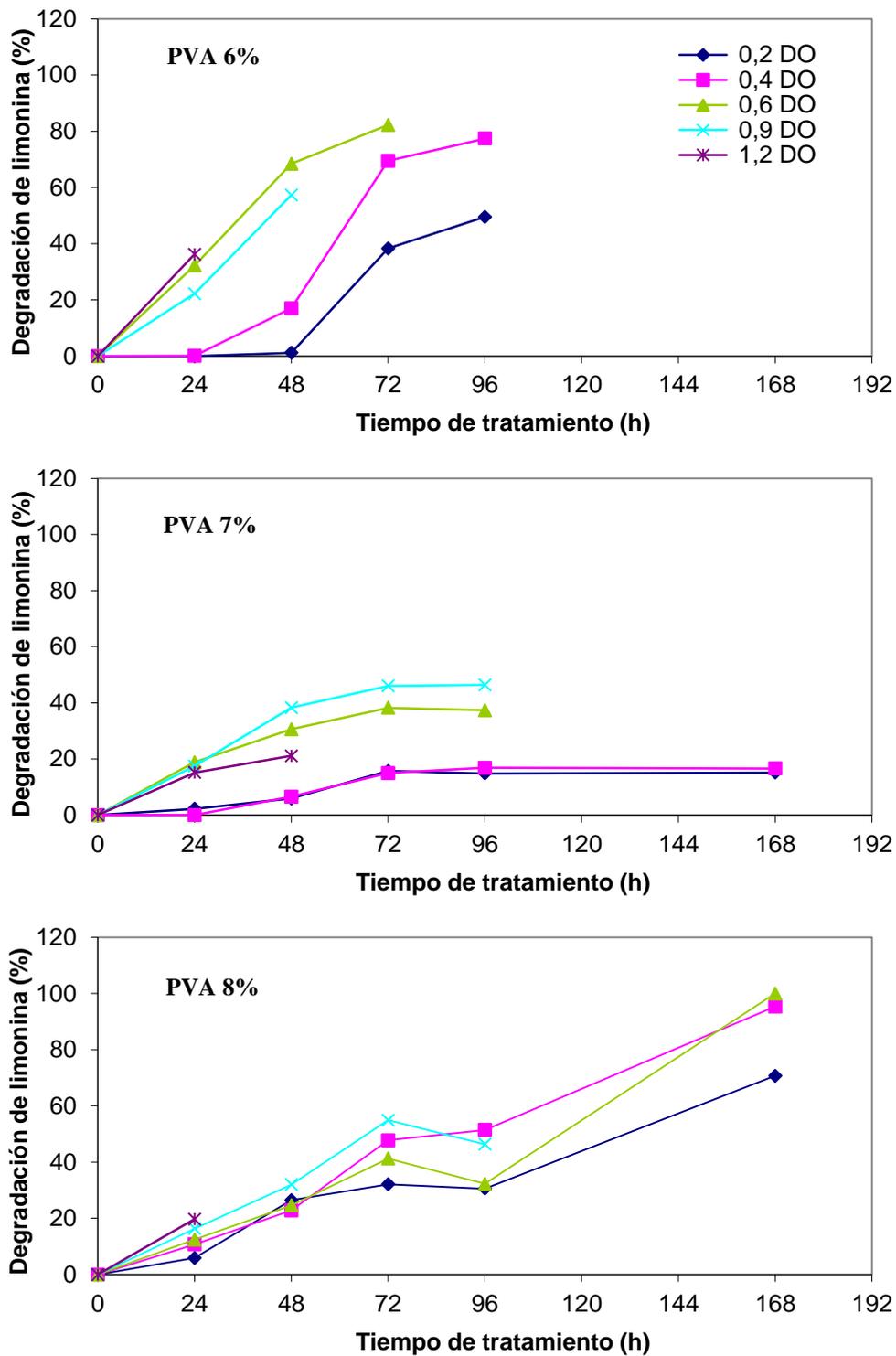


Fig. 4.7. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(8%) a diferentes concentraciones de inóculo microbiano.

La evaluación del contenido en biomasa del medio de operación (Tabla 4.8 y 4.9), constató que no se producía una liberación de microorganismos al medio, ya que no se producían cambios apreciables a lo largo de todo el tiempo de operación. También, se pudo observar un ligero incremento del pH, explicable en base al medio de pH 8 utilizado para la preparación de los inmovilizados (apdo. 3.2.2).

En base a criterios de estabilidad de los inmovilizados, tiempos de operación y capacidad catalítica en la degradación de limonina, los resultados más satisfactorios parecen obtenerse con los inmovilizados en los geles de PVA(8%)-PEG(8%).

4.2.1.2. Estabilidad operacional en sistemas modelo

El estudio de la capacidad de reutilización de los inmovilizados se realizó a escala de laboratorio operando en discontinuo, a 25 °C bajo agitación orbital de 100 rpm durante 24 h. Transcurrido el tiempo de operación, las muestras se filtraban para separar el inmovilizado y poder reutilizarlo (apdo. 3.2.4.) En todos los casos, se evaluaba en el filtrado la concentración de limonina residual. De las pruebas de optimización del apartado anterior se seleccionó para este estudio la concentración de inóculo microbiano de 0,6 DO, teniendo en cuenta que concentraciones de inóculo microbiano menores de 0,2 y 0,4 DO apenas mostraron actividad catalítica con este tiempo de incubación (24 h) y concentraciones mayores de 0,9 y 1,2 DO dieron más problemas de contaminación e inmovilizados mucho menos resistentes.

Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 4.10 y Fig. 4.9. Puede observarse que los diferentes inmovilizados eran perfectamente operativos pasados varios usos repetitivos. No obstante, también se pudo observar, en todos los casos, que el nivel de degradación de limonina disminuía progresivamente con los ciclos de reutilización. Los inmovilizados soportaron hasta cuatro ciclos de reutilización aunque, en el último ciclo el porcentaje de degradación de limonina era nulo o prácticamente nulo, con sólo un 3,60% para PVA(8%)-PEG(8%) y un 0,97% para PVA(8%)-PEG(10%).

En todos los casos se observó que el porcentaje de degradación de limonina era mayor con los inmovilizados obtenidos con PEG(8%) para todas las concentraciones de PVA evaluadas. En este sentido, la concentración de PVA(7%) era la que mostraba menos diferencias al cambiar la concentración de PEG. Por otro lado, la menor efectividad degradativa de los inmovilizados de PVA(8%)-PEG(10%) (Fig. 4.9). podría explicarse en base a la mayor consistencia del gel resultante, aspecto que ya se ha comentado en el apartado anterior.

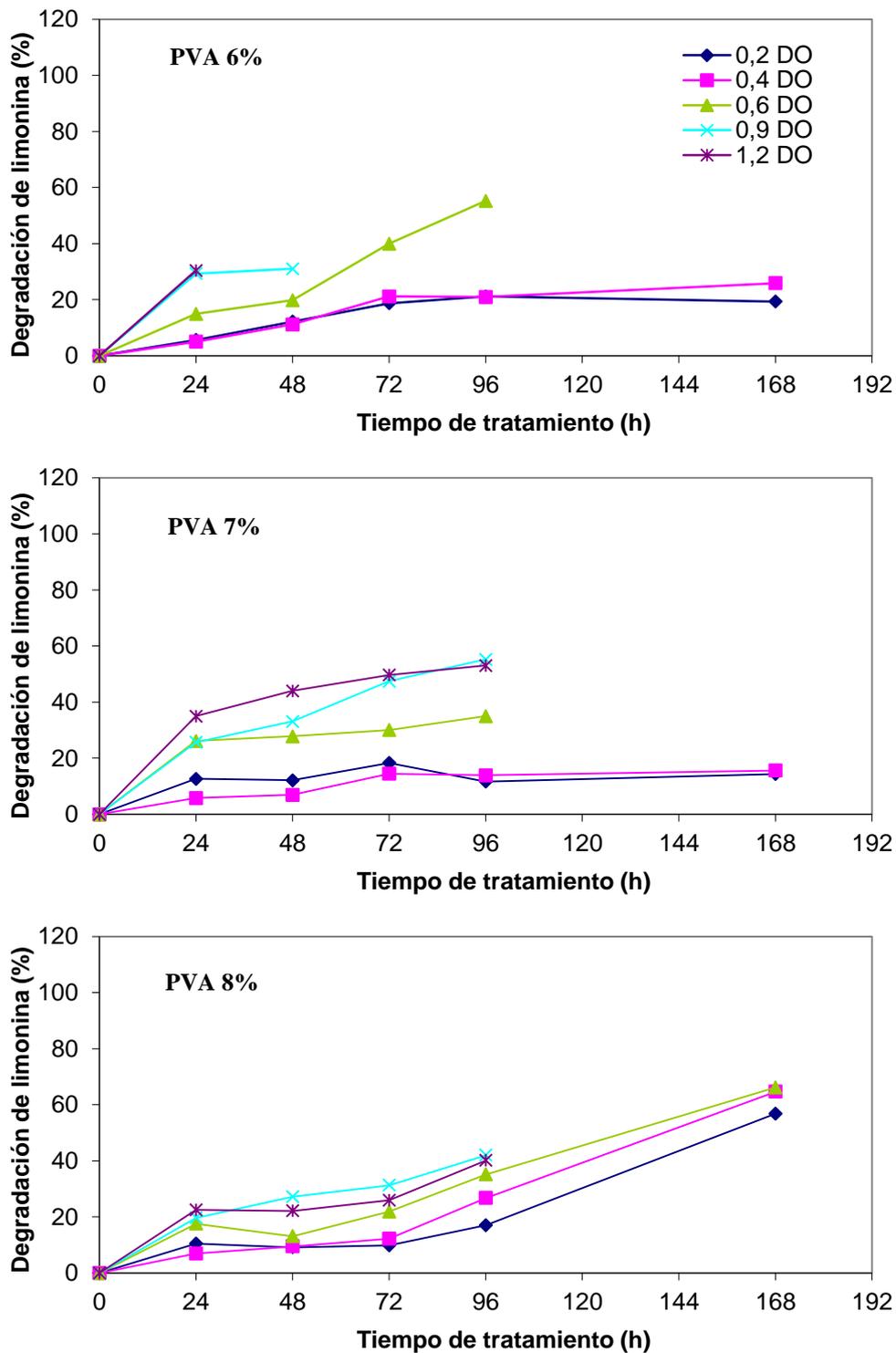


Fig. 4.8. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(10%) a diferentes concentraciones de inóculo microbiano.

Tabla 4.8. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%).

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^a (h)	Inóculo microbiano ^b						
		Control ^c	0,2	0,4	0,6	0,9	1,2	
6	Biomasa ^d	0	0,055	0,058	0,055	0,049	0,055	0,056
		24	0,055	0,057	0,056	0,050	0,053	0,055
		48	0,056	0,056	0,058	0,051	0,055	ne
		72	0,055	0,057	0,059	0,052	ne	ne
		96	0,054	0,056	0,057	ne	ne	ne
		168	0,055	ne	ne	ne	ne	ne
	pH	0	6,81	6,82	6,80	6,90	6,81	6,68
		24	6,83	6,83	6,86	6,93	6,89	6,74
		48	6,85	6,94	6,90	6,98	6,99	ne
		72	6,93	7,00	7,00	6,98	ne	ne
		96	7,01	7,04	7,08	ne	ne	ne
		168	7,03	ne	ne	ne	ne	ne
7	Biomasa ^d	0	0,055	0,053	0,053	0,050	0,056	0,055
		24	0,054	0,053	0,054	0,055	0,052	0,054
		48	0,054	0,053	0,054	0,054	0,049	0,056
		72	0,054	0,050	0,053	0,053	0,054	ne
		96	0,052	0,053	0,053	0,055	0,057	ne
		168	0,050	0,050	0,054	ne	ne	ne
	pH	0	6,77	6,77	6,70	6,71	6,74	6,81
		24	6,85	6,87	6,75	6,85	6,76	6,93
		48	6,89	6,93	6,83	6,88	6,85	7,01
		72	6,98	6,99	7,03	6,97	7,00	ne
		96	7,06	7,03	7,11	7,05	7,08	ne
		168	7,07	7,08	7,09	ne	ne	ne
8	Biomasa ^d	0	0,050	0,047	0,051	0,056	0,055	0,051
		24	0,050	0,047	0,055	0,054	0,056	0,052
		48	0,050	0,050	0,054	0,053	0,055	ne
		72	0,051	0,051	0,055	0,054	0,056	ne
		96	0,050	0,052	0,054	0,058	0,056	ne
		168	0,050	0,053	0,052	0,058	ne	ne
	pH	0	6,71	6,64	6,66	6,71	6,67	6,74
		24	6,79	6,68	6,72	6,72	6,68	6,84
		48	6,95	6,86	6,86	6,92	6,85	ne
		72	7,01	6,97	6,93	7,05	6,97	ne
		96	7,06	7,02	7,08	7,10	7,00	ne
		168	7,15	7,05	7,07	7,10	ne	ne

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm; ^bDO a $\lambda=600$ nm; ^cPerlas sin microorganismo; ^dAbsorbancia a $\lambda=600$ nm; ne- no evaluado por rotura de las perlas

Tabla 4.9. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogel de PVA-PEG(10%).

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^a (h)	Inóculo microbiano ^b						
		Control ^c	0,2	0,4	0,6	0,9	1,2	
6	Biomasa ^d	0	0,053	0,055	0,056	0,052	0,055	0,056
		24	0,053	0,056	0,056	0,053	0,055	0,054
		48	0,054	0,057	0,058	0,053	0,055	ne
		72	0,053	0,055	0,058	0,053	ne	ne
		96	0,053	0,058	0,058	0,054	ne	ne
		168	0,055	0,054	0,056	ne	ne	ne
	pH	0	6,85	6,84	6,85	6,89	6,81	6,68
		24	6,86	6,83	6,86	6,93	6,89	6,74
		48	6,85	6,95	6,90	6,98	6,99	ne
		72	6,96	7,02	7,01	7,00	ne	ne
		96	7,01	7,05	7,08	7,02	ne	ne
		168	7,03	7,10	7,06	ne	ne	ne
7	Biomasa ^d	0	0,054	0,055	0,055	0,052	0,056	0,054
		24	0,054	0,054	0,054	0,055	0,054	0,054
		48	0,055	0,055	0,054	0,052	0,051	0,055
		72	0,055	0,054	0,055	0,053	0,053	0,054
		96	0,053	0,054	0,054	0,054	0,056	0,054
		168	0,054	0,053	0,054	ne	ne	ne
	pH	0	6,75	6,80	6,71	6,74	6,80	6,83
		24	6,82	6,86	6,74	6,87	6,81	6,94
		48	6,89	6,93	6,84	6,88	6,88	7,03
		72	6,91	7,01	7,04	6,97	7,02	7,03
		96	7,03	7,02	7,10	7,05	7,09	7,11
		168	7,05	7,08	7,09	ne	ne	ne
8	Biomasa ^d	0	0,054	0,051	0,053	0,054	0,054	0,053
		24	0,054	0,052	0,054	0,053	0,055	0,053
		48	0,053	0,052	0,055	0,053	0,055	0,053
		72	0,052	0,052	0,054	0,054	0,056	0,053
		96	0,053	0,053	0,054	0,057	0,057	0,053
		168	0,052	0,054	0,052	0,057	ne	ne
	pH	0	6,73	6,66	6,69	6,72	6,67	6,77
		24	6,89	6,70	6,74	6,74	6,70	6,86
		48	6,93	6,87	6,89	6,94	6,87	6,90
		72	6,98	6,99	6,95	7,04	6,99	6,99
		96	6,98	7,03	7,08	7,11	7,00	7,03
		168	7,04	7,07	7,09	7,12	ne	ne

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm; ^bDO a $\lambda=600$ nm; ^cPerlas sin microorganismo; ^dAbsorbancia a $\lambda=600$ nm; ne- no evaluado por rotura de las perlas

En la Tabla 7.23 del anexo se recoge el análisis multifactorial, confirmando que tanto la concentración de PEG como el número de ciclos afectaban significativamente al porcentaje de degradación de limonina. La interacción entre los factores concentración de PEG y PVA si era significativa con un valor de $p < 0,05$. En la misma tabla puede observarse como para la concentración de PVA(6%) y PVA(8%) no existían diferencias significativas entre el ciclo 1 y el ciclo 2 en la degradación de limonina.

Tabla 4.10. Degradación de limonina y estabilidad operacional^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en PVA-PEG.

PEG (%, p/v)	PVA (%, p/v)	Limonina (ppm)			
		Ciclos de 24 h			
		1	2	3	4
8	6	48,57	49,16	49,67	ne
	7	47,19	49,09	53,41	60,00
	8	49,10	48,98	50,98	57,84
10	6	51,43	52,37	53,84	ne
	7	48,08	50,17	53,30	60,00
	8	52,89	53,23	55,55	59,42

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm, limonina 60 ppm a t=0

^bInóculo microbiano de 0,6 DO a $\lambda=600$ nm

ne- no evaluado por rotura de las perlas

Podría destacarse la mayor retención de la actividad catalítica, a lo largo de los tres ciclos de uso, para los inmovilizados con PVA(8%)-PEG(8%) y PVA(6%)-PEG(8%), con niveles de degradación de limonina del 18,16% (ciclo 1), 18,36% (ciclo 2), 15,04% (ciclo 3) y 19,05% (ciclo 1), 18,06% (ciclo 2) y 17,22% (ciclo 3), respectivamente (Fig. 4.9). Sin embargo, los inmovilizados en PVA(7%) reducían la degradación del compuesto amargo a prácticamente la mitad cuando se aplicaron los tres ciclos de reutilización.

En estudios realizados con células de *Pseudomonas putida* XY4 inmovilizadas en Ca-alginato-PEG era destacable que estos inmovilizados se llegaron a usar durante 18 veces sin perder apenas actividad catalítica (Cheng y col., 2014). Por otro lado, Bonine y col. (2014) al inmovilizar lipasas en perlas de alginato/PVA obtuvieron una disminución de la actividad enzimática del 50% después de cinco ciclos.

En la Tabla 4.11 se muestran los valores de biomasa y pH de las distintas muestras ensayadas. De estos datos se deduce que no se producía liberación del microorganismo ni modificaciones o alteraciones del pH del medio. El análisis estadístico de pH y biomasa se recoge en la Tabla 7.24 y 7.25 del anexo.

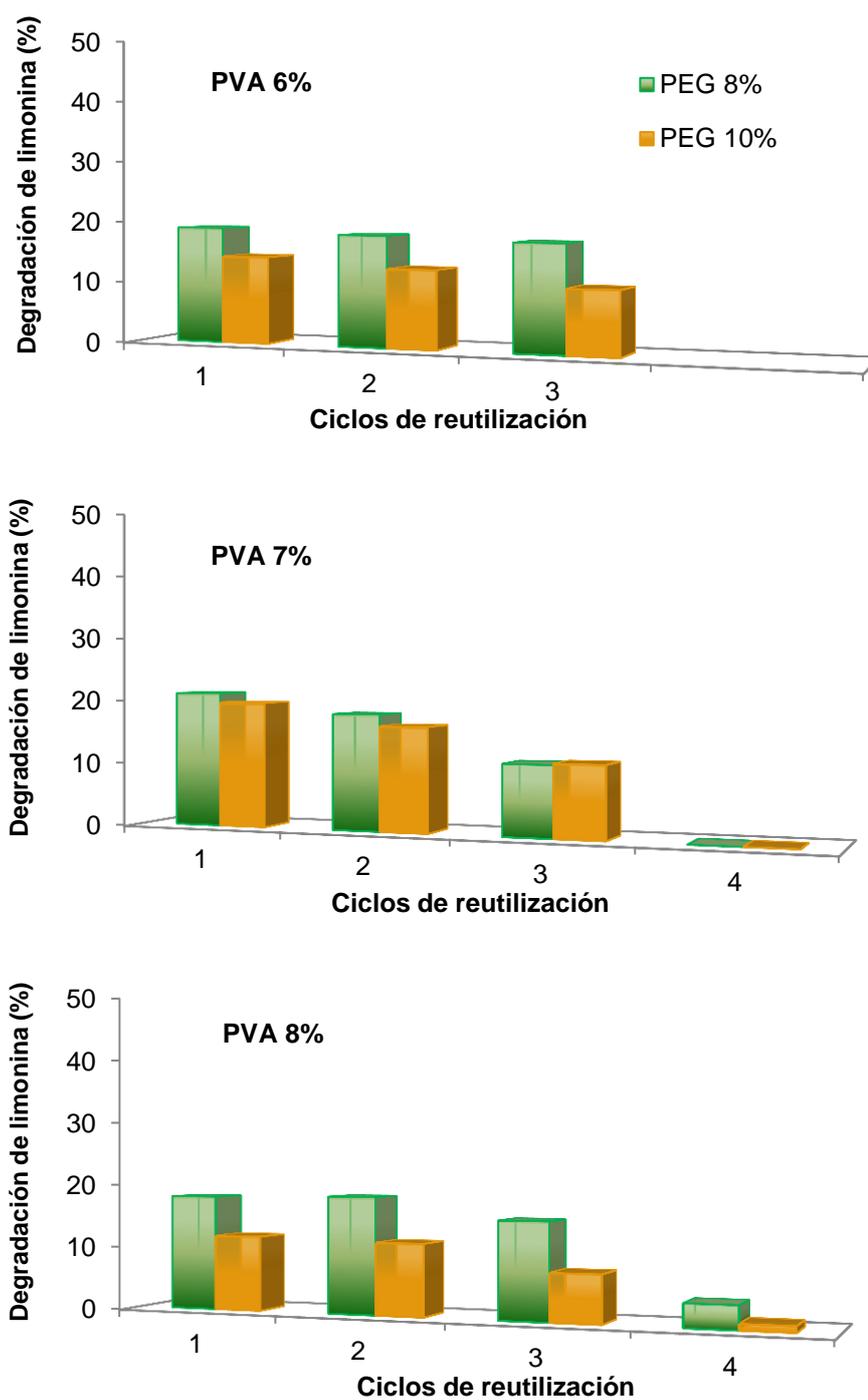


Fig. 4.9. Estabilidad operacional de células de *R. fascians* (0,6 DO) inmovilizadas en criogeles de PVA-PEG. Ciclos de reutilización de 24 h, medio de cultivo MM a pH 7, 25 °C y 100 rpm.

Tabla 4.11. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG.

PEG (%, p/v)	PVA (%, p/v)		Ciclos de reutilización ^b								
			t=0 h				t=24 h				
			1	2	3	4	1	2	3	4	
8	6	Biomasa ^c	0,055	0,055	0,054	ne	0,058	0,056	0,053	ne	
		pH	6,83	6,84	6,90	ne	6,84	6,85	6,91	ne	
	7	Biomasa ^c	0,052	0,055	0,056	0,055	0,054	0,058	0,057	0,058	
		pH	6,75	6,75	6,79	6,79	6,77	6,75	6,81	6,79	
	8	Biomasa ^c	0,058	0,056	0,058	0,059	0,061	0,059	0,061	0,060	
		pH	6,80	6,78	6,83	6,82	6,82	6,79	6,84	6,86	
	10	6	Biomasa ^c	0,053	0,056	0,055	0,056	0,056	0,059	0,057	0,060
			pH	6,81	6,80	6,82	6,83	6,81	6,79	6,83	6,82
7		Biomasa ^c	0,053	0,055	0,055	0,056	0,055	0,058	0,052	0,058	
		pH	6,78	6,80	6,76	6,80	6,79	6,83	6,79	6,82	
8		Biomasa ^c	0,057	0,056	0,055	0,058	0,058	0,057	0,055	0,059	
		pH	6,81	6,86	6,83	6,81	6,83	6,85	6,82	6,80	

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm;^bCiclos de 24 h^cAbsorbancia a $\lambda= 600$ nm

4.2.2. INMOVILIZACIÓN DE *R. fascians* POR ENCAPSULACIÓN EN PERLAS HUECAS DE ALGINATO DE CALCIO (“HOLLOW-BEADS”)

La microencapsulación como método de inmovilización celular ha encontrado aplicaciones en muchos campos incluida la industria farmacéutica, en agricultura, nutrición y para fines terapéuticos (Rathore y col., 2013). Se pretende así superar los inconvenientes encontrados en otras técnicas de inmovilización como la carga limitada de células, la fuga de éstas, la baja estabilidad mecánica, la contaminación y las limitaciones de transferencia de masa (Park y Chang, 2000). En base a estas consideraciones y a los resultados experimentales obtenidos con los criogeles de PVA-PEG se procedió, en este bloque de la Tesis, al estudio de la efectividad en la degradación de limonina de células de *R. fascians* acondicionadas y microencapsuladas en geles de alginato de calcio.

4.2.2.1. Optimización del proceso de inmovilización en perlas huecas de alginato de calcio

Los niveles de actividad de las células inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio y las características reológicas de las mismas dependen de las condiciones del proceso de inmovilización, que conlleva como variables además de la concentración de alginato de sodio, la de carboximetilcelulosa (CMC), de CaCl_2 y la concentración de células microbianas (inóculo) utilizadas. Por ello, se procedió en primer lugar, manteniendo una concentración fija de alginato de sodio del 2%, a la optimización del resto de variables de inmovilización para, posteriormente, valorar la estabilidad de los inmovilizados obtenidos en las condiciones más óptimas.

Para comprobar el efecto producido por la concentración de CMC, como componente de la solución entrecruzante, así como la cantidad de inóculo microbiano incorporado en el inmovilizado sobre la capacidad de degradación de limonina, se inmovilizó el biocatalizador en perlas huecas de alginato de calcio con concentraciones de CMC del 4 y 5%, con inóculos de *R. fascians* de 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 y 1,2 DO, manteniendo fija la concentración de alginato (2%) y CaCl_2 (2%).

Aplicando CMC al 4% no se evaluaba degradación de limonina hasta transcurridas las 96 h de tratamiento para los inóculos menos concentrados de 0,2 y 0,4 DO, obteniéndose a partir de las 48 h, niveles entre 10-27% de degradación para los inóculos más concentrados (0,6; 0,9 y 1,2 DO) (Tabla 4.12; Fig. 4.10A). Si se prolongaba el tratamiento hasta las 168 h, se eliminaba un 70% de la limonina para el inóculo microbiano de 0,6 DO y, prácticamente, toda la

limonina para inóculos de 0,9 y 1,2 DO. Con concentraciones de CMC del 5%, los inóculos de 0,9 y 1,2 DO alcanzaban valores de degradación de limonina del 49,3 y 59,4%, respectivamente, a las 24 h de tratamiento, mientras que los de 0,2 y 0,4 DO apenas alcanzaban el 20% después de 96 h. Era de destacar la capacidad biocatalítica de los inmovilizados con CMC al 5% y concentración de inóculo de 0,6 DO, ya que presentaban un 82% de degradación de limonina a las 96 h de tratamiento, en contraste con el 36% obtenido para inmovilizados con CMC al 4% y la misma concentración de inóculo (Fig. 4.10B).

Tabla 4.12. Efecto de la concentración de CMC en la degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas^a.

CMC (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^b (h)	Limonina (ppm)				
		Inóculo microbiano ^c				
		0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
4	0	56,7	58,2	60,4	58,6	62,2
	24	56,8	58,5	55,3	58,2	61,9
	48	56,8	58,7	54,1	42,7	45,3
	72	56,6	58,4	45,2	32,8	19,6
	96	58,1	58,2	38,7	23,1	15,5
	168	50,8	36,6	18,1	1,4	0,0
5	0	57,3	59,2	60,8	61,3	56,9
	24	58,6	55,4	53,0	31,1	23,1
	48	48,4	52,0	52,9	24,7	17,0
	72	52,2	51,4	36,3	21,5	11,9
	96	57,6	52,8	10,2	20,2	10,8
	168	35,5	34,9	10,9	6,5	4,6

^aCaCl₂ al 2%, alginato de sodio al 2%

^bMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm

^cDO a $\lambda=600$ nm

En la Tabla 7.26 se muestran los resultados del análisis estadístico de la varianza que indica que, para ambas concentraciones de CMC, hay diferencias significativas entre las concentraciones de inóculo microbiano ya que $p < 0,05$ para las variable de estudio.

Las soluciones de CMC al 5% eran especialmente viscosas, lo que generaba muchos problemas a la hora de la elaboración de los inmovilizados y de repetitividad de resultados. Por ello, y a pesar de los niveles de degradación de limonina sobre todo a tiempos cortos de tratamiento, se seleccionó la concentración de CMC al 4% para el resto de experiencias.

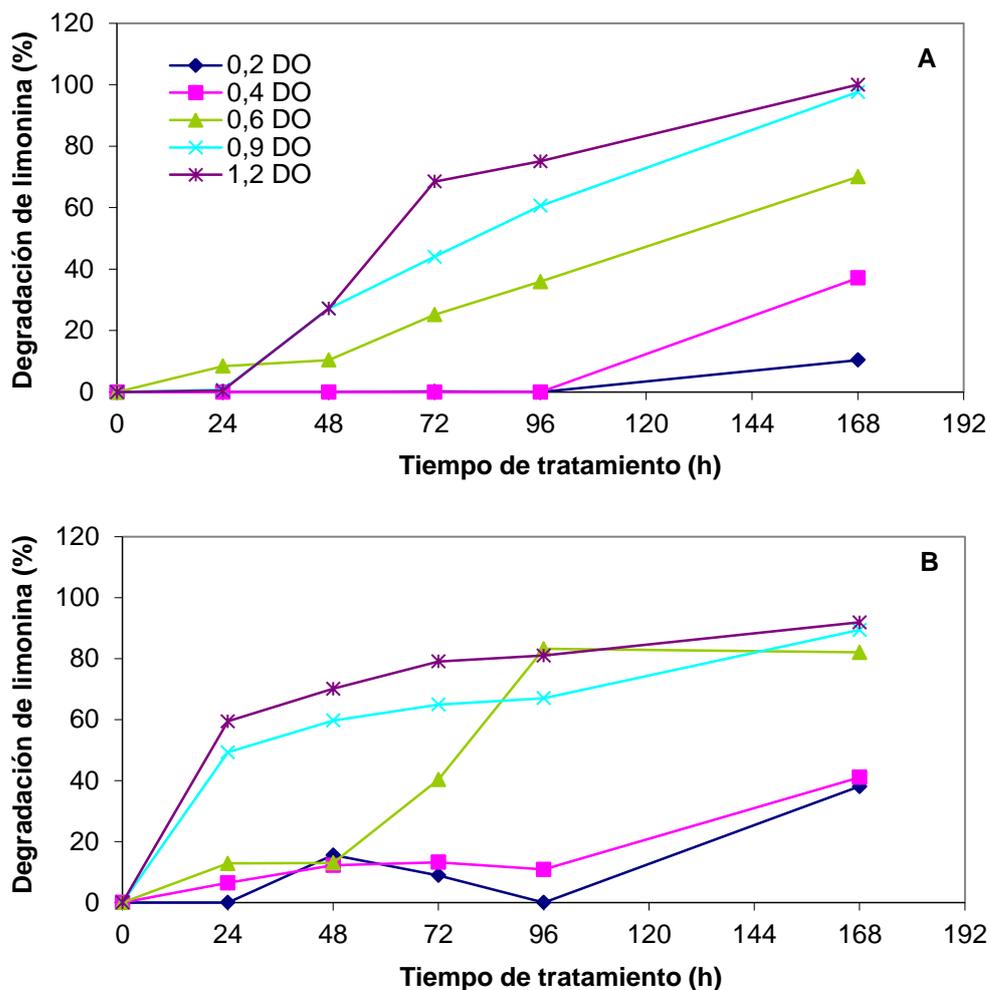


Fig. 4.10. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas a concentraciones de CMC del 4% (A) y del 5% (B). (CaCl_2 2% y alginato de sodio 2%).

A diferencia de los inmovilizados en PVA-PEG, todos los encapsulados de alginato de calcio mantenían la integridad física de las perlas para todas las concentraciones de inóculo microbiano ensayado y a lo largo de todo el tiempo de tratamiento. De hecho, se comprobó que las células viables de *R. fascians* inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio, degradaban la limonina presente sin que el microorganismo fuese liberado al medio de cultivo, ya que no se observaban aumentos significativos en los niveles de biomasa del medio durante todo el tiempo de tratamiento (Tabla 4.13).

Los valores de pH se mantenían también sin cambios aparentes en un rango ácido en contraste con la alcalinización que se observaba cuando se utilizaba PVA como soporte de inmovilización (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Evaluación de la biomasa y del pH del medio con *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^a a diferentes concentraciones de CMC.

CMC (%, p/v)		Tiempo de tratamiento ^b (h)	Inóculo microbiano ^c				
			0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
4	Biomasa ^d	0	0,058	0,056	0,056	0,055	0,056
		24	0,057	0,056	0,051	0,057	0,056
		48	0,055	0,055	0,056	0,054	0,056
		72	0,057	0,055	0,053	0,053	0,054
		96	0,057	0,059	0,053	0,055	0,056
		168	0,058	0,053	0,057	0,053	0,056
	pH	0	6,66	6,66	6,69	6,69	6,77
		24	6,46	6,40	6,45	6,40	6,50
		48	6,32	6,26	6,27	6,24	6,34
		72	6,26	6,22	6,24	6,28	6,38
		96	6,26	6,27	6,31	6,20	6,36
		168	6,30	6,35	6,51	6,36	6,57
5	Biomasa ^d	0	0,057	0,054	0,055	0,056	0,052
		24	0,055	0,054	0,058	0,056	0,058
		48	0,056	0,059	0,057	0,057	0,057
		72	0,055	0,052	0,059	0,057	0,056
		96	0,056	0,053	0,057	0,058	0,057
		168	0,056	0,054	0,055	0,059	0,058
	pH	0	6,53	6,58	6,65	6,65	6,62
		24	6,09	6,04	6,34	6,47	6,36
		48	6,04	5,99	6,30	6,31	6,22
		72	6,00	5,96	6,31	6,31	6,31
		96	5,99	5,95	6,32	6,27	6,34
		168	5,92	5,95	6,73	6,39	6,42

^aCaCl₂ al 2%, alginato de sodio al 2%^bMedio de cultivo MM, pH 7, 25°C y 100 rpm^cDO a $\lambda=600$ nm^dAbsorbancia a $\lambda=600$ nm

Fijada la concentración de CMC al 4% y manteniendo el alginato de sodio al 2%, se procedió a la modificación de la concentración de CaCl₂ (2, 3 y 4%) en la preparación de los inmovilizados. Se comprobó, en primer lugar, como esta variable afectaba a las características físicas de la perla hueca en relación al tamaño (diámetro) y espesor de la capa de gel. Como puede apreciarse en la imagen (Fig. 4.11), a medida que se incrementaba la concentración de

CaCl₂ se producía un incremento en el tamaño de la perla y en el espesor. Esto se puede atribuir al mecanismo de formación de la cápsula. Una vez que la solución de CaCl₂/CMC se gotea sobre la solución de alginato de sodio, la capa de gel se forma inmediatamente alrededor de la gota. Esta capa crece en la dirección axial de la cápsula hasta que el Ca²⁺ contenido en el interior de la gota se consume. La formación de la capa de gel está generalmente controlada por la difusión del alginato de sodio y Ca²⁺. Debido a la limitación de volumen es fundamentalmente el Ca²⁺ el que difunde entre las cadenas de alginato y promueve la gelificación. Así, cuando se incrementa la concentración de Ca²⁺ la cantidad del catión por unidad de volumen en el interior líquido de la perla hueca que se está formando es mayor y, por tanto, se pueden formar más enlaces con las cadenas de alginato, lo que redundaría en un mayor tamaño y espesor de la membrana (Chai y col., 2004).

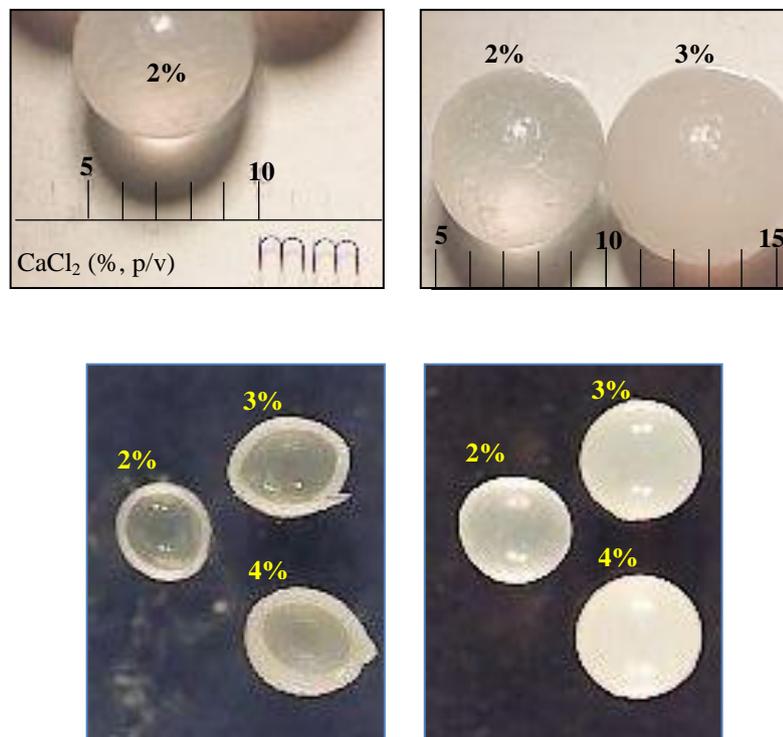


Fig. 4.11. Imágenes de perlas huecas de alginato de calcio (completas y seccionadas) obtenidas con diferentes concentraciones de CaCl₂ (alginato de sodio 2% y CMC 4%).

Los resultados sobre el efecto de la concentración de CaCl₂ en la degradación de limonina por las células encapsuladas se incluyen en la tabla 4.14. Se obtuvo que para concentraciones del 2% los inóculos de 0,9 y 1,2 DO eran los más efectivos, con niveles de degradación de limonina a las 48 h del 26,8%. Seguido de un 10,2% de degradación para el inóculo de 0,6 DO.

A las 168 h se alcanzó el 97,9 y 100% de degradación de limonina con inóculos de 0,9 y 1,2 DO, respectivamente, y un 67,7% para el de 0,6 DO (Fig. 4.12). Al aumentar la concentración de CaCl₂ al 3%, se mejoraron los porcentajes de degradación de limonina para tiempos cortos de procesado. A este respecto, con concentraciones de inóculo de 0,6; 0,9 y 1,2 DO se obtuvieron a las 24 h porcentajes del 29,7; 50,8 y 45,0%, respectivamente, frente al 7,8; 0,7 y 0,5% cuando se utilizó para la encapsulación CaCl₂ al 2%.

Tabla 4.14. Efecto de la concentración de CaCl₂ en la degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^a.

CaCl ₂ (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^b (h)	Limonina (ppm)				
		Inóculo microbiano ^c				
		0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
2	0	55,8	57,8	60,1	57,9	61,8
	24	60,2	60,2	55,4	57,5	61,6
	48	60,3	61,6	54,0	42,4	45,2
	72	62,4	60,1	45,6	31,9	20,8
	96	64,3	63,4	39,1	22,5	16,6
	168	50,4	37,1	19,4	1,2	0,0
3	0	60,4	59,4	55,3	65,0	60,4
	24	50,7	45,7	38,9	32,0	33,2
	48	48,0	47,4	38,0	36,0	30,0
	72	41,1	41,8	26,2	28,6	19,5
	96	37,1	35,5	16,5	17,1	14,2
	168	23,9	21,0	0,0	0,0	0,0
4	0	64,5	68,3	57,8	60,5	67,5
	24	55,6	54,1	45,1	46,3	48,1
	48	46,2	45,9	37,5	37,3	41,0
	72	43,1	39,1	30,8	33,8	29,0
	96	27,4	27,5	20,3	21,5	16,0
	168	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^aAlginato de sodio 2% y CMC 4%

^bMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm;

^cDO a $\lambda=600$ nm

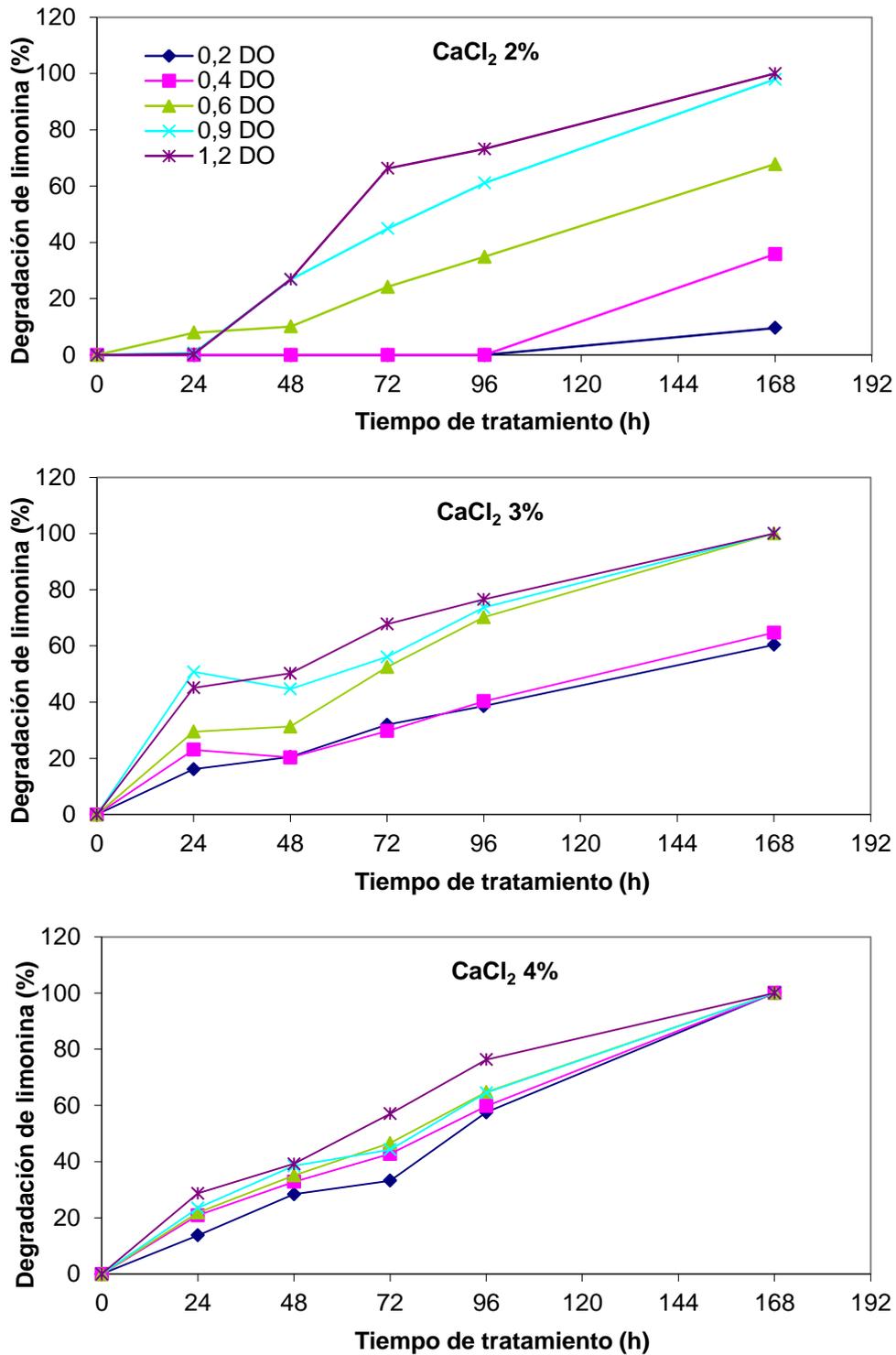


Fig. 4.12. Efecto de la concentración de CaCl_2 en la degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas a diferentes concentraciones de inóculo (alginato de sodio 2% y CMC 4%).

Era de destacar, como a medida que se incrementaba la concentración de CaCl_2 del 2 al 4%, se reducían progresivamente las diferencias en la degradación de limonina entre los diferentes inóculos microbianos, llegándose a alcanzar, para la concentración de CaCl_2 del 4%, a las 168 h para todos los inóculos el 100% de degradación de la limonina presente en el medio (Fig. 4.12).

En el análisis estadístico (Tabla 7.29 del anexo) el Test de Tukey muestra que no hay diferencias significativas entre las 24 y 48 h de tratamiento, ni entre las 72 y 96 h de tratamiento para las concentraciones de CaCl_2 del 3 y 4%. Del ANOVA (Tabla 7.30, 7.31 y 7.32 del anexo) se comprueba que para la concentración de CaCl_2 del 4% no existen diferencias significativas entre los inóculos de 0,4; 0,6 y 0,9 DO, mientras que para CaCl_2 del 2 y 3% sí se observaban diferencias significativas. Por otro lado, el valor estadístico de F de Snedecor para el factor inóculo microbiano, disminuye a medida que aumenta la concentración de CaCl_2 , lo que indica que a medida que se aumenta la concentración de CaCl_2 la importancia del efecto de la concentración de inóculo microbiano disminuye. Estos resultados pueden ser atribuibles al mayor o menor tamaño (diámetro) de las perlas huecas y del grosor y consistencia de la membrana de gel en función de la concentración del CaCl_2 utilizada.

Junto con el contenido en limonina se evaluó la biomasa y el pH del medio en las muestras ensayadas (Tabla 4.15). No se observaban incrementos de biomasa ni cambios significativos del pH (Tabla 7.33, 7.34 y 7.35 del anexo).

A pesar de los resultados obtenidos, se pudo constatar, al igual que en el caso de los inmovilizados en PVA-PEG, que la inmovilización aplicando inóculos microbianos con densidades ópticas superiores a 0,6, es decir, 0,9 y 1,2 DO, generaba numerosos problemas de tipo operativo para conseguir encapsulados íntegros. La concentración de células es uno de los factores que afectan en mayor grado a la hora de mejorar o reducir la estabilidad operativa del inmovilizado y, en consecuencia, pueden aumentar o disminuir sus niveles de efectividad (Trevan, 1990). Por esta razón, se decidió operar para las siguientes pruebas de estabilidad operacional con inóculos de 0,6 DO, para asegurar la integridad de las perlas, y concentraciones de CaCl_2 del 3 y 4%, ya que la degradación de limonina en estos inmovilizados era mayor a tiempos cortos de tratamiento que para la concentración de CaCl_2 del 2%.

Tabla 4.15. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas alginato de calcio^a.

CaCl ₂ (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^b (h)	Inóculo microbiano ^c					
		0,2	0,4	0,6	0,9	1,2	
2	Biomasa ^d	0	0,055	0,056	0,053	0,053	0,056
		24	0,058	0,057	0,055	0,054	0,057
		48	0,056	0,056	0,055	0,053	0,053
		72	0,056	0,056	0,052	0,053	0,054
		96	0,055	0,055	0,056	0,055	0,054
		168	0,056	0,055	0,055	0,055	0,055
	pH	0	6,75	6,65	6,67	6,69	6,70
		24	6,63	6,64	6,68	6,62	6,68
		48	6,69	6,60	6,68	6,64	6,62
		72	6,60	6,62	6,62	6,65	6,60
		96	6,63	6,59	6,62	6,65	6,60
		168	6,62	6,59	6,60	6,61	6,61
3	Biomasa ^d	0	0,055	0,056	0,053	0,053	0,056
		24	0,058	0,057	0,055	0,054	0,057
		48	0,056	0,056	0,055	0,053	0,053
		72	0,056	0,056	0,052	0,053	0,054
		96	0,055	0,055	0,056	0,055	0,054
		168	0,056	0,055	0,055	0,055	0,055
	pH	0	6,65	6,67	6,73	6,61	6,73
		24	6,60	6,62	6,68	6,65	6,72
		48	6,59	6,65	6,69	6,63	6,70
		72	6,62	6,61	6,60	6,63	6,68
		96	6,61	6,57	6,64	6,62	6,70
		168	6,60	6,62	6,58	6,60	6,68
4	Biomasa ^d	0	0,055	0,056	0,053	0,053	0,056
		24	0,058	0,057	0,055	0,054	0,057
		48	0,056	0,056	0,055	0,053	0,053
		72	0,056	0,056	0,052	0,053	0,054
		96	0,055	0,055	0,056	0,055	0,054
		168	0,056	0,055	0,055	0,055	0,055
	pH	0	6,62	6,72	6,69	6,72	6,70
		24	6,60	6,69	6,69	6,68	6,72
		48	6,69	6,68	6,65	6,68	6,72
		72	6,63	6,70	6,62	6,67	6,69
		96	6,65	6,65	6,61	6,68	6,65
		168	6,65	6,65	6,65	6,67	6,66

^aAlginato de sodio 2% y CMC 4%; ^bMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm; ^cDO a $\lambda=600$ nm; ^dAbsorbancia a $\lambda=600$ nm

4.2.2.2. Estabilidad operacional en sistemas modelo

El estudio de la capacidad de reutilización de los inmovilizados en perlas huecas con las condiciones obtenidas en el apartado anterior, se realizó a escala de laboratorio operando en discontinuo, a 25 °C bajo agitación orbital de 100 rpm en ciclos de 24 h, transcurrido el tiempo de operación, las muestras se filtraban para separar el inmovilizado y poder reutilizarlo en un nuevo ciclo de degradación del compuesto amargo (apdo 3.2.4).

Se obtuvieron sólo dos ciclos de reutilización para los inmovilizados en los que se había aplicado la concentración de CaCl₂ del 3%, mientras que se podían realizar hasta tres usos consecutivos con los inmovilizados de la concentración más alta del 4% (Tabla 4.16). A este respecto, el incremento del grosor de la capa del encapsulado debido al aumento de la concentración de Ca²⁺, confería una estabilidad adicional a las perlas huecas frente a la manipulación durante los procesos sucesivos de recuperación, lavado y reincorporación en un nuevo “batch”.

La eficacia de degradación de limonina para los encapsulados con CaCl₂ del 3% se reducía a la mitad en el segundo ciclo, pasando de un 32,56% de degradación, en la primera aplicación, a un 16,14% (Fig. 4.13). No obstante, los inmovilizados con la concentración de CaCl₂ del 4% mantenían una mayor efectividad catalítica a lo largo de los tres ciclos sucesivos, con niveles de degradación de limonina del 32,27; 29,33 y 24,50%, respectivamente, en orden de aplicación. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 7.36 del anexo

Tabla 4.16. Degradación de limonina y estabilidad operacional^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio^c.

CaCl ₂ (% p/v)	Limonina (ppm)		
	Ciclos de 24 h		
	1	2	3
3	40,41	50,32	n.e
4	40,64	42,40	45,30

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm, limonina 60 ppm t=0

^bInóculo microbiano de 0,6 DO a λ=600 nm

^cAlginato de sodio 2% y CMC 4%

Se realizó una prueba adicional, con los inmovilizados de mayor concentración de CaCl₂ del 4%, incrementando la duración de cada ciclo de utilización a 48 h. En esta experiencia aunque, se incrementaban los porcentajes de degradación de limonina al 45,9% para el primer ciclo y del 41,4% en el segundo, el mayor tiempo de operación en el segundo ciclo imposibilitaba una tercera reutilización.

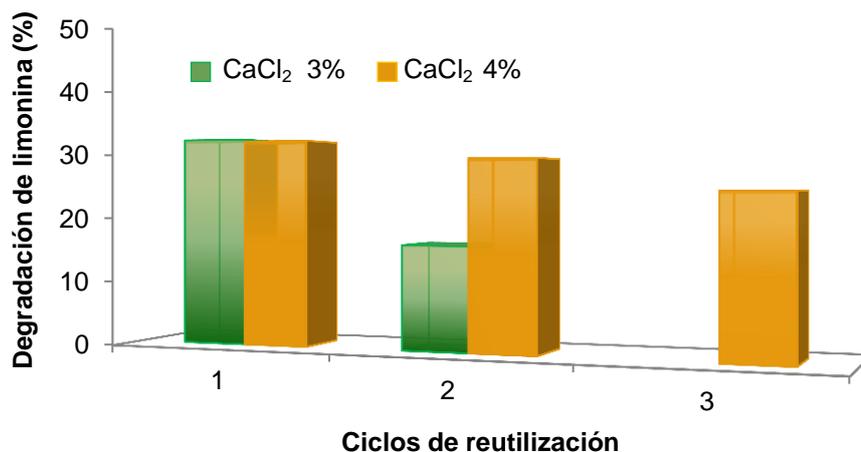


Fig. 4.13. Estabilidad operacional de células de *R. fascians* inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2% y CMC 4%). Ciclos de reutilización de 24 h. Medio MM a pH 7, 25 °C y 100 rpm

Los resultados del análisis de pH y biomasa se muestran en la Tabla 4.17 y el análisis estadístico en la Tabla 7.37 del anexo. Se constata con estos datos que no hay diferencias significativas entre los valores de biomasa y pH evaluados entre las distintas muestras.

Tabla 4.17. Evaluación de la biomasa y del pH del medio^a de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^b.

CaCl ₂ (%, p/v)		Ciclos de reutilización ^c					
		t=0 h			t=24 h		
		1	2	3	1	2	3
3	Biomasa	0,053	0,053	0,054	0,055	0,054	ne
	pH	6,81	6,83	6,83	6,85	6,84	ne
4	Biomasa	0,055	0,056	0,055	0,056	0,058	0,058
	pH	6,81	6,81	6,80	6,82	6,81	6,83

^aMedio de cultivo MM, pH 7, 25 °C y 100 rpm

^bAlginato de sodio 2% y CMC 4%

^cCiclos de 24 h

La técnica de encapsulación con alginato de calcio se ha aplicado a sistemas diversos como células y tejidos vegetales (Patel y col., 2000), para inmovilizar enzimas como invertasa (Tanriseven y Doan, 2001), células microbianas como *Lactobacillus rhamnosus* (Dembczynski y Jankowski, 2002), células y tejidos vegetales (Patel y col., 2000) y células animales como esperma de la especie porcina (Morre y col., 2000), con resultados muy dispares en cuanto a capacidad operativa y estabilidad.

En lo que se refiere al microorganismo objeto de estudio, *R. fascians*, no existen referencias previas sobre su encapsulación con este procedimiento de inmovilización. A este respecto, se ha comprobado, con las experiencias realizadas en este bloque, la elevada capacidad del microorganismo encapsulado para degradar limonina, y con cierta posibilidad de reutilización.

Las pruebas posteriores, tratan de determinar si estos resultados son extrapolables cuando se apliquen los inmovilizados para la degradación de limonina en zumos sintéticos y zumos naturales.

**4.3. DESAMARGADO DE ZUMOS POR R.
fascians INMOVILIZADO POR
ATRAPAMIENTO.**

La capacidad catalítica y estabilidad de los biocatalizadores, que determinan el éxito de cualquier aplicación tecnológica, dependen de su propia naturaleza intrínseca del soporte y método de inmovilización empleado (Bullock y Kristiansen, 1991) y, en último término, de su eficacia y estabilidad en las condiciones de procesado.

En este último bloque, se llevó a cabo el estudio de la aplicación de las células acondicionadas de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG y en perlas huecas de alginato de calcio, en zumos sintéticos, que reproducen las condiciones severas de pH y, parcialmente, de los componentes de los zumos, y en zumos naturales de naranja.

4.3.1. DEGRADACIÓN DE LIMONINA EN ZUMO SINTÉTICO POR *R. fascians* INMOVILIZADO EN CRIOGELES DE PVA-PEG

En este bloque de experiencias se procedió al estudio de la efectividad de las células inmovilizadas en geles de PVA-PEG en la degradación de limonina en condiciones que simulaban las del zumo natural. De esta manera, se podría, en su caso, diferenciar la influencia que otros componentes del zumo pueden ejercer sobre la acción catalítica de los inmovilizados. Para ello, se prepararon zumos sintéticos en un rango de pH ácido, 3, 4 y 5, siguiendo el procedimiento ya descrito en el apdo 3.3.1. En base a los resultados obtenidos en las pruebas precedentes (apdo 4.2.1) se seleccionaron los inóculos microbianos de 0,6; 0,9 y 1,2 DO, para la preparación de los inmovilizados, y un tiempo máximo de aplicación en la degradación de limonina de 96 h. En esta prueba también se evaluó el efecto de la concentración de PVA (6, 7 y 8%) y de PEG (8 y 10%). Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 4.18 y 4.19.

Al igual que en los sistemas modelo (medio MM a pH 7, apdo 4.2.1) el incremento de la concentración de PEG del 8 al 10% incrementaba la consistencia e integridad de las perlas en los zumos sintéticos. En concreto, a las 72 h de aplicación se producía la degradación de los inmovilizados con PVA(8%)-PEG(8%) (Fig. 4.14, 4.15 y 4.16), mientras que los obtenidos con la concentración más alta de PEG permanecían íntegros durante todo el periodo de estudio (Fig. 4.17, 4.18 y 4.19). En este caso, a diferencia de los sistemas modelo, para concentraciones de PEG del 8% el incremento en la concentración de PVA no mejoraba la consistencia provocando una reducción en los tiempos de aplicación. A este respecto, los componentes que participan en la gelificación, PVA y PEG, no contienen grupos ionizables y la gelificación se produce fundamentalmente por interacción por enlaces de hidrógeno por lo que la glucosa, presente en el zumo sintético, podría competir e intervenir en la formación de este tipo de interacciones. De esta manera, al incrementar la concentración de PEG al 10% se minimizaban estos efectos desestabilizantes de la estructura del gel.

Al igual que se observaba en las experiencias previas realizadas (apdo 4.2.1) al incrementar la concentración de PVA, con PEG al 10%, se incrementaba la consistencia de las perlas pero se reducía la eficacia en la degradación de limonina (Tabla 4.19 y Fig. 4.17-4.19). En términos generales, también se observaron menos diferencias en la degradación de limonina entre los distintos inóculos cuando se aplicaba la concentración de PEG al 10%.

Los resultados del ANOVA se muestran en las Tabla 7.38 y 7.39 del anexo, nos muestran que no existen diferencias significativas en la degradación de limonina para los factores concentración de inóculo microbiano, y para la concentración de PVA no existen diferencias

significativas para PEG(8%) pero sí entre PVA(6%) y PVA(7 y 8%) para PEG(10%).

Con respecto al efecto del pH del medio en la degradación de limonina, no se produjeron diferencias destacadas entre los pH de 3, 4 y 5, y las variaciones observadas parecen ser más consecuencia de las características del soporte de inmovilización debido a las concentraciones de sus componentes (PVA y PEG). A este respecto, el análisis estadístico (Tabla 7.38 y 7.39) muestra que para ambas concentraciones de PEG (8 y 10%) no existen diferencias significativas en la degradación de limonina para pH 3, 4 y 5.

En comparación con los resultados obtenidos en las pruebas de optimización, en los zumos sintéticos eran necesarios, en la mayoría de las experiencias, especialmente con PEG al 8%, tiempos mayores de aplicación para alcanzar porcentajes similares de degradación de limonina. Así, por ejemplo, para un inóculo de 0,6 DO se necesitaban tratamientos de más de 72 h para superar el 30% de degradación. Por otro lado, los máximos obtenidos en zumo sintéticos no superaban el 45-46% de degradación de limonina después de 96 h de tratamiento. No obstante, a tiempos cortos de 24 h la eficacia de la mayoría de los inmovilizados con inóculos de 0,6 DO en zumos sintéticos no presentaban diferencias significativas con la obtenida en el medio MM a pH 7 (Tabla 7.40 y 7.41 del anexo).

Se ha constatado también a lo largo de todas las experiencias que la degradación de limonina en las muestras evaluadas no se debía a la liberación del microorganismo procedente de los inmovilizados ya que no se producían modificaciones en la biomasa (Tabla 4.20). Tampoco se observaron modificaciones del pH del medio durante el tiempo de aplicación (Tablas 4.21).

No existen referencias previas sobre la aplicación en zumos sintéticos de geles de PVA-PEG como soportes de inmovilización con o sin el microorganismo de referencia (*R. fascians*). También son escasas las referencias sobre *R. fascians* inmovilizado y aplicado en zumos sintéticos para la degradación de limonina. A este respecto, Cánovas y col. (1998) describieron la capacidad de las células de *R. fascians* (NRRL-B-15096), en un sistema en discontinuo y sin aireación, de consumir un 70% de limonina en zumo sintético después de 150 h, mientras que a pH 7.0 después de 160 h sólo se reducía el 40%. La inmovilización del microorganismo en espumas de poliuretano y aplicación en un reactor en continuo conducía a una conversión del 85% de limonina en zumo sintético después de 200 h. Previamente a estas experiencias, Manjón y col (1991) utilizaron también un reactor en continuo, en condiciones de aireación, con la misma cepa de *R. fascians* inmovilizada en geles de k-carragenato y observaron una liberación del microorganismo del soporte de inmovilización a lo largo del proceso. Estos

mismos autores estudiaron el efecto del pH del medio, comprobando un incremento de la degradación de limonina cuando se modificaba el pH de 4,5 a 5,0. No obstante, también comprobaron una recuperación operativa del biocatalizador cuando se restauraba el pH de 7 después de haber mantenido a las células durante un largo periodo a pH 4.

Destacar que en las experiencias descritas anteriormente se aplicaban concentraciones de limonina un 50% inferiores a las utilizadas en esta Tesis.

Tabla 4.18. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(8%) en zumo sintético a diferente pH.

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm) ^a								
		pH 3			pH 4			pH 5		
		Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b		
		0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2
6	0	51,37	56,30	53,77	55,65	58,77	60,78	52,89	51,06	49,40
	24	41,44	49,10	42,47	45,41	48,53	44,09	42,22	42,35	33,63
	48	40,75	49,32	41,10	46,75	48,09	43,24	41,06	41,51	30,30
	72	38,01	46,03	38,01	45,85	44,07	41,44	37,58	35,28	26,15
	96	38,01	46,03	37,33	46,79	44,07	41,10	37,58	34,88	26,57
7	0	63,95	64,98	55,48	67,81	68,15	70,21	52,86	62,54	55,35
	24	56,76	56,51	49,58	60,62	60,27	66,44	51,75	58,39	50,37
	48	57,28	56,25	51,63	61,30	59,25	63,36	55,90	62,27	53,96
	72	46,75	51,63	49,44	54,11	58,90	61,30	55,35	55,07	50,37
	96	47,52	51,34	37,94	44,18	40,75	37,67	37,08	44,69	46,22
8	0	55,70	59,17	58,43	63,87	68,00	65,03	63,05	60,41	65,03
	24	46,55	51,00	49,02	53,80	59,75	54,79	58,43	62,39	63,38
	48	45,80	23,27	43,82	53,80	36,97	55,45	59,69	39,94	62,39
	72	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	96	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

^aZumo sintético, 25 °C y 100 rpm^bDO a $\lambda=600$ nm

ne- no evaluado por rotura de las perlas

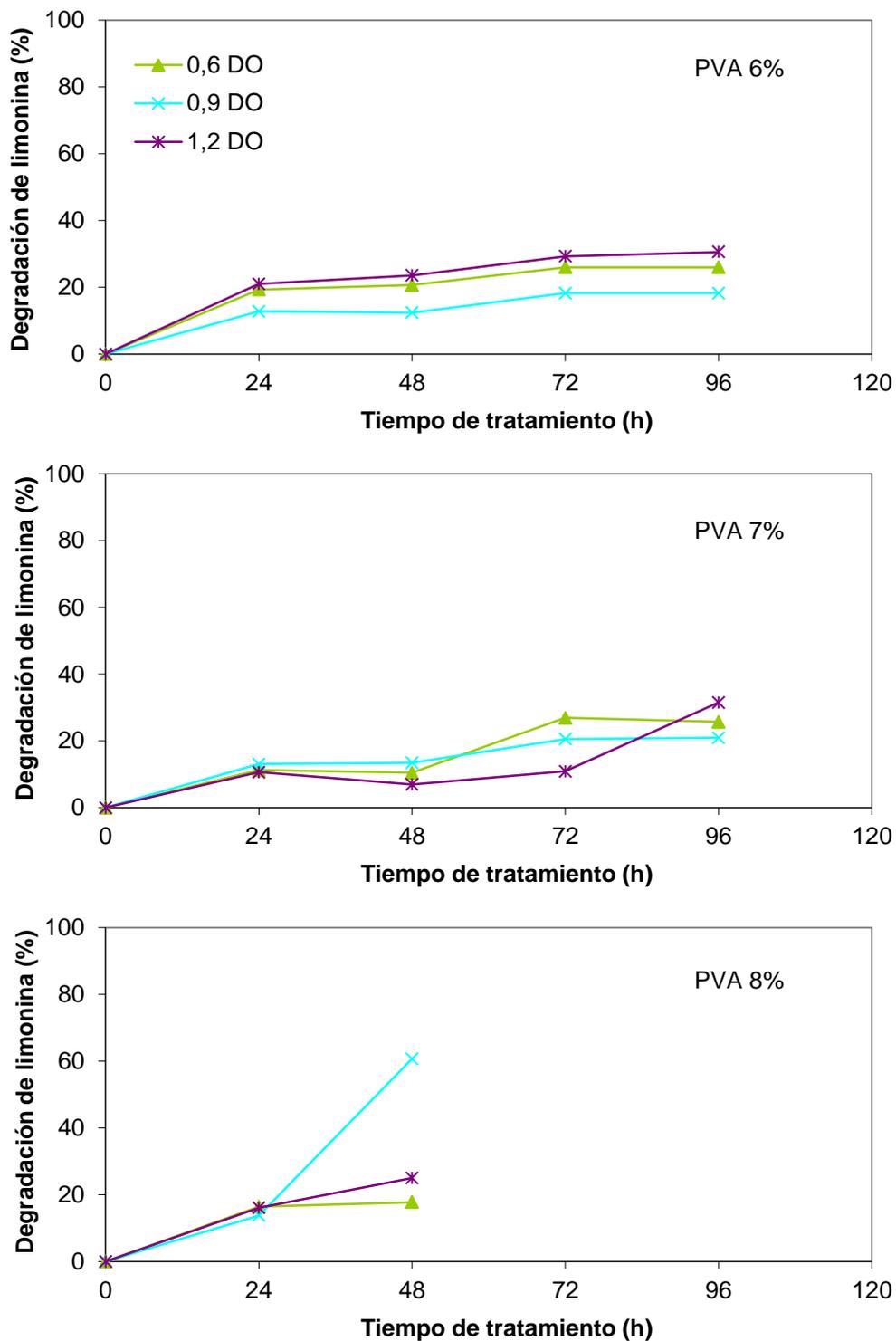


Fig. 4.14. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(8%) en zumo sintético a pH 3.

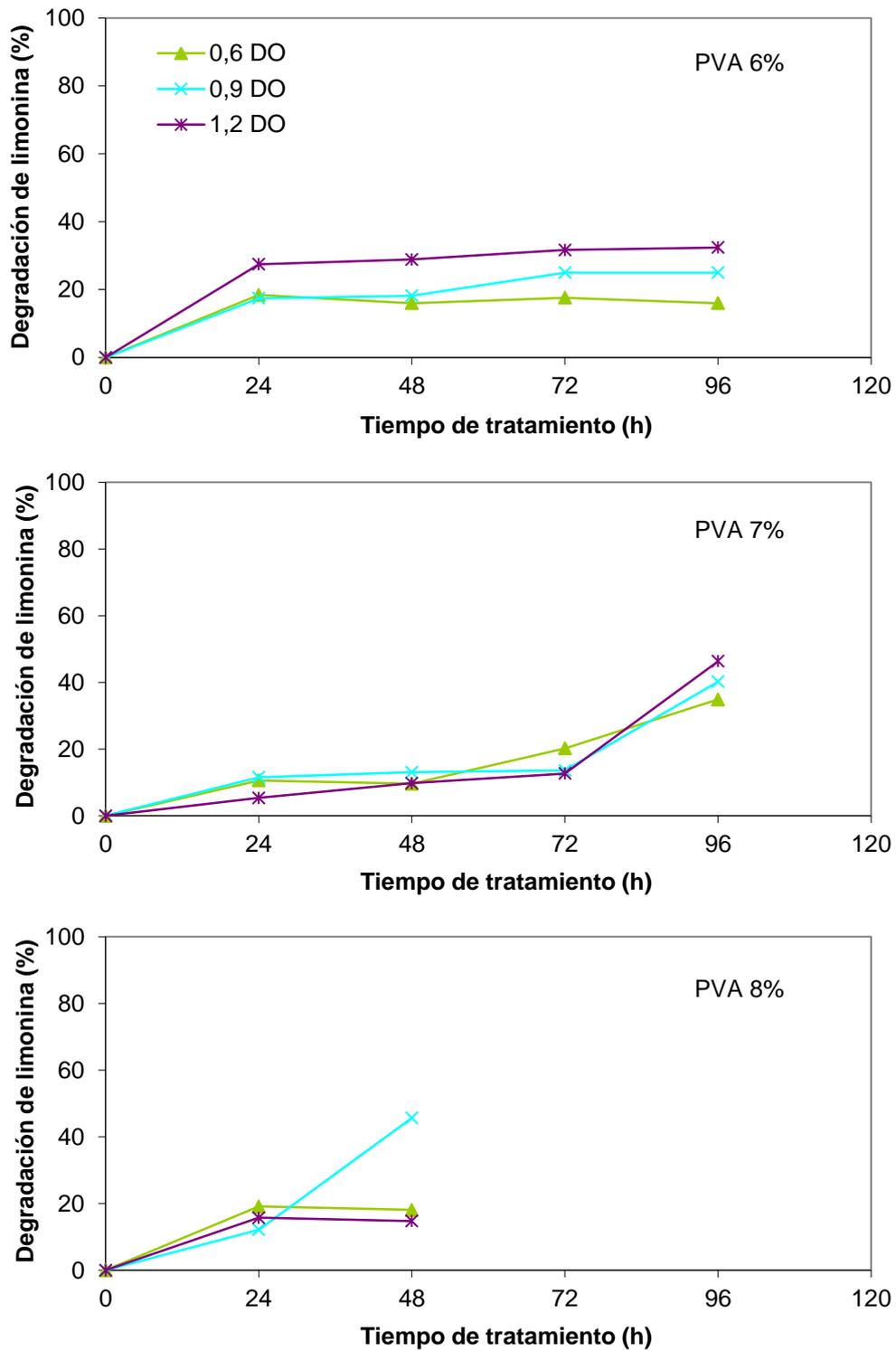


Fig. 4.15. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(8%) en zumo sintético a pH 4.

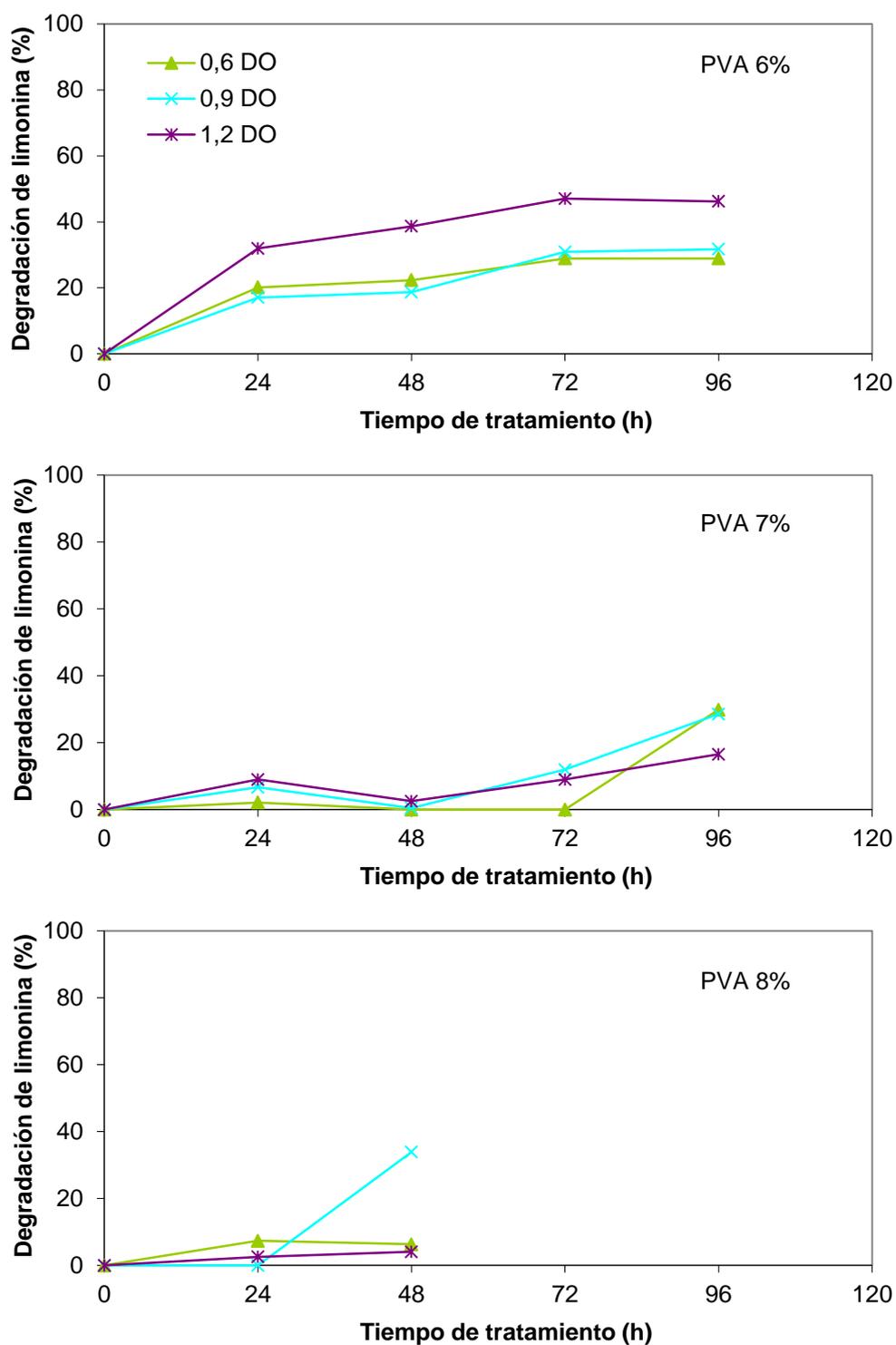


Fig. 4.16. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(8%) en zumo sintético a pH 5.

Tabla 4.19. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(10%) en zumo sintético^a a diferente pH.

PVA (%, p/v)	Tiempo de tratamiento ^a (h)	Limonina (ppm)								
		pH 3			pH 4			pH 5		
		Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b		
		0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2
6	0	53,42	59,59	51,78	50,34	46,23	50,34	44,83	44,28	45,39
	24	47,26	53,42	41,10	41,27	40,75	39,73	39,02	39,02	36,25
	48	39,73	41,10	36,99	33,90	32,53	38,36	34,04	30,72	29,89
	72	38,70	38,01	38,22	31,85	32,53	38,36	31,41	30,16	29,75
	96	34,93	32,88	31,33	28,25	27,74	30,82	27,40	26,29	24,91
7	0	72,26	72,60	72,60	67,12	71,92	73,29	55,35	61,16	55,90
	24	61,64	61,64	62,33	56,85	60,27	61,30	45,94	50,64	46,22
	48	61,30	59,59	58,90	56,51	59,25	60,27	46,22	49,81	45,94
	72	57,88	57,88	57,33	52,40	55,48	56,51	43,45	47,32	42,62
	96	57,53	55,48	53,77	50,68	51,03	55,82	42,89	44,00	40,68
8	0	54,25	55,48	63,70	56,72	58,62	61,03	55,34	45,94	48,05
	24	51,79	52,74	56,84	52,61	47,95	50,96	50,36	36,26	38,74
	48	52,70	49,66	57,20	51,78	45,20	46,24	46,50	37,08	38,74
	72	48,69	46,58	50,34	47,12	43,28	46,85	41,78	34,04	35,45
	96	50,54	51,36	55,48	49,30	44,93	48,08	38,20	31,54	32,55

^a25 °C y 100 rpm^bDO a $\lambda=600$ nm

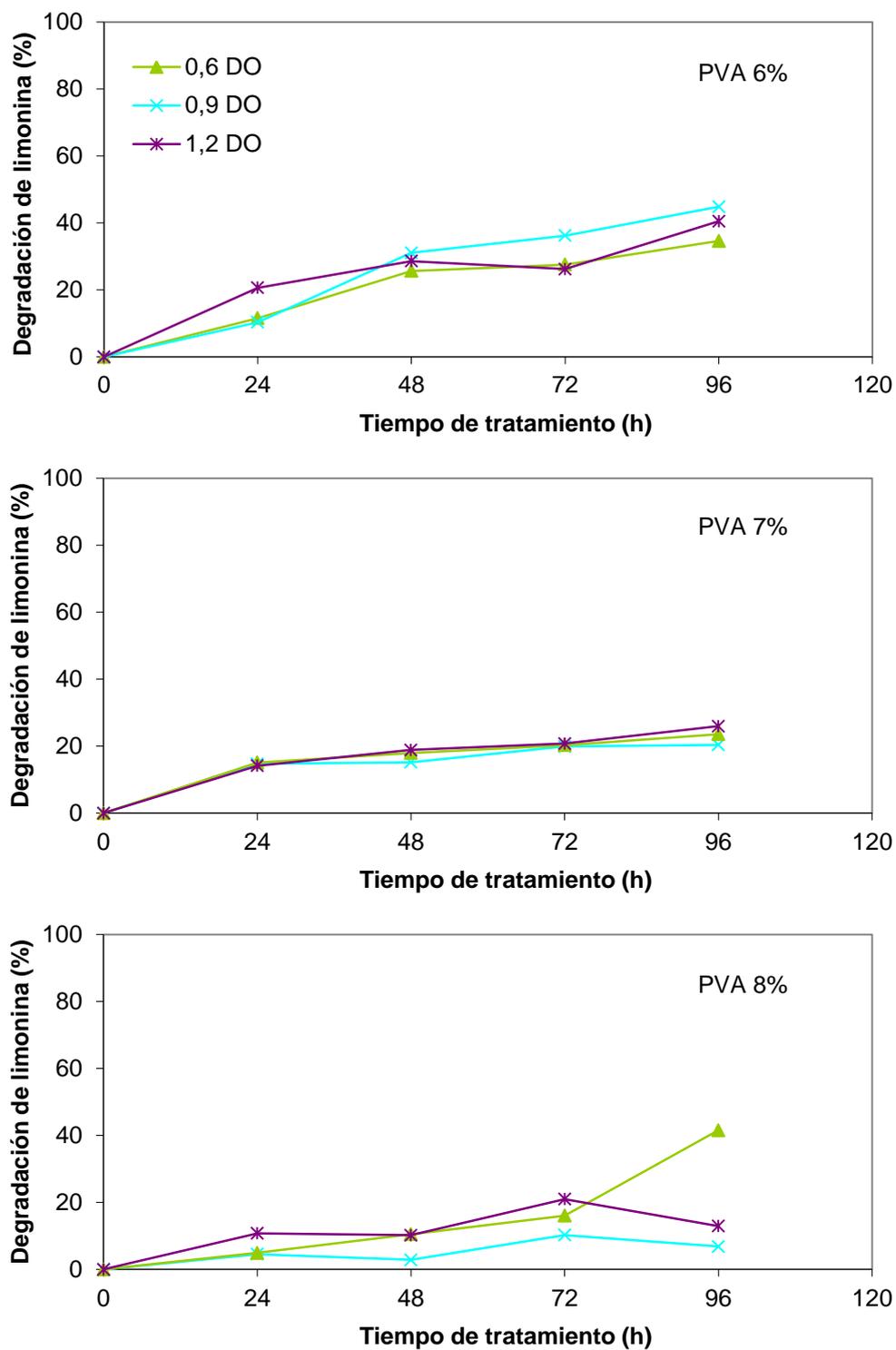


Fig. 4.17. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(10%) en zumo sintético a pH 3.

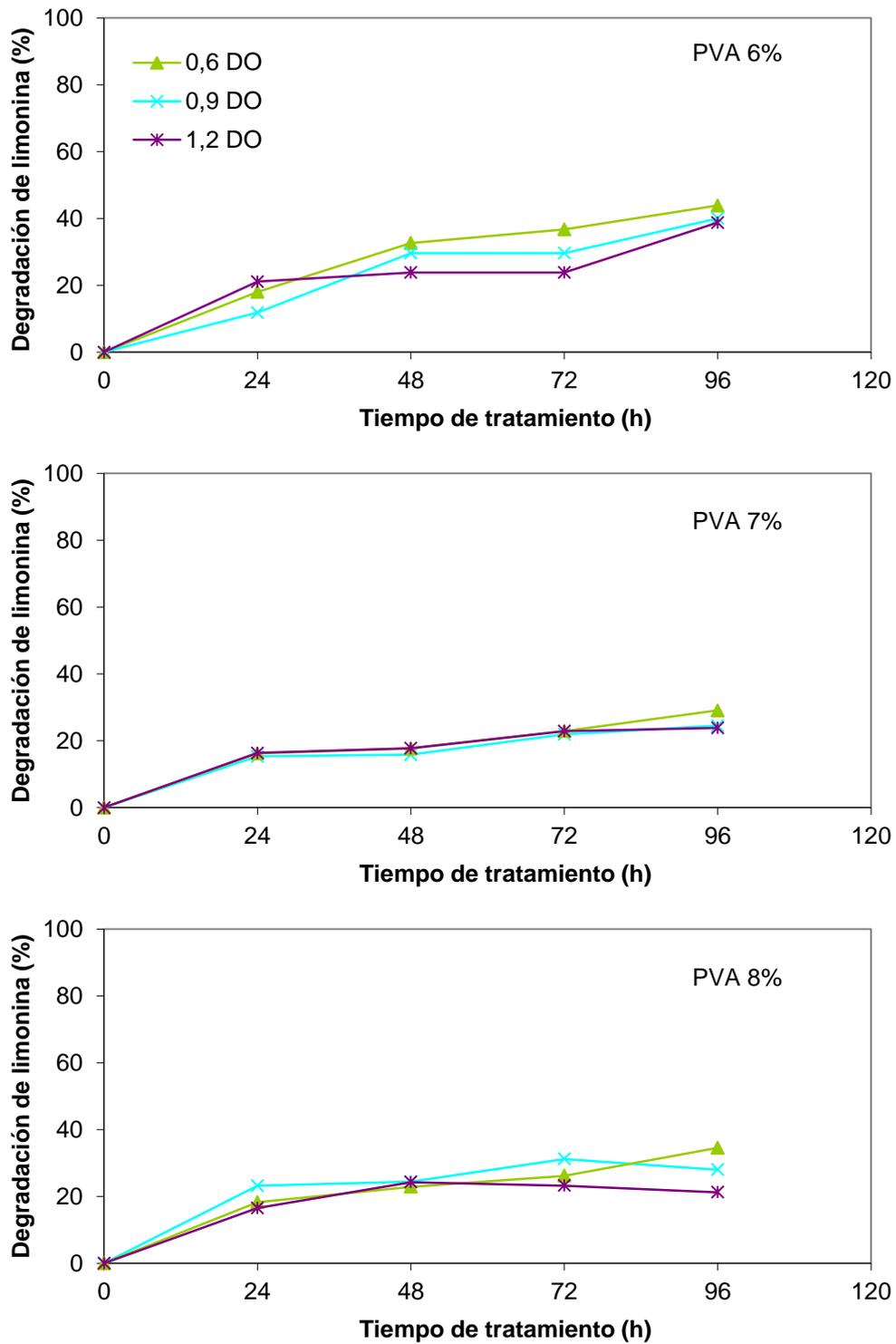


Fig. 4.18. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(10%) en zumo sintético a pH 4.

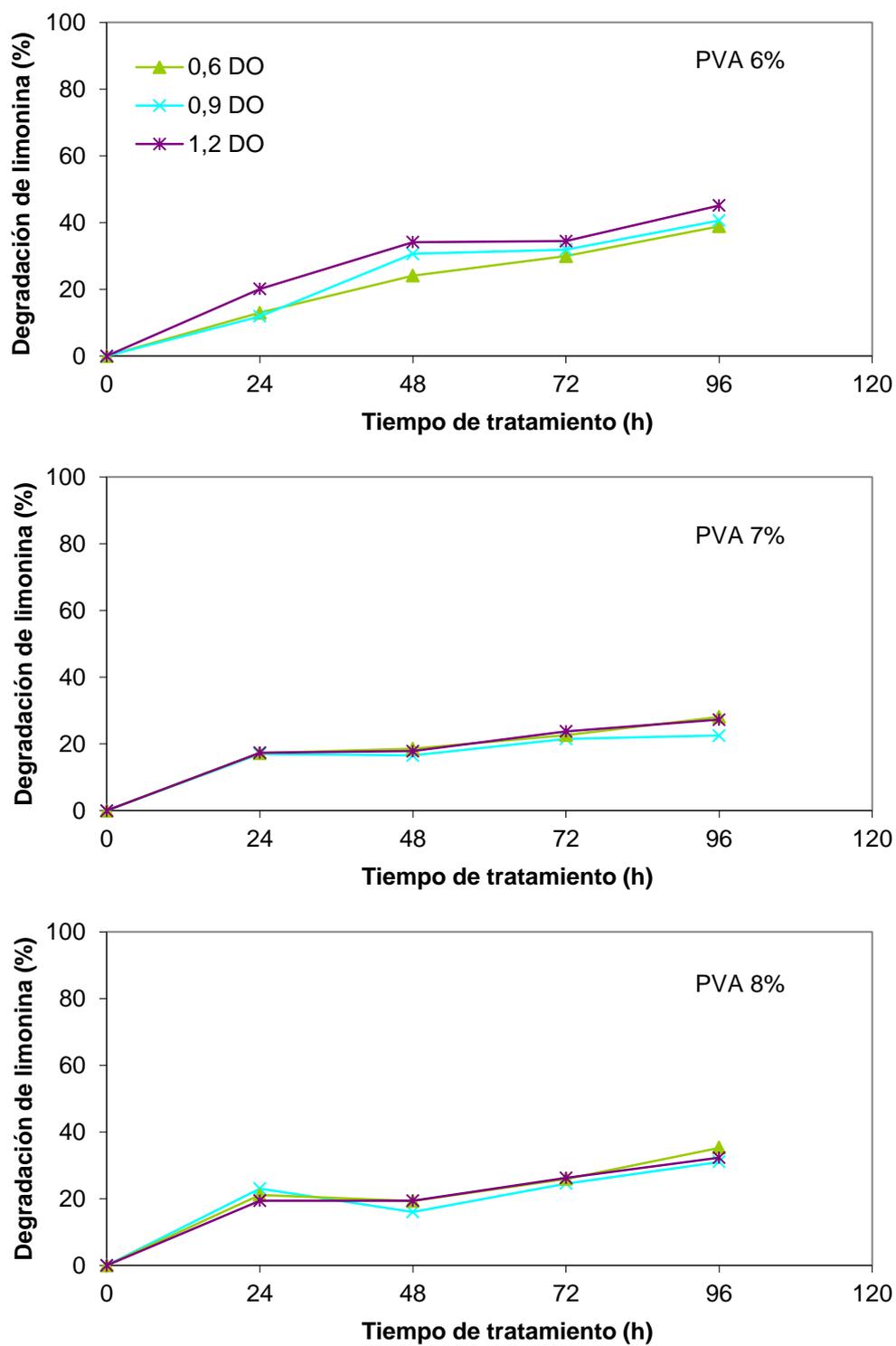


Fig. 4.19. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en geles PVA-PEG(10%) en zumo sintético a pH 5.

Tabla 4.20. Evaluación de la biomasa y del pH del zumo sintético^a aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG al 8%.

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	pH 3			pH 4			pH 5			
		Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			
		0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	
6	Biomasa ^c	0	0,052	0,056	0,051	0,053	0,054	0,053	0,053	0,051	0,049
		24	0,050	0,052	0,051	0,050	0,052	0,051	0,052	0,053	0,051
		48	0,051	0,052	0,048	0,055	0,050	0,053	0,051	0,055	0,051
		72	0,048	0,050	0,050	0,050	0,052	0,050	0,052	0,049	0,048
		96	0,043	0,045	0,049	0,053	0,049	0,052	0,049	0,050	0,050
	pH	0	3,10	3,08	3,08	4,08	4,08	4,07	5,06	5,03	5,02
		24	3,15	3,14	3,11	4,15	4,13	4,10	5,14	5,15	5,15
		48	3,06	3,09	3,10	4,10	4,09	4,09	5,07	5,07	5,08
		72	3,10	3,05	3,10	4,07	4,07	4,09	5,04	5,06	5,06
		96	3,09	3,06	3,09	4,12	4,10	4,08	5,06	5,06	5,05
7	Biomasa ^c	0	0,050	0,053	0,051	0,054	0,055	0,050	0,049	0,050	0,051
		24	0,048	0,050	0,050	0,051	0,052	0,051	0,051	0,051	0,049
		48	0,046	0,049	0,052	0,053	0,051	0,051	0,048	0,049	0,050
		72	0,048	0,048	0,048	0,050	0,052	0,049	0,050	0,052	0,049
		96	0,050	0,049	0,050	0,047	0,049	0,050	0,047	0,051	0,051
	pH	0	3,11	3,08	3,09	4,03	4,05	4,02	5,10	5,08	5,09
		24	3,12	3,09	3,10	4,08	4,08	4,08	5,11	5,10	5,08
		48	3,08	3,07	3,09	4,06	4,04	4,05	5,06	5,05	5,10
		72	3,09	3,08	3,06	4,08	4,06	4,05	5,05	5,02	5,08
		96	3,05	3,06	3,08	4,04	4,07	4,04	5,05	5,04	5,08
8	Biomasa ^c	0	0,052	0,051	0,050	0,051	0,051	0,050	0,052	0,052	0,050
		24	0,055	0,053	0,050	0,052	0,050	0,050	0,051	0,052	0,051
		48	0,053	0,050	0,049	0,050	0,047	0,051	0,049	0,051	0,049
		72	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
		96	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	pH	0	3,06	3,09	3,07	4,03	4,05	4,05	5,06	5,09	5,08
		24	3,10	3,09	3,09	4,05	4,05	4,02	5,09	5,06	5,08
		48	3,08	3,06	3,08	4,10	4,09	4,04	5,03	5,08	5,07
		72	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
		96	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

^a25 °C y 100 rpm; ^bDO a $\lambda=600$ nm; ^cAbsorbancia a $\lambda=600$ nm; ne- no evaluado por rotura de las perlas

Tabla 4.21. Evaluación de la biomasa y del pH del zumo sintético^a aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG al 10%.

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	pH 3			pH 4			pH 5			
		Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			Inóculo microbiano ^b			
		0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	0,6	0,9	1,2	
6	Biomasa ^c	0	0,055	0,050	0,050	0,054	0,050	0,052	0,055	0,050	0,051
		24	0,051	0,049	0,051	0,050	0,048	0,054	0,056	0,051	0,052
		48	0,050	0,048	0,049	0,050	0,047	0,051	0,053	0,052	0,050
		72	0,049	0,048	0,051	0,048	0,051	0,050	0,050	0,050	0,051
		96	0,050	0,046	0,049	0,050	0,048	0,051	0,051	0,049	0,050
	pH	0	3,08	3,10	3,09	4,10	4,06	4,08	5,09	5,07	5,05
		24	3,10	3,12	3,11	4,12	4,07	4,11	5,10	5,12	5,11
		48	3,06	3,08	3,08	4,15	4,09	4,10	5,07	5,08	5,06
		72	3,11	3,10	3,09	4,08	4,09	4,09	5,09	5,06	5,06
		96	3,08	3,09	3,09	4,10	4,11	4,09	5,10	5,09	5,08
7	Biomasa ^c	0	0,052	0,050	0,051	0,051	0,052	0,052	0,054	0,055	0,053
		24	0,046	0,050	0,051	0,050	0,051	0,050	0,052	0,052	0,050
		48	0,050	0,047	0,054	0,050	0,052	0,051	0,048	0,055	0,051
		72	0,048	0,048	0,050	0,048	0,050	0,050	0,051	0,054	0,051
		96	0,049	0,049	0,051	0,049	0,052	0,051	0,052	0,051	0,052
	pH	0	3,09	3,10	3,07	4,06	4,02	4,06	5,05	5,06	5,07
		24	3,08	3,15	3,11	4,12	4,09	4,09	5,11	5,09	5,07
		48	3,12	3,09	3,09	4,08	4,07	4,06	5,08	5,08	5,11
		72	3,11	3,09	3,08	4,05	4,09	4,05	5,08	5,08	5,09
		96	3,09	3,10	3,08	4,004	4,08	4,07	5,09	5,09	5,07
8	Biomasa ^c	0	0,051	0,051	0,051	0,056	0,051	0,053	0,055	0,053	0,052
		24	0,049	0,055	0,049	0,055	0,051	0,052	0,049	0,049	0,051
		48	0,048	0,053	0,049	0,052	0,053	0,053	0,052	0,045	0,050
		72	0,051	0,051	0,050	0,050	0,050	0,052	0,048	0,045	0,051
		96	0,049	0,051	0,051	0,052	0,052	0,050	0,046	0,043	0,051
	pH	0	3,05	3,06	3,06	4,08	4,06	4,06	5,02	5,03	5,06
		24	3,14	3,13	3,11	4,11	4,09	4,07	5,09	5,09	5,05
		48	3,09	3,10	3,09	4,09	4,06	4,05	5,07	5,05	5,08
		72	3,08	3,09	3,08	4,05	4,08	4,05	5,06	5,08	5,07
		96	3,09	3,08	3,05	4,08	4,08	4,06	Ne5,10	5,08	5,05

^a25 °C y 100 rpm; ^bDO a $\lambda=600$ nm; ^cAbsorbancia a $\lambda=600$ nm

4.3.2. DEGRADACIÓN DE LIMONINA EN ZUMO SINTÉTICO POR *R. fascians* INMOVILIZADO EN PERLAS HUECAS

Se ha comprobado la inestabilidad de los geles de alginato de calcio en presencia de iones como el Na^+ y el K^+ , debido a que pueden intercambiarse molecularmente con el Ca^{2+} y producir una pérdida de consistencia continua del gel de alginato (Gacesa y Hubble, 1990; Hertzberg y col., 1995; Cassidy y col., 1996). También la afinidad por el calcio de aniones como citratos, lactato y fosfatos pueden desestabilizar los geles en función del pH del medio (Cassidy y col., 1996; García, 2000) y por tanto, la operatividad de los inmovilizados. A este respecto, debido a que el zumo sintético incorpora en su composición concentraciones importantes de citrato junto con K^+ y Na^+ , se procedió, en una primera experiencia, al estudio de la integridad del soporte de inmovilización (perlas huecas), sin el microorganismo, en el medio de zumo sintético a diferentes valores de pH ácidos (2, 3, 4 y 5) y a dos temperaturas de operación (25 y 4 °C).

De las experiencias realizadas se pudo comprobar que las perlas huecas mantenían su integridad física al pH más ácido de 2, 3 y 4, independientemente de la temperatura (25 ó 4 °C). Por el contrario, a pH 5 los soportes sufrían una clara degradación, ligeramente menor a 4 °C que a 25 °C, pero en cualquier caso no operativos después de 24 h a 100 rpm (Fig. 4.20 y 4.21).

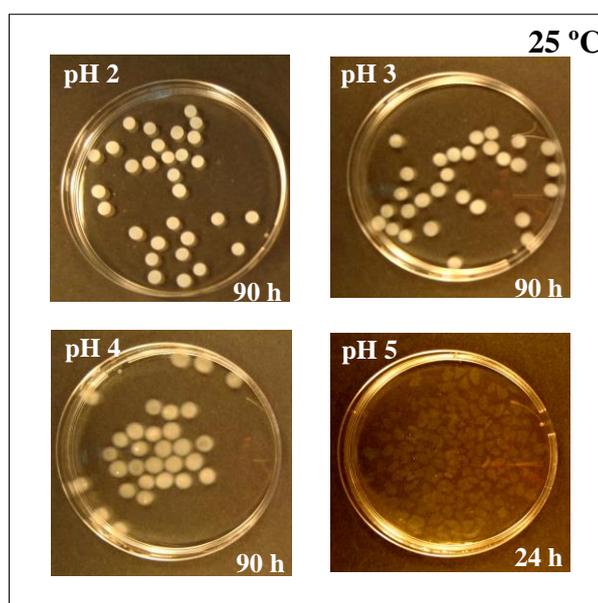


Fig. 4.20. Estabilidad de las perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl_2 2%) a 25 °C y 100 rpm en zumo sintético a pH 2, 3, 4 y 5.

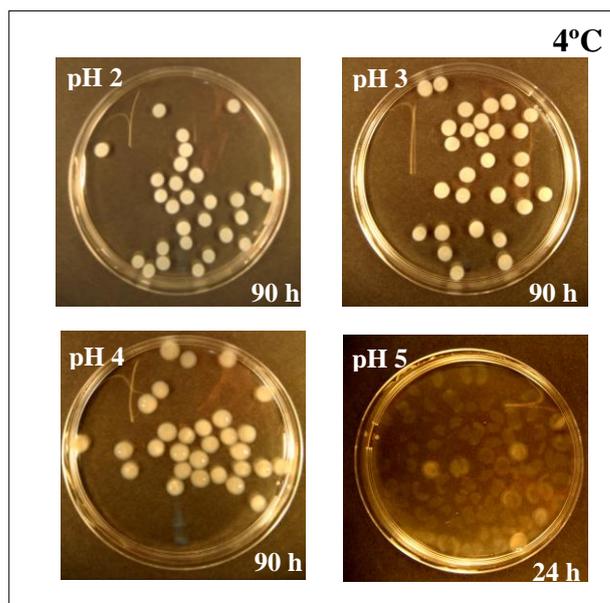


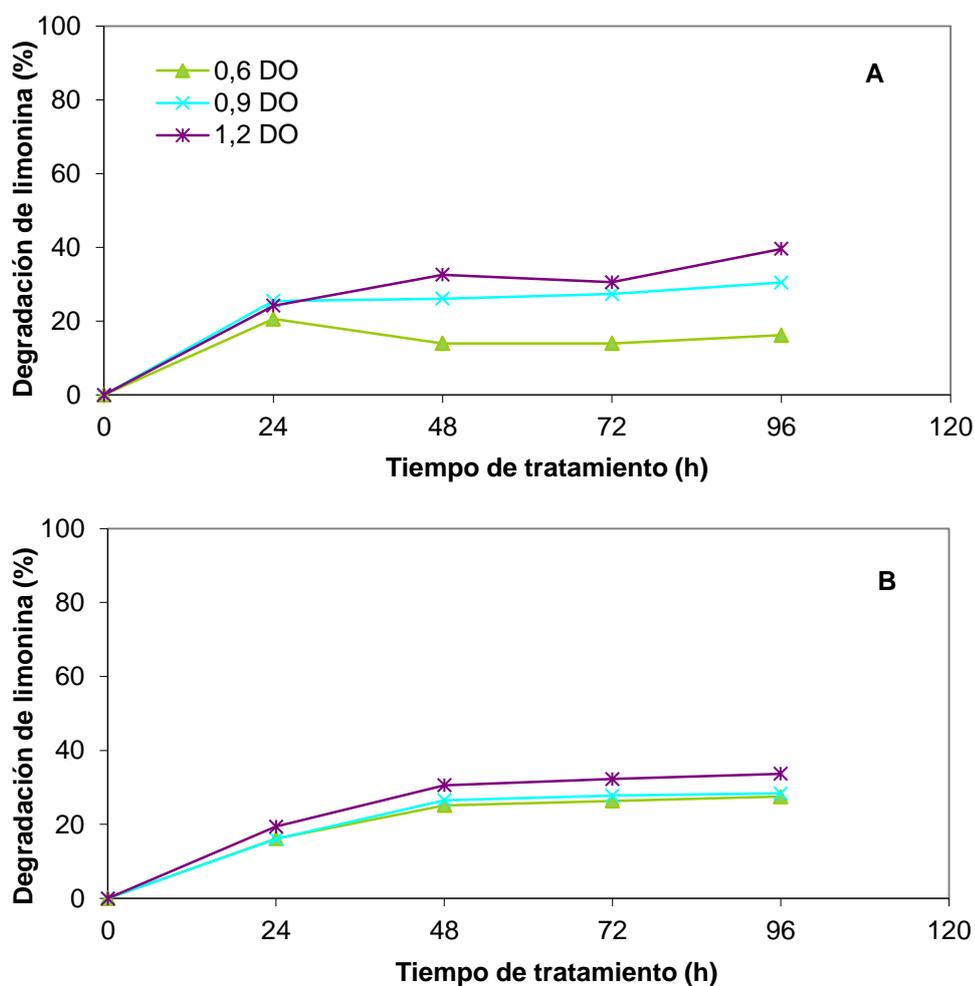
Fig. 4.21. Estabilidad de las perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl_2 2%) a 4 °C en zumo sintético a pH 2, 3, 4 y 5.

La desintegración observada por el soporte de inmovilización está relacionada fundamentalmente con la presencia de ácido cítrico como ingrediente del zumo sintético, capaz de complejar el Ca^{2+} en función del pH del medio. No obstante, este resultado, si bien pudiera considerarse negativo en cuanto a la estabilidad de estos inmovilizados, no repercutiría realmente cuando se empleen las perlas huecas en zumos naturales de cítricos, ya que su pH se encuentra en el rango de 3-4, para el que mantenían cierta estabilidad.

En base a estos resultados, junto con los ya obtenidos para este tipo de inmovilizados en sistemas modelo (apdo. 4.2.2), se procedió al estudio de la efectividad en la degradación de limonina de inóculos microbianos de *R. fascians* de 0,6; 0,9 y 1,2 DO encapsulados en perlas huecas de alginato de calcio, aplicando concentraciones variables de CaCl_2 del 3 y 4% en zumo sintético a pH 3. Puede observarse (Tabla 4.22 y Fig. 4.22), como a las 24 h de tratamiento se obtenían porcentajes de degradación de limonina del 20,4; 25,4 y 24,1% para inóculos de 0,6; 0,9 y 1,2 DO, respectivamente, para la concentración de CaCl_2 del 3%. Cuando se utilizaba CaCl_2 del 4% para la obtención de perlas huecas, se reducía la efectividad degradativa a un 16,3; 16,04 y 19,4%, respectivamente, para los mismos inóculos y tiempo de 24 h. Al aumentar el tiempo de procesado a las 96 h se producían ligeros incrementos en la degradación de limonina, con un 39,6% de degradación para el inóculo más efectivo de 1,2 DO y concentración de CaCl_2 del 3% (Fig. 4.22A) y un 33,7% cuando la concentración de CaCl_2 era del 4% (Fig. 4.22B).

Tabla 4.22. Efecto de la concentración de CaCl_2 en la degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas^a en zumo sintético a pH 3.

CaCl ₂ (%, p/v)	Tiempo de tratamiento (h) ^b	Limonina (ppm)		
		Inóculo microbiano ^c		
		0,6	0,9	1,2
3	0	46,5	55,1	51,0
	24	37,0	41,1	38,7
	48	40,1	40,8	34,4
	72	40,1	40,1	35,5
	96	39,0	38,4	30,8
4	0	57,2	55,5	59,9
	24	47,9	46,6	48,3
	48	42,8	40,8	41,6
	72	42,1	40,1	40,6
	96	41,4	39,7	39,7

^aAlginato de sodio 2% y CMC 4%^b25 °C y 100 rpm^cDO a $\lambda=600$ nm**Fig. 4.22.** Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2%, CMC 4% y CaCl_2 3%(A) y 4%(B)) en zumo sintético a pH 3.

Al igual que se había obtenido en sistemas modelo, al incrementar la concentración de CaCl₂ al 4% se hacían no significativas las diferencias entre los inóculos microbiano de 0,6 y 0,9 DO (Tabla 7.42 del anexo) reduciéndose el valor de F de 366,16 para CaCl₂ del 3% a 92,72 para CaCl₂ del 4%, lo que indica que para esta concentración de CaCl₂ el factor inóculo microbiano era menos determinante.

Al igual que en las experiencias anteriores se evaluó en las muestras ensayadas, la biomasa y el pH del medio (Tabla 4.23). Se observó que no había cambios significativos en ninguno de los dos factores (Tabla 7.43 y 7.44 del anexo).

Tabla 4.23. Evaluación de la biomasa y del pH del zumo sintético^a aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas alginato de calcio^b.

CaCl ₂ (%, p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano ^c			
		0,6	0,9	1,2	
3	Biomasa ^d	0	0,058	0,058	0,060
		24	0,059	0,055	0,059
		48	0,060	0,056	0,058
		72	0,058	0,058	0,060
		96	0,059	0,060	0,061
	pH	0	3,05	3,04	3,05
		24	3,08	3,02	3,03
		48	3,07	3,03	3,03
		72	3,05	3,05	3,02
		96	3,06	3,01	3,06
4	Biomasa ^d	0	0,055	0,058	0,059
		24	0,056	0,060	0,055
		48	0,055	0,057	0,055
		72	0,054	0,058	0,058
		96	0,057	0,059	0,055
	pH	0	3,06	3,03	3,07
		24	3,02	3,05	3,06
		48	3,05	3,06	3,05
		72	3,03	3,08	3,05
		96	3,02	3,08	3,06

^apH 3 a 25 °C y 100 rpm

^bAlginato de sodio 2% y CMC 4%

^cDO a λ= 600 nm

^dAbsorbancia a λ=600 nm

A diferencia de los inmovilizados por atrapamiento en geles de PVA-PEG, en los que se observaron sólo pequeñas diferencias en la actividad catalítica entre la aplicación en sistemas modelo (apdo. 4.2.1.1) y zumos sintéticos (apdo. 4.3.1), los encapsulados en perlas huecas de

alginato de calcio presentaban diferencias notables en los porcentajes de degradación de limonina en sistemas modelo (apdo. 4.2.2.1) y en zumos sintéticos, especialmente cuando se utilizaba CaCl_2 al 3% para obtención de los encapsulados y tiempo largos de operación. En concreto, en zumos sintéticos el incremento del tiempo de tratamiento por encima de las 24 h no provocaba mejoras notables en los niveles de degradación de limonina obtenidos (Tabla 4.22). A este respecto, Cánovas y col. (1998) obtuvieron que a partir de las 17 h de aplicación de células de *R. fascians* inmovilizadas en espumas de poliuretano en zumo sintético a pH 4, en ausencia de aireación, no mejoraba la hidrólisis de limonina. Puri y col. (1996) determinaron como efectivo un tiempo de tratamiento de 24 h para la degradación del compuesto amargo naringina en muestras de zumos de cítricos con naringinasa inmovilizada. De manera similar, Tsen y Tsai (1988) consideraron por criterios prácticos un tiempo de tratamiento de 24 h para la degradación de compuestos amargos en zumos.

Por todo lo expuesto, se seleccionó para la siguiente prueba de aplicación de los diferentes inmovilizados en zumo natural de naranja tiempos fijos de tratamiento de 24 h.

4.3.3. DESAMARGADO DE ZUMO NATURAL DE NARANJA POR *R. fascians* INMOVILIZADO POR ATRAPAMIENTO

En este último apartado, se pretende comprobar en zumo natural de naranja la estabilidad operativa y efectividad en la degradación de limonina de las células de *R. fascians* acondicionadas e inmovilizadas por atrapamiento en los soportes y condiciones desarrolladas en los apartados precedentes. A este respecto, en los resultados obtenidos previamente, se había constatado, tanto en los inmovilizados en geles de PVA-PEG como encapsulados en perlas huecas de alginato de calcio, que la inmovilización aplicando inóculos microbianos con DO elevadas (0, 9 y 1,2 DO) generaba numerosos problemas de tipo operativo para conseguir encapsulados íntegros. Por esta razón, se seleccionó el inóculo de 0,6 DO para asegurar una manipulación y elaboración menos costosa. Por otro lado, en base a las experiencias realizadas en sistemas modelo, especialmente en las pruebas de reutilización (apdos 4.2.1.2 y 4.2.2.2) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en zumo sintético, se fijó la concentración de PEG al 8% y concentraciones variables de PVA (7 y 8%) para la inmovilización por atrapamiento en geles, y concentraciones de CaCl₂ del 3 y 4% para los encapsulados en perlas huecas de alginato de calcio.

En esta experiencia los inmovilizados se aplicaban a zumo natural de naranja en las condiciones de ensayo descritas en el apdo 3.3.2, llevando a cabo su reutilización en ciclos de 24 h. La reducción en el contenido en limonoides para *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA-PEG se detallan en la Tabla 4.24.

Tabla 4.24. Degradación de limonina y estabilidad operacional en zumo de naranja^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en PVA-PEG(8%).

PVA (%, p/v)	Limonoides totales ^c (µg limonina/ml)			
	Ciclos de 24 h			
	1	2	3	4
7	29,25	33,13	34,26	36,77
8	29,99	32,44	33,36	35,39

^a25 °C y 100 rpm, limonina

^bInóculo microbiano de 0,6 DO

^c37,05 µg limonina/ml (limonoides totales a t=0)

En estos resultados puede observarse que los inmovilizados eran operativos después de varios ciclos de tratamiento, aunque perdían efectividad a medida que se usaban repetidas veces (Fig. 4.23). Así, en el primer ciclo de reutilización para inmovilizados con PVA(7%) y PVA(8%) se degradaba hasta un 21,05% y 19,03% de limonoides (µg limonina/ml), mientras que en el tercer ciclo se reducía esta degradación al 7,52% y 9,95%, respectivamente. Los geles

con PVA al 8% mantenían incluso un 4,49% de degradación en un cuarto ciclo de aplicación, la Tabla 7.45 del anexo nos muestra que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de PVA y los ciclos de 24 h.

En comparación con la aplicación de estos mismos inmobilizados en los sistemas modelo (medio MM sin fructosa a pH 7) la efectividad en el primer ciclo de aplicación era muy similar en ambos casos, pero se reducía en zumo de naranja tras los sucesivos ciclos de reutilización (Tabla 4.10). Al igual que en las pruebas de optimización (apdo 4.2.1.1), los geles de PVA(8%)-PEG(8%) aplicados en zumo natural presentaban una mayor estabilidad y eficacia en la degradación en los sucesivos ciclos de reutilización.

A diferencia de lo observado en zumos sintéticos, los geles con PVA(8%)-PEG(8%) no sufrían desestabilización de la estructura después de las 48 h de utilización. Este comportamiento, más estable en zumo de naranja, podría explicarse en base a la presencia de otros componentes en el zumo que reducen o eliminan las posibles interacciones del azúcar con los componentes del gel.

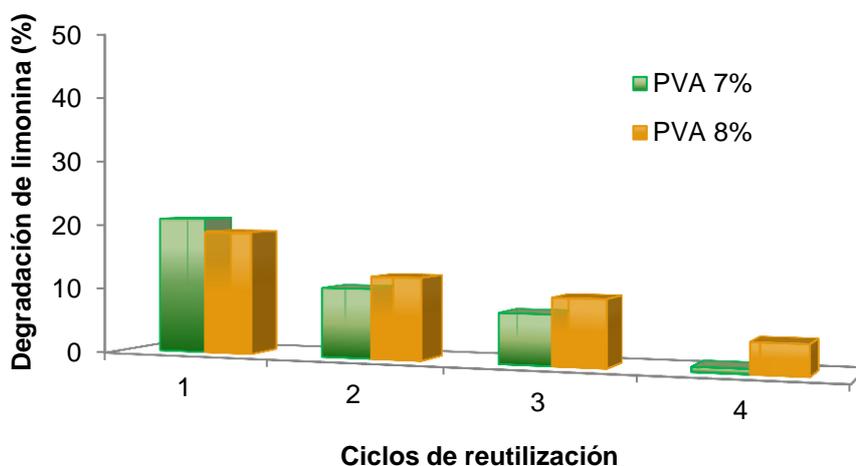


Fig. 4.23. Estabilidad operacional de células de *R. fascians* (0,6 DO) inmobilizadas en criogeles de PVA-PEG(8%) en zumo de naranja a 25 °C y 100 rpm. Ciclos de reutilización de 24 h,

Las células inmobilizadas en perlas huecas de alginato de calcio, a diferencia de los anteriores inmobilizados en geles de PVA-PEG, no admitían más que dos ciclos de aplicación (Fig. 4.24). A este respecto, los niveles de degradación de limonoides eran también inferiores a los obtenidos con los geles de PVA-PEG. Los análisis del ANOVA multifactorial recogidos en la Tabla 7.47 del anexo muestran que no hay diferencias significativas en la degradación de limonina entre los encapsulados en perlas huecas con CaCl_2 al 4% y los inmobilizados en

criogeles de PVA(7 y 8%)-PEG(8%). La mayor efectividad, en este caso, se obtuvo con la concentración de CaCl_2 del 4% con un 17,83% y 13,03% de degradación en el primer y segundo ciclo, respectivamente. El mayor grosor y consistencia de la cápsula a la concentración de CaCl_2 del 4%, como ya se ha indicado en pruebas anteriores (apdo 4.2.2.1), podría, en este caso implicar, una mayor protección o reducción del efecto sobre el biocatalizador de los distintos componentes presentes en el zumo.

En zumo de naranja, los inmovilizados en perlas huecas eran también menos efectivos y reutilizables que en los sistemas modelo (apdo 4.2.2.2, Tabla 4.16). No obstante, en comparación con los resultados obtenidos aplicando estos inmovilizados en zumo sintético a pH 3 (Tabla 4.17) las diferencias en los niveles de degradación de limonoides a las 24 h de aplicación no resultaban significativas para los inmovilizados en perlas huecas con CaCl_2 al 4% (Tabla 7.49). Sin embargo para los inmovilizados en perlas huecas con CaCl_2 al 3% sí existían diferencias significativas en la degradación de limonina en zumo sintético a pH 3 y zumo natural de naranja (Tabla 7.48 del anexo).

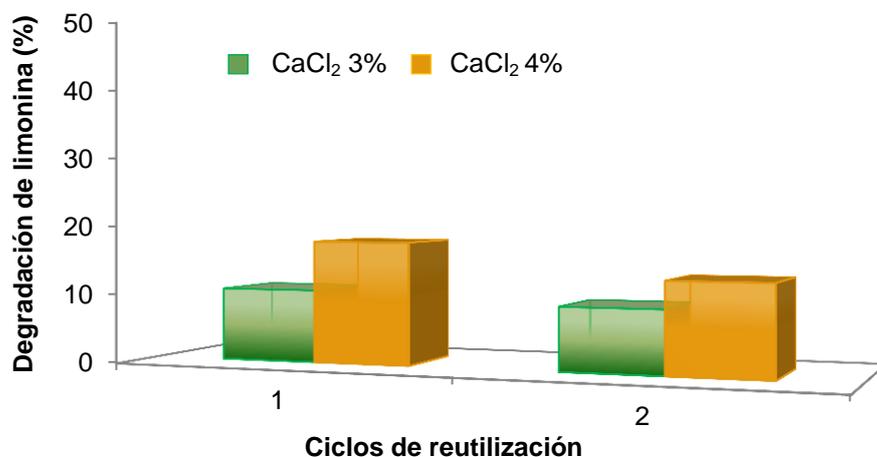


Fig. 4.24. Estabilidad operacional de células de *R. fascians* (0,6 DO) inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2% y CMC 4%) en zumo de naranja a 25 °C y 100 rpm. Ciclos de reutilización de 24 h.

De los resultados obtenidos se deduce que el zumo de naranja genera condiciones que afectan a la estabilidad y eficacia de los inmovilizados, especialmente en la encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio. Se ha señalado, en diversas experiencias con enzimas inmovilizadas en diferentes soportes y aplicadas a zumos sintéticos o naturales, la pérdida de la estabilidad operacional debido a la presencia de compuestos de bajo peso molecular como el

ácido cítrico, sacarosa, glucosa o ramnosa (Park y Chang, 1979), la concentración de flavonoides o el pH (Munish y col., 2002). También se ha señalado a las pectinas de alto peso molecular como las principales responsables de esta pérdida de estabilidad en inmovilizados enzimáticos, ya que si se sometía al zumo previamente a un proceso de clarificación se recuperaba un 99% de su eficacia (Jimeno y col., 1987). Por consiguiente, en el caso que nos ocupa, la acumulación de diferentes componentes del zumo en el soporte y en el interior de la cápsula, pueden afectar el microambiente de las células de *R. fascians*, o también saturar parcialmente los poros del gel impidiendo o reduciendo la difusión de los limonoides al interior, alterando, por tanto, la eficacia del proceso de degradación.

De los resultados obtenidos en esta experiencia parece deducirse claramente una mayor estabilidad en el zumo natural y, por tanto, efectividad en la degradación del compuesto amargo de los inóculos de *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA-PEG frente a las perlas huecas de alginato de calcio. No obstante, antes de descartar estos últimos soportes de inmovilización, una posible alternativa de mejora sería el recubrimiento/entrecruzamiento con otros polímeros (Krasaekoopt y col., 2003; Jhon y col., 2011; Tu y col., 2015). En concreto, el recubrimiento con polímeros es una de las aproximaciones sobre las que se están realizando más investigaciones ya que se ha constatado la mejora tanto en la estabilidad mecánica y química de las cápsulas, con una mayor retención y viabilidad de las células microbianas (Rathore, 2013). En concreto, se ha demostrado que la resistencia mecánica de las perlas de alginato y la porosidad del gel mejora por el tratamiento con quitosano de 5-10 kDa (Chávarri y col., 2010; Makraduli y col., 2013). El quitosano es un polímero de bajo coste, no tóxico, biodegradable y biocompatible (Estevinho y col., 2013), lo que hace que sea un buen material de recubrimiento para los métodos de encapsulación habiéndose empleado en la encapsulación de biocatalizadores enzimáticos y celulares (Kaspar y col., 2013; Kumari y col., 2013).

La calidad de los zumos de naranja comerciales dependen en gran medida de factores como el aroma, el sabor, color y turbidez, cualidades que son dependientes de las características intrínsecas del fruto como son la variedad, madurez y composición, y de las condiciones de procesamiento (método de extracción, concentración, mezcla y homogenización) y almacenamiento (Cook, 1983). La suma de estas características hace que cada zumo sea particular y determina su mayor o menor aceptación por el consumidor. Por ello, en base a estas consideraciones, se procedió a la caracterización físico-química de las muestras de zumo sometidas a desamargado, después de un ciclo de 24 h, por *R. fascians* inmovilizado con los diferentes procedimientos aplicados en la prueba anteriormente descrita. Se determinaron los

principales parámetros físico-químicos del zumo al final del tratamiento de desamargado, incluyendo controles de zumo con y sin pretratamiento térmico. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 4.24.

Se ha podido comprobar que el proceso de desamargado con *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA y en perlas huecas, no implicaba variaciones significativas en la mayor parte de los parámetros físico-químicos analizados. A este respecto, el pH del zumo objeto de estudio era de 3,6, en consonancia con el pH indicado para otros zumos de naranja (Del Caro y col., 2004). El rango de pH para los zumos desamargados era de 3,5-3,7, sin diferencias significativas con los controles (Tabla 7.52 del anexo). El contenido en sólidos solubles para las muestras de zumo natural y el zumo sometido a pretratamiento térmico se encontraba en el rango de 11,6-12,4 °Brix, también acorde con el contenido en sólidos solubles recogidos por otros autores (Del Caro y col., 2004; Tribess y col., 2009). El tratamiento de desamargado tampoco modificaba de manera significativa este parámetro con respecto a los controles (Tabla 7.54 del anexo), con valores para los zumos tratados de 11,4-12,0 °Brix. Al aplicar una resina de intercambio iónico para el desamargado de zumos de cítricos, Kola y col. (2010) tampoco observaron diferencias significativas en el contenido en sólidos solubles entre los zumos tratados (11,2 °Brix) y los zumos frescos.

Por otra parte, como mejor se estima el sabor de los zumos de cítricos es a partir de la relación de madurez (índice de madurez: IM), es decir, la relación entre los sólidos totales (°Brix) y la acidez (como ácido cítrico, principal ácido orgánico en cítricos). Esta relación, determina el balance de sabor entre el dulzor y la acidez, aumenta con la maduración y varía a lo largo de la temporada de cosecha del fruto (Bar-Peled y col., 1993). De los resultados obtenidos se comprueba que el tratamiento con los inmovilizados en PVA-PEG no modificaba de manera significativa el valor de este índice con respecto a las muestras control (Tabla 7.55 del anexo). Sin embargo, la aplicación de *R. fascians* inmovilizados en perlas huecas de alginato de calcio provocaba un incremento del IM en los zumos tratados en relación a las muestras control (Tabla 4.24; Tabla 7.55). En el caso de las perlas huecas, la posibilidad de interacción del Ca^{2+} de la matriz soporte con componentes del zumo podría explicar este incremento en el IM. Hay estudios previos que han observado también incrementos en el IM debido a diversos polímeros (Johnson y Chandler, 1982).

Tratamientos de desamargado de zumo de naranja bajo las condiciones aplicadas en la industria (Zumos Pascual, S.A) utilizando una resina polimérica macroporosa hidrofóbica sin grupos funcionales basada en perlas porosas de poliestireno entrecruzado, Lewatit VPOC 1064

MD PH (Bayr, Germany), tampoco producían cambios significativos en el pH, sólidos solubles e IM entre los zumos frescos y desamargados (Fernández-Vázquez y col., 2013). No obstante, la aplicación de esta tecnología sí provocaba un descenso significativo en el contenido en compuestos fenólicos totales en las muestras de zumo. A diferencia de estos resultados, los zumos de naranja en los que se aplicaron los inmobilizados de *R. fascians* en criogeles de PVA-PEG, el componente fenólico no se veía reducido con respecto al zumo control o en el caso de los inmobilizados en perlas huecas la reducción era mínima (Tabla 4.24).

Tabla 4.24. Caracterización físico-química de zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmobilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y perlas huecas de alginato de calcio.

Parámetros	Control A ^a	Control B ^b	Criogeles de PVA-PEG ^c		Encapsulación en perlas huecas ^d	
			PVA (7%)	PVA (8%)	CaCl ₂ (3%)	CaCl ₂ (4%)
Flavonoides totales ^e	280,22	332,72	348,37	350,22	326,88	315,01
pH	3,57	3,53	3,51	3,53	3,69	3,66
Acidez ^f	2,37	2,56	2,29	2,34	2,34	2,31
Sólidos Solubles ^g	11,61	12,35	11,42	11,45	11,72	12,00
Índice de madurez ^h	4,90	4,82	4,97	4,89	5,01	5,19
Color ⁱ	0,91	1,03	1,05	1,04	0,99	1,00
Turbidez ^j	2,21	2,29	2,31	2,29	2,27	2,27

^aZumo de naranja sin tratar, ^bZumo de naranja tratado térmicamente, 5 min a ebullición, ^c Concentración PEG 8% , ^dAlginato de sodio 2% y CMC 4%, ^eµg de naringina ml⁻¹, ^fg de ácido cítrico 100 ml⁻¹, ^gContenido en sólidos solubles (°Brix), ^h°Brix/Acidez, ⁱAbsorbancia a λ=420 nm, ^jAbsorbancia a λ=660 nm

Son numerosas las referencias sobre el impacto negativo en el contenido final de compuestos nutricionales y bioactivos en los procesos de desamargado que utilizan materiales adsorbentes (Puri y col., 2008; Lee y Kim, 2003; Busto y col, 2014). A este respecto, Stinco y col (2013) han descrito, después del desamargado del zumo de naranja con Lewatit VPOC 1064 MD PH, reducciones del 26% en ácido ascórbico, 32% en hidroxicinámico, 28% de flavonas, 41% de flavanonas y de la actividad antioxidante en comparación con los zumos frescos.

Por último, tampoco se observaron diferencias significativas en la turbidez de los zumos tratados con *R. fascians* inmobilizado en cualquiera de los dos soportes (criogeles o perlas huecas) y el control de zumo sometido a tratamiento térmico (Tabla 7.57). En relación al color,

no se observaron diferencias significativas para los zumos a los que se había aplicado el inmovilizado en criogeles de PVA-PEG (Tabla 7.56 del anexo). A diferencia de estos resultados, se ha demostrado en diferentes experiencias que la aplicación de resinas de intercambio provoca modificaciones más o menos importantes en estos dos parámetros (Fernández-Vázquez y col 2013; Stinco y col., 2013).

5. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abassi, S., Zandi, P. y Mirbagheri, E. (2005). Quantitation of limonina in Iraian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *European Food Research and Technology*, **221**: 202-207.

Alford, A.R., Murray, K. D. (2000). Prospects for citrus limonoids in insect pest management. En: *Citrus Limonoids. Functional Chemicals in Agriculture and Foods* (Berhow, M. A., Hasegawa, S., Manners, G. D., eds.). American Chemical Society, Washington, 201-211.

Adlercreutz, P. (1993). Immobilized enzymes. En: *Enzymes in Food Processing*. (Nagodawthana, T. y Reed, G., eds.). Academic Press, New York, 103-119.

Amsden, B. y Turner, N. (1999). Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, **65**: 605-610.

AOAC. (1995). Fruits and fruit products. En: *Official Methods of Analysis*, 10.

Ariga, O., Itoh, K., Sano, Y. y Natura, M. (1994). Encapsulation of biocatalyst with PVA capsules. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**: 74-78.

Ariga, O., Kato, M., Sano, T., Nakazawa, Y. y Sano, Y. (1993). Mechanical and kinetic properties of PVA hidrogel immobilizing β -galactosidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76**: 203-206.

Arnott, S., Davie, A.W., Robertson, J.M., Sim, G.A. y Watson, D.G. (1961). The structure of limonin: X-ray analysis of epilimonol iodoacetate. *Journal Chemistry Society*, 4183-4200.

Bar-Peled, M., Fluhr, R. y Gressel, J. (1993). Juvenile specific localization and accumulation of a rhamnosyl transferase and its bitter flavonoid in foliage, flowers and young citrus fruits. *Plant Physiology*, **103**: 1377-1384.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997). Frutas, frutos secos y productos derivados. En: *Química de los alimentos*. (Belitz, H.D. y Grosch, W., eds.). Acribia, Zaragoza, 629-678.

Bernay, S. (1841). Limonin. *Liebig's Annalen*, **40**: 317-320.

Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of enzymes and cells: some practical considerations. En: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. (Bickerstaff, G.F., ed.). Humana Press, Totowa, 1-11.

Bieler, N. C., Ansoerge-Schumacher, M.B. y Lainer, G. (2010). Automated lab scale production of PVA/PEG-enzyme immobilisates. *Biotechnology Journal*, **5**: 881-885.

Binello, A., Robaldo, B., Borge, A., Cavalli, R. y Cravotto, G. (2007). Synthesis of

cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents. *Journal of Applied Polymer Science*, **107**: 2549-2557.

Bonine, B.M., Peres Polizelli, P. y Bonilla-Rodriguez, G.O. (2014). Immobilization of a plant lipase from *Pachira aquatic* in alginate and alginate/PVA beads. *Enzyme Research*, 1-7.

Brun-Graepi, A.K.A.S., Rocjard, C., Bessodes, M., Scherman, D. y Merten, O.W. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, **149**: 209-224.

Bucko, M., Schenk Mayerová, A., Gemeiner, P., Vikartouska, A., Mihovilovic, M.D. y Lacík, I. (2011). Continuous testing system for Baeyer-Villiger biooxidation using recombinant *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules. *Enzyme and Microbial Technology*, **49**: 284-288.

Bucko, M., Vikartovská, A., Gemeiner, P., Lacík, I., Kolláriková, G. y Marison, I.W. (2006). *Nocardia tartaricans* cells immobilized in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-“co”-guanidine) capsules: mechanical resistance and operational stability. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, **81**: 500-504.

Bucko, M., Vikartovská, A., Lacík, I., Kolláriková, G., Gemeiner, P., Pätoprsty, V. y Brygin, M. (2005). Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-“co”-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 118-126.

Bu'lock, J. y Kristiansen, B. (1991). *Biotechnología Básica*. Acribia, Zaragoza.

Burgain, J., Gaianic, C., Linder, M. y Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, **104**: 467-483.

Busto, M.D., Cavia-Saiz, M., Ortega, N. y Muñoz, P. (2014). Enzymatic debittering on antioxidant capacity of grapefruit Juice. En: *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (Preedy, V.R., ed.). Elsevier, Londres, 195-202.

Busto, M.D., Meza, V., Ortega, N. y Pérez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, **104**: 1177-1182.

Busto, M.D., Ortega, N. y Pérez-Mateos, M. (1995). Studies on microbial β -D-glucosidase immobilized in alginate gel beads. *Process Biochemistry*, **30**: 421-426.

Busto, M.D. y Pérez-Mateos, M. (1997). Agronomic and detoxifying potential of soil

enzymes. Biotechnological perspectives on the application of immobilized enzymes in the soil environment. *Recent Research Developments in Soil Biology and Biochemistry*, **1**: 47-62.

Buwalda, S.J., Boera, K.W.M., Dijkstra, J., Feijen, J., Vermonden, T y Hennink, W.E. (2014). Hydrogels in a historical perspective from simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, **190**: 254-273.

Cánovas, M., García-Cases, L. y Iborra, J.L. (1998). Limonin consumption at acidic pH values and absence of aeration by *Rhodococcus fascians* cells in batch and immobilized continuous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 111-116.

Cassidy, M., Lee, H. y Trevors, J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells. *Journal of Industrial Microbiology*, **16**: 79-101.

Ccoriñuapa, H.F. (1999). Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de limonina. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria-La Molina. Lima, Perú.

Chai, Y., Mei, L.H., Wu, G.L., Lin, D.Q. y Yao, Sh.J. (2004). Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*, 229-233.

Chang, H.N., Segong, G.H., Yoo, I-K., Park, J.K. y Seo J-H. (1996). Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*, **51**: 157-162.

Chang, T.M.S. (1964). Semipermeable microcapsules. *Science*, **146**: 524-525.

Chávarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibañez, F.C., Marzo, F. y Villaran, M.D. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **142**: 185-189.

Cheetam, P. (1985). Principios de enzimología industrial: bases de la utilización de enzimas solubles e inmovilizados en los procesos industriales. En: *Manual de Biotecnología de los Enzimas* (Wiseman, A., ed.). Acribia, Zaragoza, 45-138.

Cheng, Y., Ma, L., Deng, C., Xu, Z. y Chen, J. (2014). Effect of PEG-mediated pore forming on Ca-alginate immobilization of nitrilase-producing bacteria *Pseudomonas putida* XY4. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, **37**: 1653-1658.

Cheong, S.H., Park, J.K., Kim, B.S. y Chang, H.N. (1993). Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane. *Biotechnology Technology*, **7**: 879-884.

Chibata, I. (1978). Preparation of immobilized enzymes and microbial cells. En:

Immobilized Enzymes Research and Development (Chibata, I., ed.). John Wiley and Sons, New York, 11-107.

Choodej, S., Sommit, D. y Pudhom, K. (2013). Rearranged limonoids and chromones from *Harrisona perforate* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **23**: 3896-3900.

Cook, R. (1983). Quality of citrus juices as related to composition and processing practices. *Food Technology*, **37**: 68-71.

Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic *lactobacilli* spray-dried in the presence of probiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, **96**(5): 1024-1039.

Corona-Hernandez, R.I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A.R., De la Rosa, L.A. y Wall-Medrano, A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**: 614-628.

Cravotto, G y Cintas, P. (2006). Power ultrasounds in organic synthesis: Moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. *Chemical Society Reviews*, **35**: 180-196.

Davis, W. (1947). Determination of flavonones in citrus. *Analytical Chemistry*, **19**: 476-478.

Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V. y Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin, C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, **84**: 99-105.

de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevia, M. y Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20**: 292-302.

Del Nobile, M.A.D., Piergiovanni, L., Buonocore, G.G., Fava, P., Puglisi, M.L. y Nicolasi, L. (2003). Naringinase immobilization in polymeric films intended for food packaging application. *Journal of Food Science*, **68**: 2046-2049.

Dembczynski, R. y Jankowski, T. (2000). Characterisation of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid-core capsules. *Biochemical Engineering*, **6**: 41-44.

Dembczynski, R. y Jankowski, T. (2002). Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme and Microbial*

Technology, **31**: 111-115.

Dinelli, D., Marconi, W. y Morisi, F. (1976). Fiber-entrapped enzymes. En: *Methods in Enzimology* (Mosbach, K., ed.). Academia Press, New York, 227-243.

Emerson, O.H. (1949). The bitter principle of Navel oranges. *Food Technology*, **3**: 243-250.

European Fruit Juice Association-AIJN. (2015). 2015 *Liquid Fruit Market Report*. Bruselas, Bélgica. Recuperado de <http://www.aijn.org>.

Faugeras, P.A., Boëns, B., Elchinger, P.H., Brouillette, F., Montplaisir, D., Zeurrouki, R. y Lucas, R. (2012). When cyclodextrins meet click chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*, **22**: 4087-4105.

Fayoux, C.S., Hernández, R.J. y Holland, R.V. (2007). The debittering of Navel orange juice using polymeric films. *Journal of Food Science*, **72**: E143-E154.

Fernandes, P., Marques, M.P.C., Carvalho, F. y Cabral, J.M.S. (2009). A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hidrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**: 561-564.

Fernández, M.J. (2002). Inmovilización y caracterización de poligalacturonasa de aplicación enológica en soportes poliméricos. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Burgos, España.

Fernández-Vázquez, R., Stinco, C.M., Hernanz, D., Heredia, F.J. y Vicario, I.M. (2013). Industrial orange juice debittering: effect on volatile compounds and overall quality attributes. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**: 1861-1867.

Fong, C.H., Hasewaga, S., Miyake, M., Ozaki, Y., Coggins, C.W. y Jr. Atkin, D.R. (1993). Limonoids and their glucosides in Valencia orange seeds during fruits growth and development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**: 112-115.

Forage, A. (1979). Utilization of agricultural and food processing wastes containing carbohydrates. *Chemical Society Reviews*, **8**: 309-314.

Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L. y Alves A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. A Review. *Trends in Food Science and Technology*, **31**: 138-155.

Gacesa, P. y Hubble, J. (1990). Efectos de la inmovilización en la estabilidad enzimática y su utilidad. En: *Tecnología de Enzimas* (Gacesa, P. y Hubble, J., eds.). Acribia, Zaragoza, 89-108.

Gallego, M.V., Pinaga, F., Ramon, D. y Valles, S. (2001). Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *Journal of Food Science*, **66**: 204-209.

Galindo, M. (1984). *Exposición intuitiva de métodos estadísticos (fundamentos y aplicaciones a la biología, medicina y otras ciencias)*. Universidad de Salamanca, Gráficas Varona, Salamanca.

García Tramontín, K. (2000). Inmovilización de enzimas pectinolíticas aplicadas a la clarificación de zumos de frutas. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Burgos, España.

Gholap, S.G. y Badiger, M.V. (2004). Synthesis and characterization of polyamphoteric hidrogel membrane based on chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, **93**: 1454-1461.

Gill, I. y Ballesteros, A. (2000). Bioencapsulation with synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biological. *Trends Biotechnoogy*, **18**: 282-296.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sciencie and Technology*, **15**: 330-347.

Gray, G.M. y Olson, A.C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin of grapefruit juice using a hollow fibre naringinase reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**: 1298-1301.

Green, K.D., Gill, I.S., Khan, J.A. y Vulfson, E.N. (1996). Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**: 535-543.

Groboillot, A., Boadi, D., Poncelet, D. y Neufeld, R. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**: 75-107.

Guadagni, D.G., Maier, U.P. y Turnbaugh, J.G. (1973). Effects of some citrus constituents on taste thresholds for limonin and naringin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **24**: 1277-1288.

Hasegawa, S. (2000). Biochemistry of Limonoids in *Citrus*. En: *Citrus Limonoids: Funtional Chemicals in Agriculture and Foods* (Berhow, M.A., Hasewaga, S. y Manners, G.D., eds.). American Chemical Society, Washington, 9-30.

Hasegawa, S., Bennet, R.D. y Maier, V.P. (1972). Metabolism of limonin and limonoate by microorganism. The conversión to non bitter compounds. *Journal of Agricultural and Food*, **20**: 435-437.

Hasegawa, S., Bennet, R.D. y Maier, V.P. (1984). Biosynthesis of limonoids in *Citrus*

seedlings. *Phytochemistry*, **23**: 1601-1603.

Hasegawa, S., Bennet, R.D. y Verdon, C.P. (1980). Limonoids in citrus seeds: origin and relative concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**: 922-925.

Hasegawa, S., Herman, Z., Orme, E. y Ou, P. (1986). Biosynthesis of limonoids in citrus: sites and translocation. *Phytochemistry*, **25**: 2783-2785.

Hasegawa, S. y Hoagland, J.E. (1977). Biosynthesis of limonoids in citrus. *Phytochemistry*, **16**: 469-471.

Hasegawa, S. y Kim, K.S. (1975). Biochemistry of limonoids, a new limonoid debittering enzyme. *Citrus Research*, **15**.

Hasegawa, S. y King, A.D. (1983). A species of bacterium-producing constitutive enzymes for limonoid metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**: 807-809.

Hasegawa, S., Maier, V.P., Border, S.N. y Bennett, R.D. (1974). Metabolism of limonoids. Isolation and characterization of deoxylimonin hydrolase from *Pseudomonas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **22**: 1093-1096.

Hasegawa, S., Maier, V.P. y A. Douglas King, Jr. (1974). Isolation of new limonoato dehydrogenase from *Pseudomonas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **22**: 523-526.

Hasegawa, S. y Miyake, V.P. (1996). Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. *Food Reviews International*, **12**: 413-435.

Hasegawa, S., Ou, P., Fong, C.H., Herman, Z., Coggins, C.W. y Jr. Atkin, D.R. (1991). Changes in the limonoate A-ring lactone and limonin 17-beta-D-glucopyranoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**: 262-265.

Hasegawa, S., Pelton, V.A. y Bennett, R.D. (1983). Metabolism of limonoids by *Arthrobacter globiformis* II: basis for a practical means of reducing the limonin content of orange juice by immobilized cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**: 1002-1004.

Hasegawa, S., Suhayda, G.C., Hsu, W. y Robertson, G.H. (1997). Purification of limonoid glucosyltransferase from navel orange albedo tissues. *Phytochemistry*, **46**: 33-37.

Hasegawa, S., Vandercook, C.E., Choi, G.Y., Herman, Z. y Ou, P. (1985). Limonoid debittering of citrus juice sera by immobilized cells *Corynebacterium fascians*. *Journal of Food Science*, **50**: 330-332.

Hasimoto, S. y Furukama, K. (1987). Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**: 52-59.

Herman, Z., Fong, C.H. y Hasegawa, S. (1991). Biosintesis of limonoid glucosides in

navel orange. *Phytochemistry*, **30**: 1487-1488.

Herman, Z. y Hasegawa, S. (1985). Limonin biosynthesis from obacunone via obacunoate in *Citrus limon*. *Phytochemistry*, **24**: 2911-2913.

Hertzberg, S., Moen, E., Vogelsang, C. y Ostgaard, K. (1995). Mixed photocross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate gels for cell entrapment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**: 10-17.

Higby, R.H. (1938). The bitter constituents of Navel and Valencia oranges. *Journal of the American Chemical Society*, **60**: 3013-3018.

Hucik, M., Bucko, M., Gemeiner, P., Stefuca, V., Vikartouska, A., Mihovilovic, M., Rudroff, F., Iqbal, N., Chorvát, D. y Lacík, I. (2010). Encapsulation of recombinant *E. coli* expressing cyclopentanone monooxygenase in polyelectrolyte complex capsules for Baeyer-Villiger biooxidation of 8-axabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one. *Biotechnology Letters*, **32**: 675-680.

Humanes, L., López-Ruiz, A., Merino, M.T., Roldán, J.M. y Diez, J. (1997). Purification and characterization of limonoate deshydrogenase from *Rhodococcus fascians*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3385-3389.

Iborra, J.L., Manjón, A., Cánovas, M., Lozano, P. y Martínez-Madrid, C. (1994). Continuous limonin degradation by immobilized *Rhodococcus fascians* cells in K-carrageenan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**: 487-493.

Ibrahim, S.A., Phetsomphou, S., Kim, C., Shahbazi, A., Seo, C.W., AbuGhazaleh, A. y Salem, M.M.E. (2009). Rapid and simple method for the encapsulation of *Lactobacillus reuteri* in the production of lactic acid. *Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology*. Springer, New York.

Ichijo, H., Nagasawa, J. y Yamauchi, A. (1990). Immobilization of biocatalysts with poly(vinyl alcohol) supports. *Journal of Biotechnology*, **14**: 169-178.

Jimeno, A., Manjón, A., Cánovas, M. y Iborra, J. (1987). Use of naringinase immobilized on glycophase-coated porous glass for fruit juice debittering. *Process Biochemistry*, **22**: 13-16.

John, R.P., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Surampalli, R.Y. y Prévost, D. (2011). Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, **31**: 211-226.

Johnson, R. y Chandler, B. (1982). Reduction of bitterness and acidity in grape fruit juice

by adsorptive processes. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **33**: 287-293.

Karim, M.R. y Hashinaga, F. (2002). Preparation and properties of immobilized pummel limonoid glucosyltransferase. *Process Biochemistry*, **38**: 809-814.

Kaspar, O., Tokárová, V., Nyanhongo, S., Gübitz, G. y Stepánek, F. (2013). Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with immobilized laccase. *Food and Bioproducts Processing*, **9**: 525-533.

Kaur, J. y Kaur, G. (2015). An insight into the role of citrus bioactives in modulation of colon cáncer. *Journal of Functionals Foods*, **13**: 239-261.

Kennedy, J.F. y Kalogerakis, B. (1984). Immobilization of enzymes on crosslinked gelatine particles activated with various forms and complexes of titanium (IV) species. *Enzymes and Microbial Technology*, **6**: 68-76.

Kennedy, J.F. y Roig, M.G. (1995). Principles of immobilization of enzymes. En: *Handbook of Enzyme Biotechnology* (Wiseman, A., ed.). Ellis Horwood, London, 235-310.

Kim, J., Jayaprakasha, G.K. y Patil, B.S. (2014). Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity in vitro by inhibiting the p38 MAPK signalling pathway in MCF-Z human breast adenocarcinoma cells. *Biochimie*, **105**: 36-44.

Klocke, J.A. y Kubo, I. (1982). Citrus limonoid by-products as insect control agents. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **32**: 299-301.

Kola, O., Kaya, C., Duran, H. y Altan, A. (2010). Removal of limonin bitterness by treatment of ion exchange and adsorbent resins. *Food Science and Biotechnology*, **19**: 411-416.

Konno, A., Misaki, M., Toda, J., Wada, T. y Yasumatsu, K. (1982). Bitterness reduction of naringin and limonin by β -cyclodextrin. *Agricultural and Biological Chemistry*, **46**: 2203-2208.

Kranz, P., Adler, P. y Kunz, B. (2011). Sorption of citrus flavour compounds on XAD-ZHP resin during the debittering of grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**: 30-36.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, **13**: 3-13.

Kumari, S. y Singh, R.P. (2013). Glycolic acid functionalized Chitosan-Au-Fe₃O₄ hybrid nanoparticle based nanohybrid scaffold for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **54**: 244-249.

Kurowska, E., Spence, J.D., Jordan, J., Wetmore, S., Freeman, D.J., Piche, L.A. y

Serratore, P. (2000). HDL cholesterol raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72**: 1095-1100.

Lam, L.K.T. y Hasegawa, S. (1989). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer*, **12**: 43-47.

Larrauri, J., Borroto, B. y Boys, T. (1996). Naringina. Procesos para su obtención a partir de hollejos de toronjas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 115-118.

Leiding, E., Prüsse, U., Vorlop, K.D. y Winter, J. (1999). Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess Engineering*, **21**: 5-12.

Lee, B.H. y Park, J.K. (1996). Encapsulation of whole cell β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, **11**: 398-404.

Lee, H.S. y Kim, J.G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*, **82**: 177-180.

Lei, S., Xu, Y., Fan, G., Xiao, M. y Pan, S. (2011). Immobilization of naringinase on mesoporousmolecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, **257**: 4096-4099.

Li, S., Wang, Z., Ding, F., Sun, D., Ma, Z., Cheng, Y. y Xu, J. (2014). Content changes of bitter compounds in “Guoqing No. 1” Satsuma mandarin (*Citrus unshiu Marc*). During fruit development of consecutive 3 seasons. *Food Chemistry*, **145**: 963-969.

Liotus, T.S. y Chu, O. (2000). Citrus products incorporating pulp processing by diafiltration. *US Patente*, 6 054 168.

López-Fouz, M., Pilar Izquierdo, M.C., Martínez-Mayo, I., Ortega, N., Pérez-Mateos, M. y Busto, M.D. (2007). Immobilization of *Rhodococcus fascians* cell in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of citrus juices. *Journal of Biotechnology*, **131**, 104-105.

Lowry, O., Rosebraugh, N., Fall, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biology and Chemistry*, **193**: 265-275.

Lozinsky, V. y Pliega, F. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**: 227-242.

Lu, Y. y Mei, L. (2007). Production of indigo by immobilization of *E. coli* BL21 (DE3) cells in calcium-alginate gel capsules. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **15**: 387-390.

Magrí, A., Vanotti, M.B. y Szögi, A.A. (2012). Anammox sludge immobilized in

polyvinyl alcohol (PVA) cryogel carriers. *Bioresource Technology*, **114**: 231-240.

Maier, V.P. y Beverly, G.D. (1968). Limonin monolactone, the nonbitter precursor responsible for delayed bitterness in certain citrus juices. *Journal of Food Science*, **33**: 488-492.

Maier, V.P. y Grant, E.R. (1970). Specific thin-layer chromatography assay of limonin, a citrus bitter principle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **18**: 250-252.

Maier, V.P., Hasewaga, S. y Hera, E. (1969). Limonin D-ring-lactone hidrolase. A new enzyme from *citrus* seeds. *Phytochemistry*, **8**: 405-407.

Makraduli, L., Crcarevska, M.S., Geskovski, N., Dodov, M.G. y Goracinova, K. (2013). Factorial design analysis and optimisation of alginate-Ca-chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*, **30**: 81-92.

Malik, M., Ganguli, A. y Ghosh, M. (2012). Modeling of permeabilization process in *Pseudomonas putida* G7 for enhanced limononin bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95**: 223-231.

Manjón, A., Iborra, J.L. y Martínez-Madrid, C. (1991). pH control of limonin debittering with entrapped *R. fascians* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**: 176-179.

Manners, G.D. (2007). Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity and Biomedical Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 8285-8294.

Manosroi, A., Kitdamrongtham, W., Ishii, K., Shinozaki, T., Tachi, Y., Takagi, M., Ebina, K., Zhang, J., Manosroi, J., Akihisa, R. y Akihisa, T. (2014). Limonoids from *Azadirachta indica* var. *siamensis*. Extracts and their cytotoxic and melanogenesis-inhibitory activities. *Chemistry and Biodiversity*, **11**: 505.

Martínez-Madrid, C., Manjón, A. y Iborra, J.L. (1989). Degradation of limonin by entrapped *Rhodococcus fascians* cells. *Biotechnology Letters*, **9**: 653-658.

Marwaha, S.S., Puri, M., Bhullar, M. y Kothari, R.M. (1994). Optimization of parameters for hydrolysis of limonin for debittering of Kinnow mandarin juice by *Rhodococcus fascians*. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**: 723-725.

McIntosh, C.A., Mansell, R.L. y Rouseff, R.L. (1982). Distribution of limonin in the fruit tissues of nine grapefruit cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 689-692..

McIntosh, C.A. y Mansell, R.L. (1997). Three-dimensional distribution of limonin, limonoate A-ring monolactone, and naringin in the fruit tissues of three varieties of citrus

paradise. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 2876-2883.

McIntosh, C.A. (2000). Quantification of limonin and limonoate A-ring monolactone during growth and development of citrus fruit and vegetative tissues by radioimmunoassay. En: *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods* (Berhow, M.A., Hasewaga, S. y Manners, G.D., eds.). American Chemical Society, Washington, 73-95.

Meza, V., Sanchez-Ruiz, M., Pérez-Mateos, M. y Busto, M.D. (2001). Degradation of limonin by new microorganisms isolated from a mixture of soil and waste citrus compost. *10th European Congress on Biotechnology*. Madrid, España.

Meza, V.J. (2003). Biosíntesis microbiana del complejo naringinasa y su inmovilización aplicada al desamargado de zumo de cítricos. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Burgos, España.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**: 426-428.

Miller, E.G., Gonzales-Sanders, A.P., Couvillon, A.M., Wright, J.M., Hasewaga, S. y Lam, L.K.T. (1994). Inhibition of oral carcinogenesis by green coffee beans and limonoid glucosides. En: *Food phytochemicals for cancer prevention I* (Huang, M.T., Osawa, T., Ho, C.-T., Resen, R.T., eds.). American Chemical Society, Washinton,: 220-229.

Miyake, M., Shimode, M., Osajima, Y., Inaba, N., Ayano, S., Ozaki, Y. y Hasegawa, S. (2000). Extraction and recovery of limonoids with the supercritical carbon dioxide micro-bubble method. En: *Citrus Limonoids. Functional Chemicals in Agriculture and Foods* (Berhow, M. A., Hasegawa, S. y Manners, G. D., eds.). American Chemical Society, Washington, 96-106.

Monopoli, V.D., Pizzio, L.R. y Blanco, M.N. (2008). Polyvinyl alcohol-polyethylenglycol blends with tungstophosphoric acid addition: Synthesis and characterization. *Materials Chemistry and Physics*, **108**: 331-336.

Montenegro, I., Arraes, G. y Wilane, R. (1995). Physical-chemical changes during extraction and clarification of guava juice. *Food Chemistry*, **54**: 383-386.

Moriyama, K., Wakabayashi, R., Goto, M. y Kamiya, N. (2015). Characterization of enzymatically gellable, phenolated linear poly(ethylene glycol) with different molecular weights for encapsulating living cells. *Biochemical Engineering Journal*, **93**:25-30.

Morre, M.L., Maggi, L., Vigo, D., Galli, A., Bornaghi, V., Maffeo, G. y Conte, U. (2000). Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads.

Biomaterials, **21**: 1493-1498.

Mukund, P., Belur, P.D. y Saidutta, M.B. (2014). Production of naringinase from a new soil isolate, *Bacillus methylotrophicus*: isolation, optimization and scale-up studies. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **44**: 146-163.

Munish, P., Kaur, L. y Marwaha, S.S. (2002). Partial purification and characterization of limonoato dehydrogenase from *Rhodococcus fascians* for the degradation of limonin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**: 669-673.

Navarro, J., Pérez, R., Gasque, F. y Lafuente, B. (1979). Influencia de las características del zumo de naranja sobre su calidad y estabilidad durante el almacenamiento aséptico refrigerado. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **20**: 389-398.

Neji, P. y Jayaprakasha. (2001). Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extracts. *European Food Research and Technology*, **213**: 484-487.

Ni, H., Chen, F., Cai, H., Xiao, A., You, Q. y Lu, Y. (2012). Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juices. *Journal of Food Science*, **71**: 1-7.

Nigam, S.C., Tsao I-F., Sakode, A. y Wong, H.Y. (1988). Techniques for preparing hidrogel membrane capsules. *Biorechnol Letters*, **2**: 271-276.

Zain, N.A.M., Suhaimi, M.S. y Idris, A. (2011). Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochemistry*, **46**: 2122-2129.

Oh, C.Y. y Park, J.K. (1998). The characteristics of encapsulated whole cell β -galactosidase. *Bioprocess Engineering*, **19**: 419-425.

Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, L.A.P., Freitas, O. y Favaro-Trindade, C.S. (2007a). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, **25**: 1687-1693.

Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O. y Favaro-Trindade, C.S. (2007b). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*, **24**: 685-693.

Park, J.K. y Chang, H.N. (1979). Preparation and characterization of immobilized naringinase on porous glass beads. *Journal of Fermentation Technology*, **57**: 310-316.

Park, J.K. y Chang, H.N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology*

Advances, **18**: 303-319.

Park, J.K., Jeong, G.S. y Chang, H.N. (1997). The effect of oxygen transfer on the activity of encapsulated whole cell β -galactosidase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **17**: 197-202.

Park, J.K. y Jung, J.Y. (2002). Production of benzaldehyde by encapsulated whole-cell benzoylformate decarboxylase. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 726-733.

Park, J.K. y Lee, K.D. (2001). Production of L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) by encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **18**: 363-370.

Patel, A.V., Pusch, I., Mix-Wagner, G. y Vorlop, K.D. (2000). A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Reports*, **19**: 868-874.

Patel, V., Müller, I., Mix-Wagner, G. y Vorlop, K.D. (1996). Hollow-beads for artificial seed construction. *International Workshop on Bioencapsulation V*, P-17, Postdam, Alemania.

Patil, B.S., Jayaprakasha, G.K., Chindambara Murthy, K.N. y Amit Vikram. (2009). Bioactive Compounds: Historical perspectives, opportunities and challenges. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57**: 8142-8160.

Pifferi, P.G., Manenti, I., Morselli, L. y Spagna, G. (1993). Isolation and purification of limonin from lemon seeds. *Italian Journal of Food Science*, **3**: 269-276.

Pilar-Izquierdo, M.C., Busto, M.D., Ortega, N. y Pérez-Mateos, M. (2013). Barley seeds encapsulated in calcium-alginate gels with phosphatase and humate-phosphatase complexes for improving phosphorus bioavailability. *Agronomy Journal*, **105**: 1565-1570.

Pino, J.A. (1997). Los flavonoides presentes en los cítricos. *Alimentaria*, **286**: 63-79.

Poraj-Kobielska, M., Peter, S., Leonhardt, S., Ullrich, R., Sheibner, K. y Hofrichter, M. (2015). Immobilization of unspecific peroxygenases (EC 1.11.2:1) in PVA/PEG gel and hollow-fiber modules. *Biochemical Engineering Journal*, **98**: 144-150.

Poulose, S.M., Haris, E.D. y Patil, B.S. (2005). Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Journal of Nutrition*, **135**: 870-877.

Prakas, S., Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. (2002). Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradise*) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**: 394-397.

Premi, R.B., Joshi, V.K. y Lal, B.B. (1998). Physico chemical and sensory qualities of

Kinnow juice debittered by immobilized cells of *Arthrobacter globiformis* II. *Journal of Science and Industrial Research*, **57**: 698-702.

Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J. y Vorlop, K.D. (1998). New process (jet cutting method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chemical Engineering and Technology*, **21**: 29-33.

Puri, M. (2000). Production, purification and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, **18**: 207-217.

Puri, M., Kaur, A., Singh, R.S. y Kanwar, J.R. (2008). Immobilized enzyme technology for detittering citrus juices. En: *Food Enzymes Applications of New Technologies* (Busto, M.D., Ortega, N., eds.). Transworld Research Network, Trivandrum, 91-103.

Puri, M., Kaur, A., Singh, R.S. y Schwarz, W.H. (2010). One-step purification and immobilization of His-tagged rhamnosidase for naringin hydrolysis. *Process Biochemistry*, **45**: 451-456.

Puri, M., Marwaha, S.S. y Kothari, R.M. (1996). Comparative kinetic characterization of soluble and alginate entrapped naringinase. *Enzyme and Microbial Technology*, **18**: 281-285.

Rajam, R. y Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *Food Science and Technology*, **60**: 773-780.

Rao, T.R., Omkaram, I., Brahmam, K.V. y Raju, Ch.L. (2013). Role of copper content on EPR, susceptibility and optical studies in poly (vinylalcohol) (PVA) complexed poly (ethyleneglycol) (PEG) polymer films. *Journal of Molecular Structure*, **1036**: 94-101.

Rao, T.R., Omkaram, I., Sumalatha, B., Brahmam, K.V. y Raju, Ch.L. (2012). Electron paramagnetic resonance and optical absorption studies of manganese ions doped in polyvinyl(alcohol) complexed with polyethylene glycol polymer films. *Ionics*, **18**: 695-701.

Rathore, S., Kumer Desai, P, M., Liew, C.V., Chan, L.W. y Sia Heng, P.W. (2013) Microencapsultaion of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, **116**: 369-381.

Reddeppa, N., Reddy, T.J.R., Achari, B.V.R., Rao, V.V.R.N. y Sharma, A.K. (2009). Electrical and optical characterization of (PEO+PVAc)polyblend films. *Ionics*, **15**: 255-259.

Ribeiro, I.A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H. y Ribeiro, M.H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **52-53**: 13-18.

Ribeiro, M.H.L., Silveira, D. y Ferreira-Diaz, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *European Food Research and Technology*, **215**: 462-471.

Richard, J.A., Kelly, I., Marion, D., Pézolet, R. y Auger, M. (2002). Interaction between-purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a ³¹P-NMR and infrared spectroscopic. *Biophysical Journal*, **83**: 2074-2083.

Richard, P. y Hilditch, S. (2009). D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied and Microbial Biotechnology*, **82**: 597-604.

Ronnenberg, T.A., Hasewaga, S., Suhayda, C. y Ozaki, Y. (1995). Limonin glucoside β -glucosidase activity in lemon seeds. *Phytochemistry*, **39**: 1305-1307.

Rosevear, A. (1984). Immobilized biocatalysts – a critical review. *Journal of Chemical Technology and B-Biotechnology*, **34**: 127-150.

Rosson, D.P. y Chirpich, T.P. (1989). The sucrose of breakfast cereals. En: *Practical Biochemistry for Colleges* (Wood, E.J., ed.). Pergamon Press, Leeds, 197.

Rothschild, G. y Karsenty, A. (1974). Cloud loss during storage of pasteurised citrus juices and concentrates. *Journal of Food Science*, **39**: 1037-1041.

Sakai, S., Ono, T., Ijima, H. y Kawakami, K. (2002). Aminopropyl-silicate membrane for microcapsule shaped bioartificial organs: control of molecular permeability. *Journal of Membrane Science*, **202**: 73-80.

Seguí, M.V., Navarro, J.L., Sendra, J.M. y Gasque, F. (1992). Determinación de limonina en zumo de naranja por cromatografía líquida de alta resolución. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **32**: 165-173.

Sekeroglu, G., Fadiloglu, S. y Gogus, F. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, **224**: 55-60.

Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., Von Stockar, V. y Marison, I.W. (2000). Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, **70**: 41-53.

Schenk Mayerová, A., Bucko, M., Gemeiner, P., Chorvát, D. y Lacík, I. (2012). Viability of free and encapsulated *Echerichia coli* overexpressing cyclopentanone monooxygenase monitored during model Baeyer-Villiger biooxidation by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters*, **34**: 309-314.

Shaw, P.E., Baines, L., Milnes, B.A. y Agmon, G. (2000). Commercial debittering processes to upgrade quality of citrus juices products. En: *Citrus limonoids*. American Chemical Society, Washington, 120-131.

Shah, N.P. y Ravula, R.R. (2000). Microencapsulation fo probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *The Australian Journal of Airy Technology*, **55**: 139-144.

Shaota, P., Sharma, S. y Pandove, G. (2013). A novel bioprocessing debittering fermentation technology by *Clavispora lusitaniae* mutant. *Research Journal of Biotechnology*, **8**: 12-17.

Singh, L. y A. Wahid, Z. (2015). Enhancement of hydrogen production from palm oil mill effluent via cell immobilization technique. *International Journal of Energy Research*, **39**: 215-222.

Singh, S.V., Jain, R.K., Gupta, A.K. y Dhatt, A.S. (2003). Debittering of citrus juices- A Review. *Journal of Food Science and Technology*, **40**: 247-253.

Soria, F., Ellenrieder, G., Bezerra, G., Cabrera, M. y Bezerra, L. (2012). α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports. *Applied and Microbial Biotechnology*, **93**: 1127-1134.

Stinco, C.M., Fernández-Vazquez, D.H., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. y Vicario, I.M. (2013). Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. *Journal of Food Engineering*, **116**: 155-161.

Suhayda, C.G., Omura, M. y Hasegawa, S. (1995). Limonoate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*: the native enzyme and its N-terminal sequence. *Phytochemistry*, **40**: 17-20.

Sun, C., Chen, K., Chen, Y. y Chen, Q. (2005). Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry*, **93**: 599-605.

Szczesna-Antczak, M. y Galas, E. (2001). *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA-cryogels. *Biomolecular Engineering*, **17**: 55-63.

Talebnia, F., Niklasson, C. y Taherzadeh, M.J. (2005). Ethanol production from glucose and dilute-acid hydrolyzates by encapsulated *S. cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, **90**: 345-353.

Talebnia, F. y Taherzadeh, M.J. (2006). In situ detoxification and continuous cultivation

of dilute acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **125**: 377-384.

Tallarico, P., Todisco, S. y Drioll, E.(1998). Use of ultrafiltration in the prevention of orange juice bitterness and effects on the aroma compounds distribution. *Agro Food Industry Hi-Tech*, **9**: 32-36.

Tanriseven, A. y Doan, S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, **36**: 1081-1083.

Tatum, J.H. y Berry, R.E. (1973). Method for estimating limonin content of citrus juices. *Journal of Food Science*, **38**: 1244-1246.

Thirkettle, J. (2000). SB-253514 and analogues; Novel inhibitors of lipoprotein associated phospholipase A(2) produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. III. Biotransformation using naringinase. *Journal of Antibiotics*, **53**: 733-735.

Tirillini, B. (2000). Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia*, **71**: 29-37.

Trevan, M. (1990). Tecnología enzimática. En: *Biotecnología: Principios Biológicos*. (Trevan, M., Boffey, S., Goulding, K. y Stanbury, P., eds.). Acribia, Zaragoza, 169-264.

Tribess, T.B., Rodas, M.A.D., Della Torre, J.C.D. y Tadini, C.C. (2009). The effect of refrigerated storage on sensory profile and physical-chemical characteristics of minimally pasteurized orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, **36**: 264-280.

Tsen, H.Y., Tsai, S.Y. y Gee-Kaite, Y. (1989). Fibre entrapment of naringinase from *Penicillium* species and application to fruit juice. *Journal of Fermentation Technology*, **62**: 263-267.

Tu, L., He, Y.H., Yang, H.B., Wu, Z.S. y Yi, L.J. (2015). Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **26**: 735-749.

Uludag, H., De Vos, P. y Tresco, P.A. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. *Advance Drug Delivery Reviews*, **42**: 29-64.

Vaks, B. y Lifshitz, A. (1981). Debittering of orange juice by bacteria which degrade limonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**: 1258-1261.

Verma, J.P., Songh, S., Ghosh, M. y Srivastava, P.K. (2010). Identification and characterization of cellular locus of limonin biotransforming enzyme in *Pseudomonas putide*. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**: 319-326.

Westman, J.O., Ylittervo, P., Franzén, C.J. y Taherzadeh, M.J. (2012). Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. *Applied and Microbial Biotechnology*, **96**: 1441-1454.

Wu, K.Y., Wisecorver, K.D. (1992). Cell Immobilization using PVA crosslinked with Boric acid. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 447-449.

Yadav, S., Yadav, R.S.S. y Yadav, K.D.S. (2013). An α -L-rhamnosidase from *Aspergillus awamori* MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**: 927-933.

Ylittervo, P., Franzén, C.J. y Taherzadeh, M.J. (2012). Mechanically robust polysioxane-ACA capsules for prolonged ethanol production. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*, **88**: 1080-1088.

Yu, J., Wang, L.M., Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M. y Patil, B.S. (2006). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 2009-2014.

Zain, N.A.M., Suhaimi, M.S. y Idris, A. (2011). Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochemistry*, **46**: 2122-2129.

Zhao, R., Sun, J., Torley, P., Wang, D. y Niu, S. (2008). Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 1349-1354.

Zou, H., Wu, S. y Shen, J. (2008). Polymer silica nanocomposites: preparation, characterization, properties and applications. *Chemical Reviews*, **108**: 3893-3957.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones más destacadas que se pueden extraer de la investigación realizada se detallan a continuación agrupadas en base a los objetivos planteados:

A. *Producción de biomasa activa en enzimas que degradan limonina.*

- El proceso de acondicionamiento mejoraba notablemente la tolerancia de las cepas de *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 y *Microbacterium flavescens* a los componentes presentes en los cítricos, obteniéndose los niveles de biomasa más elevados con la concentración de extracto de cáscara de naranja del 20%.
- La cepa de *R. fascians* NRRL-B-15096 acondicionada era la que presentaba una mayor capacidad de crecimiento en medios suplementados con limonina y con un metabolismo enzimático más activo en la degradación del compuesto amargo.

B. *Inmovilización de las células acondicionadas por atrapamiento en matrices poliméricas y estudio de su eficacia en la degradación de limonina en sistemas modelo.*

b1. *Inmovilización en criogeles de PVA*

- La incorporación de PEG mejoraba la estabilidad de los criogeles de PVA y la efectividad en la degradación de limonina del biocatalizador inmovilizado con este soporte.
- La estabilidad de los inmovilizados aumentaba con las concentraciones más altas de PEG(10%) y PVA(8%) en detrimento de la efectividad en la degradación de limonina.
- El efecto concentración de inóculo se veía reducido al incrementar la concentración de PVA al (8%).
- En las pruebas de optimización, en base a criterios conjuntos de estabilidad, tiempos de operación y capacidad en la degradación de limonina, los resultados más satisfactorios se obtuvieron con los inmovilizados en criogeles de PVA(8%)-PEG(8%), con una degradación de limonina del 100% después de 168 h.
- Los inmovilizados obtenidos con PVA(8%)-PEG(8%) permanecían operativos durante tres ciclos de reutilización, con niveles de degradación de limonina que no superaban el 19% por ciclo (24 h).

b2. *Inmovilización por encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio*

- Las diferencias en la degradación de limonina entre los diferentes inóculos microbianos se reducía con la concentración de CaCl_2 del 4%, alcanzándose en todos los casos un 100% de degradación a las 168 h.

- Los inmovilizados obtenidos con alginato de sodio al 2%, CMC 4% y CaCl_2 al 4% permanecían operativos durante tres ciclos de reutilización, con niveles de degradación de limonina por ciclo (24 h) no superiores al 24,5%.
- Para ambos protocolos de inmovilización, inóculos microbianos superiores a 0,6 DO generaban numerosos problemas de tipo operativo para la obtención de inmovilizados íntegros y estables.

C. Aplicación de los inmovilizados en zumo sintético y zumo natural de naranja. Estabilidad y eficacia en la degradación de limonina.

c1. Zumos sintéticos

- La presencia en el zumo sintético de concentraciones elevadas de glucosa provocaba un efecto desestabilizante de la estructura del criogel de PVA-PEG, que se minimizaba al incrementar la concentración de PEG al 10%. En estas condiciones, la concentración de PVA al 8% mejoraba la consistencia de las perlas pero reducía la eficacia en la degradación de limonina.
- No se produjeron diferencias destacadas en la eficacia de los inmovilizados en PVA-PEG en la degradación de limonina a pH 3, 4 y 5.
- El soporte de inmovilización (perlas huecas de alginato de calcio) mantenía su integridad física en zumos sintéticos a los pHs más ácidos de 2, 3 y 4, independientemente de la temperatura (25 ó 4°C). Por el contrario, a pH 5 los inmovilizados sufrían una clara degradación haciéndolos no operativos después de 24 h.
- Los niveles más altos de degradación de limonina obtenidos en zumo sintéticos, con inmovilizados en geles PVA-PEG o encapsulados en geles de alginato de calcio, no superaban el 40-46% después de 96 h de tratamiento. No obstante, a tiempos cortos de 24 h la eficacia de la mayoría de los inmovilizados con inóculos de 0,6 DO no presentaban diferencias significativas con los sistemas modelo.

c2. Zumo natural de naranja

- Los inmovilizados en geles de PVA(8%)-PEG(8%) resultaban ser más estables en zumo natural de naranja que en zumo sintético, con niveles de degradación de limonoides a las 24 h de tratamiento del 21,05%.
- Los inmovilizados en criogeles permitían hasta cuatro ciclos de reutilización de 24 h mientras que los encapsulados sólo admitían dos ciclos operativos.
- Los inmovilizados en criogeles presentaban una mayor estabilidad y efectividad en la

degradación de limonoides (μg de limonina/ml) que los encapsulados en geles de alginato de calcio.

- El tratamiento del zumo natural de naranja con *R. fascians* inmovilizado por atrapamiento en criogeles o encapsulación no implicaba modificación apreciable de las principales características físico-químicas del zumo (color, turbidez, pH, sólidos solubles, acidez) y mantenía también sin cambios el contenido en compuestos fenólicos.

7. ANEXOS

ANEXOS

Tabla 7.1. Producción de biomasa de *R fascians* en medio MM suplementado con extracto de cáscara de naranja (48 h, 25 °C y 150 rpm).

Extracto cáscara de naranja (%)	X	S	CV%
0 ^{aD}	1,482	0,012	0,83
5 ^C	0,211	0,072	34,17
10 ^C	0,200	0,012	5,90
20 ^C	0,183	0,027	14,67
40 ^B	0,062	0,015	24,66
60 ^{AB}	0,023	0,006	28,44
80 ^A	0,000	0,000	0,00
100 ^A	0,000	0,000	0,00
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (extracto cáscara de naranja (%))	924,94	0,0000	

^aMuestra control; medio MM sin extracto de cáscara de naranja

Tabla 7.2. Producción de biomasa de *M. flavescens* en medio MM suplementado con extracto de cáscara de naranja (48 h, 25 °C y 150 rpm).

Extracto cáscara de naranja (%)	X	S	CV%
0 ^{aB}	1,815	0,006	0,34
5 ^C	2,301	0,007	0,31
10 ^E	2,701	0,075	2,78
20 ^D	2,497	0,052	2,08
40 ^A	0,191	0,016	8,13
60 ^A	0,067	0,021	30,95
80 ^A	0,067	0,045	67,18
100 ^A	0,038	0,015	38,01
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (extracto cáscara de naranja (%))	3159,93	0,0000	

^aMuestra control; medio MM sin extracto de cáscara de naranja

Tabla 7.3. Efecto del proceso de acondicionamiento de *R. fascians* a concentraciones crecientes de extracto de cáscara de naranja sobre el crecimiento celular (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Extracto cáscara de naranja (%)	X	S	CV%
0 ^{aE}	1,003	0,003	0,26
5 ^F	1,517	0,002	0,13
10 ^G	1,684	0,004	0,24
20 ^H	2,098	0,002	0,08
40 ^D	0,747	0,002	0,20
60 ^C	0,203	0,001	0,28
80 ^B	0,154	0,002	1,30
100 ^A	0,045	0,009	20,37
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (extracto cáscara de naranja (%))	120173,33	0,0000	

^aMuestra control; medio MM sin extracto de cáscara de naranja.

Tabla 7.4. Efecto del proceso de acondicionamiento de *M. flavescens* a concentraciones crecientes de extracto de cáscara de naranja sobre el crecimiento celular (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Extracto cáscara de naranja (%)	X	S	CV%
0 ^{aB}	1,529	0,012	0,79
5 ^C	1,769	0,003	0,20
10 ^D	1,863	0,042	2,24
20 ^G	2,245	0,004	0,17
40 ^F	2,140	0,004	0,19
60 ^E	2,004	0,002	0,08
80 ^B	1,502	0,006	0,40
100 ^A	0,956	0,004	0,44
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (extracto cáscara de naranja (%))	2104,74	0,0000	

^aMuestra control; medio MM sin extracto de cáscara de naranja.

Tabla 7.5. Efecto de la concentración de limonina en la producción de biomasa de cepas acondicionadas de *R. fascians* (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Limónina en el medio de cultivo (ppm)	X	S	CV %
0 ^{aA}	0,782	0,016	2,07
100 ^B	0,855	0,005	0,54
200 ^C	0,988	0,054	5,50
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (limónina en el medio de cultivo (ppm))	40,42	0,0000	

^aMuestra control; medio MM sin limonina.**Tabla 7.6.** Efecto de la concentración de limonina en la producción de biomasa de cepas acondicionadas de *M. flavescens* (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Limónina en el medio de cultivo (ppm)	X	S	CV %
0 ^{aA}	0,643	0,016	2,43
100 ^{AB}	0,693	0,001	0,17
200 ^B	0,757	0,023	3,05
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (limónina en el medio de cultivo (ppm))	6,14	0,0182	

^aMuestra control; medio MM sin limonina.**Tabla 7.7.** Contenido en azúcares reductores en medios de cultivo con *R. fascians* a diferentes concentraciones de limonina a las 96 h de cultivo (25°C y 150 rpm).

Limónina en el medio de cultivo (ppm)	X	S	CV %
0 ^{aA}	1572,0	0,112	0,07
100 ^A	1619,0	0,081	0,31
200 ^B	1842,0	0,098	0,05
ANOVA			
FACTOR	F	p	
a (limónina en el medio de cultivo (ppm))	8,72	0,0078	

^aMuestra control; medio MM sin limonina.

Tabla 7.8. Contenido en azúcares reductores en medios de cultivo con *M. flavescens* a diferentes concentraciones de limonina (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Limónina en el medio de cultivo (ppm)	X	S	CV%
0 ^{aA}	1059,0	0,015	0,001
100 ^B	1223,0	0,012	9,81 ⁻⁴
200 ^C	1334,0	0,039	0,003
ANOVA			
FACTOR	F		p
a (limónina en el medio de cultivo (ppm))	121,56		0,0000

^aMuestra control; medio MM sin limonina.

Tabla 7.9. Degradación de limonina por cepas de *R. fascians* y *M. flavescens* en medios de cultivo MM con diferentes concentraciones de limonina a las (96 h, 25 °C y 150 rpm).

Limónina (ppm)	Limónina (ppm)					
	Cepa microbiana					
	<i>Rhodococcus fascians</i> ^A			<i>Microbacterium flavescens</i> ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%
100 ^A	18,8 ^A	23,2	123,5	80,6 ^A	20,3	25,2
200 ^A	7,6 ^A	11,4	150,1	116,3 ^A	8,6	7,35
ANOVA						
FACTOR		F			p	
a (limónina en el medio de cultivo)		5,91			0,0317	
b (microorganismo)		56,17			0,0000	
a*b		0,00			0,9852	
ANOVA		<i>R. fascians</i>			<i>M. flavescens</i>	
FACTOR		F	p	F	p	
Limónina en el medio de cultivo		2,51	0,1641	3,57	0,1079	

Tabla 7.10. Degradación de limonina y cinética de crecimiento microbiano de cepas de *R. fascians* acondicionadas con extracto de cáscara de naranja y sin acondicionar (25 °C y 150 rpm).

Tiempo de tratamiento (h)	Biomasa						Limonina (ppm)					
	Cepa acondicionada ^A			Cepa no acondicionada ^B			Cepa acondicionada ^A			Cepa no acondicionada ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^{AC}	0,02 ^A	0,00	4,56	0,02 ^A	0,00	8,84	55,81 ^D	3,00	5,37	58,01 ^D	1,80	3,10
24 ^{BB}	1,24 ^B	0,14	11,47	1,16 ^B	0,02	1,76	18,06 ^C	9,52	52,71	35,36 ^C	6,17	17,45
48 ^{CA}	1,71 ^C	0,04	2,28	1,69 ^D	0,01	0,33	1,82 ^A	2,23	122,50	9,49 ^B	2,23	23,50
72 ^{CA}	1,95 ^C	0,04	2,25	1,71 ^D	0,02	0,06	1,24 ^A	1,95	157,30	4,87 ^A	3,51	72,07
96 ^{CA}	1,92 ^C	0,01	0,33	1,57 ^C	0,06	3,97	1,82 ^A	0,00	0,00	4,68 ^A	4,11	87,82
ANOVA						ANOVA						
FACTOR		F		p		FACTOR		F		p		
a (tiempo de tratamiento)		803,56		0,0002		a (tiempo de tratamiento)		1146,31		0,0000		
b (cepa microbiana)		32,71		0,000		b (cepa microbiana)		93,68		0,0000		
a*b		8,46		0,0030		a*b		27,61		0,0000		
ANOVA	Cepa acondicionada		Cepa no acondicionada		ANOVA	Cepa acondicionada		Cepa no acondicionada				
FACTOR	F	p	F	p	FACTOR	F	p	F	p			
<i>a</i> (tiempo de tratamiento)	276,06	0,0000	1020,44	0,0000	<i>a</i> tiempo de cultivo	647,46	0,0000	657,02	0,0000			

Tabla 7.11. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA al 8% a diferentes concentraciones de inóculo (25 °C y 100 rpm).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)								
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)								
	0,6 ^C			0,9 ^B			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^C	60,0 ^B	6,34	10,57	60,0 ^B	18,67	31,12	60,0 ^B	9,34	15,57
24 ^{AB}	60,0 ^B	6,94	11,57	56,76 ^{AB}	5,70	10,04	48,72 ^A	5,87	12,05
48 ^A	60,0 ^B	7,99	13,32	47,64 ^A	7,17	15,05	41,52 ^A	9,28	22,35
72 ^{BC}	60,0 ^B	5,91	9,85	—	—	—	—	—	—
144 ^{ABC}	51,92 ^A	4,52	8,71	—	—	—	—	—	—
ANOVA									
FACTOR			F			P			
a (tiempo de tratamiento)			14,35			0,0000			
b (concentración de inóculo microbiano)			8,74			0,0000			
ANOVA	0,6		ANOVA	0,9		ANOVA	1,2		
FACTOR	F	P	FACTOR	F	P	FACTOR	F	P	
a (tiempo de tratamiento)	5,37	0,0018	a (tiempo de tratamiento)	3,62	0,0476	a (tiempo de tratamiento)	28,42	0,0000	

Tabla 7.12. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* (0,6 DO) inmovilizado en geles de PVA-PEG.

Tiempo de tratamiento (h)	limonina (ppm)																	
	PVA 6% (p/v) ^C						PVA 7% (p/v) ^B						PVA 8% (p/v) ^A					
	PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (p/v) ^{AA}			PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (p/v) ^{AA}			PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (p/v) ^{AA}		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^A	71,08 ^A	2,0	2,7	60,74 ^A	6,8	11,2	56,11 ^A	6,0	10,7	59,91 ^A	4,0	6,7	59,69 ^A	4,1	6,9	60,70 ^A	5,2	8,6
24 ^B	34,27 ^B	3,6	10,6	51,66 ^B	4,5	8,7	45,55 ^B	2,6	5,7	44,23 ^B	4,0	9,0	52,26 ^B	5,0	9,6	50,01 ^B	3,4	6,8
48 ^C	11,06 ^C	1,5	13,9	48,69 ^C	0,6	1,2	38,95 ^C	5,9	15,1	43,24 ^C	1,7	3,9	44,98 ^C	2,9	6,4	52,73 ^C	1,0	1,9
72 ^D	5,45 ^D	0,6	11,2	36,47 ^D	1,5	4,1	34,66 ^D	1,7	4,9	41,92 ^D	1,4	3,3	35,08 ^D	1,5	4,3	47,41 ^D	0,6	1,3
96 ^D	—	—	—	27,20 ^E	4,0	14,7	35,15 ^E	1,7	4,8	38,95 ^E	2,1	5,4	40,44 ^E	2,3	5,7	39,36 ^E	1,1	2,8
168 ^E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,00 ^F	0,0	0,0	20,55 ^F	0,6	2,9
ANOVA																		
FACTOR						F						P						
a (tiempo de tratamiento)						163,61						0,0000						
b (concentración de PVA)						43,14						0,0000						
c (concentración de PEG)						73,74						0,0000						
a*b						13,50						0,0000						
b*c						17,30						0,0000						
ANOVA			PVA 6% (p/v)			ANOVA			PVA 7% (p/v)			ANOVA			PVA 8% (p/v)			
FACTOR			F	P	FACTOR			F	P	FACTOR			F	P				
a (tiempo de tratamiento)			5446,22	0,0000	a (tiempo de tratamiento)			1603,84	0,0015	a (tiempo de tratamiento)			5875,31	0,0000				
b (concentración de PEG)			1713,21	0,0000	b (concentración de PEG)			13,46	0,0000	b (concentración de PEG)			963,45	0,0000				
a*b			1839,34	0,0000	a*b			59,76	0,0000	a*b			415,09	0,0000				

Tabla 7.13. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(6%)-PEG(8%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^B			0,4 ^B			0,6 ^A			0,9 ^A			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^D	72,62	5,43	7,48	69,76	0,76	1,09	71,08	1,98	2,79	71,41	3,52	4,93	71,17	0,68	0,96
24 ^C	54,41	0,62	1,14	49,57	4,23	8,53	34,27	3,63	10,59	39,53	5,16	13,05	32,29	1,26	3,90
48 ^B	35,37	3,23	9,13	28,55	1,41	4,94	11,06	1,54	13,92	15,02	0,78	5,19	—	—	—
72 ^A	19,31	1,87	9,68	11,06	0,88	7,96	5,45	0,61	11,19	—	—	—	—	—	—
96 ^A	15,35	1,55	10,10	21,62	2,30	10,64	—	—	—	—	—	—	—	—	—
168	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F						p					
a (tiempo de tratamiento)				318,36						0,0000					
b (inóculo microbiano)				18,73						0,0000					

Tabla 7.14. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(7%)-PEG(8%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^B			0,4 ^B			0,6 ^A			0,9 ^A			1,2 ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^C	53,47	2,1	3,9	52,04	4,3	8,3	56,11	6,0	10,7	53,50	5,1	9,5	58,59	0,7	1,2
24 ^{BC}	52,28	0,5	0,9	52,15	0,8	1,5	45,55	2,6	5,7	44,16	1,6	3,6	49,73	0,5	1,0
48 ^{AB}	50,28	1,9	3,8	48,63	0,2	0,4	38,95	5,9	15,1	33,01	2,3	6,9	46,21	1,3	2,8
72 ^A	45,06	2,4	5,3	44,23	1,5	3,4	34,66	1,7	4,9	28,89	3,4	11,8	—	—	—
96 ^A	45,55	2,1	4,6	43,27	2,6	6,0	35,15	1,7	4,8	28,68	3,8	13,2	—	—	—
168 ^A	45,39	1,2	2,6	43,41	1,8	4,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				18,71					0,0000						
b (inóculo microbiano)				16,57					0,0000						

Tabla 7.15. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(8%)-PEG(8%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^A			0,4 ^A			0,6 ^A			0,9 ^A			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^D	53,50	3,1	5,8	52,68	2,3	4,4	59,69	4,1	6,9	53,09	0,5	0,9	52,26	1,4	2,7
24 ^{CD}	50,34	0,5	1,0	47,04	1,9	4,0	52,26	5,0	9,6	44,43	1,3	2,9	41,95	0,2	0,5
48 ^{BC}	39,34	2,9	7,4	40,64	1,2	2,9	44,98	2,9	6,4	36,10	2,4	6,6	—	—	—
72 ^B	36,31	3,0	8,3	27,51	0,4	1,5	35,08	1,5	4,3	23,94	5,1	21,3	—	—	—
96 ^B	37,14	0,8	2,2	25,59	3,6	14,1	40,44	2,3	5,7	28,48	0,7	2,5	—	—	—
168 ^A	15,68	1,2	7,7	2,48	1,1	44,4	0,00	0,0	0,0	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				21,32					0,0000						
b (inóculo microbiano)				0,92					0,4724						

Tabla 7.16. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(6%)-PEG(10%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^A			0,4 ^A			0,6 ^A			0,9 ^A			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^{CD}	55,45	5,1	9,2	56,11	3,2	5,7	60,74	6,8	11,2	57,22	1,3	2,3	60,96	5,1	8,4
24 ^C	52,32	3,7	7,1	53,31	0,8	1,5	51,66	4,5	8,7	40,44	2,6	6,4	42,42	0,7	1,7
48 ^{BC}	48,69	2,4	4,9	49,84	1,9	3,8	48,69	0,6	1,2	39,45	0,9	2,3	—	—	—
72 ^{AB}	45,06	4,7	10,4	44,23	2,4	5,4	36,47	1,5	4,1	—	—	—	—	—	—
96 ^A	43,70	0,6	1,4	44,36	4,0	9,0	27,20	4,0	14,7	—	—	—	—	—	—
168 ^A	44,73	1,4	3,1	41,59	5,1	12,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				10,94					0,0000						
b (inóculo microbiano)				2,54					0,0717						

Tabla 7.17. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(7%)-PEG(10%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^B			0,4 ^B			0,6 ^{AB}			0,9 ^A			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^B	58,59	1,2	2,0	57,11	3,2	5,6	59,91	4,0	6,7	65,63	2,8	4,3	58,37	4,5	7,7
24 ^A	51,16	2,4	4,7	53,80	0,7	1,3	44,23	4,0	9,0	48,77	3,1	6,4	37,96	3,1	8,2
48 ^A	51,49	1,1	2,1	53,14	1,4	2,6	43,24	1,7	3,9	43,90	0,3	0,7	32,68	3,5	1,1
72 ^A	47,86	1,8	3,8	48,85	2,2	4,5	41,92	1,4	3,3	34,49	4,4	12,8	29,38	0,7	2,4
96 ^A	51,74	3,4	6,6	49,48	1,9	3,8	38,95	2,1	5,4	29,38	2,0	6,8	27,40	1,4	5,1
168 ^A	50,17	0,9	1,8	48,19	3,5	7,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				11,91					0,0000						
b (inóculo microbiano)				10,74					0,0001						

Tabla 7.18. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por *R. fascians* inmovilizado en geles de PVA(8%)-PEG(10%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^A			0,4 ^A			0,6 ^A			0,9 ^A			1,2 ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^D	56,69	2,4	4,2	58,80	4,3	7,3	60,70	5,2	8,6	63,59	0,9	1,4	56,66	3,5	6,2
24 ^{CD}	50,75	3,1	6,1	54,71	2,1	3,8	50,01	3,4	6,8	51,08	2,5	4,9	43,91	0,2	4,6
48 ^C	51,50	3,5	6,9	53,23	3,6	6,7	52,73	1,0	1,9	46,30	1,8	3,9	44,10	4,1	9,3
72 ^{BC}	51,12	2,7	5,3	51,62	3,8	7,4	47,41	0,6	1,3	43,70	2,2	5,0	41,96	2,8	6,7
96 ^B	47,04	0,9	1,9	43,08	0,9	2,1	39,36	1,1	2,8	36,89	3,4	9,2	33,92	2,1	6,2
168 ^A	24,51	1,5	6,1	20,80	1,7	8,2	20,55	0,6	2,9	—	—	—	—	—	—
ANOVA															
FACTOR				F						p					
a (tiempo de tratamiento)				26,63						0,0000					
b (inóculo microbiano)				1,04						0,4131					

Tabla 7.19. Evaluación de la biomasa del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%).

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)										
		0,2 ^{C AA}		0,4 ^{C A BC}		0,6 ^{A A C}		0,9 ^{B A C}		1,2 ^{BC A AB}		
		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	
6	0 ^A	0,058	0,02	0,055	0,04	0,049	0,03	0,055	0,00	0,056	0,01	
	24 ^A	0,057	0,03	0,056	0,01	0,050	0,02	0,053	0,00	0,055	0,01	
	48 ^A	0,056	0,01	0,058	0,02	0,051	0,02	0,055	0,01	—	—	
	72 ^A	0,057	0,01	0,059	0,01	0,052	0,0	—	—	—	—	
	96 ^A	0,056	0,00	0,057	0,01	—	—	—	—	—	—	
	168	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
7	0 ^A	0,053	0,01	0,053	0,01	0,050	0,01	0,056	0,02	0,055	0,05	
	24 ^A	0,053	0,00	0,054	0,01	0,055	0,01	0,052	0,01	0,054	0,01	
	48 ^A	0,053	0,00	0,054	0,02	0,054	0,01	0,049	0,04	0,056	0,01	
	72 ^A	0,050	0,02	0,053	0,02	0,053	0,01	0,054	0,01	—	—	
	96 ^A	0,053	0,05	0,053	0,02	0,055	0,00	0,057	0,00	—	—	
	168 ^A	0,050	0,01	0,054	0,02	—	—	—	—	—	—	
8	0 ^A	0,047	0,01	0,051	0,03	0,056	0,01	0,055	0,05	0,051	0,01	
	24 ^A	0,047	0,01	0,055	0,01	0,054	0,02	0,056	0,01	0,052	0,00	
	48 ^A	0,050	0,00	0,054	0,02	0,053	0,02	0,055	0,02	—	—	
	72 ^A	0,051	0,00	0,055	0,00	0,054	0,02	0,056	0,01	—	—	
	96 ^A	0,052	0,00	0,054	0,01	0,058	0,02	0,056	0,01	—	—	
	168 ^A	0,053	0,02	0,052	0,00	0,058	0,01	—	—	—	—	
ANOVA		PVA 6%				PVA 7%				PVA 8%		
FACTOR		F		p		F		p		F		p
a (tiempo de tratamiento)		1,23		0,3315		0,45		0,8078		1,54		0,2213
b (Inóculo microbiano)		22,85		0,0000		1,99		0,1356		13,26		0,0000

Tabla 7.20. Evaluación del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%).

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)										
		0,2 ^{BAA}		0,4 ^{BAA}		0,6 ^{BAA}		0,9 ^{BAA}		1,2 ^{AAA}		
		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	
6	0 ^A	6,82	0,02	6,80	0,02	6,90	0,02	6,81	0,01	6,68	0,01	
	24 ^A	6,83	0,01	6,86	0,02	6,93	0,02	6,89	0,01	6,74	0,01	
	48 ^B	6,94	0,02	6,90	0,01	6,98	0,01	6,99	0,01	—	—	
	72 ^B	7,00	0,02	7,00	0,02	6,98	0,01	—	—	—	—	
	96 ^B	7,04	0,02	7,08	0,02	—	—	—	—	—	—	
	168	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
7	0 ^A	6,77	0,01	6,70	0,01	6,71	0,02	6,74	0,02	6,81	0,02	
	24 ^{AB}	6,87	0,01	6,75	0,02	6,85	0,01	6,76	0,01	6,93	0,02	
	48 ^{BC}	6,93	0,01	6,83	0,02	6,88	0,01	6,85	0,01	7,01	0,02	
	72 ^{CD}	6,99	0,01	7,03	0,02	6,97	0,01	7,00	0,01	—	—	
	96 ^D	7,03	0,02	7,11	0,02	7,05	0,02	7,08	0,02	—	—	
	168 ^D	7,08	0,01	7,09	0,00	—	—	—	—	—	—	
8	0 ^A	6,64	0,01	6,66	0,01	6,71	0,02	6,67	0,01	6,74	0,00	
	24 ^{AB}	6,68	0,02	6,72	0,01	6,72	0,01	6,68	0,01	6,84	0,01	
	48 ^{BC}	6,86	0,01	6,86	0,02	6,92	0,02	6,85	0,01	—	—	
	72 ^C	6,97	0,02	6,93	0,01	7,05	0,02	6,97	0,00	—	—	
	96 ^C	7,02	0,01	7,08	0,02	7,10	0,01	7,00	0,00	—	—	
	168 ^C	7,05	0,02	7,07	0,02	7,10	—	—	—	—	—	
ANOVA		PVA 6%				PVA 7%				PVA 8%		
FACTOR		F		p		F		p		F		p
a (tiempo de tratamiento)		20,52		0,0000		24,13		0,0000		16,77		0,0000
b (Inóculo microbiano)		9,98		0,0001		0,72		0,5891		1,84		0,1607

Tabla 7.21. Evaluación de la biomasa del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(10%).

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)										
		0, ^{2BC BA}		0, ^{4C AB ABC}		0,6 ^{A AB BC}		0,9 ^{AB A C}		1,2 ^{BC AB AB}		
		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	
6	0 ^A	0,055	0,00	0,056	0,00	0,052	0,00	0,055	0,05	0,056	0,03	
	24 ^A	0,056	0,05	0,056	0,02	0,053	0,00	0,055	0,01	0,054	0,03	
	48 ^A	0,057	0,02	0,058	0,02	0,053	0,00	0,055	0,02	—	—	
	72 ^A	0,055	0,04	0,058	0,01	0,053	0,03	—	—	—	—	
	96 ^A	0,058	0,05	0,058	0,03	0,054	0,01	—	—	—	—	
	168 ^A	0,054	0,03	0,056	0,04	—	—	—	—	—	—	
7	0 ^A	0,055	0,01	0,055	0,04	0,052	0,04	0,056	0,01	0,054	0,00	
	24 ^A	0,054	0,02	0,054	0,01	0,055	0,03	0,054	0,03	0,054	0,00	
	48 ^A	0,055	0,04	0,054	0,00	0,052	0,02	0,051	0,02	0,055	0,01	
	72 ^A	0,054	0,01	0,055	0,00	0,053	0,03	0,053	0,02	0,054	0,02	
	96 ^A	0,054	0,03	0,054	0,00	0,054	0,01	0,056	0,00	0,054	0,01	
	168 ^A	0,053	0,02	0,054	0,05	—	—	—	—	—	—	
8	0 ^A	0,051	0,04	0,053	0,00	0,054	0,01	0,054	0,03	0,053	0,01	
	24 ^A	0,052	0,01	0,054	0,00	0,053	0,07	0,055	0,04	0,053	0,02	
	48 ^A	0,052	0,00	0,055	0,06	0,053	0,02	0,055	0,03	0,053	0,01	
	72 ^A	0,052	0,02	0,054	0,01	0,054	0,03	0,056	0,02	0,053	0,02	
	96 ^A	0,053	0,01	0,054	0,02	0,057	0,02	0,057	0,02	0,053	0,02	
	168 ^A	0,054	0,03	0,052	0,05	0,057	0,01	—	—	—	—	
ANOVA		PVA 6%				PVA 7%				PVA 8%		
FACTOR		F		p		F		p		F		p
a (tiempo de tratamiento)		1,54		0,2232		0,78		0,5729		1,16		0,3610
b (Inóculo microbiano)		10,83		0,0001		3,24		0,0335		7,95		0,0005

Tabla 7.22. Evaluación del pH del medio de degradación de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(10%).

PVA (%,p/v)	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)									
		0,2 ^{B AB AB}		0,4 ^{B A AB}		0,6 ^{B A B}		0,9 ^{B AB A}		1,2 ^{A B AB}	
		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
6	0 ^{AB}	6,84	0,02	6,85	0,03	6,89	0,01	6,81	0,00	6,68	0,02
	24 ^{AB}	6,83	0,02	6,86	0,05	6,93	0,00	6,89	0,00	6,74	0,01
	48 ^B	6,95	0,01	6,90	0,00	6,98	0,02	6,99	0,01	—	—
	72 ^B	7,02	0,02	7,01	0,01	7,00	0,02	—	—	—	—
	96 ^B	7,05	0,02	7,08	0,02	7,02	0,01	—	—	—	—
	168 ^A	7,10	0,01	7,06	0,02	—	—	—	—	—	—
7	0 ^A	6,80	0,03	6,71	0,00	6,74	0,05	6,80	0,04	6,83	0,02
	24 ^{AB}	6,86	0,01	6,74	0,01	6,87	0,01	6,81	0,01	6,94	0,02
	48 ^B	6,93	0,04	6,84	0,01	6,88	0,01	6,88	0,01	7,03	0,02
	72 ^C	7,01	0,01	7,04	0,01	6,97	0,04	7,02	0,03	7,03	0,01
	96 ^C	7,02	0,01	7,10	0,00	7,05	0,03	7,09	0,03	7,11	0,01
	168 ^C	7,08	0,02	7,09	0,02	—	—	—	—	—	—
8	0 ^A	6,66	0,01	6,69	0,04	6,72	0,02	6,67	—	6,77	0,02
	24 ^A	6,70	0,02	6,74	0,02	6,74	0,03	6,70	—	6,86	0,06
	48 ^B	6,87	0,01	6,89	0,01	6,94	0,02	6,87	—	6,90	0,01
	72 ^C	6,99	0,01	6,95	0,01	7,04	0,02	6,99	—	6,99	0,04
	96 ^C	7,03	0,01	7,08	0,01	7,11	0,02	7,00	—	7,03	0,07
	168 ^C	7,07	0,01	7,09	0,02	7,12	0,01	—	—	—	—
ANOVA		PVA 6%				PVA 7%				PVA 8%	
FACTOR		F	p	F	p	F	p	F	p		
a (tiempo de tratamiento)		6,48	0,0010	44,33	0,0000	76,70	0,0000	3,54	0,0243		
b (Inóculo microbiano)		12,87	0,0000	4,00	0,0152	3,54	0,0243				

Tabla 7.23. Efectividad en la degradación de limonina y estabilidad operacional en medio de cultivo MM de células de *R. fascians* inmovilizadas en PVA-PEG.

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)																	
	PVA 6% (p/v)						PVA 7% (p/v)						PVA 8% (p/v)					
	PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (0/v) ^{AA}			PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (p/v) ^{AA}			PEG 8% (p/v) ^{BB}			PEG 10% (p/v) ^{AA}		
	X	S	CV(%)	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
1 ^{C B D C}	48,57 ^A	0,9	1,8	51,4 ^B	5,8	11,3	47,2 ^D	4,0	8,5	48,1 ^D	10,4	21,6	49,1 ^C	4,2	8,5	52,9 ^C	2,6	4,9
2 ^{BC B C C}	49,16 ^A	5,9	12,0	52,4 ^{AB}	1,9	3,6	49,1 ^C	0,4	0,8	50,2 ^C	0,3	0,6	48,9 ^C	2,6	5,32	53,2 ^C	0,5	0,9
3 ^{B A B B}	49,67 ^A	3,3	6,6	53,84 ^A	1,4	2,6	53,4 ^B	10	18,7	53,3 ^B	8,1	15,2	50,9 ^B	13,7	26,9	55,6 ^B	5,9	10,6
4 ^{A A A}	—	—	—	—	—	—	60,0 ^A	1,21	2,1	60,0 ^A	1,9	3,2	58,8 ^A	3,2	5,4	59,4 ^A	2,5	4,2
ANOVA																		
FACTOR						F						p						
a (ciclos)						47,98						0,0000						
b (concentración de PVA)						1,56						0,2540						
c (concentración de PEG)						22,57						0,0003						
b*c						3,99						0,0409						
ANOVA			PVA 6% (p/v)			ANOVA			PVA 7% (p/v)			ANOVA			PVA 8% (p/v)			
FACTOR			F	p		FACTOR			F	p		FACTOR			F	p		
a (ciclos)			12,95	0,0010		a (ciclos)			656,52	0,0000		a (ciclos)			276,16	0,0000		
b (concentración de PEG)			145,52	0,0000		b (concentración de PEG)			4,85	0,0427		b (concentración de PEG)			256,88	0,0000		
a*b			1,95	0,1848		a*b			2,06	0,1466		a*b			11,07	0,0004		
ANOVA			PVA 6% (p/v)				PVA 7% (p/v)				PVA 8% (p/v)							
FACTOR			PEG 8% (p/v)		PEG 10% (p/v)		PEG 8% (p/v)		PEG 10% (p/v)		PEG 8% (p/v)		PEG 10% (p/v)					
FACTOR			F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P				
Ciclos			2,52	0,1601	12,38	0,0074	358,88	0,0000	300,75	0,0000	145,58	0,0000	84,60	0,0000				

Tabla 7.24. Evaluación De la biomasa y el pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogel de PVA-PEG(8%).

PVA (% p/v)		Ciclos de reutilización	Biomasa			pH						
			X	S	CV%	X	S	CV%				
6	t=0h ^{AA}	1 ^{AA}	0,055	0,05	90,91	6,83	0,04	0,59				
		2 ^{AB}	0,055	0,02	36,36	6,84	0,04	0,58				
		3 ^{AC}	0,054	0,02	37,04	6,90	0,01	0,14				
		4 ^{ABC}	—	—	—	—	—	—				
	t=24h ^{AA}	1 ^{AA}	0,058	0,02	34,48	6,84	0,04	0,058				
		2 ^{AB}	0,056	0,02	35,71	6,85	0,03	0,44				
		3 ^{AC}	0,053	0,02	37,74	6,91	0,01	0,14				
		4 ^{ABC}	—	—	—	—	—	—				
7	t=0h ^{AA}	1 ^{AB}	0,052	0,04	76,92	6,75	0,03	8,08				
		2 ^{AA}	0,055	0,02	36,36	6,75	0,02	0,29				
		3 ^{AC}	0,056	0,02	35,71	6,79	0,02	0,29				
		4 ^{ABC}	0,055	0,01	18,18	6,79	0,01	0,14				
	t=24h ^{AA}	1 ^{AB}	0,054	0,01	18,52	6,77	0,03	0,44				
		2 ^{AA}	0,058	0,01	17,24	6,75	0,02	0,29				
		3 ^{AC}	0,057	0,02	35,09	6,81	0,02	0,29				
		4 ^{ABC}	0,058	0,01	17,24	6,79	0,02	0,29				
8	t=0h ^{AA}	1 ^{AB}	0,058	0,01	17,24	6,80	0,004	0,06				
		2 ^{AA}	0,056	0,01	17,86	6,78	0,002	0,03				
		3 ^{AB}	0,058	0,01	17,24	6,83	0,01	0,15				
		4 ^{AB}	0,059	0,004	6,78	6,82	0,02	0,29				
	t=24h ^{AA}	1 ^{AB}	0,061	0,03	49,18	6,82	0,02	0,29				
		2 ^{AA}	0,059	0,002	3,33	6,79	0,02	0,29				
		3 ^{AB}	0,061	0,01	16,39	6,84	0,02	0,29				
		4 ^{AB}	0,060	0,02	33,33	6,86	0,003	0,04				
ANOVA	Biomasa						pH					
	PVA (% p/v)						PVA (% p/v)					
	6		7		8		6		7		8	
FACTOR	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Ciclos	2,14	0,273	2,13	0,239	4	0,142	12,8	0,016	17	0,021	12,83	0,063
Tiempo	0,02	0,636	0,55	0,313	9	0,07	0,11	0,871	3,16	0,214	0,11	0,231

^aMedio MM, 25 °C y 100 rpm;

Tabla 7.25. Evaluación de la biomasa y el pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(10%).

PVA (% p/v)		Ciclos de reutilización	Biomasa			pH						
			X	S	CV%	X	S	CV%				
6	t=0h ^{AA}	1 ^{AA}	0,053	0,02	37,74	6,81	0,001	0,15				
		2 ^{AA}	0,056	0,01	17,86	6,80	0,001	0,15				
		3 ^{AA}	0,055	0,01	18,18	6,82	0,01	0,15				
		4 ^{AA}	0,056	0,002	35,71	6,83	0,02	0,29				
	t=24h ^{AA}	1 ^{AA}	0,056	0,01	17,85	6,81	0,01	0,15				
		2 ^{AA}	0,059	0,03	50,85	6,79	0,01	0,15				
		3 ^{AA}	0,057	0,02	35,09	6,83	0,01	0,15				
		4 ^{AA}	0,060	0,02	33,33	6,82	0,03	0,44				
7	t=0h ^{AA}	1 ^{AA}	0,053	0,01	18,87	6,78	0,01	0,15				
		2 ^{AA}	0,055	0,02	36,36	6,80	0,02	0,29				
		3 ^{AA}	0,055	0,02	36,36	6,76	0,01	0,15				
		4 ^{AA}	0,056	0,02	35,71	6,80	0,01	0,15				
	t=24h ^{AA}	1 ^{AA}	0,055	0,04	72,73	6,79	0,03	0,44				
		2 ^{AA}	0,058	0,04	68,97	6,83	0,02	0,29				
		3 ^{AA}	0,052	0,01	19,23	6,79	0,02	0,29				
		4 ^{AA}	0,058	0,002	3,45	6,82	0,02	0,29				
8	t=0h ^{AA}	1 ^{BCA}	0,057	0,001	1,75	6,81	0,02	0,29				
		2 ^{ABA}	0,056	0,01	17,85	6,86	0,01	0,15				
		3 ^{AA}	0,055	0,001	1,82	6,83	0,02	0,29				
		4 ^{CA}	0,058	0,03	51,72	6,81	0,02	0,29				
	t=24h ^{AA}	1 ^{BCA}	0,058	0,01	17,24	6,83	0,01	0,15				
		2 ^{ABA}	0,057	0,02	35,08	6,85	0,002	0,03				
		3 ^{AA}	0,055	0,02	36,36	6,82	0,01	0,15				
		4 ^{CA}	0,059	0,01	16,95	6,80	0,03	0,44				
ANOVA	Biomasa						pH					
	PVA (% p/v)						PVA (% p/v)					
	6		7		8		6		7		8	
FACTOR	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Ciclos	1,54	0,365	1,90	0,339	35,67	0,008	0,97	0,511	2,36	0,249	7,81	0,062
Tiempo	0,05	0,836	0,55	0,513	9	0,06	0,11	0,761	3,16	0,174	0,11	0,761

^aMedio MM, 25 °C y 100 rpm;

Tabla 7.26. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas a concentración de CMC del 4 y 5% (alginato de sodio 2% y CaCl₂ 2%).

CMC (%)	Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
		Inóculo microbiano (DO λ a 600 nm)														
		0,2 ^C			0,4 ^C			0,6 ^B			0,9 ^A			1,2 ^A		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
4 ^B	0 ^E	56,7	6,1	10,8	58,2	8,1	13,9	60,4	10,2	16,9	58,6	3,8	6,5	62,2	7,2	11,6
	24 ^{DE}	56,8	0,8	1,4	58,5	1,5	2,6	55,3	3,5	6,3	58,2	4,6	7,9	61,9	5,4	8,7
	48 ^{CD}	56,8	5,4	9,5	58,7	12,2	20,8	54,1	8,1	15,0	42,7	0,9	2,1	45,3	0,1	0,2
	72 ^{BC}	56,6	10,2	18,0	58,4	0,5	0,9	45,2	0,4	0,9	32,8	1,6	4,9	19,6	1,4	7,1
	96 ^B	58,1	3,3	5,7	58,2	5,3	9,1	38,7	2,5	6,5	23,1	2,9	12,6	15,5	2,6	16,8
	168 ^A	50,8	4,4	8,7	36,6	2,4	6,6	18,1	3,8	21,0	1,4	0,3	21,4	0,0	0,2	
5 ^A	0 ^F	57,3	1,2	2,1	59,2	4,1	6,9	60,8	8,1	13,3	61,3	8,1	13,2	56,9	5,7	10,0
	24 ^E	58,6	7,7	13,1	55,4	0,8	1,4	53,0	7,4	13,9	31,1	6,2	19,9	23,1	10,1	43,7
	48 ^D	48,4	11,1	22,9	52,0	9,7	18,7	52,9	0,5	1,0	24,7	1,7	6,9	17,0	12,3	72,4
	72 ^C	52,2	15,6	29,9	51,4	1,4	2,7	36,3	2,4	6,6	21,5	0,8	3,7	11,9	1,2	9,7
	96 ^B	57,6	4,2	7,3	52,8	1,8	3,4	10,2	3,6	35,3	20,2	3,7	18,3	10,8	0,9	8,3
	168 ^A	35,5	2,8	7,9	34,9	5,6	16,0	10,9	4,1	37,6	6,5	0,2	3,1	4,6	2,8	60,9
ANOVA																
FACTOR				F						p						
a (concentración de CMC)				14,96						0,0006						
b (tiempo de tratamiento)				33,36						0,0000						
c (inóculo microbiano)				30,04						0,0000						
b*c				2,82						0,0055						
ANOVA				CMC 4%						CMC 5%						
FACTOR				F			p			F			p			
a (tiempo de tratamiento)				22,76			0,0000			3723,98			0,0000			
b (inóculo microbiano)				20,50			0,0000			4470,00			0,0000			

Tabla 7.27. Evaluación de la biomasa y del pH del medio^a con *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CaCl₂ 2% y CMC 4%).

	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO λ a 600 nm)														
		0,2 ^C			0,4 ^C			0,6 ^B			0,9 ^A			1,2 ^A		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
Biomasa	0 ^E	0,058	0,01	17,2	0,056	0,02	35,7	0,056	0,00	0,0	0,055	0,03	54,5	0,056	0,00	0,0
	24 ^{DE}	0,057	0,00	0,0	0,056	0,02	35,7	0,051	0,00	0,0	0,057	0,03	52,6	0,056	0,00	0,0
	48 ^{CD}	0,055	0,02	36,4	0,055	0,01	18,2	0,056	0,01	17,9	0,054	0,02	37,0	0,056	0,01	17,9
	72 ^{BC}	0,057	0,01	17,5	0,055	0,02	36,4	0,053	0,02	37,7	0,053	0,01	18,9	0,054	0,02	37,0
	96 ^B	0,057	0,01	17,5	0,059	0,01	17,0	0,053	0,02	37,7	0,055	0,01	18,2	0,056	0,01	17,9
	168 ^A	0,058	0,00	0,0	0,053	0,03	56,6	0,057	0,01	17,5	0,053	0,01	18,9	0,056	0,01	17,9
pH	0 ^D	6,66	0,01	0,2	6,66	0,01	0,2	6,69	0,01	0,2	6,69	0,02	0,3	6,77	0,01	0,2
	24 ^C	6,46	0,02	0,3	6,40	0,00	0,0	6,45	0,00	0,0	6,40	0,02	0,3	6,50	0,02	0,3
	48 ^B	6,32	0,02	0,3	6,26	0,00	0,0	6,27	0,00	0,0	6,24	0,01	0,2	6,34	0,00	0,0
	72 ^A	6,26	0,02	0,3	6,22	0,02	0,3	6,24	0,03	0,5	6,28	0,00	0,0	6,38	0,00	0,0
	96 ^A	6,26	0,01	0,2	6,27	0,01	0,2	6,31	0,01	0,2	6,20	0,01	0,2	6,36	0,01	0,2
	168 ^B	6,30	0,01	0,2	6,35	0,01	0,2	6,51	0,00	0,0	6,36	0,00	0,0	6,57	0,01	0,2
ANOVA				Biomasa						pH						
FACTOR				F			p			F			p			
<i>a (tiempo de tratamiento)</i>				22,76			0,0000			3723,98			0,0000			
<i>b (inóculo microbiano)</i>				20,50			0,0000			4470,00			0,0000			

^aMedio de cultivo MM, 25°C y 100 rpm

Tabla 7.28. Evaluación de la biomasa y del pH del medio^a con *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CaCl₂ 2% y CMC 5%).

	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO λ a 600 nm)														
		0,2 ^C			0,4 ^C			0,6 ^B			0,9 ^A			1,2 ^A		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
Biomasa	0 ^E	0,057	0,03	52,6	0,054	0,01	18,5	0,055	0,01	18,2	0,056	0,01	17,9	0,052	0,01	19,2
	24 ^{DE}	0,055	0,01	18,2	0,054	0,02	37,0	0,058	0,01	17,2	0,056	0,02	35,7	0,058	0,02	34,5
	48 ^{CD}	0,056	0,03	53,6	0,059	0,01	16,9	0,057	0,02	35,1	0,057	0,03	52,6	0,057	0,01	17,5
	72 ^{BC}	0,055	0,02	36,4	0,052	0,02	38,5	0,059	0,01	16,9	0,057	0,02	35,1	0,056	0,01	17,9
	96 ^B	0,056	0,02	35,7	0,053	0,01	18,9	0,057	0,02	35,1	0,058	0,01	17,2	0,057	0,01	17,5
	168 ^A	0,056	0,02	35,7	0,054	0,03	55,6	0,055	0,02	36,4	0,059	0,01	17,0	0,058	0,01	17,2
pH	0 ^C	6,53	0,01	0,2	6,58	0,05	0,8	6,65	0,06	0,9	6,65	0,03	0,5	6,62	0,06	0,9
	24 ^B	6,09	0,02	0,3	6,04	0,04	0,7	6,34	0,05	0,8	6,47	0,03	0,5	6,36	0,04	0,6
	48 ^B	6,04	0,01	0,2	5,99	0,01	0,2	6,30	0,01	0,2	6,31	0,05	0,8	6,22	0,01	0,2
	72 ^A	6,00	0,01	0,2	5,96	0,06	1,0	6,31	0,01	0,2	6,31	0,02	0,3	6,31	0,08	1,3
	96 ^A	5,99	0,08	1,3	5,95	0,05	0,8	6,32	0,08	1,3	6,27	0,08	1,3	6,34	0,07	1,1
	168 ^A	5,92	0,03	0,5	5,95	0,06	1,0	6,73	0,03	0,5	6,39	0,07	1,1	6,42	0,03	0,5
ANOVA				Biomasa						pH						
FACTOR				F			p			F			p			
<i>a (tiempo de tratamiento)</i>				22,76			0,0000			3723,98			0,0000			
<i>b (inóculo microbiano)</i>				20,50			0,0000			4470,00			0,0000			

^aMedio de cultivo MM, 25°C y 100 rpm

Tabla 7.29. Degradación de limonina en por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas de alginato de calcio.

CaCl ₂ (%)	Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
		Inóculo microbiano														
		0,2 ^A			0,4 ^A			0,6 ^B			0,9 ^{BC}			1,2 ^C		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
2 ^B	0 ^A	55,8	10,5	28,8	57,8	5,2	8,9	60,1	5,6	9,3	57,9	11,4	16,7	61,8	3,4	5,5
	24 ^B	60,2	8,1	13,5	60,2	0,8	1,3	55,4	0,9	1,6	57,5	3,1	5,4	61,6	1,1	1,8
	48 ^B	60,3	3,6	6,0	61,6	1,5	2,4	54,0	10,2	18,9	42,4	1,6	3,8	45,2	2,8	6,2
	72 ^C	62,4	1,4	2,2	60,1	3,2	5,3	45,6	8,4	18,4	31,9	6,7	21,0	20,8	10,2	49,0
	96 ^C	64,3	9,7	15,1	63,4	9,7	15,3	39,1	6,8	17,4	22,5	5,8	25,8	16,6	9,1	54,8
	168 ^D	50,4	2,6	5,2	37,1	7,1	19,1	19,4	0,5	2,6	1,2	0,4	33,3	0,0	6,4	
3 ^A	0 ^A	60,4	1,5	2,5	59,4	6,0	10,1	55,3	2,8	5,0	65,0	2,5	3,9	60,4	4,3	7,2
	24 ^B	50,7	2,3	4,5	45,7	8,6	18,7	38,9	3,3	8,4	32,0	5,5	17,1	33,2	3,6	10,9
	48 ^B	48,0	1,6	3,4	47,4	4,6	9,7	38,0	3,8	10,1	36,0	3,1	8,5	30,0	2,7	9,0
	72 ^C	41,1	5,0	12,1	41,8	5,0	11,9	26,2	8,3	31,7	28,6	2,3	8,2	19,5	1,8	9,1
	96 ^C	37,1	1,7	4,6	35,5	0,6	1,6	16,5	7,0	42,3	17,1	2,8	16,4	14,2	4,8	36,7
	168 ^D	23,9	6,0	25,2	21,0	2,3	10,9	0,0	2,4		0,0	1,0		0,0	3,8	
4 ^A	0 ^A	64,5	4,4	6,7	68,3	6,2	9,0	57,8	3,2	5,5	60,5	3,2	5,4	67,5	4,6	6,8
	24 ^B	55,6	5,2	9,4	54,1	1,7	3,2	45,1	1,0	2,2	46,3	4,0	8,7	48,1	1,7	3,6
	48 ^B	46,2	0,7	1,5	45,9	2,4	5,1	37,5	1,7	4,6	37,3	3,8	10,2	41,0	8,0	19,5
	72 ^C	43,1	3,1	7,2	39,1	4,2	10,8	30,8	11,2	36,4	33,8	0,5	1,6	29,0	0,7	2,4
	96 ^C	27,4	1,4	0,4	27,5	0,9	3,1	20,3	2,4	11,9	21,5	2,0	9,4	16,0	1,6	10,2
	168 ^D	0,0	0,4		0,0	1,1		0,0	3,2		0,0	0,6		0,0	2,0	
ANOVA																
FACTOR		F									p					
a (concentración de CaCl ₂)		37,11									0,0000					
b (tiempo de tratamiento)		114,26									0,0000					
c (inóculo microbiano)		27,42									0,0000					
a*c		3,80									0,0021					
a*b		2,79									0,0102					
c*b		2,36									0,0102					

Tabla 7.30. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas (alginato de sodio 2%, CMC 4% y CaCl₂ 2%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
	0,2 ^A			0,4 ^B			0,6 ^C			0,9 ^D			1,2 ^E		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^A	55,8	10,5	28,8	57,8	5,2	8,9	60,1	5,6	9,3	57,9	11,4	16,7	61,8	3,4	5,5
24 ^B	60,2	8,1	13,5	60,2	0,8	1,3	55,4	0,9	1,6	57,5	3,1	5,4	61,6	1,1	1,8
48 ^C	60,3	3,6	6,0	61,6	1,5	2,4	54,0	10,2	18,9	42,4	1,6	3,8	45,2	2,8	6,2
72 ^D	62,4	1,4	2,2	60,1	3,2	5,3	45,6	8,4	18,4	31,9	6,7	21,0	20,8	10,2	49,0
96 ^E	64,3	9,7	15,1	63,4	9,7	15,3	39,1	6,8	17,4	22,5	5,8	25,8	16,6	9,1	54,8
168 ^F	50,4	2,6	5,2	37,1	7,1	19,1	19,4	0,5	2,6	1,2	0,4	33,3	0,0	6,4	
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				16692,09					0,0000						
b (inóculo microbiano)				13023,13					0,0000						
a*b				1843,32					0,0000						

Tabla 7.31. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas (alginato de sodio 2%, CMC 4% y CaCl₂ 3%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano														
	0,2 ^A			0,4 ^B			0,6 ^B			0,9 ^B			1,2 ^C		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^A	60,4	1,5	2,5	59,4	6,0	10,1	55,3	2,8	5,0	65,0	2,5	3,9	60,4	4,3	7,2
24 ^B	50,7	2,3	4,5	45,7	8,6	18,7	38,9	3,3	8,4	32,0	5,5	17,1	33,2	3,6	10,9
48 ^B	48,0	1,6	3,4	47,4	4,6	9,7	38,0	3,8	10,1	36,0	3,1	8,5	30,0	2,7	9,0
72 ^C	41,1	5,0	12,1	41,8	5,0	11,9	26,2	8,3	31,7	28,6	2,3	8,2	19,5	1,8	9,1
96 ^D	37,1	1,7	4,6	35,5	0,6	1,6	16,5	7,0	42,3	17,1	2,8	16,4	14,2	4,8	36,7
168 ^E	23,9	6,0	25,2	21,0	2,3	10,9	0,0	2,4		0,0	1,0		0,0	3,8	
ANOVA															
FACTOR				F						p					
a (tiempo de tratamiento)				14804,97						0,0000					
b (inóculo microbiano)				3957,56						0,0000					
a*b				248,65						0,0000					

Tabla 7.32. Degradación de limonina en medio de cultivo MM por células de *R. fascians* inmovilizadas por encapsulación en perlas huecas (alginato de sodio 2%, CMC 4% y CaCl₂ 4%).

Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)														
	Inóculo microbiano														
	0,2 ^A			0,4 ^B			0,6 ^C			0,9 ^C			1,2 ^D		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^A	64,5	4,4	6,7	68,3	6,2	9,0	57,8	3,2	5,5	60,5	3,2	5,4	67,5	4,6	6,8
24 ^B	55,6	5,2	9,4	54,1	1,7	3,2	45,1	1,0	2,2	46,3	4,0	8,7	48,1	1,7	3,6
48 ^C	46,2	0,7	1,5	45,9	2,4	5,1	37,5	1,7	4,6	37,3	3,8	10,2	41,0	8,0	19,5
72 ^D	43,1	3,1	7,2	39,1	4,2	10,8	30,8	11,2	36,4	33,8	0,5	1,6	29,0	0,7	2,4
96 ^E	27,4	1,4	0,4	27,5	0,9	3,1	20,3	2,4	11,9	21,5	2,0	9,4	16,0	1,6	10,2
168 ^F	0,0	0,4		0,0	1,1		0,0	3,2		0,0	0,6		0,0	2,0	
ANOVA															
FACTOR				F					p						
a (tiempo de tratamiento)				366,97					0,0000						
b (inóculo microbiano)				21776,41					0,0000						
a*b				51,07					0,0000						

Tabla 7.33. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^b.

	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
		0,2 ^{BA}			0,4 ^{BA}			0,6 ^{ABA}			0,9 ^{AA}			1,2 ^{ABA}		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
Biomasa	0 ^A	0,055	0,03	54,55	0,056	0,04	71,43	0,053	0,02	37,74	0,053	0,03	56,60	0,056	0,03	53,57
	24 ^A	0,058	0,01	17,24	0,057	0,02	35,1	0,055	0,02	36,36	0,054	0,03	55,56	0,057	0,02	35,09
	48 ^A	0,056	0,01	17,86	0,056	0,01	17,85	0,055	0,01	18,18	0,053	0,01	18,87	0,053	0,01	18,87
	72 ^A	0,056	0,002	3,57	0,056	0,01	17,86	0,052	0,01	19,23	0,053	0,003	5,66	0,054	0,01	18,52
	96 ^A	0,055	0,01	18,18	0,055	0,01	18,18	0,056	0,01	17,86	0,055	0,02	36,36	0,054	0,02	37,04
	168 ^A	0,056	0,02	35,71	0,055	0,003	5,45	0,055	0,001	1,82	0,055	0,01	18,18	0,055	0,01	18,81
pH	0 ^B	6,75	0,01	0,15	6,65	0,02	0,30	6,67	0,01	0,15	6,69	0,03	0,45	6,70	0,04	0,60
	24 ^{AB}	6,63	0,02	0,30	6,64	0,02	0,30	6,68	0,03	0,45	6,62	0,02	0,30	6,68	0,03	0,45
	48 ^{AB}	6,69	0,02	0,30	6,60	0,05	0,76	6,68	0,01	0,15	6,64	0,02	0,30	6,62	0,02	0,30
	72 ^A	6,60	0,01	0,15	6,62	0,01	0,15	6,62	0,01	0,15	6,65	0,01	0,15	6,60	0,03	0,45
	96 ^A	6,63	0,03	0,45	6,59	0,08	1,21	6,62	0,02	0,30	6,65	0,01	0,15	6,60	0,01	0,15
	168 ^A	6,62	0,01	0,15	6,59	0,03	0,46	6,60	0,06	0,91	6,61	0,01	0,15	6,61	0,01	0,15
ANOVA				Biomasa						pH						
FACTOR				F			p			F			p			
a (tiempo de tratamiento)				2,06			0,1139			6,98			0,0006			
b (inóculo microbiano)				4,46			0,0097			1,60			0,1688			

^aMedio MM, 25 °C y 100 rpm^bAlginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl₂ 2%

Tabla 7.34. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^b

		Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
		0,2 ^{B A}			0,4 ^{B A}			0,6 ^{AB A}			0,9 ^{A A}			1,2 ^{AB B}		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
Biomasa	0 ^A	0,055	0,01	18,2	0,056	0,01	17,9	0,053	0,02	37,4	0,053	0,01	18,9	0,056	0,01	17,9
	24 ^A	0,058	0,02	34,5	0,057	0,01	17,5	0,055	0,01	18,2	0,054	0,01	18,5	0,057	0,02	35,1
	48 ^A	0,056	0,01	17,9	0,056	0,01	17,9	0,055	0,01	18,2	0,053	0,01	18,9	0,053	0,03	56,6
	72 ^A	0,056	0,02	35,7	0,056	0,02	35,7	0,052	0,03	57,7	0,053	0,02	37,7	0,054	0,01	18,5
	96 ^A	0,055	0,01	18,2	0,055	0,01	18,2	0,056	0,01	17,9	0,055	0,01	18,2	0,054	0,01	18,5
	168 ^A	0,056	0,01	17,9	0,055	0,01	18,2	0,055	0,01	18,2	0,055	0,01	18,2	0,055	0,01	18,2
pH	0 ^A	6,65	0,05	0,8	6,67	0,02	0,3	6,73	0,06	0,9	6,61	0,05	0,8	6,73	0,02	0,3
	24 ^A	6,60	0,03	0,5	6,62	0,02	0,3	6,68	0,01	0,2	6,65	0,05	0,8	6,72	0,02	0,3
	48 ^A	6,59	0,08	1,2	6,65	0,09	1,4	6,69	0,04	0,6	6,63	0,01	0,2	6,70	0,08	1,2
	72 ^A	6,62	0,05	0,8	6,61	0,05	0,8	6,60	0,02	0,3	6,63	0,07	0,1	6,68	0,07	1,1
	96 ^A	6,61	0,02	0,3	6,57	0,02	0,3	6,64	0,01	0,2	6,62	0,09	0,1	6,70	0,06	0,9
	168 ^A	6,60	0,04	0,6	6,62	0,04	0,6	6,58	0,01	0,2	6,60	0,08	1,2	6,68	0,04	0,6
ANOVA				Biomasa						pH						
FACTOR				F			p			F			p			
a (tiempo de tratamiento)				2,06			0,1139			3,44			0,0209			
b (inóculo microbiano)				4,46			0,0097			10,51			0,0001			

^aMedio MM, 25 °C y 100 rpm

^bAlginato de sodio 2% y CMC 4% y CaCl₂ 3%

Tabla 7.35. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^b

		Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)														
		0,2 ^C			0,4 ^C			0,6 ^B			0,9 ^A			1,2 ^A		
		X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
Biomasa	0 ^E	0,055	0,002	3,63	0,056	0,002	3,57	0,053	0,01	18,87	0,053	0,02	37,74	0,056	0,02	35,71
	24 ^{DE}	0,058	0,01	17,24	0,057	0,001	1,75	0,055	0,01	18,18	0,054	0,02	37,04	0,057	0,03	52,63
	48 ^{CD}	0,056	0,01	17,86	0,056	0,01	17,86	0,055	0,001	1,82	0,053	0,03	56,60	0,053	0,01	18,87
	72 ^{BC}	0,056	0,03	53,57	0,056	0,03	53,57	0,052	0,02	38,46	0,053	0,01	18,88	0,054	0,03	55,56
	96 ^B	0,055	0,001	1,82	0,055	0,01	18,18	0,056	0,03	53,57	0,055	0,01	18,18	0,054	0,01	18,52
	168 ^A	0,056	0,02	35,71	0,055	0,02	36,36	0,055	0,01	18,18	0,055	0,01	18,18	0,055	0,002	3,64
pH	0	6,62	0,01	0,15	6,72	0,02	0,29	6,69	0,01	0,15	6,72	0,02	0,29	6,70	0,05	0,75
	24	6,60	0,02	0,30	6,69	0,01	0,15	6,69	0,01	0,15	6,68	0,03	0,45	6,72	0,02	0,30
	48	6,69	0,02	0,30	6,68	0,01	0,15	6,65	0,008	0,12	6,68	0,02	0,30	6,72	0,03	0,45
	72	6,63	0,05	0,75	6,70	0,03	0,45	6,62	0,01	0,15	6,67	0,04	0,60	6,69	0,03	0,45
	96	6,65	0,01	0,15	6,65	0,02	0,30	6,61	0,02	0,30	6,68	0,03	0,45	6,65	0,01	0,15
	168	6,65	0,02	0,30	6,65	0,01	0,15	6,65	0,02	0,30	6,67	0,01	0,15	6,66	0,01	0,15
ANOVA				Biomasa						pH						
FACTOR				F			p			F			p			
a (tiempo de tratamiento)				2,06			0,1139			2,01			0,1202			
b (inóculo microbiano)				4,46			0,0097			4,29			0,0115			

^aMedio MM, 25 °C y 100 rpm^bAlginato de sodio 2% y CMC 4% y CaCl₂ 4%

Tabla 7.36. Degradación de limonina y estabilidad operacional en medio de cultivo MM de células de *R. fascians* inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio (Alginato de sodio 2% y CMC 4%).

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)					
	CaCl ₂ 3% (p/v) ^A			CaCl ₂ 4% (p/v) ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%
1 ^{BBC}	40,41	5,34	13,21	40,64	8,12	19,98
2 ^{AAB}	50,32	2,16	4,29	42,40	0,81	1,91
3 ^{AA}	—	—	—	45,30	2,41	5,32
ANOVA						
FACTOR		F		p		
a (Ciclos)		13,55		0,0011		
b (CaCl ₂ (% , p/v))		9,39		0,0108		
ANOVA	CaCl ₂ 3% (p/v)		ANOVA	CaCl ₂ 4% (p/v)		
FACTOR	F	p	FACTOR	F	p	
Ciclos	404,42	0,0000	Ciclos	46,17	0,0002	

Tabla 7.37. Evaluación de la biomasa y del pH del medio de degradación^a de limonina aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas de alginato de calcio^b.

CaCl ₂ (%, p/v)		Ciclos de reutilización	Biomasa			pH		
			X	S	CV%	X	S	CV%
3	t=0h ^{AA}	1 ^{AA}	0,053	0,02	37,74	6,81	0,02	0,29
		2 ^{AA}	0,053	0,01	18,87	6,83	0,02	0,29
		3 ^{AA}	0,054	0,01	18,52	6,83	0,01	0,15
	t=24h ^{BB}	1 ^{AA}	0,055	0,04	72,73	6,85	0,01	0,15
		2 ^{AA}	0,054	0,01	18,52	6,84	0,03	0,44
		3 ^{AA}	—	—	—	—	—	—
4	t=0h ^{AA}	1 ^{AA}	0,055	0,02	36,36	6,81	0,002	0,03
		2 ^{AA}	0,056	0,02	35,71	6,81	0,03	0,44
		3 ^{AA}	0,055	0,001	1,82	6,80	0,02	0,29
	t=24h ^{BB}	1 ^{AA}	0,056	0,01	17,86	6,82	0,01	0,15
		2 ^{AA}	0,058	0,03	51,72	6,81	0,01	0,15
		3 ^{AA}	0,058	0,03	51,72	6,83	0,01	0,15
ANOVA		Biomasa		ANOVA		pH		
FACTOR		F	p	FACTOR		F	p	
a (ciclo)		0,49	0,6315	a (ciclo)		0,00	1,000	
b (concentración de CaCl ₂ (%, p/v))		27,63	0,0012	b (concentración de CaCl ₂ (%, p/v))		9,52	0,0177	
c (tiempo de tratamiento)		9,95	0,0161	c (tiempo de tratamiento)		6,37	0,0396	

^aMedio de cultivo MM, 25 °C y 100 rpm^bAlginato de sodio 2% y CMC 4%

Tabla 7.38. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(8%) en zumo sintético a diferente pH.

pH	Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)																	
		PVA (% p/v)																	
		6 ^A						7 ^A						8 ^A					
		Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)																	
		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A	
X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
3 ^{AB}	0	51,37	1,2	56,30	4,3	53,77	3,7	63,95	5,3	64,98	9,8	55,48	3,8	55,70	0,8	59,17	6,2	58,43	5,2
	24	41,44	1,7	49,10	6,2	42,47	4,6	56,76	6,2	56,51	1,0	49,58	9,2	46,55	1,6	51,00	2,5	49,02	9,1
	48	40,75	6,3	49,32	2,8	41,10	4,2	57,28	2,8	56,25	2,5	51,63	0,3	45,80	8,2	23,27	6,1	43,82	3,0
	72	38,01	2,8	46,03	1,9	38,01	2,9	46,75	3,1	51,63	5,6	49,44	10,4	—	—	—	—	—	—
	96	38,01	3,1	46,03	2,4	37,33	7,1	47,52	2,6	51,34	5,1	37,94	5,1	—	—	—	—	—	—
4 ^A	0	55,65	0,6	58,77	4,3	60,78	6,5	67,81	2,8	68,15	2,9	70,21	6,8	63,87	3,5	68,00	4,8	65,03	0,7
	24	45,41	1,0	48,53	0,8	44,09	2,5	60,62	1,5	60,27	10,2	66,44	2,5	53,80	6,2	59,75	7,1	54,79	5,1
	48	46,75	2,5	48,09	0,2	43,24	1,9	61,30	0,7	59,25	5,3	63,36	1,6	53,80	2,8	36,97	8,5	55,45	6,3
	72	45,85	9,3	44,07	1,3	41,44	6,3	54,11	2,7	58,90	7,1	61,30	1,2	—	—	—	—	—	—
	96	46,79	3,6	44,07	3,2	41,10	0,4	44,18	4,1	40,75	2,8	37,67	0,5	—	—	—	—	—	—
5 ^B	0	52,89	7,4	51,06	4,2	49,40	1,6	52,86	3,6	62,54	1,8	55,35	5,1	63,05	6,2	60,41	3,1	65,03	4,9
	24	42,22	3,8	42,35	8,3	33,63	3,0	51,75	11,1	58,39	5,6	50,37	4,9	58,43	1,2	62,39	0,6	63,38	9,2
	48	41,06	7,3	41,51	1,6	30,30	4,5	55,90	2,8	62,27	3,2	53,96	3,2	59,69	3,6	39,94	1,4	62,39	6,1
	72	37,58	1,6	35,28	1,1	26,15	2,6	55,35	7,2	55,07	2,8	50,37	3,8	—	—	—	—	—	—
	96	37,58	1,8	34,88	4,9	26,57	3,1	37,08	1,5	44,69	6,1	46,22	2,7	—	—	—	—	—	—
ANOVA																			
FACTOR		F						p											
a (pH)		4,99						0,0086											
b (tiempo de tratamiento)		32,44						0,0000											
c (inóculo microbiano)		1,11						0,3374											
d (concentración de PVA)		3,02						0,0536											
b*d		3,03						0,0044											

Tabla 7.39. Degradación de limonina por células de *R. fascians* inmovilizadas en geles de PVA-PEG(10%) en zumo sintético a diferente pH.

pH	Tiempo de tratamiento (h)	Limonina (ppm)																		
		PVA (% p/v)																		
		6 ^B						7 ^A						8 ^A						
		Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)																		
		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A		0,6 ^A		0,9 ^A		1,2 ^A		
X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	
3 ^A	0 ^A	53,42	2,5	59,59	4,1	51,78	2,0	72,26	1,1	72,60	2,3	72,60	3,7	54,25	3,4	55,48	0,7	63,70	3,2	
	24 ^B	47,26	3,1	53,42	3,9	41,10	3,8	61,64	3,2	61,64	4,2	62,33	6,3	51,79	2,1	52,74	8,2	56,84	1,5	
	48 ^B	39,73	0,9	41,10	6,2	36,99	5,6	61,30	5,6	59,59	3,7	58,90	7,9	52,70	5,3	49,66	1,7	57,20	3,4	
	72 ^C	38,70	1,3	38,01	2,7	38,22	4,9	57,88	3,5	57,88	2,5	57,33	1,5	48,69	11,5	46,58	2,6	50,34	4,7	
	96 ^C	34,93	3,6	32,88	2,4	31,33	1,3	57,53	7,2	55,48	2,4	53,77	1,0	50,54	5,3	51,36	2,3	55,48	4,0	
4 ^A	0 ^A	50,34	10,1	46,23	0,9	50,34	6,2	67,12	0,9	71,92	5,6	73,29	2,6	56,72	3,2	58,62	4,9	61,03	3,4	
	24 ^B	41,27	0,8	40,75	5,1	39,73	8,4	56,85	2,5	60,27	3,8	61,30	3,5	52,61	4,1	47,95	3,7	50,96	2,5	
	48 ^B	33,90	4,8	32,53	6,8	38,36	3,2	56,51	7,4	59,25	3,7	60,27	4,7	51,78	1,8	45,20	4,8	46,24	7,2	
	72 ^C	31,85	2,6	32,53	3,4	38,36	0,6	52,40	3,8	55,48	2,9	56,51	5,2	47,12	1,3	43,28	1,5	46,85	8,1	
	96 ^C	28,25	9,5	27,74	2,9	30,82	5,4	50,68	6,2	51,03	0,2	55,82	3,6	49,30	5,1	44,93	9,6	48,08	7,3	
5 ^A	0 ^A	44,83	5,9	44,28	1,2	45,39	3,1	55,35	2,8	61,16	0,9	55,90	2,9	55,34	2,6	45,94	3,7	48,05	0,4	
	24 ^B	39,02	1,6	39,02	1,0	36,25	4,3	45,94	2,3	50,64	10,2	46,22	7,2	50,36	3,0	36,26	5,6	38,74	10,5	
	48 ^B	34,04	0,8	30,72	0,3	29,89	3,5	46,22	1,5	49,81	5,3	45,94	5,9	46,50	5,9	37,08	7,3	38,74	8,3	
	72 ^C	31,41	3,1	30,16	6,2	29,75	3,2	43,45	1,2	47,32	6,1	42,62	0,3	41,78	10,3	34,04	2,7	35,45	3,1	
	96 ^C	27,40	6,2	26,29	8,7	24,91	2,1	42,89	0,4	44,00	2,5	40,68	1,6	38,20	7,2	31,54	2,1	32,55	5,0	
ANOVA																				
FACTOR		F						p												
a (pH)		0,76						0,4706												
b (tiempo de tratamiento)		74,08						0,0000												
c (inóculo microbiano)		1,39						0,2533												
d (concentración de PVA)		13,39						0,000												
b*d		4,10						0,0003												

Tabla 7.40. Degradación de limonina para *R. fascians* (0,6 DO) inmovilizado en PVA-PEG(8%) en medio MM pH 7 y en zumo sintético a diferentes pHs a las 24 h de tratamiento.

Medio de degradación de limonina	Degradación de limonina (%)					
	PVA 6% ^B		PVA 7% ^A		PVA 8% ^{AB}	
	X	S	X	S	X	S
Medio MM (25 °C; pH 7) ^A	32,21	3,66	18,82	2,61	12,44	5,02
Zumo sintético pH 3 ^A	19,33	1,74	11,24	6,24	19,83	1,61
Zumo sintético pH 4 ^A	18,40	0,99	10,60	1,51	15,77	6,18
Zumo sintético pH 5 ^A	20,17	3,76	2,10	111,08	7,33	1,24
ANOVA						
FACTOR	F			p		
a (medio de degradación de limonina)	2,56			0,1510		
b (concentración de PVA)	5,86			0,0388		

Tabla 7.41. Degradación de limonina para *R. fascians* (0,6 DO) inmovilizado en PVA-PEG(10%) en medio MM pH 7 y en zumo sintético a diferentes pHs a las 24 h de tratamiento.

Medio de degradación de limonina	Degradación de Limonina (%)					
	PVA 6% ^A		PVA 7% ^A		PVA 8% ^A	
	X	S	X	S	X	S
Medio MM (25 °C; pH 7) ^A	14,95	4,51	26,17	4,01	17,61	3,42
Zumo sintético pH 3 ^A	11,53	3,12	14,69	3,18	4,54	2,11
Zumo sintético pH 4 ^A	18,02	0,78	15,31	2,47	23,2	4,09
Zumo sintético pH 5 ^A	12,96	3,45	17,00	2,31	23	3,03
ANOVA						
FACTOR	F			p		
a (medio de degradación de limonina)	1,91			0,2289		
b (concentración de PVA)	0,56			0,5984		

Tabla 7.42. Degradación de limonina y estabilidad operacional en zumo sintético a pH 3 de células de *R. fascians* inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2% y CMC 4%).

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)																	
	CaCl ₂ 3% (p/v) ^A									CaCl ₂ 4% (p/v) ^A								
	Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)									Inóculo microbiano (DO a λ 600 nm)								
	0,6 ^{AA}			0,9 ^{BB}			1,2 ^{BC}			0,6 ^{AA}			0,9 ^{BA}			1,2 ^{BB}		
	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%	X	S	CV%
0 ^{A AA}	46,5	4,8	10,3	55,1	5,2	9,4	51,0	3,2	6,3	57,2	7,2	12,6	55,5	4,2	7,6	59,9	5,1	8,5
24 ^{B BB}	37,0	5,1	13,7	41,1	8,1	19,7	38,7	5,6	14,5	47,9	2,2	4,6	46,6	8,4	18,0	48,3	3,7	7,7
48 ^{BC CC}	40,1	1,3	3,2	40,8	1,8	4,4	34,4	6,7	19,5	42,8	4,5	10,5	40,8	6,3	15,4	41,6	5,3	12,7
72 ^{BC CD}	40,1	0,9	2,2	40,1	5,4	13,5	35,5	5,4	15,2	42,1	3,6	8,6	40,1	6,1	15,2	40,6	5,2	12,8
96 ^{C DD}	39,0	3,4	8,7	38,4	3,1	8,1	30,8	8,0	25,9	41,4	2,8	1,0	39,7	0,4	1,0	39,7	2,2	5,5
ANOVA																		
FACTOR				F						p								
a (tiempo de tratamiento)				49,97						0,0000								
b (CaCl ₂ (% p/v))				0,13						0,7221								
c (inóculo microbiano)				10,60						0,0007								
ANOVA	CaCl ₂ 3% (p/v)						ANOVA	CaCl ₂ 4% (p/v)										
	Inóculo microbiano							Inóculo microbiano										
	0,6		0,9		1,2			0,6		0,9		1,2						
FACTOR				F		p		FACTOR				F		p				
a (tiempo de tratamiento)				712,33		0,0000		a (tiempo de tratamiento)				1788,27		0,0000				
b (inóculo microbiano)				366,16		0,0000		b (inóculo microbiano)				92,72		0,0000				
a*b				59,86		0,0000		a*b				7,18		0,0000				

Tabla 7.43. Evaluación de la biomasa y del pH del zumo sintético pH 3 aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl₂ 3%).

	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO λ a 600 nm)					
		0,6 ^{AA}		0,9 ^{AA}		1,2 ^{AA}	
		X	S	X	S	X	S
Biomasa	0 ^A	0,058	0,02	0,058	0,02	0,060	0,01
	24 ^A	0,059	0,05	0,055	0,03	0,059	0,01
	48 ^A	0,060	0,01	0,056	0,03	0,058	0,01
	72 ^A	0,058	0,01	0,058	0,02	0,060	0,03
	96 ^A	0,059	0,02	0,060	0,01	0,061	0,01
pH	0 ^A	3,05	0,02	3,04	0,01	3,05	0,03
	24 ^A	3,08	0,02	3,02	0,01	3,03	0,03
	48 ^A	3,07	0,03	3,03	0,01	3,03	0,01
	72 ^A	3,05	0,01	3,05	0,06	3,02	0,00
	96 ^A	3,06	0,00	3,01	0,02	3,06	0,01
ANOVA		Biomasa		ANOVA		pH	
FACTOR		F	p	FACTOR		F	p
a (inóculo microbiano)		3,65	0,3135	a (inóculo microbiano)		4,12	0,0589
b (tiempo de tratamiento)		1,41	0,3135	b (tiempo de tratamiento)		0,05	0,9944

Tabla 7.44. Evaluación de la biomasa y del pH del zumo sintético pH 3 aplicando *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas alginato de calcio (alginato de sodio 2%; CMC 4% y CaCl₂ 4%).

	Tiempo de tratamiento (h)	Inóculo microbiano (DO λ a 600 nm)					
		0,6 ^{AA}		0,9 ^{BA}		1,2 ^{BA}	
		X	S	X	S	X	S
Biomasa	0 ^A	0,055	0,03	0,058	0,02	0,059	0,01
	24 ^A	0,056	0,00	0,060	0,02	0,055	0,02
	48 ^A	0,055	0,01	0,057	0,01	0,055	0,01
	72 ^A	0,054	0,03	0,058	0,00	0,058	0,01
	96 ^A	0,057	0,02	0,059	0,00	0,055	0,01
pH	0 ^A	3,06	0,01	3,03	0,01	3,07	0,02
	24 ^A	3,02	0,03	3,05	0,02	3,06	0,03
	48 ^A	3,05	0,03	3,06	0,02	3,05	0,01
	72 ^A	3,03	0,01	3,08	0,01	3,05	0,00
	96 ^A	3,02	0,01	3,08	0,05	3,06	0,01
ANOVA		Biomasa		ANOVA		pH	
FACTOR		F	p	FACTOR		F	p
a(inóculo microbiano)		4,52	0,0487	a(inóculo microbiano)		2,24	0,1683
b(tiempo de tratamiento)		0,48	0,7521	b(tiempo de tratamiento)		0,15	0,9568

Tabla 7.45. Degradación de limonina y estabilidad operacional^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en PVA-PEG(8%).

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)					
	PVA (% p/v)					
	7 ^A			8 ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%
1 ^D	29,25 ^D	5,75	19,66	29,99 ^D	8,72	20,08
2 ^C	33,13 ^C	2,93	8,84	32,44 ^C	1,97	6,07
3 ^B	34,26 ^B	8,35	24,37	33,36 ^B	2,35	7,04
4 ^A	36,77 ^A	0,89	2,42	35,39 ^A	6,11	17,26
ANOVA						
FACTOR		F			P	
a (concentración de PVA)		11022,31			0,0000	
b (Ciclos de 24 h)		238530,20			0,0000	
a*b		6158,68			0,0000	
ANOVA	PVA (7%)		ANOVA	PVA (8%)		
FACTOR	F	P	FACTOR	F	P	
ciclos	2139529,0	0,0000	ciclos	1091250,75	0,0000	

^aZumo de naranja, 25 °C y 100 rpm, limonina 37,05 ppm a t=0

^bInóculo microbiano de 0,6 DO a λ=600 nm

Tabla 7.46. Degradación de limonina y estabilidad operacional^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en perlas huecas de alginato de calcio (alginato de sodio 2% y CMC 4%).

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)					
	CaCl ₂ (% p/v)					
	3 ^A			4 ^B		
	X	S	CV%	X	S	CV%
1 ^A	33,12 ^A	4,51	13,62	30,40 ^A	2,26	7,43
2 ^B	33,07 ^B	1,86	5,62	32,22 ^B	5,03	15,61
ANOVA						
FACTOR		F			p	
a (concentración de CaCl ₂)		92,51			0,0000	
b (Ciclos de 24 h)		29,38			0,0006	
ANOVA	CaCl ₂ 3% (p/v)		ANOVA	CaCl ₂ 4% (p/v)		
FACTOR	F	p	FACTOR	F	p	
ciclos	28709,12	0,0000	ciclos	133949,75	0,0000	

^aZumo de naranja, 25 °C y 100 rpm, limonina 37,05 ppm a t=0

^bInóculo microbiano de 0,6 DO a λ=600 nm

Tabla 7.47. Degradación de limonina y estabilidad operacional^a de células de *R. fascians*^b inmovilizadas en criogel de PVA-PEG y perlas huecas de alginato de calcio

Ciclos de 24 h	Limonina (ppm)							
	Soporte							
	PVA 7% (p/v) ^B		PVA 8% (p/v) ^B		CaCl ₂ 3% ^A		CaCl ₂ 4% ^B	
	X	S	X	S	X	S	X	S
1 ^B	29,25	5,65	29,99	8,72	33,12	7,12	30,40	2,65
2 ^A	33,13	2,93	32,44	1,97	33,07	1,86	33,22	5,03
ANOVA								
FACTOR	F						p	
a (soporte)	50,42						0,0000	
b (ciclos)	203,97						0,0000	
a*b	21,11						0,0000	

^aZumo de naranja, 25 °C y 100 rpm, limonina 37,05 ppm a t=0^bInóculo microbiano de 0,6 DO a $\lambda=600$ nm**Tabla 7.48.** Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas (alginato de sodio 2%; CMC 4%) y CaCl₂ 3% en zumo sintético pH 3 y zumo natural de naranja.

Tiempo de tratamiento	Degradación de imonina (%)					
	Zumo sintético pH 3 ^B			Zumo natural de naranja ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%
24 h	8,44	5,08	13,73	10,61	7,12	21,50
ANOVA						
FACTOR	F			p		
Tipo de zumo	149,14			0,0003		

Tabla 7.49. Degradación de limonina por *R. fascians* inmovilizado en perlas huecas (alginato de sodio 2%; CMC 4%) y CaCl₂ 4% en zumo sintético pH 3 y zumo natural de naranja.

Tiempo de tratamiento	Degradación de limonina (%)					
	Zumo sintético pH 3 ^A			Zumo natural de naranja ^A		
	X	S	CV%	X	S	CV%
24 h	12,83	2,18	4,55	17,83	2,65	8,71
ANOVA						
FACTOR	F			p		
Tipo de zumo	3,84			0,01216		

Tabla 7.50. Contenido en limonoides en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Limonoides (μg limonina ml^{-1})		
	X	S	CV%
Control A ^A	28,21	5,12	18,15
Control B ^C	37,05	0,98	2,65
PVA 7% ^A	29,25	5,75	19,66
PVA 8% ^A	29,99	8,72	20,08
CaCl ₂ 3% ^B	33,12	7,12	21,50
CaCl ₂ 4% ^{AB}	30,44	2,65	8,71
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	31,53	0,0000	

Tabla 7.51. Contenido en flavonoides totales en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Flavonoides totales (μg naringina ml^{-1})		
	X	S	CV%
Control A ^A	280,22	0,95	0,34
Control B ^D	332,72	0,86	0,26
PVA 7% ^E	348,37	1,05	3,01
PVA 8% ^E	350,22	0,72	0,21
CaCl ₂ 3% ^C	326,88	0,68	0,21
CaCl ₂ 4% ^B	315,01	1,13	3,56
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	1640,37	0,0000	

Tabla 7.52. pH en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	pH		
	X	S	CV%
Control A ^A	3,57	0,03	0,84
Control B ^A	3,53	0,05	1,42
PVA 7% ^A	3,51	0,06	1,71
PVA 8% ^A	3,53	0,01	0,28
CaCl ₂ 3% ^A	3,69	0,03	0,81
CaCl ₂ 4% ^A	3,66	0,02	0,55
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	0,02	0,9999	

Tabla 7.53. Acidez en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Acidez (g ácido cítrico 100 ml ⁻¹)		
	X	S	CV%
Control A ^A	2,37	0,06	2,53
Control B ^A	2,56	0,03	1,17
PVA 7% ^A	2,29	0,11	4,80
PVA 8% ^A	2,34	0,06	2,56
CaCl ₂ 3% ^A	2,34	0,06	2,56
CaCl ₂ 4% ^A	2,31	0,03	1,30
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	0,03	0,9995	

Tabla 7.54. Contenido en sólidos solubles en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogel de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Sólidos solubles (°Brix)		
	X	S	CV%
Control A ^A	11,61	0,24	2,07
Control B ^A	12,35	0,18	1,46
PVA 7% ^A	11,42	0,09	0,79
PVA 8% ^A	11,45	0,02	0,17
CaCl ₂ 3% ^A	11,72	0,01	0,09
CaCl ₂ 4% ^A	12,00	0,12	1,00
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	0,38	0,8498	

Tabla 7.55. Índice de madurez en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogel de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Turbidez (Absorbancia a λ 660 nm)		
	X	S	CV%
Control A ^A	4,90	0,02	0,41
Control B ^A	4,82	0,06	1,20
PVA 7% ^A	4,97	0,03	0,60
PVA 8% ^A	4,89	0,04	0,82
CaCl ₂ 3% ^A	5,01	0,02	0,40
CaCl ₂ 4% ^A	5,19	0,02	0,39
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	0,09	0,9914	

Tabla 7.56. Color en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Color (Absorbancia a λ 420 nm)		
	X	S	CV%
Control A ^A	0,91	0,01	1,10
Control B ^C	1,03	0,01	0,97
PVA 7% ^C	1,05	0,04	3,81
PVA 8% ^C	1,04	0,03	2,90
CaCl ₂ 3% ^B	0,99	0,01	1,01
CaCl ₂ 4% ^B	1,00	0,01	1,00
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	78,80	0,0000	

Tabla 7.57. Turbidez en zumo de naranja desamargado con *R. fascians* inmovilizado en criogeles de PVA-PEG(8%) y *hollow-beads*, inóculo microbiano 0,6 DO.

Tratamiento	Turbidez (Absorbancia a λ 660 nm)		
	X	S	CV%
Control A ^A	2,21	1,05	47,51
Control B ^A	2,29	0,86	37,55
PVA 7% ^A	2,31	0,16	6,92
PVA 8% ^A	2,29	0,78	34,06
CaCl ₂ 3% ^A	2,27	1,11	48,89
CaCl ₂ 4% ^A	2,27	0,07	3,08
ANOVA			
FACTOR	F	p	
Tratamiento	1,00	1,0000	