INMOVILIZACION DE PECTINASAS Y/O CELULASAS Y DETERMINACION DE ALGUNOS DE SUS EFECTOS EN EL JUGO DE GUAYABA

LUIS ROLANDO RIOS ALZATE

FRANCISCO JAVIER ARIAS VARGAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
INGENIERIA QUÍMICA
2002

INMOVILIZACION DE PECTINASAS Y/O CELULASAS Y DETERMINACION DE ALGUNOS DE SUS EFECTOS EN EL JUGO DE GUAYABA

LUIS ROLANDO RIOS ALZATE
Código 394515
Linea de profundizacion: Alimentos

FRANCISCO JAVIER ARIAS VARGAS
Código 394519
Linea de profundizacion: Alimentos

Trabajo para optar al título de
Ingeniero Químico

MODALIDAD: TRABAJO DE GRADO

DIRECTORA:
GLORIA GIRALDO
TECNÓLOGA QUÍMICA
ESPECIALISTA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
ADMINISTRADORA DE EMPRESAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
INGENIERIA QUÍMICA
2002

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

Presidente del Jurado

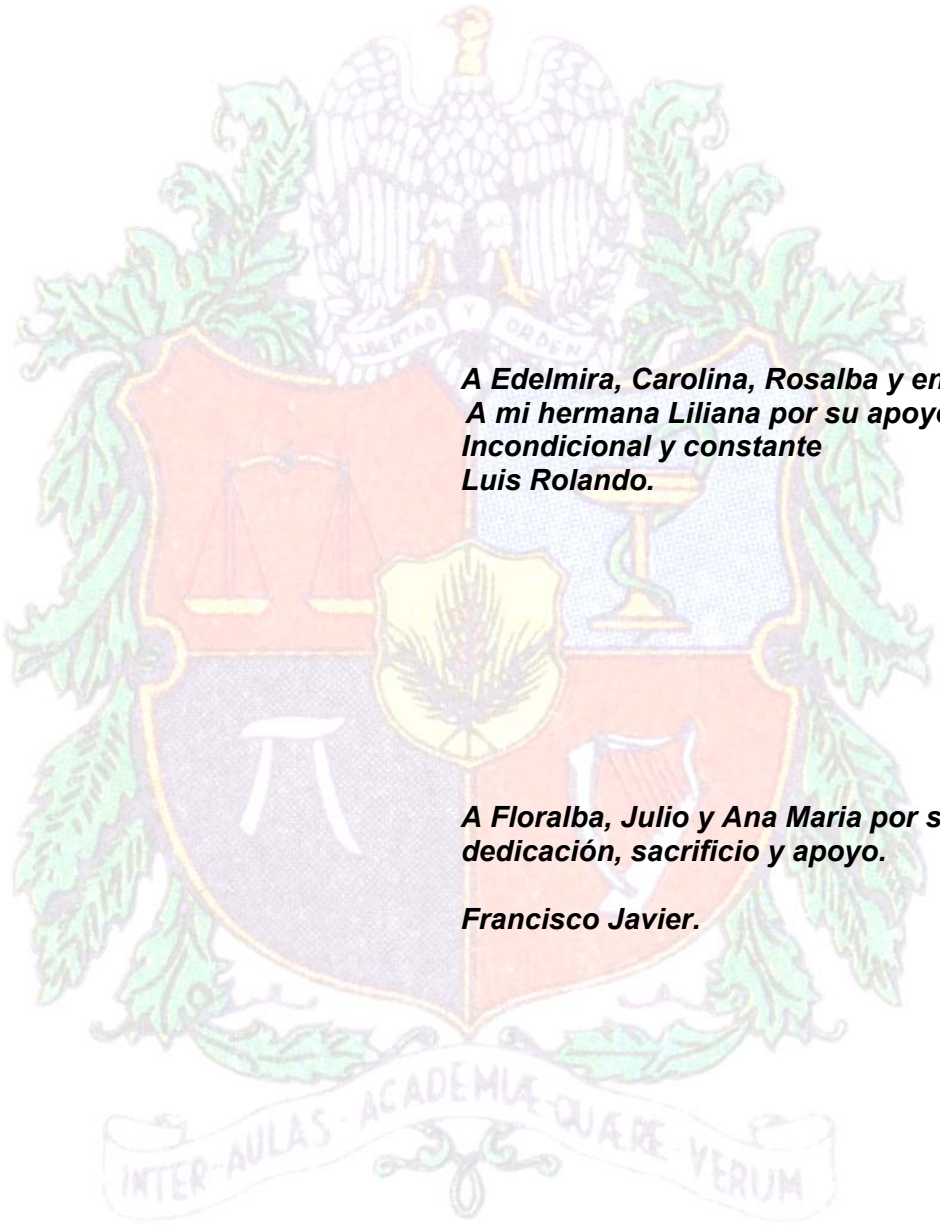
_____

Jurado

_____

Jurado

Manizales, día_____ mes_____ año _____



A Edelmira, Carolina, Rosalba y en especial
A mi hermana Liliana por su apoyo
Incondicional y constante
Luis Rolando.

A Floralba, Julio y Ana Maria por su dedicación, sacrificio y apoyo.

Francisco Javier.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Proenzimas S.A y en especial a Rodrigo Mejía Gómez, por su valiosa ayuda y constante apoyo a todo nivel.

Folcol Ltda. y en especial a su Gerente Adán Cruz, por su generosa colaboración para con el proyecto.

Joürgen Schneider Subdirector de la División Biotecnológica de la Worthington Biochemical Corporation, por sus aportes bibliográficos.

Jean Dornier Investigador del CIRAD , por la colaboración prestada.

Gloria Inés Giraldo, Directora del trabajo de grado, por su irrestricto y diligente apoyo.

Al personal Humano que conforma los Laboratorios de Química de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración constante y oportuna.

RESUMEN

Muchos factores influencian el procedimiento de inmovilización por enlace covalente sobre quitina, pero a su vez son susceptibles de ser optimizados en función de obtener una alta actividad catalítica. Es así como mediante la utilización de un diseño factorial, se alcanzó la relación entre temperatura (45ºC), concentración de activante (4% de ácido acético) y volumen de brazo espaciador (1.6 mL de glutaraldehido); para obtener un protocolo viable y reproducible de inmovilización de pectinasas y celulasas a partir de un cóctel enzimático comercial (Naturalzyme® 200 XL).

Las características cinéticas y los parámetros de temperatura y pH, fueron determinados para la enzima libre y la inmovilizada evaluando las ventajas y desventajas con su consecuente aplicación en la reducción de viscosidad de un jugo de guayaba. Es así como se abre una posibilidad de aplicación en la industria de jugos, apartir de la simulación de operación de un reactor PFR, además se realizaron varios seguimientos sobre la influencia del brazo espaciador en la superficie del soporte y sus efectos en el proceso general de inmovilización mediante microscopía de barrido electrónico (ESEM).

ABSTRACT

Many factors influence the immobilization procedure for covalent bound on chitin, but in turn they are susceptible of being optimized in function of obtaining a high catalytic activity. It is as well as by means of the use of a factorial design, the relationship was reached among temperature (45ºC), activer concentration (4% of acetic acid) and volume of space arm (1.6 glutaraldehyde mL); to obtain a viable protocol and reproducible of pectinase and celulase immobilization to leave from a commercial enzymatic cocktail (Naturalzyme 200 XL).

The kinetic characteristics and the parameters of temperature and pH, they were determined for the free enzyme and the immobilized, evaluating the advantages and disadvantages with their consequent application in the reduction of viscosity of a guava juice. It is as well as an application possibility opens up in the industry of juices, to leave of the simulation of operation of a PFR reactor, was also carried out several pursuits on the influence of the space arm in the surface of the support and its effects in the general process of immobilization by means of scanning electron microscopy (ESEM).

TABLA DE CONTENIDO

		Página
	INTRODUCCIÓN	
1.	OBJETIVOS	16
1.1	OBJETIVO GENERAL	16
1.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	17
2.1	PARED CELULAR DE LAS FRUTAS	17
2.1.1	La pectina	17
2.1.1.1	Las enzimas pecticas	19
2.1.1.2	Enzimas saponificadoras	19
2.1.1.3	Enzimas depolimerizadoras	20
2.1.1.4	La pectin-liasa	21
2.1.2	La celulosa	22
2.1.2.1	Las enzimas celulíticas	22
2.2	ZUMOS DE FRUTAS TROPICALES	24
2.3	GUAYABA	24
2.4	PROCESOS GENERALES DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS	27
2.4.1	Escogencia del soporte y el método	27
2.4.2	Métodos de inmovilización de enzimas	29
2.4.3	Inmovilización por adsorción	29
2.4.3.1	Principales ventajas del método	29
2.4.3.2	Principales desventajas	30
2.4.4	Enlace covalente	30
2.4.5	Atrapamiento	35
2.4.6	Encapsulación	36
2.4.7	Reticulación	37
2.4.8	Soportes para la inmovilización de enzimas	39
2.4.8.1	La quitina	40
2.4.9	Inmovilización sobre quitina	41
2.5	PROPIEDADES CINÉTICAS	44
2.5.1	Velocidad de reacción	44
2.5.2	Determinación de las constantes cinéticas	46
2.5.3	Efectos de la temperatura y el pH	47
2.6	ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL CONJUNTO ENZIMA SOPORTE	49
3	MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1	MATERIALES	52
3.2	ENZIMA UTILIZADA	52
3.3	EQUIPOS DE ANALISIS	52
3.4	EQUIPOS DE PROCESO	52
3.5	MÉTODOS	53
3.5.1	Preparación del soporte	53
3.5.2	Preparación y caracterización de la pulpa	54
3.5.3	Preparación del jugo	54
3.5.4	Curvas patrón	55
3.5.5	Caracterización de la enzima	55
3.5.6	Ensayos preliminares	55
3.5.7	Diseño 2^n	57
3.5.8	Ecuación del sistema de inmovilización	58
3.5.9	Respuesta de la pectinasa frente a diferentes parámetros	59
3.5.9.1	Respuesta frente al pH (pectinasa libre e inmovilizada)	59

3.5.9.2	Actividad pectinasa (libre e inmovilizada) frente a la temperatura	59
3.5.9.3	Actividad pectinasa (libre e inmovilizada) frente a la concentración	59
3.5.10	Respuesta de la celulasa frente a diferentes parámetros	59
3.5.11	Reducción en la viscosidad del jugo de guayaba	60
3.5.12	Efecto de la enzima libre e inmovilizada en los azucares reductores.	60
3.5.13	Determinación de la estabilidad operacional	61
3.5.14	Visualización de algunos efectos en el proceso de inmovilización	61
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1	CARACTERIZACION DE LA PULPA	62
4.2	CURVAS PATRON	62
4.2.1	Curva patrón de proteína	62
4.2.2	Curva patrón de azucares reductores	63
4.3	ENSAYOS PRELIMINARES	64
4.4	IDENTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS A OPTIMIZAR	65
4.5	ECUACIONES DEL COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA BASADO EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA Y EN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA	67
4.6	PROTOCOLO DE INMOVILIZACIÓN PARA PECTINASAS	68
4.7	RESPUESTA DE LA PECTINASA FRENTE A DIVERSOS PARAMETROS	69
4.7.1	Respuesta frente al pH (pectinasa libre e inmovilizada)	69
4.7.2	Actividad pectinasa (libre e inmovilizada) frente a la temperatura	70
4.7.3	Actividad pectinasa libre e inmovilizada frente a la concentración de sustrato	71
4.7.4	Lineweaber burk para pectinliasa libre e inmovilizada	72
4.8	RESPUESTA DE LA CELULASA FRENTE A DIFERENTES PARÁMETROS	73
4.8.1	Actividad celulasa libre e inmovilizada frente al pH	73
4.8.2	Actividad celulasa libre e inmovilizada frente a la concentración de sustrato	74
4.8.3	Lineweaber burk para celulasa libre e inmovilizada	75
4.8.4	Actividad celulasa libre e inmovilizada frente a la temperatura	77
4.9	ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL CONJUNTO INMOVILIZADO	78
4.10	EFECTO ENZIMATICO DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA SOBRE EL JUGO DE GUAYABA	79
4.10.1	Reducción en la viscosidad del jugo de guayaba	79
4.10.2	Efecto de la enzima libre e inmovilizada en los azucares reductores.	83
4.11	VISUALIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN Y EL EFECTO DEL BRAZO ESPACIADOR .	84
4.11.1	Poro de quitina antes y después de la inmovilización	84
4.11.2	Inmovilización con y sin brazo espaciador	85
4.11.3	Influencia del brazo espaciador en el efecto conformacional	86
4.12	COSTOS DE PREPARACIÓN DEL SOPORTE	88
5	CONCLUSIONES	89
6	RECOMENDACIONES	92
7	BIBLIOGRAFÍA	93

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AE.	Amino etil
Batch:	Reactor por lotes.
ºC:	Grado Centígrado
C1:	Exo-β-Glucanasa a la celulosa
CMC:	Carboxi Metil Celulosa
CSTR:	Reactor de tanque agitado.
Cx:	Endo-(1,4)-β-Gluconasa
DEAE	Dietil amino etil
DNS:	Ácido Dinitro Salicílico
FBR:	Reactor de lecho fluidizado
HEC	Hidroxi etil celulosa
Glu:	Glutaraldehido.
Kw:	Kilowatio
K_M:	Constante de Michaelis Menten
mL:	Mililitro
ME	Molécula espaciadora
Nm:	Nanómetro
NAG	n-acetil-glucosamina
PFR	Reactor de lecho empacado
PL:	Pectin-Liasa
PE:	Pectin-esterasa
SEM:	Microscopia de barrido electrónico
Torr:	Torricelli.
$t_{1/2}$	Vida media
μL:	Microlitro
μm:	Micrómetro
UI:	Unidades internacionales
UV:	Ultra violeta visible
V_{max}	Velocidad máxima de reacción

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Producción mundial estimada de puré de guayaba (1987-1988)	27
Tabla 2.	Consideraciones fundamentales en la selección del soporte y el método de Inmovilización.	28
Tabla 3	Porcentaje de reactividad relativa de residuos de aminoácidos	34
Tabla 4.	Número de reacciones en las que cada aminoácido participa	34
Tabla 5.	Resumen de algunas propiedades para las diferentes clases de Inmovilización	39
Tabla 6	Materiales empleados	52
Tabla 7.	Listado de métodos usados para la caracterización de la pulpa	54
Tabla 8.	Listado de métodos usados para la caracterización de la enzima	55
Tabla 9.	Datos para la inmovilización de pectinasa sobre quitosano sin molécula espaciadora	56
Tabla 10.	Inmovilización de pectinasa sobre quitosano usando molécula espaciadora	56
Tabla 11.	Condiciones del protocolo de inmovilización.	58
Tabla 12.	Niveles máximos(+) y mínimos(–) de las variables del plan	58
Tabla 13.	Matriz de experiencia para el plan 2^3	58
Tabla 14	Caracterización de la pulpa de guayaba obtenida	62
Tabla 15.	Datos para la obtención de la curva de proteína (Método de Biuret)	62
Tabla 16.	Datos para la obtención de la curva patrón de Azucares reductores (DNS)	63
Tabla 17.	Resumen sobre los resultados obtenidos mediante los protocolos especificados las tablas 9 y 10 (Pruebas realizadas por triplicado)	64
Tabla 18.	Condiciones del protocolo de inmovilización	65
Tabla 19.	Niveles máximos(+) y mínimos(–) de las variables del plan	66
Tabla 20.	Matriz de experiencia para el plan 2^3	66
Tabla 21.	Respuestas Obtenidas del Plan (Pruebas por Duplicado)	66
Tabla 22.	Parámetros de la proteína inmovilizada	67
Tabla 23.	Parámetros para la actividad de la pectinasa inmovilizada	67
Tabla 24	Datos para generar la curva de Pectinasa libre Vs pH	A4
Tabla 25.	Datos para generar la curva de la pectinasa inmovilizada vs pH	A4
Tabla 26.	Datos para generar la curva Pectinasa libre Vs Temperatura	A4
Tabla 27.	Datos para generar la curva de la pectinasa inmovilizada frente a la temperatura	A4
Tabla 28.	Datos para generar la curva de pectinasa libre Vs Concentración de Sustrato	A4
Tabla 29.	Datos para generar la curva Pectinasa Inmovilizada frente a la concentración de sustrato	A4
Tabla 30.	Doble recíprocos para generar la grafica de lineweaber (pectinasa libre)	A4
Tabla 31.	Dobles recíprocos para generar lineweaber de la pectinasa inmovilizada	A4
Tabla 32.	Datos obtenidos para generar la curva celulasa libre frente al pH	A4
Tabla 33.	Datos para generar la curva de Celulasa inmovilizada frente al pH	A4
Tabla 34.	Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa Libre frente a la concentración de Sustrato	A4
Tabla 35.	Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa Inmovilizada frente a la concentración de Sustrato	A4
Tabla 36.	Datos lineweaber para celulasa libre	A4
Tabla 37.	Datos lineweaber para celulasa inmovilizada	A4

Tabla 38. Datos de estabilidad operacional A4
Tabla 39. Datos para la reducción de viscosidad jugo guayaba (enzima libre) A4
Tabla 40. Datos para la reducción de viscosidad jugo guayaba (enzima inmovilizada) A4
Tabla 41. Comparación en la Reducción de la viscosidad del Jugo de Guayaba 81
Tabla 42. Datos de Estabilidad Operacional (Batch) para un Jugo de Guayaba 82
Tabla 43. Costo por paso en el proceso de inmovilización (costo por gramo) 88

LISTA DE FIGURAS

		Página
Fig.1	Porción de una molécula de pectina	17
Fig. 2	Ácido α-D-Galacturónico	18
Fig. 3	Gráfico de zonas cabelludas	18
Fig.4	Acción de la Depolimerasa sobre la pectina	19
Fig.5	Acción de la Pectinesterasa sobre la Pectina	19
Fig.6	Enzimas Depolimerizadoras	20
Fig. 7	Reacción Vía Endomecanismo	20
Fig.8	Reacción Vía Exomecanismo	21
Fig.9	Acción de la Pectin-liasa	21
Fig. 10	Porción de una molécula de celulosa	22
Fig. 11	Ataque de la Endo-β-Glucanasa a la celulosa	23
Fig. 12	Ataque de la Exo-β-Glucanasa a la celulosa	23
Fig. 13	Psidium Guajaba (Guayaba Común)	25
Fig. 14	Interior de la guayaba	26
Fig. 15	inmovilización por adsorción	29
Fig. 16	Inmovilización por Enlace Covalente	31
Fig. 17	Microarquitectura de algunos soportes de material usados para la Inmovilización de enzimas	32
Fig. 18	Inmovilización por atrapamiento	36
Fig. 19	Inmovilización por Encapsulación	37
Fig. 20	Inmovilización por Reticulación	38
Fig. 21	Resumen sobre los métodos de inmovilizacion	38
Fig. 22	Estructura de la Química de la Quitina	40
Fig.23	Estructura Química del Quitosano	41
Fig.24	Proceso General de Inmovilización sobre Quitosano	43
Fig. 25	Efecto de la concentración de reactante en la velocidad de una reacción catalizada Por una enzima.	46
Fig. 26	Grafico de dobles recíprocos	47
Fig.27	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática (esta respuesta es esperable típicamente en un rango de 0 a 100 ºC)	48
Fig.28	Relación entre la actividad enzimática y el pH	49
Fig. 29	Estabilidad operacional de una enzima inmovilizada	50
Fig. 30	Gráfico de la estabilidad operacional	51
Fig.31	Materia prima empleada en la elaboración de la pulpa	54
Fig.32	Reactor de lecho empacado utilizado	61
Fig. 33	Curva patrón de Proteína	63
Fig.34	Curva Patrón de Azucares Reductores	64
Fig.35	Hojuelas con enzima inmovilizada	69
Fig.36	Respuesta de la Pectinasa libre frente al pH	69
Fig.37	Respuesta de la Pectinasa Inmovilizada frente al pH	70
Fig.38	Respuesta de la pectinasa libre frente a la temperatura	70
Fig.39	Respuesta de la pectinasa inmovilizada frente a la temperatura	71
Fig. 40	Respuesta de la pectinasa libre frente a la concentración de sustrato	71
Fig 41	Respuesta de la pectinasa inmovilizada frente a la concentración de sustrato	72
Fig 42	Curva de Lineweaber para la pectinasa libre	72
Fig. 43	Grafico de lineweaber para la pectinasa inmovilizada	73
Fig. 44	Actividad celulasa libre frente al pH	74
Fig. 45	Actividad celulasa Inmovilizada frente al pH	74
Fig. 46	Respuesta de la celulasa libre frente a la concentración de sustrato	75
Fig. 47	Respuesta de la celulasa inmovilizada frente a la concentración de sustrato	75

Fig. 48	Grafico de lineweaber para la celulasa libre	76
Fig. 49	Gráfico de lineweaber para celulasa inmovilizada	76
Fig. 50	Respuesta de la celulasa libre frente a la temperatura	77
Fig. 51	Respuesta de la celulasa inmovilizada frente a la temperatura	78
Fig. 52	Estabilidad operacional del conjunto inmovilizado	78
Fig. 53	Linealización de la estabilidad operacional	79
Fig. 54	Efecto de la Enzima libre sobre la viscosidad en el jugo de guayaba	80
Fig. 55	Linealización del efecto de la enzima libre sobre la viscosidad el jugo de guayaba	80
Fig. 56	Efecto de la enzima inmovilizada sobre la viscosidad el jugo de guayaba	81
Fig. 57	Linealización del efecto de la enzima inmovilizada sobre la viscosidad el jugo de guayaba	81
Fig. 58	Aumento de azucares reductores en la guayaba (celulasa libre)	83
Fig. 59	Aumento de azucares reductores en la guayaba (inmovilizada)	83
Fig. 60	Poro de quitosano antes de la inmovilización	84
Fig. 61	Poro de quitosano después del proceso de inmovilización	85
Fig. 62	Inmovilización sin brazo espaciador	86
Fig. 63	Inmovilización con brazo espaciador	86
Fig. 64	Acercamiento a una estructura de proteína sin brazo espaciador	87
Fig. 65	Acercamiento a una estructura de proteína con brazo espaciador	87

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 METODO DE BIURET

ANEXO 2 METODO DEL DNS PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

ANEXO 3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA PECTINASA Y CELULASA

ANEXO 4 TABLAS DE RESULTADOS

ANEXO 5 FICHA TECNICA DE LA ENZIMA

INTRODUCCION

Con el auge de la biotecnología, las enzimas son los catalizadores mas estudiados actualmente frente a los demás; pues presentan una mayor selectividad frente al sustrato o reactivo, mayor rendimiento, hacen la conversión de reactivo a producto más rápido y con una ventaja que supera a todas la anteriores y es que se presentan con abundancia en la naturaleza lo que hace muy fácil su acceso.

Las preparaciones enzimáticas (cócteles) son ampliamente utilizadas en la industria de procesamiento de jugos por sus efectos en el proceso, por ejemplo la reducción de la viscosidad y la licuefacción de la pared celular. Esta última requiere una cantidad y presencia de varias enzimas como son pectinasas y celulasas para obtener un sinergismo entre ambas. Inmovilizando estas enzimas en un soporte sólido, se puede tener la posibilidad de la reutilización de la actividad catalítica, el control de la reacción y el posible diseño de un bioreactor con el consecuente beneficio de poder llevar un proceso de tipo batch a continuo.

La inmovilización de pectinasas y celulasas ha sido ampliamente estudiada en la industria de alimentos y la industria del papel. El uso de estas enzimas inmovilizadas en la industria de jugos, requiere varias condiciones como son soportes baratos y accesibles que contengan grupos reactivos que permitan una activación fácil y que a su vez no sean tóxicos, a su vez que permitan una estabilidad adecuada en la industria alimenticia. La quitina, cumple con estos requerimientos; ella ha sido ampliamente utilizada en alimentos y en la industria farmacéutica.

Con este trabajo se inmovilizaron pectinasas a partir del cóctel enzimático Naturalzyme® 200 XL (Ver anexo 5) en un soporte de quitina, al mismo tiempo que se obtuvo un protocolo de inmovilización para tal enzima con base en un plan de experiencia factorial (2^n) el cual proporciono un modelo matemático que relaciona las tres variables principales en la inmovilización como son la temperatura de activación, concentración de activante y concentración del brazo espaciador. Así mismo, se compararon las posibilidades de la inmovilización sobre quitina y se evaluaron algunos parámetros propios de la catálisis enzimática tales como la constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima (V_m) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$), así como su efecto en la reducción de la viscosidad de un jugo de guayaba y su evaluación en la producción de azucares reductores.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar pectinasas y/o celulasas sobre quitina

1.2 Objetivos específicos:

- Obtener un protocolo de inmovilización de pectinasas sobre quitina.
- Obtener una ecuación matemática que describa el fenómeno de la inmovilización en términos de las variables de proceso con base en el plan de diseño factorial.
- Establecer las condiciones más adecuadas para inmovilizar la enzima sobre la superficie de quitina utilizando modelos matemático-estadísticos para definir el diseño experimental.
- Establecer la conveniencia de la utilización de un brazo espaciador como el glutaraldehido en el proceso de inmovilización.
- Comparar algunos parámetros de las propiedades de la enzima libre frente a la inmovilizada tales como la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}), las cuales se obtendrán experimentalmente.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 PARED CELULAR DE LAS FRUTAS

Por lo general la composición porcentual de los polisacáridos de la pared celular de las frutas, no presenta mayores diferencias teniendo la siguiente distribución:

Pectina	35%
Celulosa	30%
Hemicelulosa	30%
Proteína en Plantas dicotiledóneas	5%

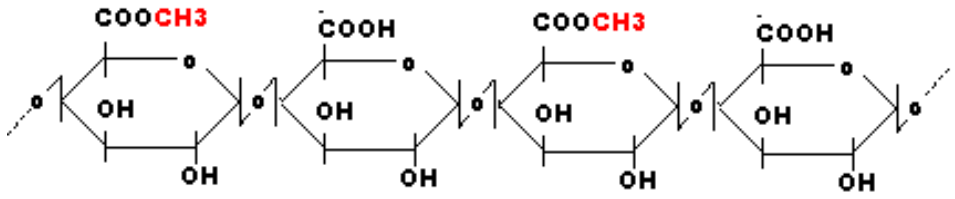
Casi todos los modelos de la pared celular, sugieren micro-fibrillas celulósicas incrustadas en una matriz de polisacáridos no celulósicos y proteína. Estos coloides son responsables de la viscosidad en el proceso de tratamiento de la pulpa de las frutas; por lo cual su importancia en el estudio de la clarificación y procesamiento de jugos [8].

2.1.1 LA PECTINA.

Las sustancias pécticas están constituidas por un gran numero de compuestos, dependiendo del grado y tipo de acción enzimática. El compuesto primario en el tejido intacto y maduro es la protopectina, una sustancia insoluble que sirve para mantener unidas las células de la pared celular. La protopectina puede ser insoluble debido a su tamaño o por su unión con cationes bivalentes o con otros polisacáridos.

En la pectina o polimetil-galacturonato (Fig. 1), el 75% de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonato se encuentran esterificadas con metanol. En el ácido péctico (Ácido Poligalacturónico) han sido removidos todos los grupos metoxi.

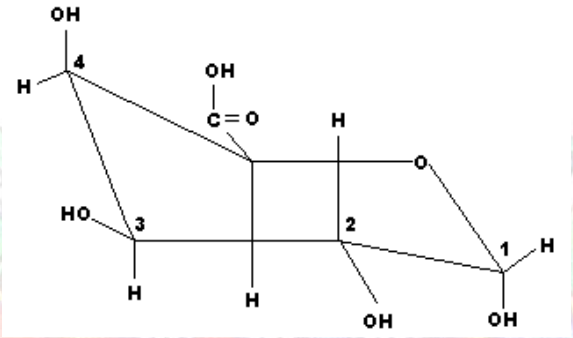
Fig.1 Porción de una molécula de pectina



Los Rhamno-Galacturonatos son los principales constituyentes de las sustancias pecticas. Las cadenas primarias consisten principalmente de unidades α-D-Galacturonato con 2 a 4% de unidades de L-Rhamnosa (Cada una con alrededor de 25 unidades de Galacturonato).

Los restos de Ácido α-D-Galacturónicos están unidos por enlaces α-(1,4) tal y como se muestra en la figura 2.

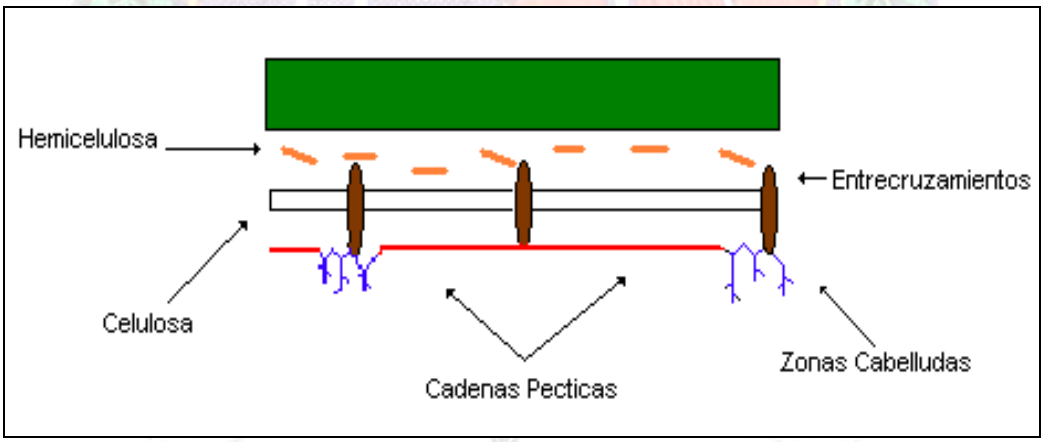
Fig. 2 Ácido α-D-Galacturónico



Fuente: Lehninger [12]

Se ha encontrado que los residuos de rhamnosa en el esqueleto homogalacturónico sirve de unión de la arabinosa y galactosa a los lados de la cadena, lo cual conforma las zonas cabelludas (Fig.3) donde generalmente estas zonas rhamnogalacturónicas no son susceptibles a la degradación por pectinasas [8].

Fig. 3 Gráfico de zonas cabelludas



Fuente: Cirad [7]

2.1.1.1 Las Enzimas Pécticas: las enzimas que actúan sobre las sustancias pécticas, están divididas en dos categorías; las enzimas depolimerizadoras (Fig.4) y las saponificadoras o pectin-esterasas (Fig. 5).

Fig.4 Acción de la Depolimerasa sobre la pectina

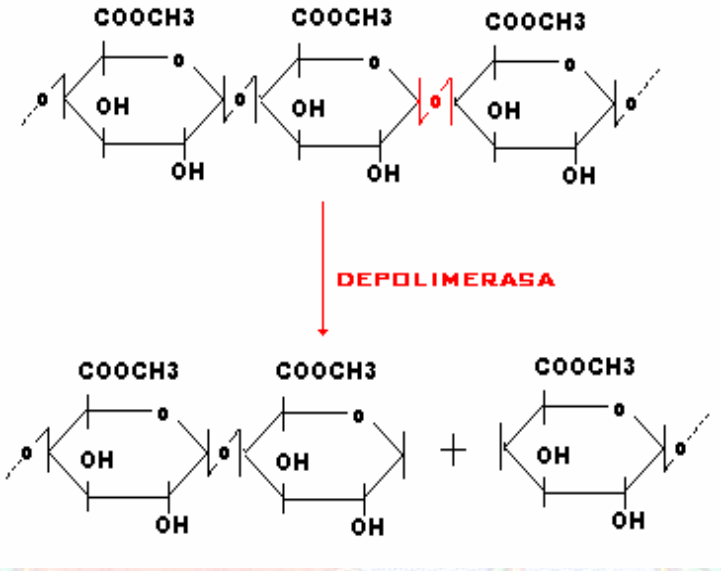
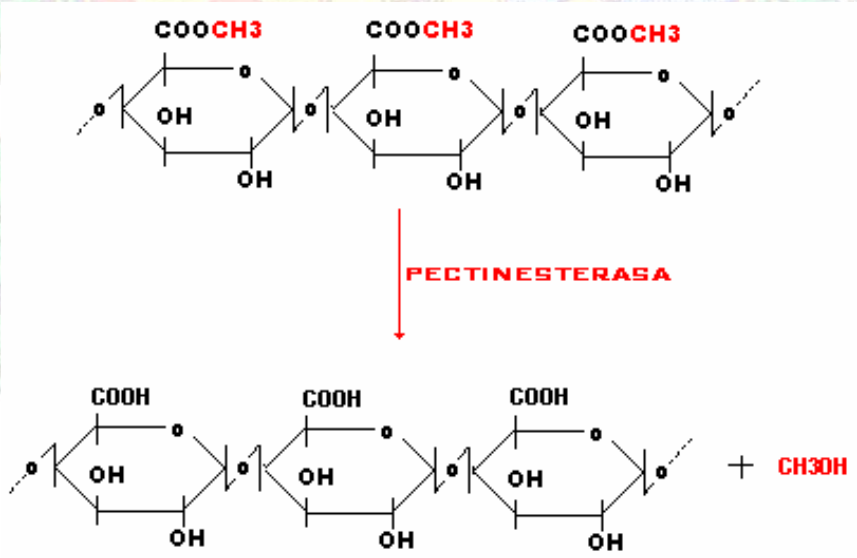


Fig.5 Acción de la Pectinesterasa sobre la Pectina

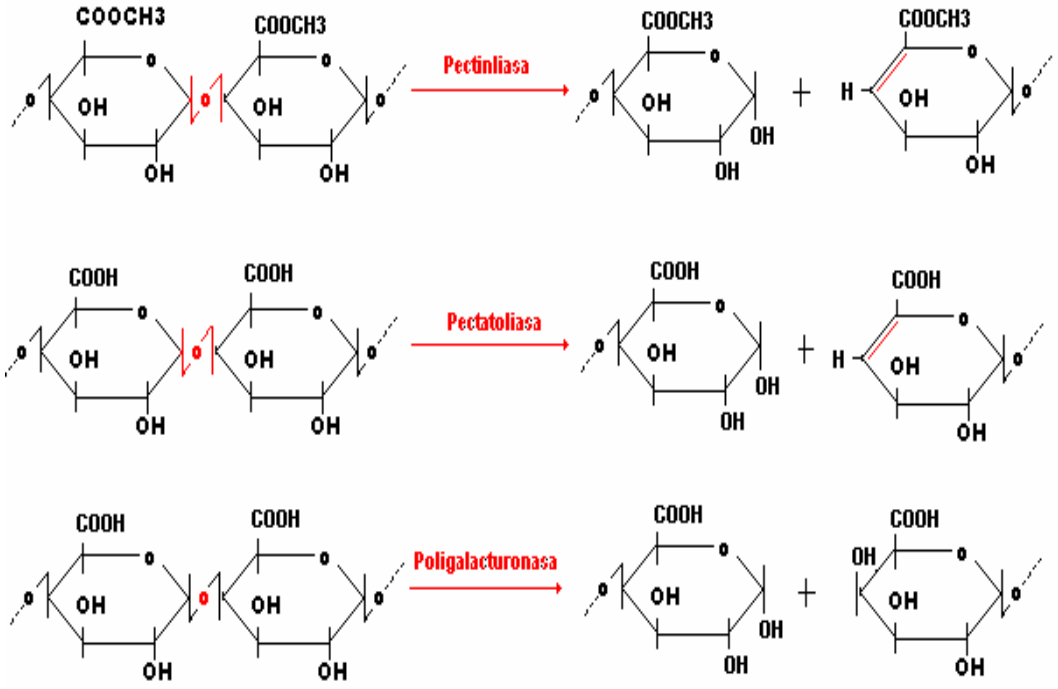


Fuente: Cirad [7]

2.1.1.2 Enzimas Saponificadoras: una enzima saponificadora, es específicamente una pectin-metil-esterasa la cual libera un grupo metil-ester del ácido Poligalacturónico y a la que se conoce como pectin-esterasa o PE o Pectin-pectil-hidrolasa.

2.1.1.3 Enzimas Depolimerizadoras: las enzimas depolimerizadoras, son clasificadas de acuerdo al criterio de si son hidrolíticas sobre los enlaces (1,4) Glicosídicos del esqueleto poligalacturónico como la poligalacturonasa o transeliminativas como la pectatoliasa y la pectinliasa (Fig. 6).

Fig.6 : Enzimas Depolimerizadoras



Así mismo dichas enzimas se clasifican de acuerdo al sitio de ataque con respecto al sustrato; así, si atacan a la pectina fraccionándola en unidades de más de dos moléculas de ácido galacturónico se le conoce como de endomecanismo (Fig. 7), en cambio si ataca y fracciona la pectina por sus extremos se le conoce como de exo-mecanismo (Fig. 8).

Fig. 7 Reacción Vía Endomecanismo

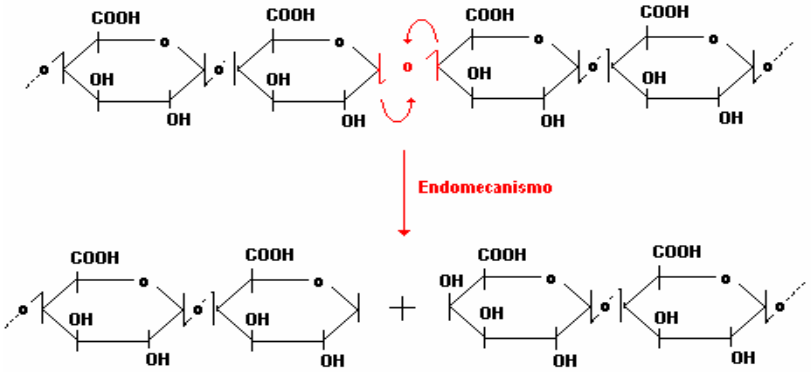
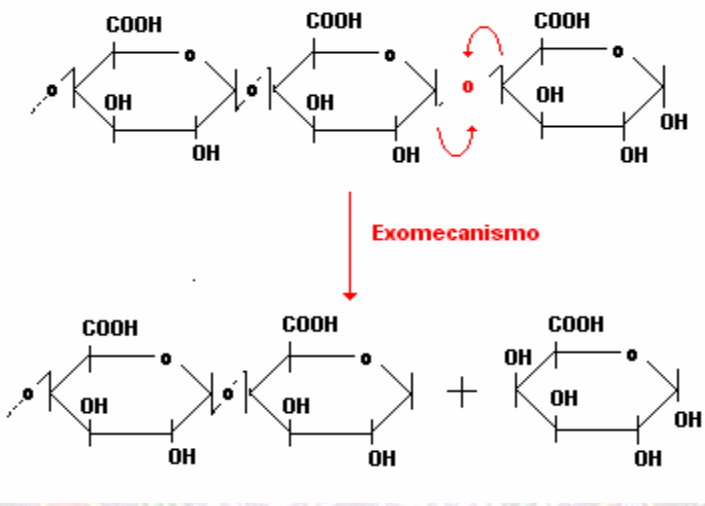


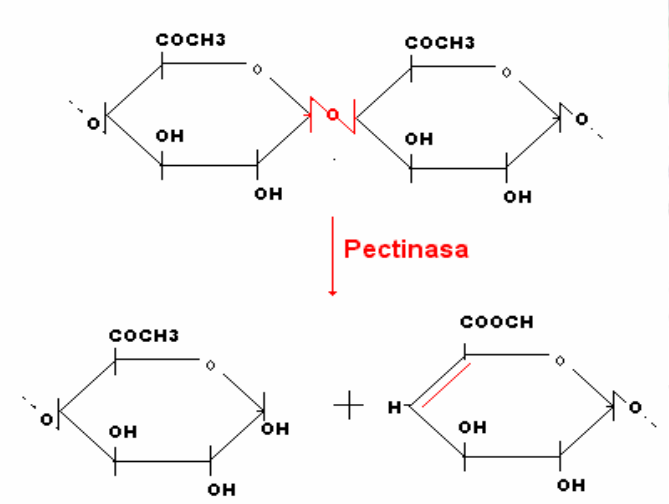
Fig.8 Reacción Vía Exomecanismo



La principal enzima pectinolítica utilizada en la industria es la PL debido al mayor contenido de pectina en el material insoluble de los jugos. Otras enzimas tales como la PE, son evitadas en los procesos debido a subproductos que alteran las propiedades organolépticas del jugo y producen material toxico para el consumo humano como lo es en este caso el metanol.

2.1.1.4 Pectin-liasa: las pectin-liasas llevan a cabo la ruptura del puente glicosídico por un mecanismo de β-eliminación sobre pectinas con alto grado de esterificación, produciendo un doble enlace sobre los carbonos 4 y 5 del ácido galacturónico como se muestra en la figura 9.

Fig.9 Acción de la Pectin-liasa

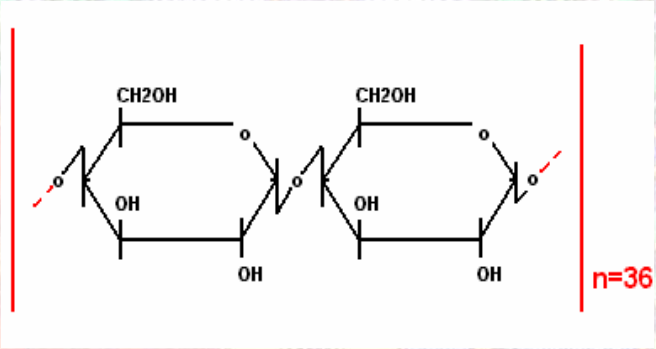


2.1.2 LA CELULOSA.

Es un polisacárido que determina y forma la estructura de las membranas celulares de la especies vegetales y se puede encontrar asociada a otros compuestos como hemicelulosas y ligninas.

La celulosa es un β-glucósido de cadena lineal. La configuración β permite a la celulosa formar cadenas muy largas y rectas (Fig. 10). La cadena recta formada por este tipo de uniones es óptima para construir fibras por una elevada fuerza tensil [8].

Fig. 10 Porción de una molécula de celulosa

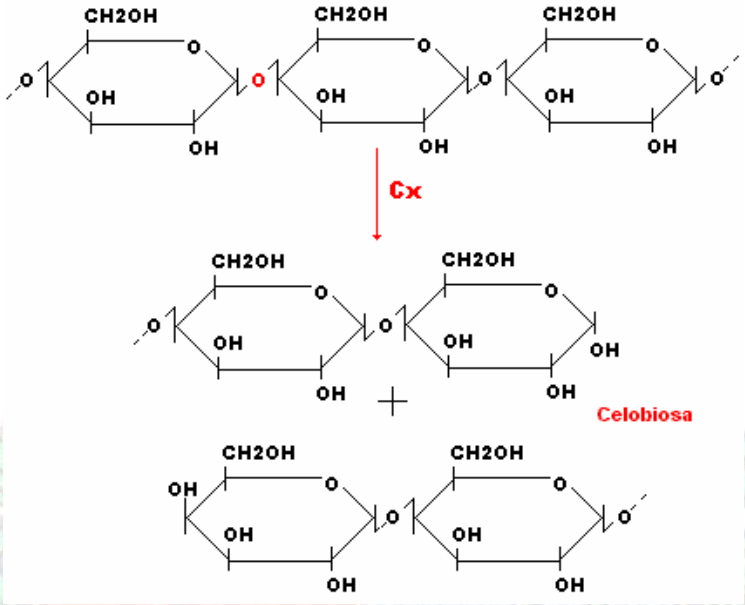


La hidrólisis completa de este polisacárido con ácido concentrado produce únicamente D-glucosa, pero la hidrólisis parcial rinde el disacárido reductor celobiosa, cuyo enlace entre las unidades de D-glucosa es β-(1,4) [8]. Se ha encontrado que la celulosa esta asociada con una mono-capa de hemicelulosa, la cual esta constituida principalmente por xiloglucano, que es una cadena glucosidica lineal β-(1,4); La cadena contiene xilosa, galactosa y fructuosa que están unidas al carbono 6 del residuo glucosídico del esqueleto glucan en forma de intervalos regulares.

2.1.2.1 Las Enzimas Celulíticas: de igual manera que la pectina es atacada por enzimas que la degradan, la celulosa es atacada por enzimas celulíticas que pueden ser solo de dos tipos:

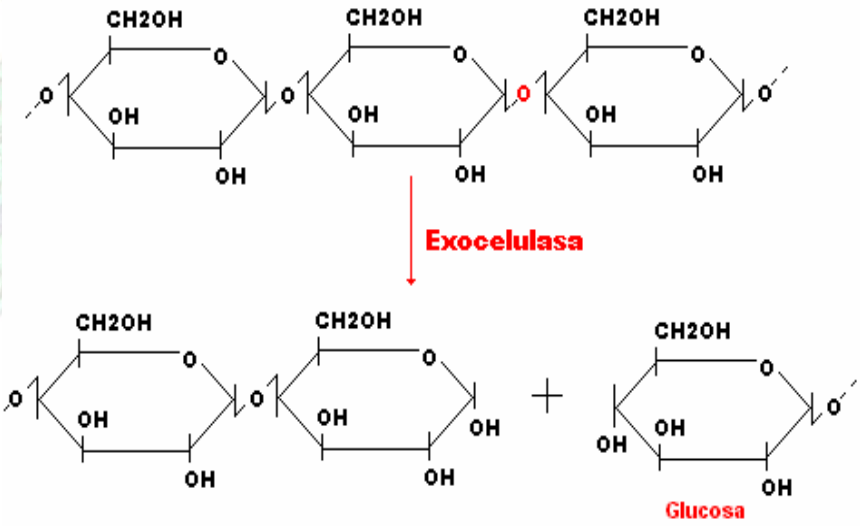
- **Endo-β-Glucanasa:** también llamada Cx; hidroliza los enlaces β-(1,4)-Glicosídicos así como se muestra la figura 11. No ataca la celobiosa pero hidroliza las celodextrinas y celulosas sustituidas como CMC (Carboximetil celulosa) y HEC (Hidroxi-etil-celulosa). Algunas Endo-glucanasas también actúan sobre celulosa cristalina, la especificidad de esta enzima no es muy alta, porque ataca celulosas altamente sustituidas [7]

Fig. 11 Ataque de la Endo-β-Glucanasa a la celulosa



❖ **Exo-β-Glucanasa**: también llamada C1, ataca las partes terminales de la cadena obteniéndose glucosa (Fig. 12).

Fig. 12 Ataque de la Exo-β-Glucanasa a la celulosa



Las celulasas son encontradas en plantas, también son producidas por bacterias y hongos. Las preparaciones ricas en actividad celulítica son obtenida principalmente a partir de la especie tricoderma.

2.2 ZUMOS DE FRUTAS TROPICALES

Son los recién llegados al mercado de zumos y bebidas a base de frutas. Con la excepción del zumo de piña los demás se han establecido en ese sector muy recientemente y tienen todavía mucho espacio para desarrollarse. Desde 1932, se comercializa el zumo de piña y el avance de los demás zumos tropicales ha sido mucho más reciente, por lo que el mercado para ellos esta poco introducido en Europa y especialmente en Norteamérica.

La expansión de la demanda fue estimulada, sin duda, por la diversidad de frutas tropicales que son asequibles desde los años 80, primero se vendieron en tiendas de comunidades étnicas y ahora se les encuentra en los mayores supermercados de Europa y Norteamérica. Este interés da lugar al empleo de métodos de producción más sofisticados, así como de selección y envasado, con lo que se consigue mayor calidad y aspecto más atractivo de fruta fresca, lo que a su vez, aumenta la demanda. El resultado ha sido un mayor conocimiento del público en torno a las frutas tropicales y creciente interés por los zumos y bebidas elaboradas a base de dichas frutas, lo que se ha visto fomentado por la propaganda de los principales distribuidores.

A parte de la piña, los principales zumos con cierta popularidad en Europa, son la Guayaba, el mango, Fruta de la pasión (Maracuyá) y algunos otros de menos importancia. Con la excepción de la piña, los zumos tropicales no se beben como tales y se encuentran como néctares o bebidas a base de zumo o como un ingrediente en bebidas mezcla de varias frutas, que son las que han llegado a ser más habituales en los últimos años.

Cuando se hace referencia al grado de concentración, este se expresa en grados Brix y no en volumen. La razón para esto es doble: Primero, no hay criterio oficial para grado Brix o contenido en sólidos de zumos sin concentrar de frutas tropícales o purés y segundo, los sólidos naturalmente presentes en diversas frutas varían considerablemente según su origen, variedad y el momento en que han sido cosechados. [1]

2.3 GUAYABA

La guayaba, *psidium guajaba L*. (Ver Fig. 13); pertenece a la familia de la *Myrtaceae* que incluye el conocido mirto mediterráneo de tanto importancia mitológica para los griegos y romanos, el eucalipto y los brotes secos de *Syzygium Aromaticum* conocidos como clavos, los únicos frutos comestibles de dicha familia son las guayabas, las cuales se transforman industrialmente, aunque hay otras frutas como las cerezas brasileñas y los tambis, que se venden en mayor parte como fruta fresca a nivel local [1].

Fig. 13 *Psidium Guajaba* (Guayaba Común)

Se cree que las guayabas son originarias de las zonas tropicales y de Sudamérica, pero crecieron muy bien en Asia a principios del siglo XVII y ahora son conocidas en muchas zonas tropicales y subtropicales del mundo.

La planta crece espontáneamente y se adapta bien a distintas condiciones tanto en regiones tropicales como subtropicales, las zonas más importantes de producción, incluyen Florida, California y Hawai, América Central y Sudamérica, India, Sudeste de Asia, Australia y las islas del mar del sur y las regiones norte y sur de África. [1]

El fruto tiene un tamaño aproximado de un limón, puede ser redondo o en forma de pera y crecen arbolitos o arbustos que dan fruto a los tres años y están en completo rendimiento a los seis años. Las plantaciones tienen una densidad de 250 árboles por hectárea y en plena producción se consigue 35 toneladas de fruta por hectárea, es fácil la multiplicación por semillas, creciendo en forma silvestre y extendiéndose en algunas áreas como Florida, casi como las malas hierbas. El fruto tiene la corteza amarilla y el interior se parece al tomate, presentando gran cantidad de pequeños semillas afiladas (Fig. 14).

Hay muchas variedades diferentes, demasiado numerosas para enunciarlas todas; y estas se han desarrollado en distintas zonas así como una gran variedad de tipo silvestre de baja calidad. Para la industria que fabrica el zumo, es conveniente dividir los diferentes tipos en un sentido amplio como los de pulpa blanca o pulpa rosada, de las cuales la variedad Beaumont es, posiblemente, la que mejor se conoce.

Fig. 14 Interior de la guayaba

El zumo y el puré de la guayaba tienen un alto valor nutritivo y unas características olfato-gustativas peculiares. El total de sólidos solubles tiende a ser bajo con valores medio de 9 ºBrix y la relación Brix / Ácido se sitúa entre 6 y 20 así como el pH varia entre 3.2 y 4.2.

Para producir el puré de guayaba, el método usual es aplastar la fruta y pasarla a través de tamices o filtros para separar las semillas y el material fibroso de las cortezas. El rendimiento en zumo es bajo, alrededor del 25 al 30 % del peso de fruta utilizada y se han usado varios métodos en las que se incluye la cocción y la congelación para romper las estructuras celulares y aumentar el rendimiento. Las cocciones se realizan a 100ºC durante 30 minutos, pero altera las características olfato-gustativas y la congelación es cara.

Recientemente, algunos fabricantes han usado el tratamiento con enzimas para obtener mayores rendimientos. La mayor dificultad de la fabricación se debe a las semillas y sus fragmentos, porque son muy afiladas y duras y en el puré dan lugar a una textura desagradable y arenosa. Además, causan excesivo desgaste y roturas en la maquinaria, especialmente en las zonas recubiertas de goma del equipo de llenado [1].

La producción mundial de puré estimada en áreas escogidas se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. **Producción mundial estimada de puré de guayaba (1987-1988)**

País	Toneladas
EE UU	5500-6000
Brasil	4000
Sudáfrica	800-1000
Australia	600-1000
India	1500
Pakistán	100-200
Taiwán	100-200
Otros	400-600

Fuente: Producción y Envasado de Zumos y Bebidas de Frutas sin Gas.. Ed Acribia S.A 1995.

2.4 PROCESOS GENERALES DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La tecnología para la inmovilización de células y enzimas se ha desarrollado y tiene alrededor de 25 años de existencia, pero es en años recientes que se ha puesto a nivel y no se observa declinación. Toda vez que la expansión en biotecnología y los desarrollo esperados crecen con los avances en tecnología genética, se ha revitalizado el entusiasmo para la inmovilización de enzimas y células. Los trabajos de investigación y desarrollo han provisto materiales y métodos para la inmovilización. Mucha de esta expansión puede ser atribuida a los desarrollos y aplicaciones específicas. Sorpresivamente esto ha dado un estudio detallado y comprensivo de los métodos y soportes en la inmovilización. Toda vez, que no se cuenta con un material y método ideal para la inmovilización se ha provisto un método estándar para cada tipo de inmovilización.

Un gran número de aspectos prácticos, pueden ser considerados antes de embarcarse en un trabajo experimental que conduzca finalmente a una enzima inmovilizada, es por esto que el trabajo debe ser planeado con un propósito y a una efectividad optima. [3]

2.4.1 ESCOGENCIA DEL SOPORTE Y EL MÉTODO

En solución, las moléculas de enzima están verdaderamente dispersas en el medio y tienen un movimiento completamente libre. La inmovilización de una enzima, es una técnica especialmente designada en la cual hay una gran restricción del movimiento libre de la misma. Esta primera consideración es lo que decide el material de soporte, lo que a su vez determina la aplicación.

Muchos de los puntos a considerar cuando se va a tomar una decisión para este trabajo se resumen en la tabla 2, mostrando como diferentes métodos de

inmovilización pueden influir en la actividad y en la vida útil del complejo inmovilizado.

Tabla 2: Consideraciones fundamentales en la selección del soporte y el método de Inmovilización.

Propiedad	Puntos a considerar
Física	Fuerza, No compresión de partículas, Área de superficie válida, Forma (Lecho/fibras/hojuelas), Grado de porosidad, Volumen del poro, Permeabilidad, Densidad, Espacio para el incremento de biomasa, Velocidad de flujo y caída de presión.
Química	Hidrofilidad (agua enlazada con el soporte), Inertes hacia la enzima, Grupo funcionales validos para la modificación y regeneración, Reutilización del soporte
Estabilidad	Almacenamiento, Actividad residual enzimática, Productividad celular, Regeneración de la actividad enzimática, Mantenimiento de la viabilidad celular, Estabilidad mecánica del material de soporte
Resistencia	Ataque por bacterias u hongos, Disrupción por químicos, pH, Temperatura, Solventes orgánicos, Proteasas y mecanismos de defensa celular.
Seguridad	Biocompatibilidad (Envuelve una respuesta inmune), toxicidad de los reactivos componentes, Salud y seguridad para los trabajadores en el proceso y los usuarios, Especificación de la preparación inmovilizada (Lista aprobada por la FDA) para alimentos, farmacéutico y aplicaciones médicas.
Económica	Viabilidad y costos del soporte, Químicos, Equipo especial, Reactivos, Habilidad técnica requerida, Impacto ambiental, Preparación a escala industrial, Posibilidad para el escalado, Proceso continuo, Vida útil, Recuperabilidad del soporte, Cero contaminación (Producto libre de enzimas o celulas)
Reacción	Velocidad de flujo, Carga de la enzima y productividad catalítica, cinética de la reacción, sitio de la reacción. Enzima o sistemas múltiples: Batch, CSTR, FBR, PBR, ALR y otros más; Limitaciones en los cofactores de transferencia de masa, sustratos y productos.

Fuente: Inmmobilization of Enzymes and Cells [3]

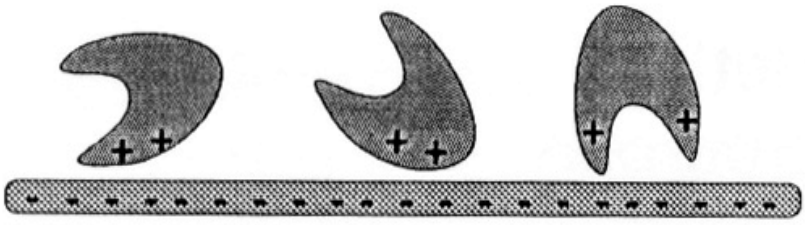
2.4.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La actividad o funcionalidad de las enzimas esta ligada al mantenimiento de la integridad de la conformación ternaria en particular de su sitio activo. Los procesos de inmovilización deben por consiguiente, ser métodos suaves, bien regulados, que respeten la estructura nativa de la proteína, además que los enlaces que se crean entre la enzima y el soporte excluyan los aminoácidos involucrados directamente en la reacción catalítica [3].

2.4.3 INMOVILIZACION POR ADSORCION

La inmovilización por adsorción (Fig. 15), Es un método simple e involucra interacciones de superficie reversibles entre la enzima y el material del soporte. Las fuerzas involucradas son principalmente electrostáticas tales como fuerzas de Vander Walls, Iónicas e Interacciones de puentes de hidrógeno, además de las fuerzas hidrofóbicas que pueden ser significativas. Estas fuerzas son verdaderamente débiles, pero sustancialmente grandes en número para ser una limitante considerable para el proceso de adsorción. Por ejemplo, es conocido que células de levadura tienen una superficie química que esta normalmente cargada negativamente, así que el uso de un soporte cargado positivamente, hace posible la inmovilización. Existiendo una interfase química entre la enzima y el soporte utilizado, no es requerida la activación química y por ende hay pequeños daños en la integridad de las células y/o enzimas por este método de inmovilización. El procedimiento consiste en mezclar juntos los componentes biológicos y el soporte con propiedades adsortivas bajo condiciones deseables de pH, fuerza iónica y así mismo por periodos de incubación, seguidos por una recolección del material inmovilizado y un lavado extensivo para remover los componentes biológicos no enlazados [3].

Fig. 15 inmovilización por adsorción



2.4.3.1 Principales ventajas del método

- Pocos daños a la enzima.
- Simple, económico y rápido para obtener la inmovilización.
- No hay cambios químicos entre la enzima y el soporte.
- Regeneración reversible con enzima fresca.

2.4.3.2 Principales desventajas

- Goteo de enzimas partiendo del soporte, contaminación del producto.
- Enlaces no específicos.
- Carga excesiva del soporte.
- Impedimento estérico por el soporte.

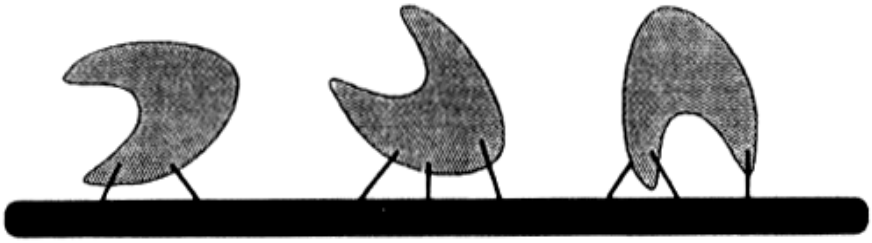
La desventaja más significativa es el goteo del biocatalizador partiendo del soporte, la desorción puede ocurrir bajo muchas circunstancias y cambios ambientales en pH, Temperatura y fuerza iónica que pueden promover la desorción. Algunas veces la enzima, firmemente adsorbida, es realmente desorbida durante la reacción como resultado de una limitación de sustrato. Limitaciones de contaminante presente en el sustrato o en la producción de producto y en otras condiciones conllevan a un cambio en la conformación de la proteína. Factores físicos como la velocidad de flujo, burbujeo, abrasión partícula-partícula y efecto de escamación de material particulado sobre las paredes del recipiente, pueden conllevar a desorción. La desorción puede convertirse en una ventaja si la regeneración del soporte se produce dentro de un régimen operacional que permita una expulsión rápida del catalizador biológico agotado y un reemplazo con biocatalizador fresco.

Limitaciones no especificadas pueden convertirse en un problema si el sustrato, producto y/o contaminantes residuales son cargados e interactúan con el soporte. Esto puede conducir a limitaciones de difusión y problemas en la cinética de la reacción, con la consecuente alteración en los parámetros de V_{max} y K_m. Además, limitaciones por protones en el material de soporte pueden resultar en alteraciones de pH del micro ambiente alrededor del soporte con consecuentes cambios en el pH óptimo (1-2 unidades de pH), esto puede ser muy importante para las enzimas con requerimientos de pH precisos. A menos que cuidadosamente se controle la sobrecarga del soporte puede conducir a una actividad catalítica y a la ausencia de espacios deseables entre la molécula de la enzima y el soporte produciendo problemas relacionados con impedimentos estéricos [3].

2.4.4 ENLACE COVALENTE

Este Método de inmovilización (Fig. 16), involucra la formación de un enlace covalente entre la enzima y el material de soporte, el enlace es normalmente formado entre el grupo funcional presente sobre la superficie del soporte y el grupo funcional perteneciente al aminoácido residual sobre la superficie de la enzima. Un número de aminoácidos del grupo funcional son deseables para la participación del enlace covalente. Los más involucrados son los del grupo amino (NH_2) de la lisina o arginina, el grupo carboxilo (CO_2H) del ácido aspártico o el ácido glutámico, el grupo hidroxilo (OH) de la serina o treonina, y el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína.

Fig.16 Inmovilización por enlace covalente



La gran variedad de materiales de soporte que están disponibles, reflejan el hecho que no existe un soporte ideal. De esta forma, las ventajas y desventajas de un soporte, deben ser tomadas en cuenta cuando se consideran procedimientos posibles para conllevar una inmovilización de una enzima. Muchos factores tienen influencia en la selección de un soporte particular, y un trabajo de búsqueda muestra que la hidrofilicidad es el factor más importante para el mantenimiento de la actividad celular en el ambiente del soporte. Consecuentemente polímeros de polisacáridos que presentan esta propiedad, son los materiales de soporte más populares para la inmovilización de enzimas. Por ejemplo, celulosa, sephadex, almidón y agarosa (sefarosa) son usadas para la inmovilización de enzimas. Los azucares residuales en estos polímeros tienen grupos hidroxilos, los cuales son grupos funcionales ideales para la activación química y proveen la formación del enlace covalente. Así mismo, los grupos hidroxilos forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, por eso se crea un ambiente acuoso (hidrofílico) con el soporte. Los soportes de polisacáridos son susceptibles de desintegración microbiana o fúngica, y solventes orgánicos pueden causar un encogimiento del gel en los soportes usualmente utilizados para formar estos lechos.

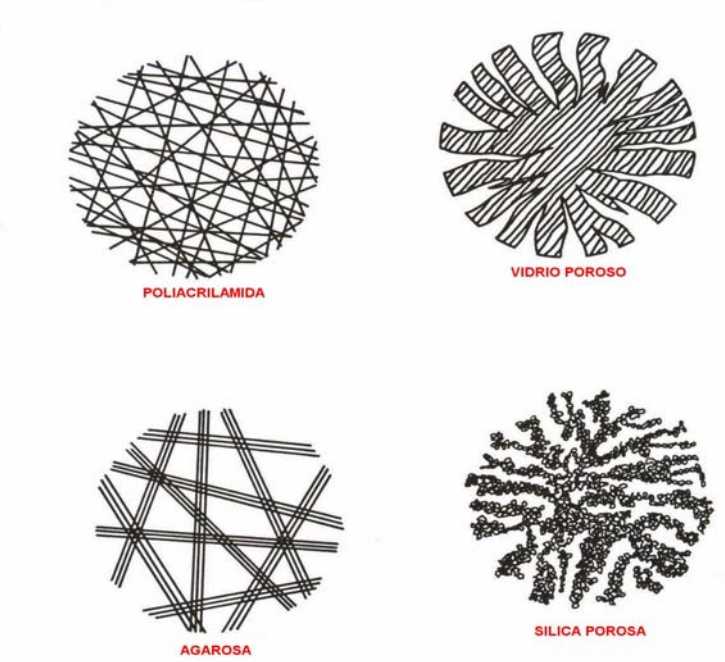
Otros soportes utilizados para la inmovilización de enzimas son la sílica y el vidrio poroso, la microarquitectura de esta se muestra en la figura 17. La sílica porosa consiste en pequeñas partículas esféricas de sílica fusionadas entre ellas, lo cual conlleva a formar microcavidades y pequeños canales. El soporte es normalmente sólido y el lecho formado es muy fuerte y durable. El vidrio de boro silicato sinterizado puede ser termostatado para formar un sistema uniforme de canales. El diámetro de los canales depende de las condiciones de temperatura. Los poros en el vidrio son también durables y resistentes a la desintegración microbial o distorsión por solventes. Toda vez, que estos dos soportes tienen baja hidrofilicidad; sin embargo estos dos soportes son menos hidrofílicos que los materiales polisacáridos. Hay muchos procedimientos de reacción para el acoplamiento del soporte por enlace covalente. Sin embargo, muchas reacciones caben dentro de las siguientes categorías:

- Formación de unión isourea
- Formación de unión diazo
- Formación de un enlace peptídico
- Reacción de alquilación.

Esto es importante para la escogencia del método que no inactivará la enzima por reacción con los aminoácidos del sitio activo. Así, si se emplea una enzima con un grupo carboxilo en el sitio activo para la participación en la catálisis, es deseable escoger una reacción que involucre grupos amino de enlace covalente con el soporte. Básicamente dos pasos están involucrados en la formación del enlace covalente de la enzima hacia el material de soporte.

Primeramente, los grupos funcionales del material de soporte deben ser activados por un reactivo específico y segundo, la enzima es adicionada en una reacción de acoplamiento con el material de soporte; normalmente la reacción de activación permite que los grupos funcionales sobre el soporte fuertemente electrofílico (Deficiencia de electrones), se activen para llegar a la reacción de acoplamiento. Estos grupos reaccionaran con nucleófilos fuertes (Donación de electrones), como los grupos funcionales amino (NH_2) de ciertos aminoácidos, sobre la superficie de la enzima, para formar el enlace covalente [3].

Fig. 17 microarquitectura de algunos soportes de material usados para la inmovilización de enzimas



Fuente: Bickerstaff [3]

El bromo cianuro (BrCN) ha sido ampliamente utilizado como activante del grupo funcional hidroxilo en soportes de materiales polisacáridos. En este método, la enzima y el soporte están unidos por medio de un enlace isourea. En el caso de la activación de la carbodiimida, el material de soporte puede tener un grupo funcional carboxilo (CO_2H), y la enzima y el soporte están unidos por medio de un enlace peptídico. Si el material de soporte contiene un grupo funcional amino aromático, puede ser diazotizado usando ácido nítrico. Seguidamente, la adición de pequeñas cantidades de enzima conducen a la formación del enlace diazo entre el grupo reactivo diazo sobre el soporte y el anillo de la estructura de un aminoácido aromático, como la tirosina. [3]

Es importante reconocer que no todos los métodos de inmovilización están restringidos a un tipo particular de material de soporte, y hay un numero sumamente grande de permutaciones posibles entre los métodos de inmovilización y el material de soporte. Esto es posible por la modificación química de los grupos funcionales normales sobre el material de soporte para producir un rango de derivados, conteniendo diferentes grupos funcionales. Por ejemplo, el grupo funcional normal en la celulosa es el grupo hidroxilo, y la modificación química de esta se ha producido en el rango de los derivados de la celulosa, como es la AE-Celulosa (Amino-etil), CM-Celulosa (Carboxi metil), y DEAE-Celulosa (Dietil amino etil). Así, estas modificaciones químicas, incrementan el rango de los métodos de inmovilización que pueden ser usados para obtener un material de soporte. La derivatización puede ser así mismo usada para modificar las cargas en la superficie del material para promover el enlace del biocatalizador [3]. En el caso de las enzimas, estos biocatalizadores contienen un grupo grande de aminoácidos o grupos funcionales, los cuales son deseables para la formación del enlace con el soporte. La tabla 3 muestra algunos aminoácidos envueltos en la formación de enlaces entre molécula y soporte. Los aminoácidos con grupos amida (L-glutamina y L-asparagina), con cadenas hidrocarbonadas y sitios en la cadena como (L-alanina, L-eusina, L-isoleucina, L-valina, L-fenilalanina y L-prolina) y glicina; están ausentes en la tabla 3, ya que relativamente su baja concentración como sitios expuestos en la superficie de la proteína se debe a su naturaleza hidrofóbica y consecuentemente un sitio no reactivo en la cadena. La relación amino-composición y número de proteínas, tomándolo desde el punto de vista de reactividad relativa de residuos se muestra en la tabla 3. [11]

Tabla 3. Porcentaje de reactividad relativa de residuos de aminoácidos

Residuo	Reactividad Relativa (%)
Serina	7.8
Lisina	7
Treonina	6.5
Asparagina	4.8
Glutamina	4.8
Arginina	3.8
Tirosina	3.4
Cisteina	3.4
Histidina	2.2
Metionina	1.6
Triptofano	1.2

Fuente: Immobilized Enzymes and Cells [11]

Una interesante comparación del número de reacciones en la cual cada aminoácido puede participar se muestra en la tabla 4 [11].

Tabla 4. Número de reacciones en las que cada aminoácido participa

Residuo	Numero de Reacciones
Cisteina	31
Lisina	27
Tirosina	16
Histidina	13
Metionina	7
Triptofano	7
Arginina	6
Glutamina	4
Asparagina	4
Serina	0*
Treonina	0*

Fuente: Inmmobilized Enzyme and Cells [11]
*Normalmente considerado sitio no reactivo para este uso.

2.4.5 ATRAPAMIENTO

La inmovilización por atrapamiento (Fig. 18), difiere de la adsorción y del enlace covalente, en que las moléculas de enzima se encuentran libres en la solución, pero restringida en su movimiento por los espacios del gel. La porosidad de los espacios del gel es controlada para asegurar que la estructura este lo suficientemente firme para prevenir el rompimiento de la enzima, pero a su vez se permite el libre movimiento del sustrato y del producto. Inevitablemente, el soporte conlleva a actuar como una barrera para la transferencia de masa, y así mismo esto puede tener serias implicaciones para la cinética de la reacción y puede tener desventajas desagradables para las proteínas previniendo de esta forma que haya interacción con el biocatalizador inmovilizado.

Los siguientes son los principales métodos de atrapamiento:

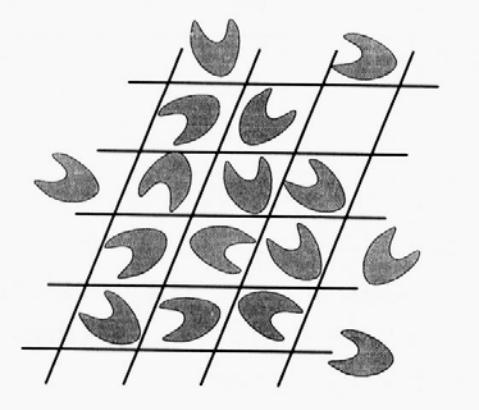
- Gelación ionotrópica de macromoléculas con cationes multivalentes (Alginato)
- Gelación inducida por temperatura (Gelatina, agarosa)
- Polimerización orgánica por reacción química o fotoquímica (Poliacrilamida)
- Precipitación partiendo de un solvente inmiscible (Poli estireno)

El atrapamiento puede ser finalizado por mezclado de la enzima con el material del polímero polionico y así se pueden formar mallas del polímero con los cationes multivalentes y se forma una reacción de intercambio iónico para formar los espacios de la estructura que atrapa la enzima (gelación ionotrópica). El cambio con temperatura es un método simple de gelación por transición de fase usando alrededor de 1-4% de soluciones de agarosa o gelatina. Sin embargo, los geles formados son suaves e inestables. Un desarrollo significativo en esta área es la introducción de polímeros de k-carragenato que pueden formar geles por gelación ionotrópica y por transiciones de fase inducidas por temperatura, así ha sido introducido un grado grande de flexibilidad en la gelación en los sistemas para la inmovilización.

Alternativamente, es posible mezclar la enzima con monómeros químicos que a su vez se polimerizan para formar la red de enlaces poliméricos cruzados y el atrapamiento de la enzima en los espacios intersticiales. El ultimo método se usa muy ampliamente y un número de monómeros acrílicos están disponibles para la formación de copolimeros hidrofílicos. Por ejemplo, el monómero de acrilamida es polimerizado a la forma de poliacrilamida y el metilacrilato es polimerizado a la forma de polimetacrilato. En adición al monómero el agente cruzador se adiciona durante la polimerización para la formación de enlaces cruzados ayudando a crear los espacios de la red tridimensional. El tamaño del poro del gel y sus propiedades mecánicas están determinadas por las cantidades relativas del monómero y el

agente cruzador. Es por consiguiente posible variar estas concentraciones para influir en la estructura de los intersticios. El polímero formado puede ser roto en partículas de un tamaño deseado o la polimerización puede ser ordenada en forma de lechos de partícula definida. La precipitación ocurre más por separación de fase que por reacción química, pero las enzimas y células entran en contacto con un solvente orgánico miscible en agua, aún más, las enzimas y células no son tolerantes a muchos solventes. Este método está limitado a una alta estabilización previa de enzimas y células [3].

Fig. 18 Inmovilización por atrapamiento

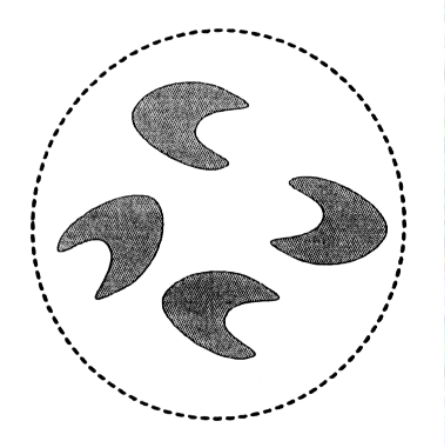


2.4.6 ENCAPSULACION

La Encapsulación de enzimas y/o células (Ver Fig. 19), puede ser llevada a cabo envolviendo los componentes biológicos con varias membranas semipermeables. Esto es similar al atrapamiento de enzimas o células teniéndolas libres en solución, pero restringida en el espacio. Proteínas grandes y enzimas no pueden pasar dentro o fuera de la cápsula, pero pequeños sustratos y productos pueden pasar libremente a través de la membrana semipermeable. Muchos materiales han sido usados para construir las microcápsulas, variando de 10 a 100 μm; por ejemplo, el nylon y nitrato de celulosa han demostrado ser muy populares. Los problemas asociados con la difusión han sido mucho más agudos y pueden resultar en la ruptura de la membrana si los productos que vienen de la reacción se acumulan rápidamente. Un problema más allá de la inmovilización de la partícula de enzima o célula, tiene que ver con la densidad justamente similar al de su alrededor, con el problema consiguiente en la configuración del reactor, así mismo la dinámica de flujo. Esto hace así mismo el uso posible de células biológicas como cápsulas y un notable ejemplo de esto es el uso de eritrocitos (Glóbulos rojos). La membrana del eritrocito es normalmente permeable a pequeñas moléculas, sin embargo, cuando el eritrocito es colocado en una solución hipotónica, ellas se inflan, estirando la membrana celular y sustancialmente incrementando la permeabilidad. En estas condiciones, las

proteínas del eritrocito difunden fuera de la célula y las enzimas pueden difundir dentro de la célula. Retornando los eritrocitos inflados a una solución isotónica, se habilita la membrana celular a retornar a su estado normal, y las enzimas atrapadas dentro de la célula no pueden traspasar hacia fuera. Una ventaja distintiva de este método es la co-inmobilización. Celulas y/o enzimas pueden ser inmobilizadas en cualquier combinación deseada para una aplicación particular [3].

Fig. 19 Inmovilización por Encapsulación



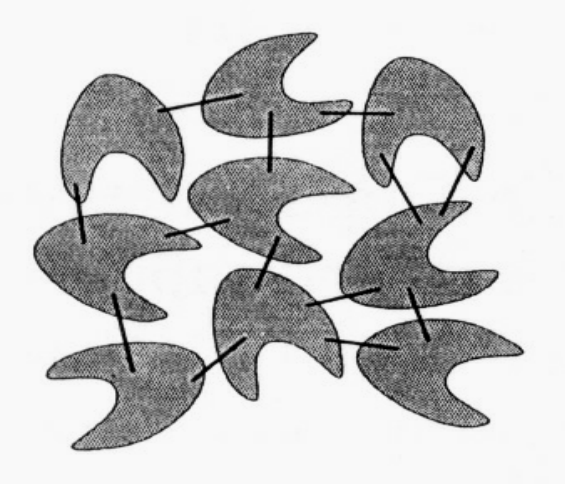
2.4.7 RETICULACION

Este tipo de inmovilización (Véase Fig. 20), se realiza en un soporte libre y envuelve la unión de células o enzimas para formar una larga estructura compleja tridimensional y puede ser llevada a cabo por métodos físicos o químicos.

Los métodos químicos para la Reticulación, normalmente involucran la formación de un enlace covalente entre las células por medio de reactivos bi o multifuncionales como el glutaraldehido y el diisocianato de tolueno. Sin embargo, la toxicidad de tales reactivos es un factor limitante para aplicar este método a células vivientes y muchas enzimas. La albúmina y la gelatina se han usado para proporcionar a las moléculas de la proteína espaciadores adicionales con el fin de minimizar los problemas que pueden causarse por el enlace cruzado de una sola enzima.

El entrecruzamiento físico de células por floculación, es muy conocido en la industria biotecnológica y se obtienen altas densidades de células. Los agentes floculantes, como son poliaminas, polietileniminas, sulfonatos de poliestireno y varios fosfatos han sido ampliamente utilizados. El entrecruzamiento es raramente usado como un camino de inmovilización a causa de la ausencia de propiedades mecánicas y la estabilidad del poro causando limitaciones severas. El entrecruzamiento es menos usado que los otros métodos de inmovilización [3].

Fig. 20 Inmovilización por Reticulación



Un resumen sobre los métodos de inmovilización y algunas propiedades se listan en la figura 21 y tabla 5

Fig. 21 Resumen sobre métodos de inmovilización [10]

Fuente: Inmobilized Enzymes and Cells [11]

Tabla 5. Resumen de algunas propiedades para las diferentes clases de Inmovilización

Propiedad	Enlace Cruzado	Adsorción Física	Enlace Iónico	Quelación	Enlace Covalente	Atrapamiento
Preparación	Intermedio	Simple	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza del Enlace	Fuerte	Débil	Intermedio	Intermedio	Fuerte	Intermedia
Actividad Enzimática	Bajo	Intermedio	Alto	Alto	Alta	Bajo
Regeneración del Soporte	Imposible	Posible	Posible	Intermedio	Alta	Intermedio
Costo de la Inmovilización	Intermedio	Bajo	Bajo	Intermedio	Alta	Intermedia
Estabilidad	Alto	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alta	Alto
Protección de la enzima contraataque microbiano	Algunas Veces	No	No	No	No	Si

Fuente: Inmobilized Enzymes and Cells [11]

2.4.8 SOPORTES PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Existen tantos soportes para inmovilización de enzimas como polimeros y materiales insolubles existen, la utilización o no de un soporte depende de varios factores como la afinidad de este por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales o grupos reactivos que se enlacen a la proteína y/o facilidad para transformarlos en estos [3]. Si el método de inmovilización es físico, el soporte debe adsorber muy fácilmente la proteína, pero debe ser liberada por el soporte muy lentamente. El soporte debe ser muy fácil de preparar o de fácil acceso, a la vez que se debe presentar varias formas físicas con el objeto de utilizarlo en reactores industriales . Otro factor de mucha importancia es que el soporte no debe ser tóxico, ni debe alterar las propiedades organolépticas del jugo, además que debe ser de bajo costo.

Diversos autores han experimentado con varios tipos de soportes de origen orgánico e inorgánico, tales como la quitina, quitosan, gel agarosa, polimetacrilato, poliestireno, polietileno, vidrio poroso, celulosa, alúmina, nylon, etc.

La mayoría de soportes de origen vegetal o animal, presentan el inconveniente que alteran las propiedades del jugo, caso que no se presenta con los soportes poliméricos fabricados por el hombre. Estos presentan el inconveniente de que son costosos y en ocasiones no son muy afines para con las proteínas, llegando al punto de no fijarse covalentemente sino por adsorción.

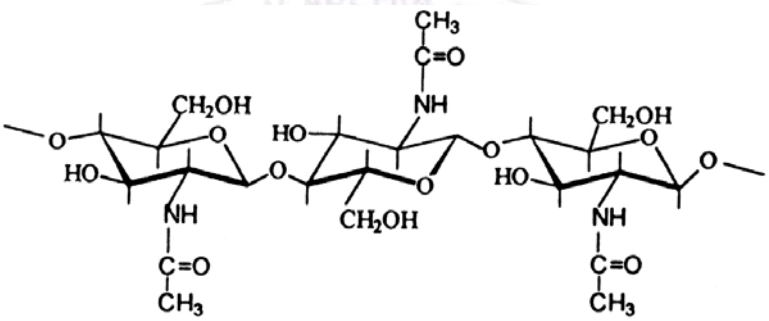
2.4.8.1 La quitina: Es un polímero de origen natural y posee la gran cualidad de ser biodegradable .Es el segundo químico orgánico natural más abundante en la naturaleza , después de la celulosa se clasifica como biopolímero por estar constituido de largas cadenas de monómeros de azúcar unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. La gran abundancia de la quitina en la naturaleza, se debe al hecho que se haya en todos los seres que habitan el planeta: pétalos de las plantas, algas y hongos, insectos y crustáceos. Es producida biológicamente en la tierra a un volumen anual estimado en 100 billones de toneladas. En Colombia se arrojan al mar un volumen anual de mas de 5000 toneladas de desechos de crustáceos según el Departamento Nacional de Planeación (DNP) y el Departamento Nacional de Pesca Artesanal (INPA). El quitosano que es la forma desacetilada de la quitina (Ver Fig. 23), presenta propiedades físicas, químicas y biológicas muy particulares debido a sus iones catiónicos. Esta carga positiva atraen todo elemento cercano que tenga iones de carga negativa. Esta condición singular permite aplicarla en un extenso abanico de aplicaciones que va desde los usos industriales y ambientales hasta su empleo en la medicina.

Para obtener un material con las propiedades anteriormente mencionadas se hace necesario desarrollar un proceso de limpieza, trituración, separación de proteínas, lavado, desmineralización y secado. [2]

Un procedimiento industrial a partir de caparazones y patas de jaiba consiste en someter este material a maceración en alcohol (30% v/v) para separar grasa y proteína, después se decanta y el material se somete a la acción del ácido clorhídrico diluido y frió para disolver el carbonato de calcio. Después de esto se decanta nuevamente y se sitúa el material con ácido clorhídrico concentrado y en ebullición. Por concentración y enfriamiento del líquido anterior se obtiene cristales de quitosano.

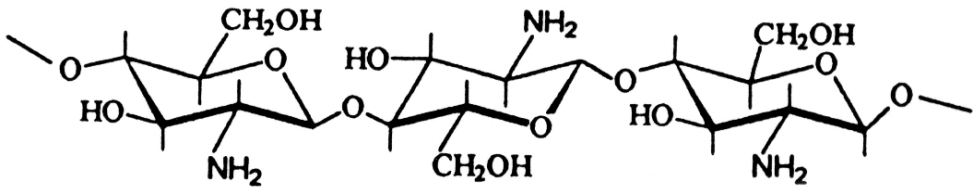
El proceso anterior se repite varias veces hasta obtener la mayor cantidad de quitosano posible. La disolución obtenida se trata con carbón activado, después se filtra, enfría y cristaliza para obtener el quitosano. [2]

Fig. 22 Estructura Química de la Quitina



El quitosano es la forma desacetilada de la quitina (Fig.23)

Fig.23 Estructura Química del Quitosano



2.4.9 INMOVILIZACIÓN SOBRE QUITINA

Algunos soportes como celulosa, poliacrílicos, poliestirenos y poliamidas (Como el nylon); permiten la unión directa de los grupos NH_2 de la enzima con sus respectivos grupos funcionales previa activación de los mismos. La quitina al igual que otras clases de soportes como el vidrio poroso, las dextranas, agarosas, silicatos de aluminio y óxidos metálicos requieren de una molécula espaciadora (ME).

La metodología de inmovilización sobre quitosano (Ver Fig.24), puede conllevar dos o tres etapas y son:

- Activación de la superficie.
- Adición del brazo espaciador a la superficie
- Inmovilización de la enzima.

Un brazo espaciador es una molécula bifuncional, la cual puede enlazarse en un extremo a la superficie activada, quedando por el otro extremo restante activa a enlazarse a la enzima o cualquier tipo de molécula a fin. Es así como las moléculas más utilizadas con estos propósitos son las diaminas, diácidos, dialdehídos y aminoácidos [4].

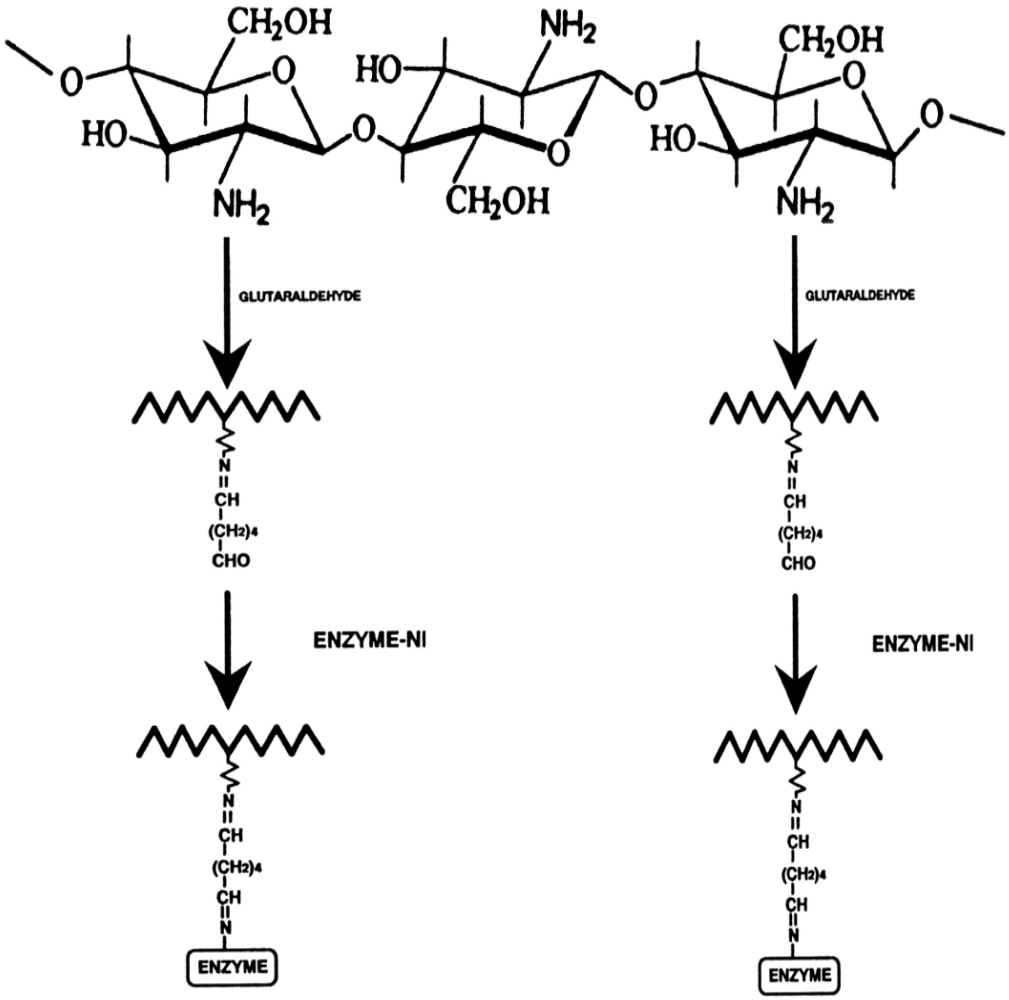
Debido a que las enzimas son moléculas grandes comparadas con el tamaño normal de los átomos, se presenta una repulsión estérica alta cuando las enzimas son enlazadas directamente al soporte, lo cual se puede ver reflejado en una perdida de actividad catalítica del conjunto, siendo así extremadamente desventajoso inmovilizar la enzima, pues la gran mayoría de ella perderá su actividad catalítica. Cuando se introduce el brazo espaciador, este problema es minimizado pues el costo introducido al sistema en algún otro reactivo, es superado al final debido a que se presenta una retención de la actividad catalítica por el conjunto inmovilizado. [4]

Los brazos espaciadores hipotéticamente tienen la capacidad de aumentar la superficie de contacto en el momento de la inmovilización de la enzima sobre el soporte, debido a que existe una mayor área superficial entre el soporte y la enzima. Lo anterior se puede asegurar que es realmente valido para soportes de forma esférica o semiesférica. La forma mas practica de llegar a estas condiciones, es la reducción en el tamaño de partícula, sin embargo en este trabajo la reducción implica un aumento significativo en la caída de presión durante la operación del reactor PFR, haciéndose necesario la utilización de un sistema especial de bombeo a la entrada y salida del reactor el cual no estaba disponible. Para evitar este problema se trabajó con hojuelas de quitina las cuales tenían un tamaño promedio de 75 mm (ver Fig. 35).

Después de haber explorado los principales métodos de inmovilización, se opto por inmovilizar covalentemente a pesar de la alta perdida de actividad catalítica que presenta este procedimiento, sin embargo la resistencia física final del conjunto enzima soporte, hace que este método sea atractivo ya que el conjunto inmovilizado va a ser sometido a un proceso mecánico de fricción, durante la operación en el reactor PFR. Los otros métodos de inmovilización permiten el goteo de enzima, la perdida de la misma y problemas tales como la presencia de enzima en el producto final bajo las condiciones anteriormente descritas.

Se analizaron el nylon y de la quitina como soportes; el primero con ventajas comparativas frente al segundo como la no biodegradabilidad y la posibilidad de hacer arreglos en diferentes disposiciones (mallas, tejidos, pellets, etc.) pero se descarto pues el activante (dimetil sulfato), es de difícil adquisición en el mercado nacional, ya que es un precursor en la creación de materiales explosivos. Además debido a su toxicidad podría generarse algún tipo de residualidad, lo cual no es compatible con las normas técnicas de seguridad en la industria alimentaría. Por lo anterior se opto por la quitina, material que presenta buenas propiedades mecánicas y a pesar de su biodegradabilidad, su implementación en la industria de jugos no presenta problemas debido a que normalmente se trabaja bajo condiciones de asepsia que limitan este fenómeno.

Fig.24 Proceso General de Inmovilización sobre Quitosano



INTER-AULAS · AL ARTE POR QUE ARE VERUM

2.5. PROPIEDADES CINÉTICAS

Al estudiar la aplicabilidad comercial de un catalizador enzimático existen tres puntos principales que deben ser tenidos en cuenta [9]:

- La velocidad de reacción (Actividad Catalítica)
- La extensión de la reacción (Constante de equilibrio)
- La duración de la actividad (Estabilidad)

2.5.1 VELOCIDAD DE REACCION

Las enzimas, como catalizadores que son, aceleran las reacciones químicas, pero ellas mismas no resultan irreversiblemente modificadas. El aumento de la velocidad se atribuye al descenso de la energía de activación de la reacción, en términos simples, esto se explica por la unión física del reactante a la enzima en un sitio activo, formando un complejo meta estable. La energía de activación para la rotura de este complejo es considerablemente menor que para la rotura del reactante solo. Partiendo de este sencillo concepto, se puede proponer el esquema de reacción siguiente:

$$\underset{[E]}{\text{Enzima}} + \underset{[R]}{\text{Reactante}} \rightleftharpoons \underset{[ER]}{\text{Complejo}} \longrightarrow \underset{[E]}{\text{Enzima}} + \underset{[P]}{\text{Producto}} \qquad \textbf{(2.1)}$$

La etapa del complejo se considera reversible, ya que el mismo tiene un estado energético semejante a la mezcla enzimática. La rotura subsiguiente del complejo para rendir los productos se considera exotérmica, esta etapa puede ser prácticamente irreversible en muchos casos. La expresión de velocidad para este tipo de reacción se obtiene usualmente utilizando una hipótesis de estado estacionario, esto es, la concentración del complejo permanece constante.

$$[E] + [R] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ER] \xrightarrow{k_2} [E] + [P] \qquad \textbf{(2.2)}$$

Aceptando la hipótesis de estado estacionario,

$$\underset{\text{Formación}}{} \quad \underset{\text{rotura}}{}$$

$$\frac{d[ER]}{dt} = k_1[E][R] - (k_{-1} + k_2)[ER] = 0 \qquad \textbf{(2.3)}$$

Por lo tanto,

$$k_1[E][R] = (k_{-1} + k_2)[ER] \qquad \textbf{(2.4)}$$

Para que esta hipótesis sea valida, la velocidad de reacción debe ser lineal, por lo tanto se determina usualmente tan próxima al tiempo cero como sea posible, antes de que la concentración cambie apreciablemente (Velocidad inicial).

La ecuación anterior puede ser reordenada para dar:

$$\frac{[E]\,[R]}{[ER]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_m \qquad \textbf{(2.5)}$$

Donde K_m es la constante de Michaelis-Menten.

La ley de conservación de la masa requiere que la concentración de enzima $[E_0]$ no cambie.

$$[E_0] = [ER] + [E] \qquad \textbf{(2.6)}$$

Por lo tanto,

$$[E] = [ER] - [E_0] \qquad \textbf{(2.7)}$$

Sustituyendo (2.7) en la ecuación (2.5) y reordenando queda:

$$[ER] = \frac{[E_0]\,[R]}{k_m + R} \qquad \textbf{(2.8)}$$

Las dimensiones de esta expresión son unidades de concentración. La constante de velocidad k_2 es de primer orden y tiene unidades de tiempo^{-1}. Multiplicando ambos miembros de la ecuación (2.8) por k_2 se obtendrá la velocidad de cambio de la concentración de producto con el tiempo en función de la velocidad máxima posible, la constante de Michaelis y la concentración de reactante [9].

$$\frac{dP}{dt} = [ER]\,k_2 = \frac{[E_0]\,[R]\,k_2}{k_m + R} \qquad \textbf{(2.9)}$$

Que usualmente se escribe como

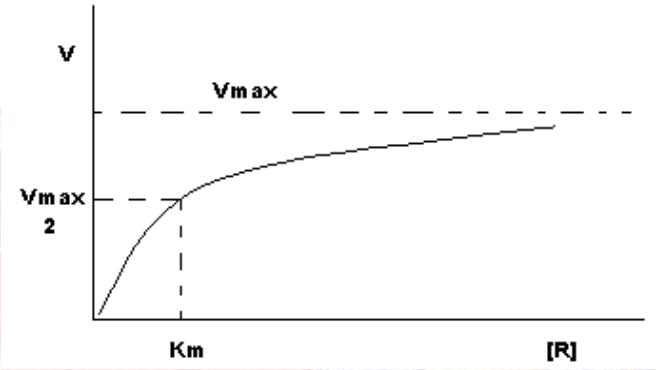
$$\nu = \frac{V_{max}\,[R]}{k_m + [R]} \qquad \text{La ecuación de Michaelis-Menten} \qquad \textbf{(2.10)}$$

Para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es necesario determinar V_{max} y K_m para la enzima particular empleada. Esto puede realizarse midiendo la velocidad inicial de reacción en un rango de concentraciones de reactante (ver figura 25). Se puede demostrar algebraicamente que cuando la concentración de reactante es igual a K_m, se obtiene una velocidad neta mitad de

la velocidad máxima V_{max}. La ecuación (2.10) muestra que a valores de [R] mucho menores que K_m la expresión puede simplificarse a:

$$\nu = \frac{V_{max}[R]}{k_m} \qquad \text{primer orden, ya que } K_m + [R] \approx K_m \qquad \textbf{(2.11)}$$

Fig. 25 Efecto de la concentración de reactante en la velocidad de una reacción catalizada Por una enzima.



A valores de [R] mucho mayores que k_m, la ecuación anterior se aproxima a

$$\nu = \frac{V_{max}[R]}{[R]} \quad \text{orden cero} \qquad \textbf{(2.12)}$$

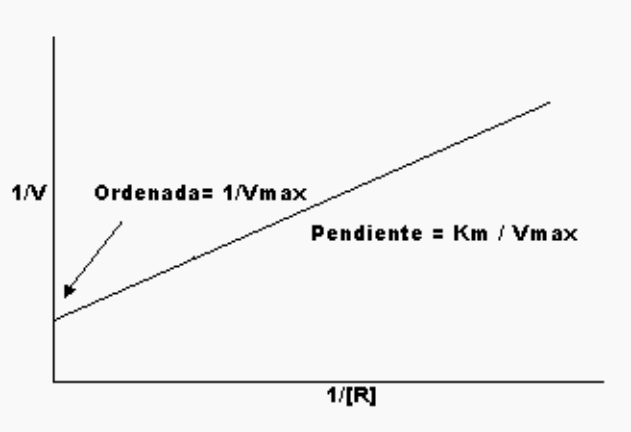
2.5.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS

La naturaleza hiperbólica de la curva de ν frente a [R] hace difícil la determinación de las constantes a partir de este sencillo gráfico. Existe una tendencia invariable a subestimar el valor de la V_{max}; sin embargo sirve para demostrar la importancia de emplear un rango de concentraciones por encima y por debajo de k_m, para evitar obtener datos sólo de la región de primer orden o de orden cero. El método gráfico más ampliamente usado es la representación de dobles recíprocos, donde se toman los inversos de cada miembro de la ecuación 10 para obtener:

$$\frac{1}{\nu} = \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[R]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad \textbf{(2.13)}$$

Representando $1/\nu$ frente a $1/[R]$ se obtiene una relación lineal permitiendo la determinación de ambas constantes por regresión lineal. Sin embargo al tomar los inversos se atribuye la mayor significación a las velocidades obtenidas a baja concentración de reactivos, que están sujetas al mayor error experimental (Fig. 26)

Fig. 26 Grafico de dobles recíprocos



2.5.3 EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y pH

La ecuación de Michaelis-Menten muestra que la velocidad de una reacción enzimática es

$$K_2 [ER] \qquad \textbf{(2.14)}$$

Por lo tanto, la velocidad de la reacción dependerá de la concentración de [ER] y el valor de k_2. En un esquema simplificado, la variación de la velocidad de la reacción enzimática con la temperatura puede ser descrita en términos de cambios en el valor de k_2. Como en las reacciones químicas sencillas, esta puede ser descrita por la relación de Arrhenius [9].

$$K_2 = A.\ exp.\ (-E/RT) \qquad \textbf{(2.15)}$$

Donde:

A = La constante de Arrhenius
E = La energía de activación
R = La constante de los gases
T = La temperatura

Si se han determinado A y E, k_2 puede ser calculado para una temperatura dada. Alternativamente, si se mide V_{max} en idénticas condiciones a dos temperaturas, las constantes A y E pueden ser determinadas.

Tomando logaritmos en la ecuación 2.15

$$\text{Ln } k_2 = \text{ln } A \; - \; \frac{E}{RT} \qquad \textbf{(2.16)}$$

Por lo tanto

$$\text{Ln } V_{max}^{2} = \text{ln } A - \frac{E}{RT^{2}} \qquad \textbf{(2.17)}$$

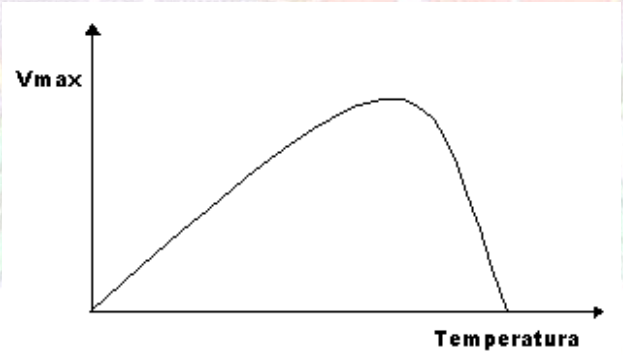
$$\text{Ln } V_{max}^{1} = \text{Ln } A - \frac{E}{RT^{1}} \qquad \textbf{(2.18)}$$

Restando las ecuaciones 2.17 y 2.18

$$\text{Ln } \frac{V_{max}^{2}}{V_{max}^{1}} = \text{Ln } \frac{k_2^{2}[E_0]}{k_2^{1}[E_0]} = -\frac{E}{R}\left|\frac{T^{1} - T^{2}}{T^{1}T^{2}}\right| \qquad \textbf{(2.19)}$$

En la práctica, es más preciso realizar experimentos en un rango de temperaturas y representar Ln(V_{max}) frente a 1/T. En el caso de las enzimas la relación de Arrhenius se mantiene sólo en un rango restringido de temperatura. La limitada estabilidad térmica de las enzimas resulta en su inactivación a elevadas temperaturas y un gráfico de V_{max} frente a la temperatura será de la forma mostrada en la figura 27. Debe ser tenido en cuenta que la forma de este gráfico no implica la existencia de una única temperatura óptima. La elección de las condiciones de operación debe surgir siempre del balance de una alta velocidad con la necesidad de una estabilidad aceptable.

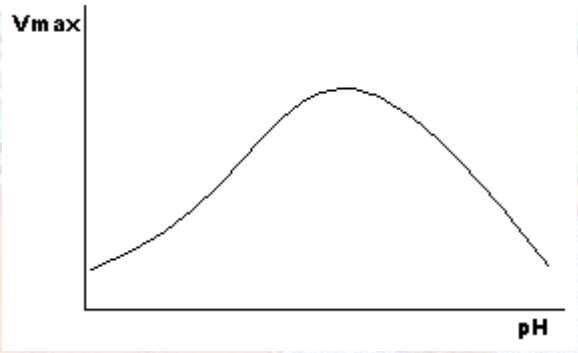
Fig.27 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática
(esta respuesta es esperable típicamente en un rango de 0 a 100 ºC)



Aunque la hipótesis simplificada del efecto de la temperatura sobre la V_{max} presentado aquí es útil en muchos casos, el examen de la ecuación 2.5, muestra que existe una relación entre k_m y k_2. A partir de esta expresión, esta claro que las enzimas donde la magnitud de k_{-1} es semejante a k_2, K_m también mostrará una dependencia con la temperatura.

Los efectos del pH en la actividad enzimática establecen el enriquecimiento de que grupos críticos del centro activo, deben estar en el estado de ionización correcto para que la reacción transcurra. Un requerimiento semejante es aplicable a la ionización del reactante. Deberá realizarse normalmente un gráfico de V_{max} frente al pH para determinar el pH óptimo dela enzima (Fig. 28). La constante de Michaelis, k_m y por lo tanto la velocidad inicial, no tienen que presentar necesariamente la misma variación con el pH [9].

Fig.28 Relación entre la actividad enzimática y el pH



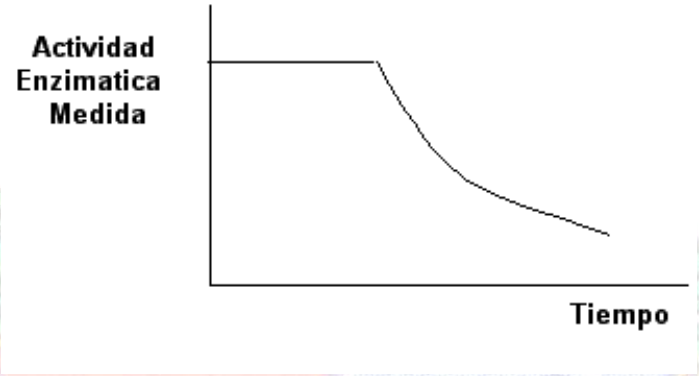
2.6 ESTABILIDAD OPERACIONALDEL CONJUNTO ENZIMA SOPORTE

La estabilidad operacional de un biocatalizador inmovilizado, se ve afectado por varios factores, entre ellos se incluye la inhibición irreversible por sustancias que estén presentes en el sustrato, o bien que se produzcan endogenamente mediante desnaturalización por el pH, la temperatura, o un cambio en la fuerza iónica, rozamientos mecánicos, ataque microbiano, acumulación en la columna de sustancias extrañas o algún escape de enzima del soporte, la disolución o fragmentación del soporte o que exista un contacto entre la enzima y el sustrato poco eficaz.

La pérdida de actividad enzimática se puede considerar como un caso especial de inhibición enzimática que pudiera ocurrir de forma homogénea en la totalidad de la partícula y progresando hacia el interior. La disminución de la actividad aumenta al aumentar la cantidad del agente desnaturalizante presente, lo que consiste en un efecto de primer orden con respecto al tiempo. No obstante, cuando la reacción está limitada por la difusión, como ocurre normalmente, la disminución de la actividad es lineal en el tiempo, hasta que la actividad del biocatalizador se reduce a un nivel en el que la reacción ya no está limitada por la difusión. En las curvas experimentales que se obtienen en la desactivación de enzimas, las que tienen forma cóncava aparecen cuando existe eliminación de la enzima durante el uso del reactor, mientras que las convexas indican inhibición acumulativa o desnaturalización de la enzima [18].

La figura 29 representa la estabilidad operacional de una enzima inmovilizada con respecto al tiempo de operación, donde se observa un periodo durante el cual aparentemente no se pierde actividad y después ocurre un decaimiento exponencial de la misma.

Fig. 29 Estabilidad operacional de una enzima inmovilizada



Un parámetro que muestra la efectividad del conjunto inmovilizado, es la constante de desactivación de la enzima, la cual se obtiene asumiendo que el proceso de desactivación de la enzima, sigue una función exponencial de pendiente negativa.

$$E = E_o.e^{-k't} \qquad \textbf{(2.20)}$$

Donde:

E : Actividad en el Tiempo t
E_o: Actividad Inicial
K´: Constante de desactivación de la enzima
t : Tiempo

Tomando Logaritmos a ambos lados:

$$Ln(E) = Ln(E_o.e^{-k't}) \qquad \textbf{(2.21)}$$

Obtenemos:

$$Ln(E_o / E) = k'.t \qquad \textbf{(2.22)}$$

Graficando Ln(% de Actividad) Vs Tiempo de operación, se obtiene la figura 30, donde la pendiente de la recta es la constante de desactivación de la enzima. Para obtener la vida media de la enzima, se realiza el siguiente procedimiento:

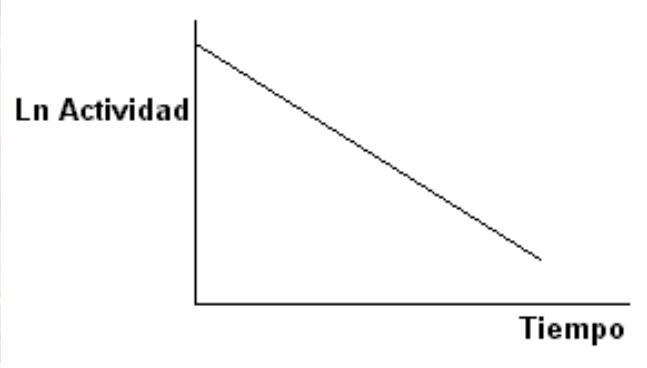
$$E = E_o / 2 \qquad \textbf{(2.23)}$$

$$\text{Ln}\,(E_o / E) = K't \qquad \textbf{(2.24)}$$

$$\text{Ln}\,(2.E_o / E_o) = k't \qquad \textbf{(2.25)}$$

$$\text{Vida Media} = t_{1/2} = \text{Ln}\,(2) / K' \qquad \textbf{(2.26)}$$

Fig. 30 Grafico linealización estabilidad operacional



3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

Tabla 6 Materiales empleados

Quitina	Obtenida de la caparazón de Jaiba
Ácido Acético	Carlo Erba 99%
Glutaraldehido	Exro 748 al 50% (v/v)
Ácetato de sodio	Merck 99.9%
Ácido Dinitrosalicílico	Carlo Erba grado reactivo
Albúmina de suero bovino	Merck al 98%
Glucosa	Carlo Erba al 99.9%
Carboximetil celulosa	Sigma grado reactivo
Pectina	Sigma grado reactivo
Sulfato de cobre	Carlo Erba grado reactivo
Hidróxido de sodio	Carlo Erba grado reactivo

3.2 ENZIMA UTILIZADA

Se uso el cóctel enzimático Naturalzyme® 200 XL producido por Proenzimas®, proveniente de una cepa de *aspergillus niger* compuesto principalmente de pectinasa y en grado menor celulasa, con las siguientes características:

Actividad: 0.045 UI/mg (específica para pectinasa) a pH 4.0 y 40ºC
Forma: Líquido Ámbar Oscuro
Solubilidad: Completamente soluble en agua
Densidad : 1.1-1.2 g/mL
Kosher: Producto Certificado
Proteína: 322.84 mg / mL

3.3 EQUIPOS DE ANALISIS

- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 (Rango 200-1100 nm)
- Viscosímetro Schoot Visco-Easy (Precisión 1 cP)
- pH-metro Schoot Handy Lab 1 (Precisión 0.1 unidades de pH)
- Refractómetro Extrech, escala 0 – 32 °Brix
- Microscopio de barrido electrónico ambiental(ESEM) Phillips XL-30

3.4 EQUIPOS DE PROCESO

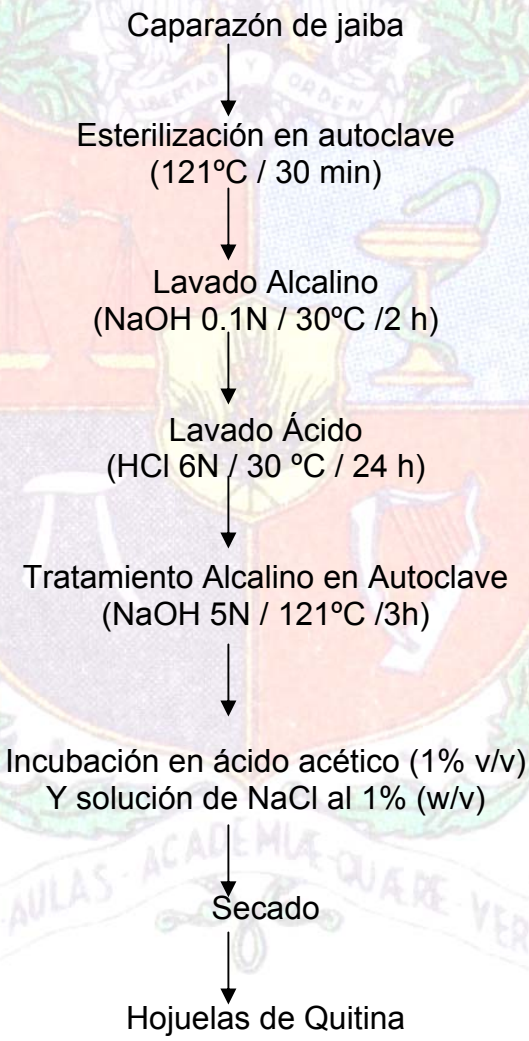
- Balanza Analítica Kern (Presición 0.1 mg)
- Baño Termostático Eterna con control PID (Rango 0-200°C y precisión 0.1°C)
- Bomba Peristáltica Pulsatron 0 - 1.6 (galones/hora)
- Nevera Icasa

3.5 METODOS

3.5.1 PREPARACION DEL SOPORTE

El quitosano, es obtenido por desacetilación mediante un tratamiento alcalino drástico de la quitina, el cual es el principal componente de los exoesqueletos de muchos crustáceos e insectos. Así mismo, hace parte de la pared celular de muchos hongos [6].

Se obtiene la quitina proveniente de la caparazón de jaiba, a la cual se le hace el siguiente tratamiento descrito por Vaillant [22].



3.5.2 PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LA PULPA DE GUAYABA

A partir de guayabas en estado de maduración adecuada (ver Fig.31), se obtuvo una pulpa sin tratamiento térmico a la cual se le realizaron los ensayos mostrados en la tabla 7:

Fig. 31 Materia prima empleada para la elaboración de la pulpa

Tabla 7. Listado de métodos usados para la caracterización de la pulpa

Parámetro	Método
º Brix	Refractometría
PH	Potenciometría
Densidad 20/20 (g/mL)	Picnometría
Acidez libre expresada como Ácido Cítrico	Titulación
Proteína Soluble (en 100 g de muestra)	Biuret
Azucares Reductores (en 100 g de muestra)	DNS
Viscosidad (cP)	Viscosimetría

3.5.3 PREPARACIÓN DEL JUGO

A partir de la pulpa obtenida, se preparó un jugo con base en la norma NTC 404 a 8º Brix [10].

3.5.4 CURVAS PATRON

Una enzima ante todo es una proteína y como tal debe ser caracterizada por medio de un método analítico. En este caso al tratarse de una enzima soluble se escogió el método de Biuret, en el cual el contenido de proteína se estandarizo por medio de un patrón de albúmina de suero bovino (ANEXO 1)
Como uno de los subproductos del ataque enzimático son los azucares reductores, se estandarizo una curva por el método del DNS (ANEXO 2)

3.5.5 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA

La actividad catalítica de una enzima se mide por la propiedad de generar un subproducto el cual puede ser cuantificable con el tiempo, en el caso de la pectinasa la generación de un doble enlace debido a la acción de la pectinasa hace posible la determinación de la actividad y para la celulasa la producción de azucares reductores.

Tabla 8. Listado de métodos usados para la caracterización de la enzima

Parámetro	Método
Proteína	Biuret (anexo 1)
Actividad Catalítica (Pectinasa y Celulasa)	UV-Visible (anexo 3)

3.5.6 ENSAYOS PRELIMINARES DE INMOVILIZACION

Los ensayos preeliminares se hacen con el objeto de mirar la reproducibilidad del método, ya que si este no es lo suficientemente reproducible, indica que los factores que influyen en el proceso no se mantienen constantes, por ende no puede realizarse un plan de experiencia.

Por las razones expuestas anteriormente, antes de que un método se pueda declarar como un protocolo viable para un proceso, se debe estar seguro de la respuesta en el comportamiento del producto. Para poder comprobar la reproducibilidad en el proceso de inmovilización, se realizaron experiencias sin molécula espaciadora a temperatura ambiente y en baño térmico, como también experiencias con molécula espaciadora (Glutaraldehido), con activación a temperatura ambiente y baño térmico para diferentes concentraciones de ácido acético. Estas pruebas además de demostrar la reproducibilidad del proceso de inmovilización en las condiciones descritas, muestra el valor de la actividad del conjunto enzima soporte, lo cual ayuda a tomar una decisión de que tipo de condiciones son mejores para el protocolo de inmovilización.

Para realizar lo anterior, se deben de aclarar los pasos que se deben de seguir para una inmovilización:

- **Paso 1**: Activación de la superficie (quitosano), con ácido acético
- **Paso 2**: Adición de la molécula espaciadora a la superficie (glutaraldehido)
- **Paso 3**: Inmovilización de la enzima.

De acuerdo a lo anterior, tenemos:

Tabla 9: Datos para la inmovilización de pectinasa sobre quitosano sin molécula espaciadora

Ensayo	**Activación del Soporte**	**Parámetro**	**Valor**	**Volumen (mL)**	**Temperatura de Activación (ºC)**	**Tiempo (min)**
PS1	Paso 1	Concentración de Ácido Acético (%)	4	12.5	$T_{ambiente}$	30
PS2			4	12.5	50	30
PS3			8	12.5	$T_{ambiente}$	30
PS4			8	12.5	50	30
	Fijación de la Enzima	**Parámetro**	**Valor**	**Buffer pH**	**Temperatura de Incubación**	**Tiempo (h)**
PS1	Paso 2	Actividad pectinasa ofrecida (UI/g)	A encontrar	4.0	5 ºC	15
PS2				4.0	5 ºC	15
PS3				4.0	5 ºC	15
PS4				4.0	5 ºC	15

Tabla 10: Inmovilización de pectinasa sobre quitosano usando molécula espaciadora

Ensayo	**Paso 1**	**Parámetro**	**Valor**	**Volumen (mL)**	**Temperatura de Activación (ºC)**	**Tiempo (min)**
PC1	Activación del Soporte	Concentración de Ácido Acético (%)	4	12.5	$T_{ambiente}$	30
PC2			4	12.5	50	30
PC3			8	12.5	$T_{ambiente}$	30
PC4			8	12.5	50	30
	Paso 2	**Parámetro**	**Valor**	**Volumen (mL)**	**Temperatura de Fijación (ºC)**	**Tiempo (min)**
PC1	Fijación del Glutaraldehido	Volumen de Glutaraldehido	0.8	4.0	40	24
PC2			0.8	4.0	40	24
PC3			1.6	4.0	40	24
PC4			1.6	4.0	40	24
	Paso 3	**Parámetro**	**Valor**	**pH**	**Temperatura de Incubación**	**Tiempo (h)**
PC1	Fijación de la Enzima	Actividad PL ofrecida (UI/g)	A encontrar	4.0	5 ºC	15
PC2				4.0	5 ºC	15
PC3				4.0	5 ºC	15
PC4				4.0	5 ºC	15

3.5.7 DISEÑO 2^n

Una vez se este seguro que se puede inmovilizar reproduciblemente enzimas sobre la quitina, el paso a seguir es encontrar las condiciones en las cuales dichas enzimas se inmovilizan en mayor cantidad pero teniendo en cuenta que lo mas interesante en estos casos son aquellas condiciones donde se presenta mayor actividad catalítica.

Comúnmente para optimizar un protocolo que posee distintas variables, se emplea un método lógico; el cual consiste en mantener constantes n-1 variables y cambiar paulatinamente a la variable restante hasta encontrar un punto donde su comportamiento sea el mas alto (optimo). Este método no es recomendable a casos como el aquí expuesto, ya que no tiene en cuenta las interacciones conjuntas de las variables, las cuales se presentan muy a menudo en experiencias que posee pocas variables y experiencias donde unas variables dependen de otras [17].

Para tener en cuenta interacciones se hace uso de modelos matemático-estadísticos conocidos como planes de experiencia factorial.

Los diseños factoriales 2^n o también conocidos como planes de experiencia son ampliamente utilizados en experimentos donde se quiere encontrar los valores óptimos de un grupo de variables, las cuales están determinadas por un rango de valores, estos conocidos como niveles de la variable. Estos niveles pueden ser cuantitativos cuando se trata de niveles numéricos o cualitativos cuando se trata la ausencia o presencia de un factor.

El diseño factorial que maneja dos niveles de diseño 2^n presenta entonces un nivel inferior y un nivel superior respectivamente, los cuales pueden ser denotados como (+) para el nivel superior y (-) para el nivel inferior.

Esta metodología tiene la ventaja de no desperdicio de reactivos, poco tiempo de análisis, tiene en cuenta las interacciones bifactoriales, trifactoriales, etc; También posee la ventaja de que una vez realizado el plan de experiencia se obtiene una ecuación que describe el comportamiento del sistema dentro de los rangos predichos.

Los diferentes parámetros para el protocolo se muestran en la tabla 11

Tabla 11. Condiciones del protocolo de inmovilización.

Paso	Parámetro	Tipo	Rango
Activación del soporte	Concentración de Ácido Acético (%)	Variable	A determinar
	Temperatura (T_1) ºC	Variable	A determinar
	Tiempo (t_1) min	Constante	
Fijación del glutaraldehido (Glu)	Volumen de Glu (mL/ g de soporte)	Variable	A determinar
	Temperatura (T_2) ºC	Constante	
	pH_1	Constante	
	Tiempo (t_2) h	Constante	
Fijación de la enzima	Actividad de PL ofrecida (PL UI/g)	A determinar	A determinar
	pH_2	Constante	
	Temperatura(T_3) ºC	Constante	
	Tiempo (t_3) h	Constante	

De la tabla anterior se establecen los niveles máximos y mínimos (ver tabla 12)

Tabla 12. Niveles máximos(+) y mínimos(–) de las variables del plan

Nombre de la variable	Convención	Nivel inferior	Nivel superior
Concentración de Ácido Acético (%)	A	-	+
Temperatura de Activación (ºC)	B	-	+
Volumen de Glu (mL/ g de soporte)	C	-	+

La matriz de ensayos que indica los niveles en los cuales se deben realizar las experiencias se construye con tres variables asi:

Tabla 13. Matriz de experiencia para el plan 2^3

CORRIDA	A	B	C	COMBINACIÓN DEL TRATAMIENTO
1	-	-	+	l
2	+	-	+	a
3	-	+	+	b
4	+	+	+	ab
5	-	-	-	c
6	+	-	-	ac
7	-	+	-	bc
8	+	+	-	abc

3.5.8 Ecuación del sistema de inmovilización

Para encontrar la ecuación que describe el comportamiento del sistema [17], se hace uso de los valores de respuesta obtenidos del plan, lo cual se hace calculando el valor de los parámetros I,B,C,AB,AC,BC,ABC. Las ecuaciones que muestran los efectos A, B, C y sus combinaciones son:

$$A = 1/4n\ [a+ab+ac+abc-i-a-c-bc] \quad (2.27)$$

$$B = 1/4n\ [b+ab+bc+abc-I-a-c-ac] \quad (2.28)$$

$$C = 1/4n[c+ac+bc+abc-I-a-b-ab] \quad (2.29)$$

$$AB = \frac{abc+ab+c+(1)}{4n} - \frac{bc+b+ac+a}{4n} \quad (2.30)$$

$$AC = 1/4n\ [(1)-a+b-ab-c+ac-bc+abc] \quad (2.31)$$

$$BC = 1/4n\ [(1)+a-b-ab-c-ac+bc+abc] \quad (2.32)$$

$$ABC = 1/4n\ [abc-bc-ac+c-ab+b+a-(1)] \quad (2.33)$$

La ecuación general del proceso será entonces [17]:

$$Y = I + AX_1+BX_2+ABX_1X_2+CX_3+ACX_1X_3+ABCX_1X_2X_3 \quad (2.34)$$

3.5.9 Respuesta de la pectinasa frente a diversos parámetros

Se realizaron varias pruebas para evaluar el comportamiento de las enzimas libres e inmovilizada frente a diversos factores como pH, temperatura y concentración de sustrato para determinar los máximos niveles de actividad catalítica (Pectinasa y Celulasa) y así encontrar los rangos óptimos de trabajo.

3.5.9.1 Respuesta frente al pH (pectinasa libre e inmovilizada): la evaluación de la respuesta del pH de la enzima libre e inmovilizada se hace necesaria para determinar el pH en el cual se presenta el máximo de actividad catalítica, para lograr esto se hacen varias corridas bajo condiciones de temperatura y concentración de enzima y sustrato fijas, haciendo variar solamente el pH mediante buffers.

3.5.9.2 Actividad pectinasa (libre e inmovilizada) frente a la temperatura: La evaluación de la respuesta de la temperatura de la enzima libre e inmovilizada se hace necesaria para determinar la temperatura en la cual se presenta el máximo de actividad catalítica, para lograr esto se hacen varias corridas bajo condiciones de pH constante, concentración de enzima y sustrato fijas haciendo variar solamente la temperatura mediante un baño termostático con control PID.

3.5.9.3 Actividad pectinasa libre e inmovilizada frente a la concentración de sustrato: Habiendo determinado el pH y la temperatura donde se presenta la máxima actividad catalítica, se procede con estos dos parámetros controlados a evaluar las constantes cinéticas; para ello se recurre al proceso de

saturación de los sitios activos manteniendo una concentración constante de enzima frente a una concentración variable y creciente de sustrato

3.5.10 Respuesta de la celulasa frente a diferentes parámetros

Aunque la optimización del proceso de inmovilización se realizo para la pectinasa; el cóctel Naturalzyme® 200 XL esta compuesto por una mezcla de enzimas, lo que permite que haya la posibilidad de que se inmovilicen otras a parte de la pectinasa, la cual se encuentra en mayor porcentaje.

No se descarta la posibilidad que se inmovilice la celulasa, la cual tiene un papel importante en la industria de jugos para romper paredes de celulosa convirtiéndolas en glucosa.

Con base en lo anterior, también se determinó la respuesta de la celulasa frente a diferentes parámetros como pH, temperatura y concentración de sustrato, con miras a obtener los rangos óptimos y los parámetros cinéticos, tal y como se anoto anteriormente.

3.5.11 Reducción en la viscosidad del jugo de guayaba

Uno de los parámetros más importantes a determinar en el presente trabajo, es la reducción de viscosidad en el jugo de guayaba, ya que esta propiedad esta determinada por el alto contenido de pectina en la fruta. Para este análisis se realiza en laboratorio una simulación de reactor batch para el jugo de guayaba, midiendo la reducción de viscosidad del jugo tanto para la enzima libre como para la inmovilizada.

En ambos casos (libre e inmovilizada), se tomaron 100 gramos de jugo. Para el caso de la libre 10μL de Naturalzyme® 200 XL y para la inmovilizada 0.3979 gramos del conjunto inmovilizado.

3.5.12 Efecto de la enzima libre e inmovilizada en los azucares reductores.

En el punto anterior, se analizó la disminución en la viscosidad del jugo de guayaba; esto nos da información sobre el ataque de la pectinasa a la pectina presente en el jugo, pero no involucra la celulasa; por lo anterior, se realizo un seguimiento en los dos procesos de la cantidad de azúcares reductores generados en la muestra. La cantidad de azúcares reductores al inicio de las pruebas debe ser menor que el obtenido al final, ya que no se ha iniciado el ataque de la celulasa.

3.5.13 Determinación de la estabilidad operacional

Para la determinación de la estabilidad operacional, se construyo un reactor de lecho empacado (ver Fig. 32) con las siguientes características:

- Volumen: 38.27 cm^3
- Peso del conjunto inmovilizado: 2.8598 gramos.
- Temperatura: 30ºC (Controlada por el baño termostático PID)
- Flujo: 1.50 mL / min (Controlado por una bomba peristáltica)
- Alimento: Solución de pectina al 1% en buffer pH 4.0

Fig. 32 Reactor de lecho empacado utilizado

3.5.14 Visualización de algunos efectos de superficie en el proceso de inmovilización

Durante el proceso de inmovilización pueden ocurrir cambios en la apariencia física del soporte (color y textura), que hacen suponer la existencia de cierta cantidad de enzima fijada al soporte. Para comprobar si hubo o no inmovilización, se sometieron varias muestras de soporte a un minucioso análisis de la superficie mediante un microscopio de barrido electrónico (ESEM).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACION DE LA PULPA

Los siguientes son los resultados de la caracterización de la pulpa de guayaba, obtenida por los métodos enumerados en la tabla 7. Se requieren conocer los valores iniciales, ya que al someterse el jugo a la acción de las enzimas algunos parámetros tales como azucares reductores, Brix, viscosidad y proteína van a resultar afectados.

Tabla 14. Caracterización de la Pulpa de Guayaba Obtenida

Parámetro	Resultado
º Brix	7.0
pH	3.77
Densidad 20/20 (g/mL)	1.042
Acidez libre expresada como Ácido Cítrico	0.1939 g Ac. / g de muestra
Proteína Soluble (en 100 g de muestra)	0.02515 g
Azucares Reductores (en 100 g de muestra)	0.4395 g
Viscosidad (cP)	2610

4.2 CURVAS PATRON

4.2.1 Curva patrón de proteína

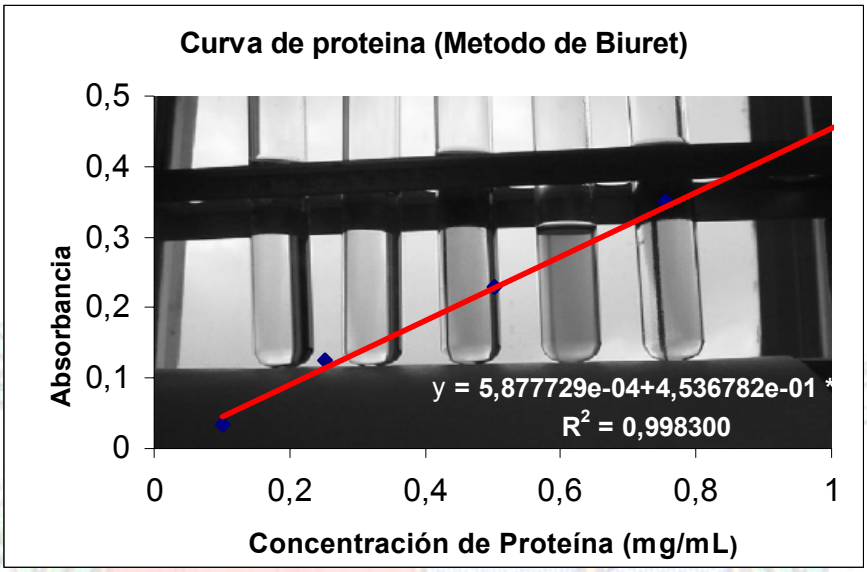
Esta curva se realizó preparando varios patrones de albúmina disueltos en agua destilada como se indica en la tabla 15 (Anexo 1), por el método de Biuret. Los resultados del patronamiento de la curva se muestran a continuación.

Tabla 15. Datos para la obtención de la curva de proteína (Método de Biuret)

Longitud de Onda (nm)	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
540	0.1005	0.0347
540	0.2512	0.1253
540	0.5025	0.2289
540	0.7538	0.3508
540	1.0050	0.4486

La gráfica obtenida se muestra en la Fig. 33 :

Fig.33 Curva patrón de proteína



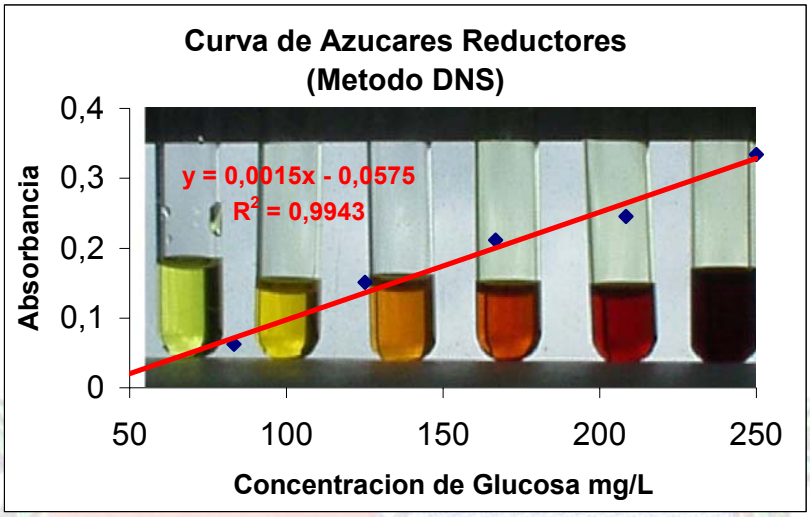
4.2.2 Curva patrón de azucares reductores

Esta curva se realizó preparando varios patrones de glucosa disueltos en agua destilada como se indica a continuación en la tabla 16, por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Anexo 2).

Tabla 16. Datos para la obtención de la curva patrón de Azucares reductores (DNS)

Longitud de Onda (nm)	Concentración (mg/L)	Absorbancia
540	41.666	0.0051
540	83.333	0.0619
540	125.00	0.1506
540	166.66	0.2110
540	208.33	0.2453
540	250.00	0.3338

Fig.34 Curva patrón de azucares reductores



4.3 ENSAYOS PRELIMINARES

Los ensayos preliminares propuestos en las tabla 9 y 10, permitieron encontrar los rangos máximos y mínimos para las variables los cuales se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Resumen sobre los resultados obtenidos mediante los protocolos especificados en las tablas 9 y 10 (Pruebas realizadas por triplicado)

Ensayo	Características				Valores encontrados	
	Peso de Quitina (g)	Temperatura de Activación (ºC)	Concentración de ácido acético (%)	Volumen de Glu (mL)	Proteína inmovilizada (mg de Prot./ g de Quitina)	Actividad pectinasa (UI/g de Quitina)
PS1	0.4985	Ambiente	4	0	13.5987	0.3036
PS2	0.50135	50	4	0	18.49315	0.3172
PS3	0.4949	Ambiente	8	0	16.6779	0.3036
PS4	0.5363	50	8	0	11.4247	0.2800
PC1	0.5003	Ambiente	4	0.8	6.4128	0.4451
PC2	0.5020	50	4	0.8	7.4070	0.4287
PC3	0.5010	Ambiente	8	1.6	4.4577	0.5316
PC4	0.5024	50	8	1.6	10.1895	0.6337

En general, de la tabla 17 se observa que la no presencia de molécula espaciadora disminuye significativamente la actividad catalítica (en promedio 0.3011 UI/g de quitina), en comparación con la que si la posee (en promedio 0.501 UI/g de quitina); bajo las mismas condiciones de temperatura, concentración y

ácido acético. En el caso de la adición de molécula espaciadora, se observa un aumento constante de la actividad catalítica, por ende se decide optimizar este parámetro; bajo los diferentes valores de temperatura y concentración de ácido acético.

En un proceso de inmovilización, la retención de actividad catalítica es más importante que la misma cantidad de proteína inmovilizada, esto se observa apartir de la tabla 17 donde el ensayo (PS2) presenta más cantidad de proteína inmovilizada, pero la actividad no es tan alta como la del ensayo (PC3) donde hay menor cantidad de enzima inmovilizada pero hay más retención de actividad. Esto se explica por la aparición de los efectos estéricos como consecuencia de que algunas moléculas son inmovilizadas en una posición relativa a la superficie del soporte, tal que el sitio activo resulta relativamente inaccesible a las moléculas de sustrato [17]. Así podemos notar que el principal efecto de la molécula espaciadora es precisamente la reducción del efecto estérico.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO A OPTIMIZAR

Después de haber asegurado que el proceso de inmovilización es reproducible bajo las diferentes condiciones anteriormente descritas, se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo:

1. Concentración de ácido acético entre 4-8 %
2. Temperatura de activación entre 45-55 ºC
3. brazo espaciador (Volumen de Glutaraldehido 0.8-1.6 mL).

Los diferentes pasos, tipos de variable y rangos de la misma; se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Condiciones del protocolo de inmovilización.

Paso	Parámetro	Tipo	Rango
Activación del soporte	Concentración de Ácido Acético (%)	Variable	4-8
	Temperatura (T_1) ºC	Variable	45-55
	Tiempo (t_1) min	Constante	30
Fijación del glutaraldehido (Glu)	Volumen de Glu (mL/ g de soporte)	Variable	1.6-3.2
	Temperatura (T_2) ºC	Constante	40
	pH_1	Constante	4.0
	Tiempo (t_2) h	Constante	24
Fijación de la enzima	Actividad de PL ofrecida (PL UI/g)	A determinar	A determinar
	pH_2	Constante	4.0
	Temperatura(T_3) ºC	Constante	5
	Tiempo (t_3) h	Constante	15

Teniendo en cuenta los rangos de las variables, se determinaron los niveles máximos y mínimos

Tabla 19. Niveles máximos(+) y mínimos(–) de las variables del plan

Nombre de la variable	Convención	Nivel inferior	Nivel superior
Concentración de Ácido Acético (%)	A	4	8
Temperatura de Activación (ºC)	B	45	55
Volumen de Glu (mL/ g de soporte)	C	0.8	1.6

La matriz de experiencia o matriz que indica los niveles en los cuales se deben realizar las experiencias se construye con las tres variables así:

Tabla 20. Matriz de experiencia para el plan 2^3

Corrida	A	B	C	Combinación del tratamiento
1	4	45	0.8	I
2	8	45	0.8	a
3	4	55	0.8	b
4	8	55	0.8	ab
5	4	45	1.6	c
6	8	45	1.6	ac
7	4	55	1.6	bc
8	8	55	1.6	abc

Esta matriz indica como se combinan los niveles en cada variable dentro de cada experiencia. Así en la corrida numero 1 se trabajo con las variables A,B,C, en el nivel inferior, esto quiere decir que la variable A (Concentración de Ácido Acético) toma el valor de 4%, la variable B (Temperatura de activación) toma el valor de 45 ºC y la variable C (volumen de Glutaraldehido) toma el valor de 0.8 mL. Con las combinaciones de los tratamientos descritos en la tabla 18, se obtuvieron los valores para las variables de salida las cuales se muestran en la tabla 21.

Tabla 21: Respuestas Obtenidas del Plan (Pruebas por Duplicado)

Experiencia		Proteína inmovilizada (mg Prot. /g de Quitina)	Actividad pectinasa (UI/g de Quitina)
1	(1)	32.55	0.2429
2	a	32.30	0.2513
3	b	31.01	0.2348
4	ab	32.40	0.2221
5	c	31.67	0.2982
6	ac	31.36	0.2597
7	bc	32.87	0.3070
8	abc	45.88	0.2080

4.5 ECUACIONES DEL COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA BASADO EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA Y EN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

De la tabla 21 se calculan los parámetros I, A, B, C, AB, AC y ABC los cuales permiten encontrar la ecuación característica a partir de la ecuación general [17] :

Tabla 22: Parámetros para la proteína inmovilizada

Parámetro	Valor	Desviación Respecto a I (%)	S	Conclusión
I	33.755	0	71.21	
A	1.73	5.125	0.1871	8 % de Ácido Acético
B	1.785	5.288	0.1991	Temperatura de Activación 55 ºC
AB	1.87	5.540	0.2186	
C	1.7275	5.117	0.1865	Volumen de Glutaraldehido 1.6 mL
AC	1.445	4.281	0.1305	
BC	2.145	6.355	0.2876	
ABC	1.46	4.325	0.1332	

Tabla 23: Parámetros para la actividad de la pectinasa inmovilizada.

Parámetro	Valor	Desviación Respecto a I (%)	S	Conclusión
I	0.2530	0	0.0040	
A	-0.01772	7.0039	1.962 e-5	4 % de Ácido Acético
B	-0.010025	3.9624	6.2812 e-6	Temperatura de Activación 45 ºC
AB	0.0102	4.0316	6.5025 e-6	
C	0.015225	6.0177	1.4487 e-5	1.6 mL de Glutaraldehido
AC	0.0111125	1.2152	7.718 e-6	
BC	-0.0007	0.2766	3.06 e-8	
ABC	0.004925	1.9466	1.5159 e-6	

Las ecuaciones que describen el comportamiento del sistema de inmovilización con respecto a la cantidad de proteína inmovilizada y la actividad pectinasa son:

- ***Proteína Inmovilizada*** = $33.755 + 1.73X_1 + 1.785X_2 + 1.87X_1X_2 + 1.7275X_3 + 1.445X_1X_3 + 2.145X_2X_3 + 1.46X_1X_2X_3$ **(mg de proteína / gramos de quitina)**

- ***Actividad Pectinasa*** = $0.2530 - 0.01772X_1 - 0.010025X_2 + 0.0102X_1X_2 + 0.015225X_3 + 0.0111125X_1X_3 - 0.0007X_2X_3 + 0.004925X_1X_2X_3$ **(UI / gramo de quitina)**

4.6 PROTOCOLO DE INMOVILIZACIÓN PARA PECTINASAS

Según los resultados obtenidos en el diseño experimental y teniendo en cuenta que el criterio más importante para trabajar con una enzima no es la cantidad de proteína inmovilizada sino la actividad catalítica, se pueden aplicar para las tres variables en estudio, las condiciones que le son más favorables para que el conjunto enzima-soporte retenga la mayor actividad; estas son:

- Concentración de Ácido Acético: 4%
- Temperatura de Activación del soporte: 45 ºC
- Volumen de Glutaraldehido: 1.6 mL

El procedimiento para inmovilizar la pectinasa será entonces:

a. A un peso de 0.5 g de Quitina, se adicionan 12.5 mL de ácido acético al 4%. Se incuba a 45 ºC por 30 minutos, posteriormente se lava la quitina con agua deionizada hasta eliminar el olor a ácido acético.

b. Se suspende la superficie activada en 5 mL de ácido acético al 4% y se adicionan 1.6 mL de solución de Glutaraldehido (50%) y se deja debidamente tapado por 24 horas a 40ºC.

c. Transcurrido este tiempo, se lava con buffer acetato pH 4.0, 0.1M y se adiciona 11 mL del buffer más 1mL de Naturalzyme® 200 XL. Se incuba a 5ºC durante 15 horas.

d. Se filtra y se lava el sólido con buffer acetato pH 4.0, 0.1M y NaCl 0.02M hasta un volumen cercano a 75 mL (Este filtrado se guarda para análisis de proteína).

e. Por último se cubre de nuevo el conjunto enzima-soporte con el buffer y se guarda en la nevera.

La figura 35 muestra el resultado del proceso de inmovilización de pectinasas sobre las hojuelas de quitina bajo las condiciones anteriormente descritas.

Fig. 35 Hojuelas con enzima inmovilizada

Tamaño promedio de partícula 75 mm

4.7 RESPUESTA DE LA PECTINASA FRENTE A DIVERSOS PARAMETROS

4.7.1 Respuesta frente al pH (pectinasa libre e inmovilizada)

La variación de la actividad catalítica frente al pH para la enzima libre e inmovilizada se muestran en las figuras 36 y 37.

Fig.36 Respuesta de la Pectinasa libre frente al pH (ver tabla 22)

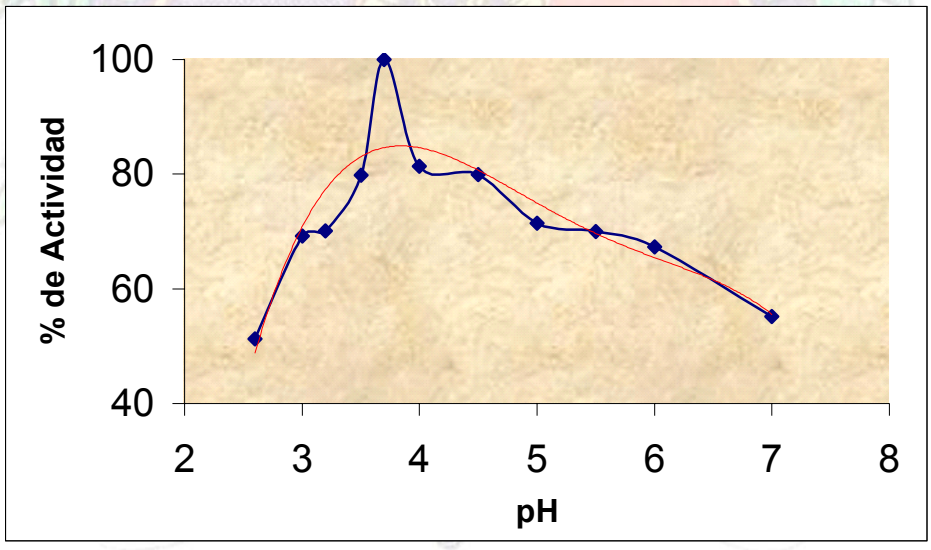
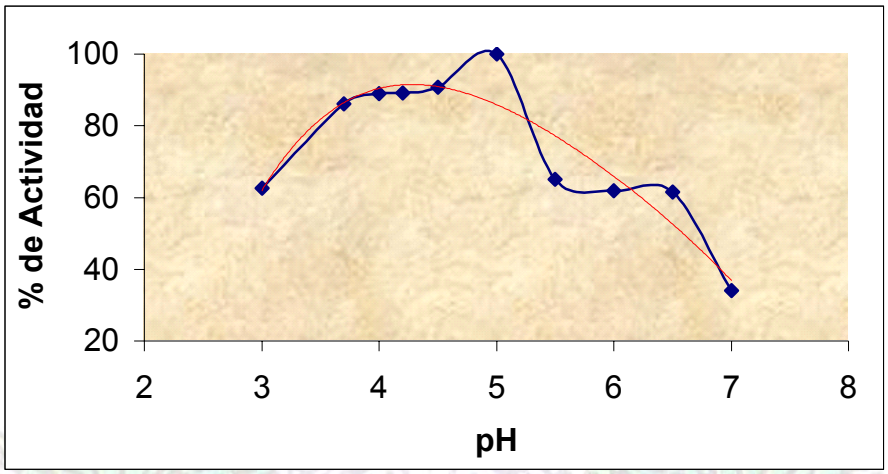


Fig.37 Respuesta de la Pectinasa Inmovilizada frente al pH (ver tabla 23)



Se puede observar apartir de las figuras 36 y 37, que el pH óptimo de la enzima libre es de 3.7, mientras que el de la enzima inmovilizada es de 5.0; lo que muestra un desplazamiento del pH hacia la zona básica cuando se inmovilizan la pectinasa sobre quitina, lo cual es desfavorable para el proceso de catálisis en un jugo de guayaba, ya que el pH de la pulpa se encuentra alrededor de 3.77;

4.7.2 Actividad pectinasa (libre e inmovilizada) frente a la temperatura.

Siendo la temperatura un factor de peso en la actividad catalítica ya que modifica la energía cinética del sustrato hacia la enzima, se determinó la temperatura de trabajo por medio de las siguientes figuras:

Fig.38 Respuesta de la pectinasa libre frente a la temperatura (ver tabla 24)

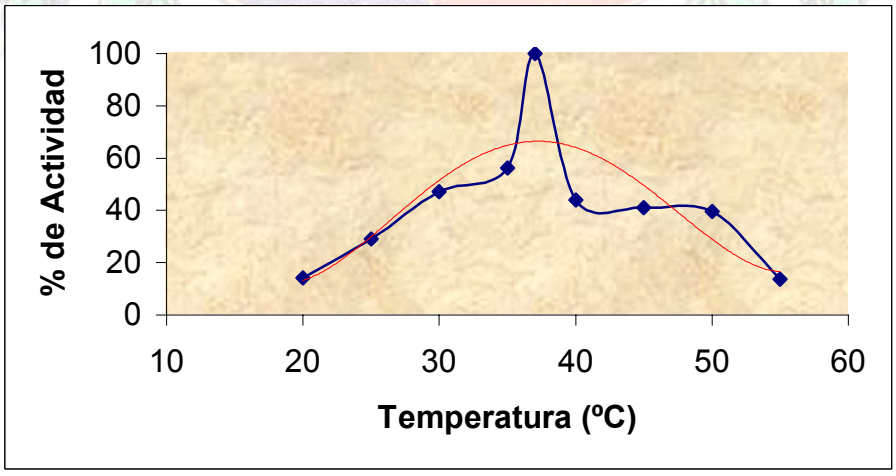
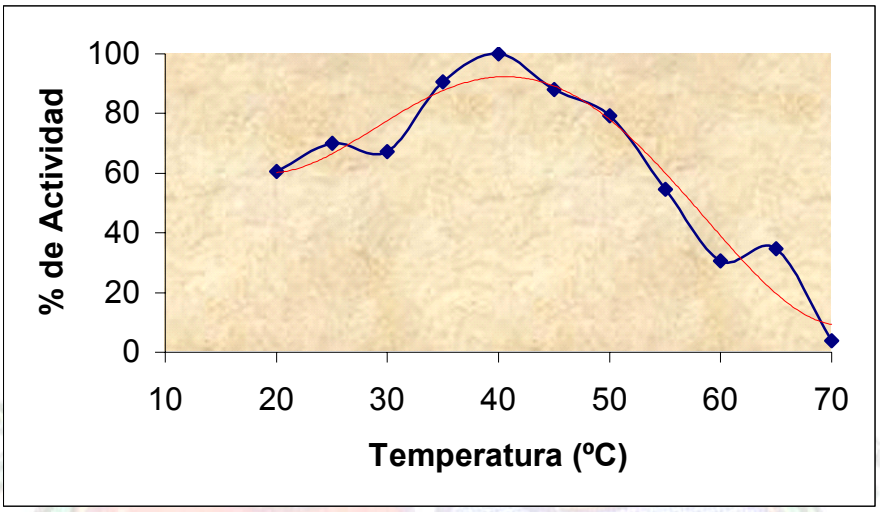


Fig.39 Respuesta de la pectinasa inmovilizada frente a la temperatura (ver tabla 25)



A partir de las figuras 38 y 39, la temperatura óptima para la enzima libre se encuentra en 37 ºC y para la enzima inmovilizada 40ºC, observando que el óptimo se desplaza en 3ºC.

4.7.3 Actividad pectinasa libre e inmovilizada frente a la concentración de sustrato

La saturación del sitio activo de la enzima por el sustrato juega un factor importante en la cinética química, lo anterior se muestra en las figuras 40 y 41.

Fig.40 Respuesta de la pectinasa libre frente a la concentración de sustrato (ver tabla 26)

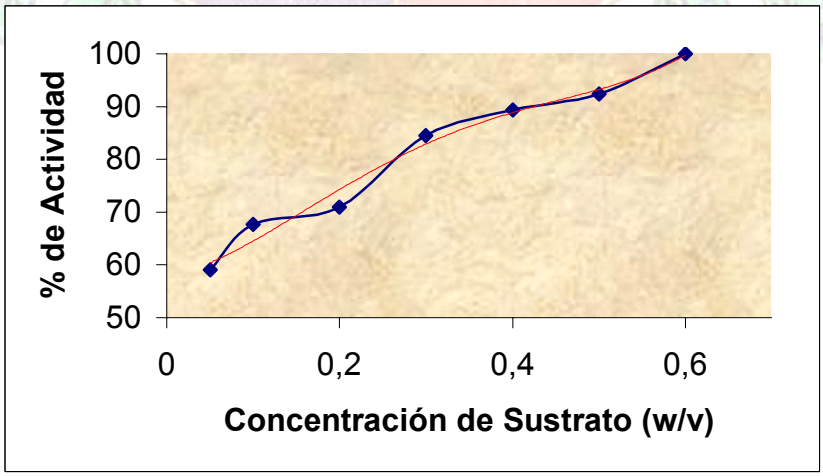
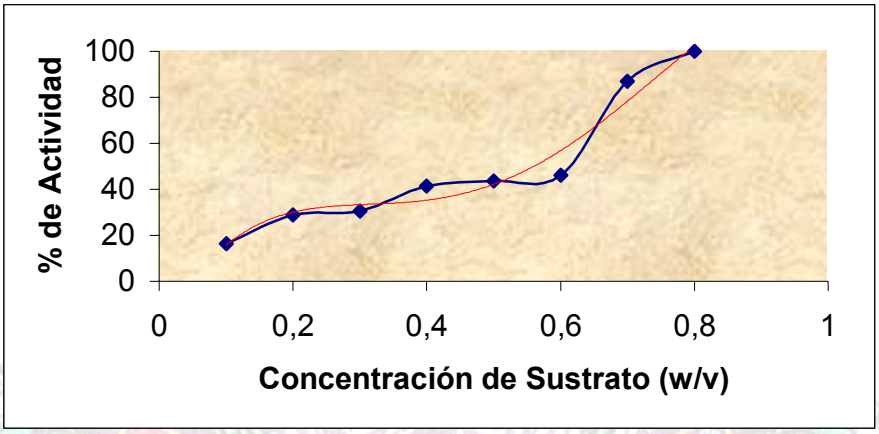


Fig.41 Respuesta de la pectinasa inmovilizada frente a la concentración de sustrato (ver tabla 27)



4.7.4 Lineweaber-burk para pectinliasa libre e inmovilizada

Una vez obtenida la relación entre el aumento de concentración de sustrato y actividad catalítica, se procede a la linealización de los gráficos anteriores para obtener de estos los parámetros cinéticos.

Fig.42 Curva de Lineweaber para la pectinasa libre (ver tabla 28)

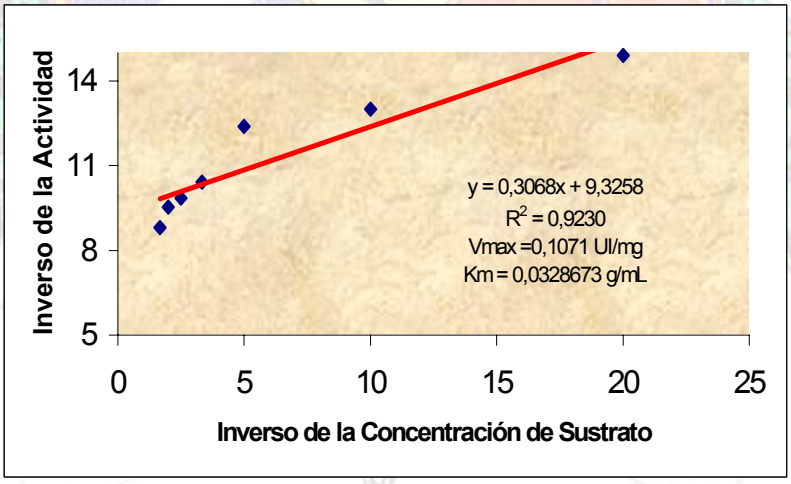
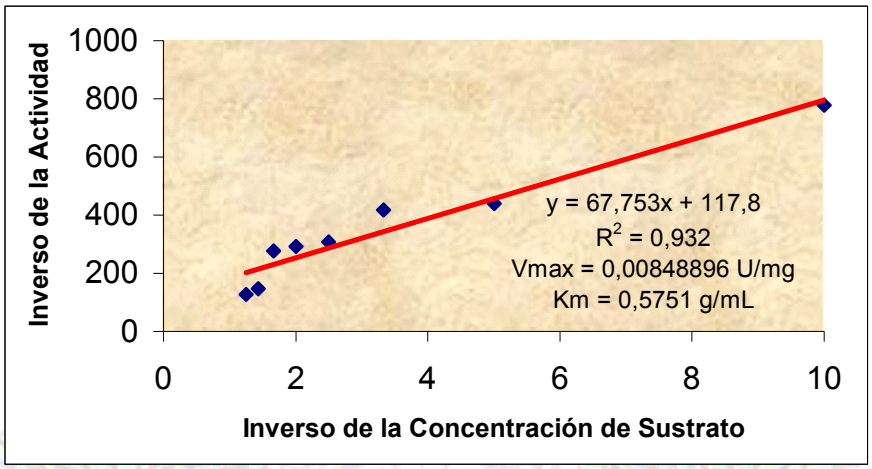


Fig.43 Grafico de lineweaber para la pectinasa inmovilizada (ver tabla 29)



A partir de las figuras 42 y 43, se determina que la velocidad máxima de reacción de la enzima libre encontrada es 0.1071 UI/mg y comparada con la de la pectinasa inmovilizada (0.00848896 UI/mg) es cien veces mayor, lo cual muestra que la enzima libre actúa mucho más rápido que la enzima inmovilizada.

En el caso de la constante de Michaelis-Menten para la pectinasa libre (0.0328673 g/mL) en comparación con la inmovilizada (0.5751g/mL), el que se obtenga un valor más grande para la inmovilizada, indica que para llegar a una velocidad de reacción máxima se necesita una alta concentración de sustrato o dicho de otra manera, como a la enzima inmovilizada se le ha restringido su movimiento, el sustrato no puede acceder a ella tan fácilmente como en el caso de libre en la cual se requiere solamente pequeñas cantidades de sustrato para ser saturada y el máximo de velocidad es alcanzado a bajas concentraciones de sustrato [23].

4.8 RESPUESTA DE LA CELULASA FRENTE A DIFERENTES PARÁMETROS

4.8.1 Actividad celulasa libre e inmovilizada frente al pH.

Como se puede observar de las figuras 44 y 45, la máxima actividad de la celulasa (libre e inmovilizada), se presento en un rango estrecho de pH (4.2-4.5) lo que muestra que este factor no incide directamente en la inmovilización de celulasa. Es de aclarar que el protocolo esta especificado para inmovilizar preferencialmente pectinasas, ya que la actividad celulasa inmovilizada es casi nula en comparación con la libre.

Fig. 44 Actividad celulasa libre frente al pH (ver tabla 30)

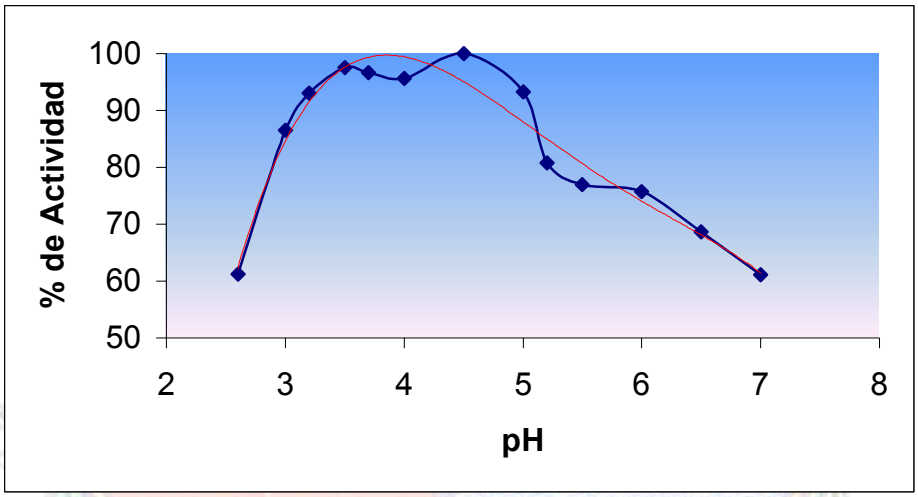
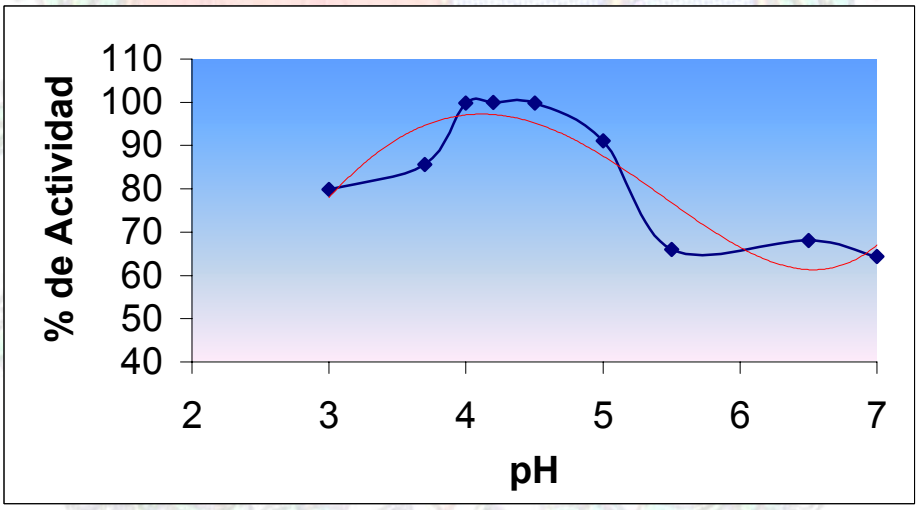


Fig. 45 Actividad celulasa Inmovilizada frente al pH (ver tabla 31)



4.8.2 Actividad celulasa libre e inmovilizada frente a la concentración de sustrato

Habiendo determinado el pH y la temperatura donde se presenta la máxima actividad catalítica para la pectinasa bajo estos mismos parámetros se evaluó la respuesta de la celulasa frente a la concentración de CMC (ver Fig. 46 y 47).

Fig. 46 Respuesta de la celulasa libre frente a la concentración de sustrato (ver tabla 32)

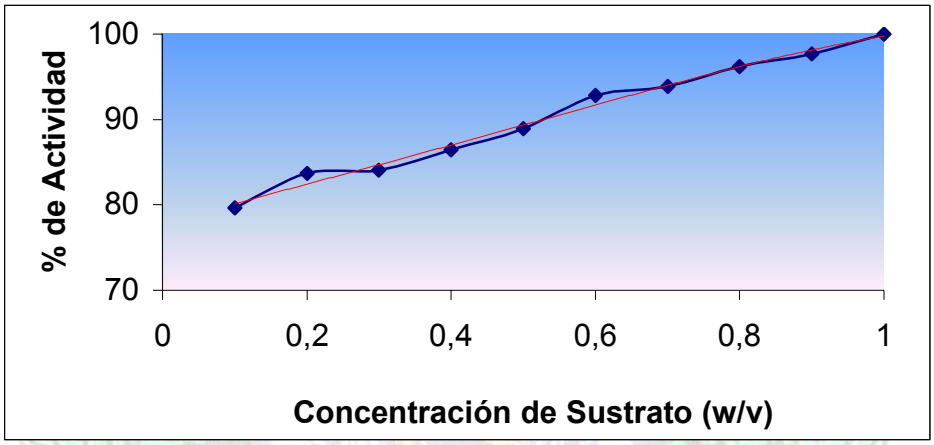
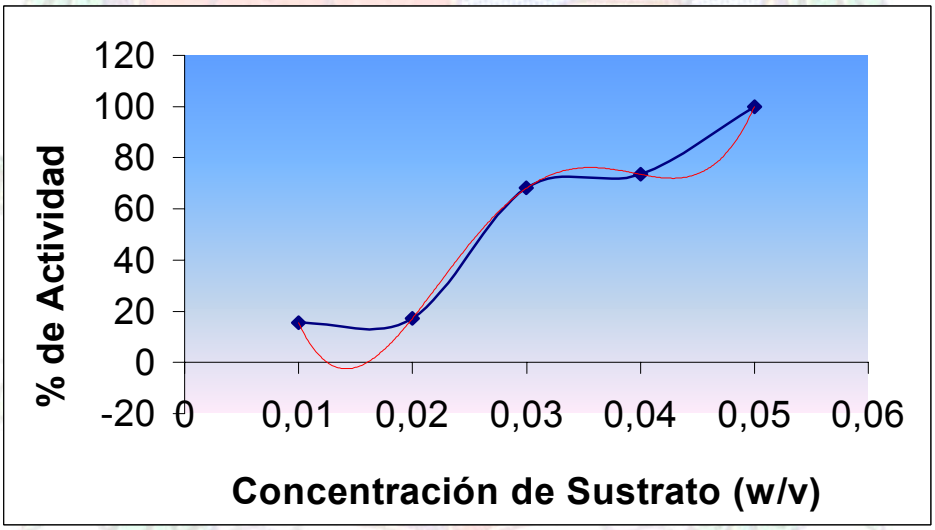


Fig. 47 Respuesta de la celulasa inmovilizada frente a la concentración de sustrato (ver tabla 33)



4.8.3 Lineweaber-burk para celulasa libre e inmovilizada

Linealizando las gráficas anteriores, se obtienen los parámetros cinéticos de la celulasa los cuales se relacionan en las figuras 48 y 49.

Fig. 48 Grafico de lineweaber para la celulasa libre (ver tabla 34)

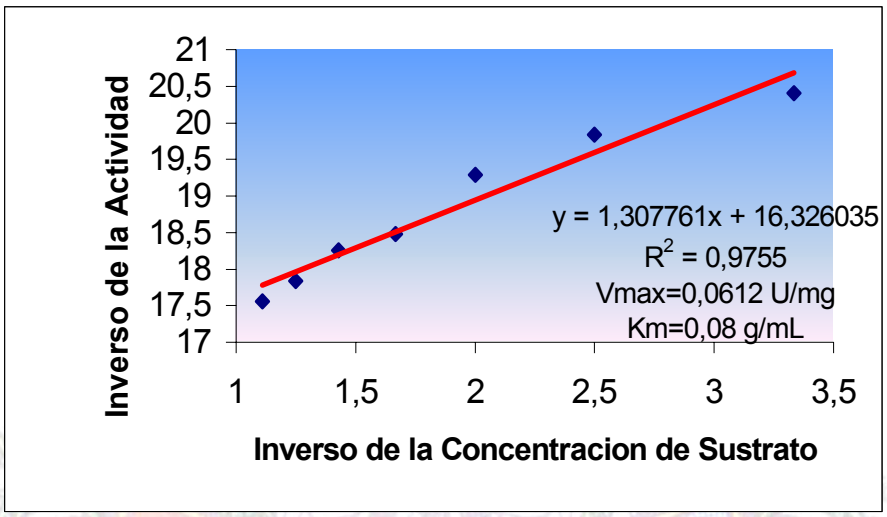
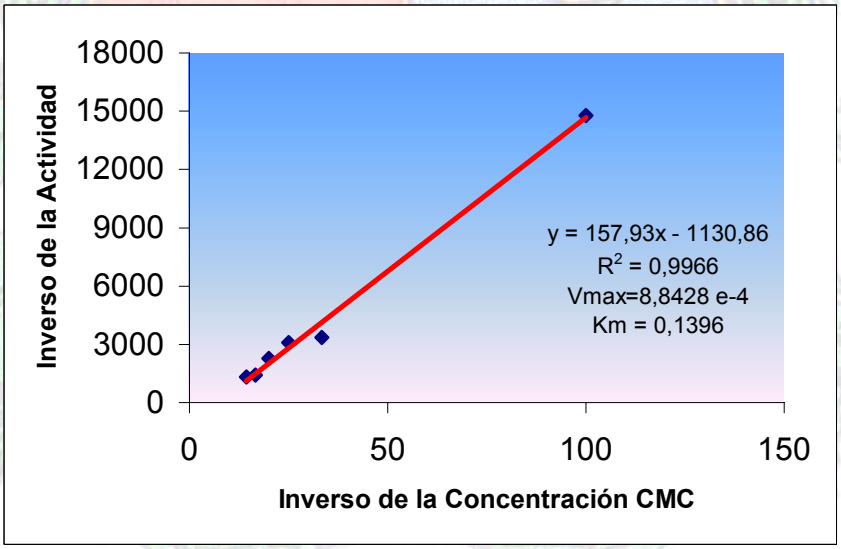


Fig. 49 Gráfico de lineweaber para celulasa inmovilizada (ver tabla 35)



Las figuras 48 y 49 representan la actividad de la enzima frente al cambio de la concentración de sustrato, donde se puede ver que la saturación de los sitios activos de la enzima se produce una vez esta actúa a su velocidad máxima de catálisis, así para la enzima libre la velocidad de reacción (0.0612 UI/mg) es mucho mayor que para la enzima inmovilizada (8.8424e-4 UI/mg). De igual manera que para el caso de la pectinasa inmovilizada, la celulasa inmovilizada presenta una constante de Michaelis mayor (0.1396 g/mL) que para la enzima libre (0.08 g/mL), lo cual significa que la enzima inmovilizada es saturada a

concentraciones más bajas que la enzima libre, debido a la dificultad para el acceso del sustrato a los sitios activos. Además para el caso de la celulasa pueden estar comprometidos algunos aminoácidos del sitio activo en la inmovilización. Esto se manifiesta por la baja actividad catalítica presentada.

De lo anterior se deduce que 133.09 mg de proteína inmovilizada tienen el mismo efecto que 1 mg de proteína libre. El resultado anterior se debe a que el proceso de inmovilización no fue especificado para la inmovilización de celulasa.

4.8.4 ACTIVIDAD CELULASA LIBRE E INMOVILIZADA FRENTE A LA TEMPERATURA

De acuerdo a los resultados obtenidos en las figuras 50 y 51, se observa que para la celulasa la temperatura optima de la enzima inmovilizada se desplaza 5ºC, al igual que la pectinasa en el proceso de inmovilización ha tenido un efecto de estabilidad adicional a la enzima.

La enzima se ha estabilizado de tal manera que se debe de tener una temperatura superior en el caso de la inmovilizada frente a la libre para que el sustrato posea una mayor movilidad y pueda este acceder al sitio activo.

Fig. 50 Respuesta de la celulasa libre frente a la temperatura (ver tabla 36)

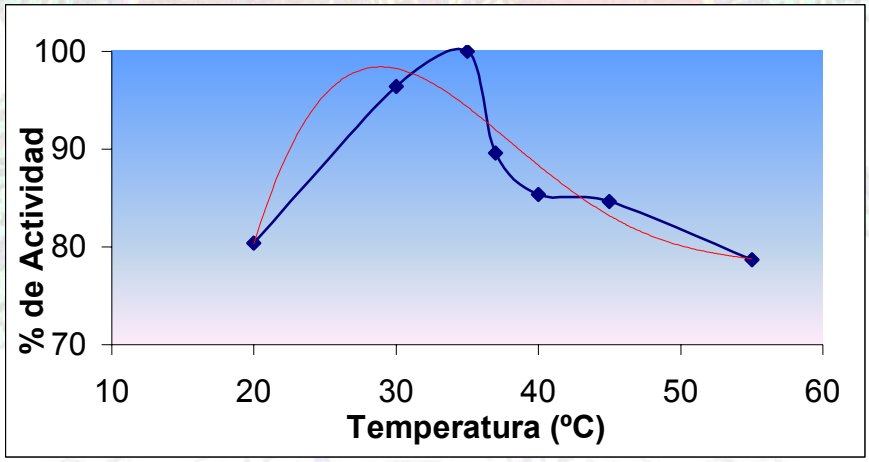
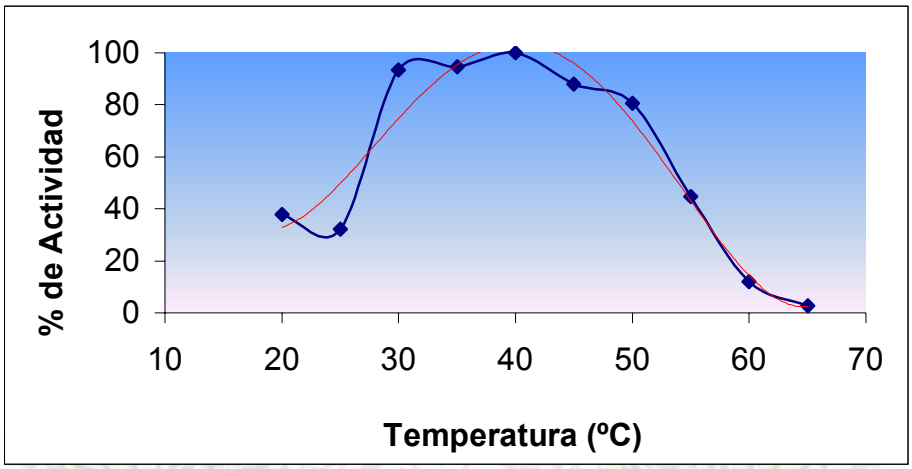


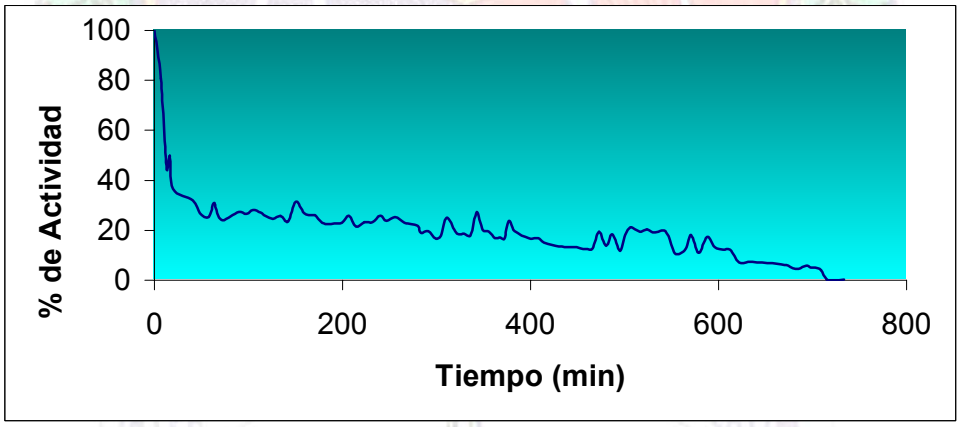
Fig. 51 Respuesta de la celulasa inmovilizada frente a la temperatura (ver tabla 37)



4.9 ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL CONJUNTO INMOVILIZADO

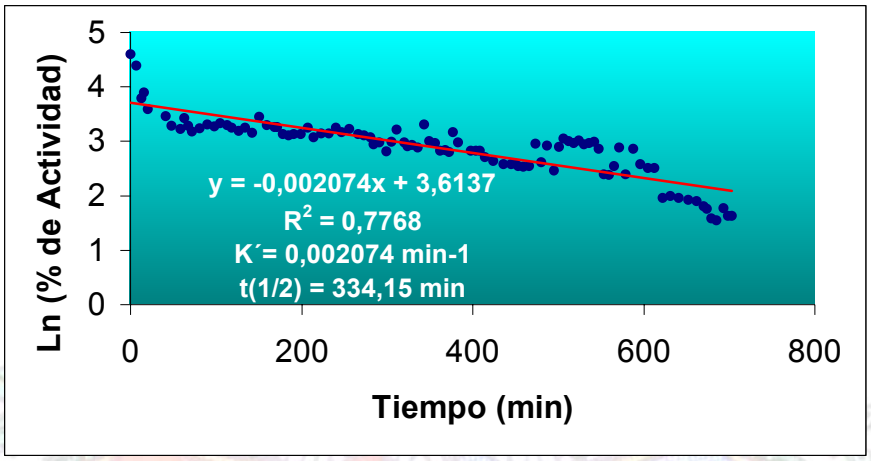
La prueba se realizo en el reactor de lecho empacado por un tiempo total de 771 minutos, recolectándose un total de 105 datos, los cuales se encuentran ordenados en la tabla 38 (Anexo 3) y a apartir de los cuales se obtuvo la siguiente gráfica:

Fig. 52 Estabilidad operacional del conjunto inmovilizado (ver tabla 38)



A partir de la gráfica anterior y linealizando el porcentaje de actividad frente al tiempo se obtiene la constante de desactivación y el tiempo de vida media del conjunto enzima-soporte, tal y como se muestra en la figura 53:

Fig. 53 Linealización de la estabilidad operacional



En la figura 52 donde se muestra la actividad frente al tiempo de operación, se observa que la gráfica presenta una forma de tendencia cuasi-exponencial de pendiente negativa, lo que representa que la actividad del soporte decae con el tiempo de operación; teniendo que en aproximadamente 771 minutos, la actividad pectinasa del soporte ha decaído notablemente. Además en los primeros 334 minutos de operación del reactor, la caída en la actividad es lenta y se sitúa alrededor del 30% de actividad residual. Hallando el intercepto de la linea de tendencia mostrada en la figura 53, la actividad nula se presenta en 29.03 horas de operación.

4.10 EFECTO ENZIMATICO DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA SOBRE EL JUGO DE GUAYABA

4.10.1 Reducción en la viscosidad del jugo de guayaba

Uno de los objetivos principales del presente trabajo es cuantificar el efecto de la inmovilización en la reducción de la viscosidad del jugo de guayaba. Los resultados se muestran en las figuras 54 y 55:

Fig 54. Efecto de la Enzima libre sobre la viscosidad en el jugo de guayaba (ver tabla 39)

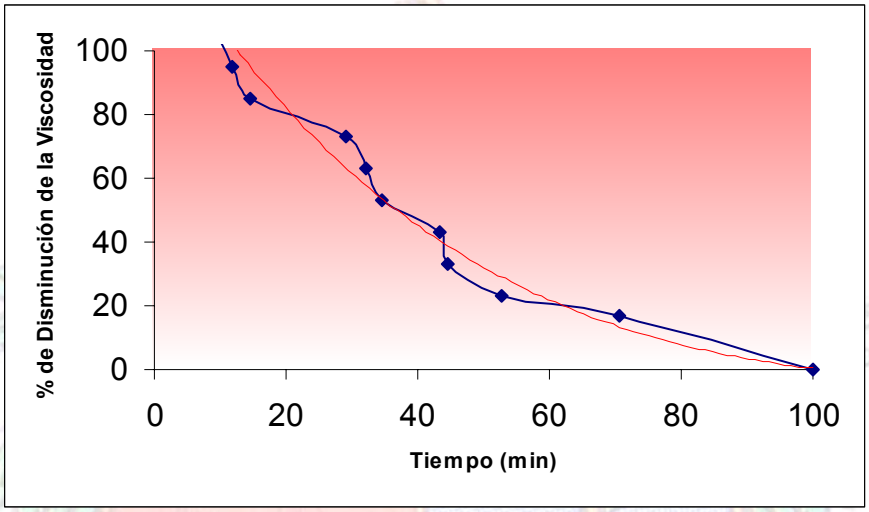


Fig. 55 Linealización del efecto de la enzima libre sobre la viscosidad el jugo de guayaba

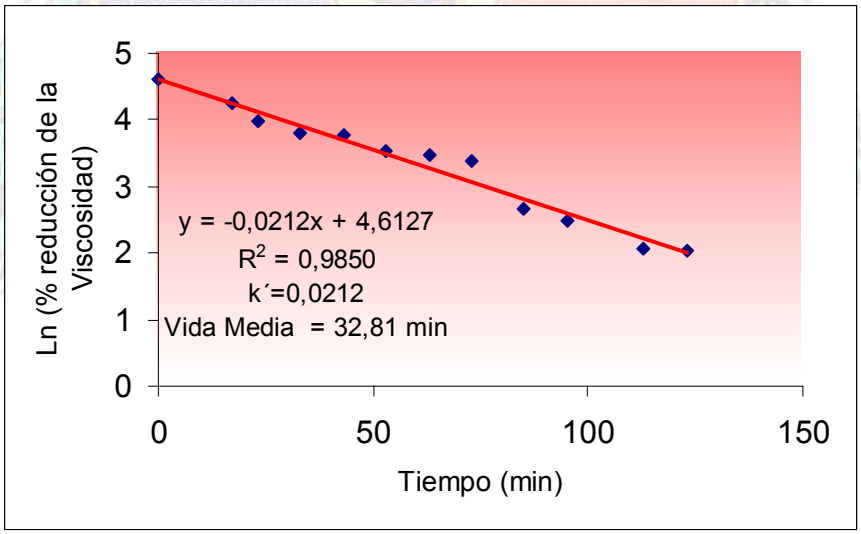


Fig. 56 Efecto de la enzima inmovilizada sobre la viscosidad el jugo de guayaba (ver tabla 40)

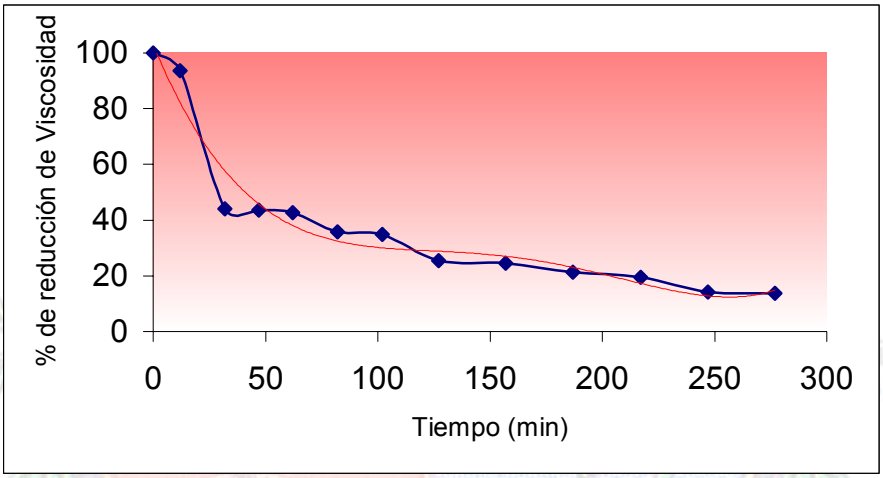


Fig. 57 Linealización del efecto de la enzima inmovilizada sobre la viscosidad el jugo de guayaba

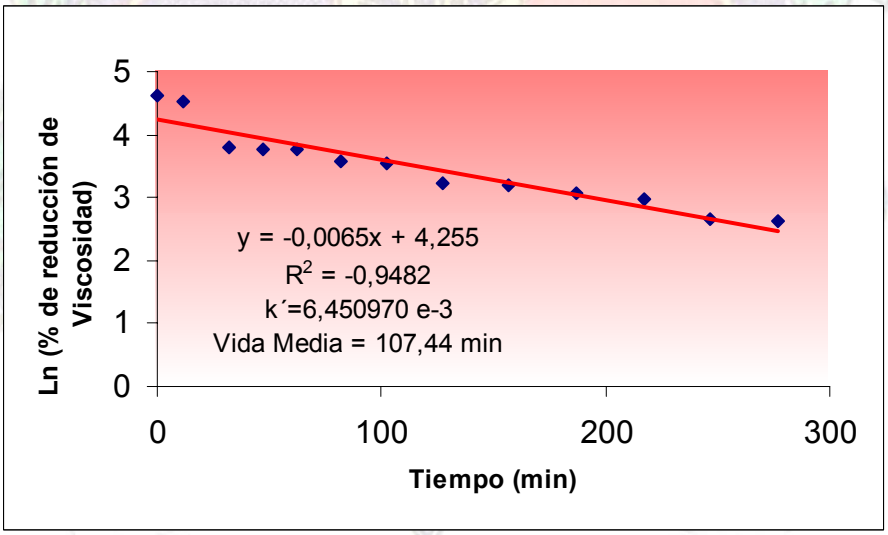


Tabla 41. Comparación en la Reducción de la viscosidad del Jugo de Guayaba

Enzima	% Reducción de la Viscosidad	Enzima Utilizada (UI)	Actividad Específica (UI / mg de Proteína)	Tiempo (horas)
Libre	92.34	3.22	0.045	2
Inmovilizada	76.47	0.58	1.046	2

La tabla anterior muestra que como era de esperarse, la enzima libre presenta una mayor efectividad en la reducción de la viscosidad para un mismo tiempo. Esto se debe a la movilidad que presenta el sustrato frente a la enzima en comparación con la inmovilizada.

Para la enzima inmovilizada se observó que después de 2 horas se obtuvo una reducción del 76.47%; lo que indica que después de transcurrido este tiempo, el conjunto inmovilizado, no es tan efectivo con respecto a la enzima libre. Si se desea obtener el mismo porcentaje de reducción de viscosidad que en el caso de la libre; se debe utilizar un peso de conjunto inmovilizado mayor. Esta decisión se hará en términos de un análisis económico entre tiempo de residencia o peso de conjunto inmovilizado con respecto al factor económico.

Tabla 42: Datos de Estabilidad Operacional (Batch) para un Jugo de Guayaba

Tipo	**Constante de Desactivación de la enzima (min^{-1}) (k´)**	**Tiempo de Vida Media (min) ($t_{1/2}$)**	**Tiempo de Desactivación (min)**
Libre	0.0212	32.81	217.58
Inmovilizada	6.45097e-3	107.44	654.62

Aunque de la tabla anterior se puede concluir que la constante de desactivación de la enzima inmovilizada con respecto a la libre es pequeña como era de esperarse (por las razones anteriormente expuestas), este decaimiento de la enzima se ve compensado por el tiempo de desactivación total del conjunto inmovilizado que es tres veces mayor con respecto a la libre. Por lo tanto si en un proceso industrial, se desea un tiempo menor o equiparable de utilización de enzima inmovilizada en comparación con la libre; se debe recurrir a un sistema de reactores en cascada con el fin de evitar un tamaño excesivo en el dimensionamiento del tamaño del reactor.

4.10.2 Efecto de la enzima libre e inmovilizada en los azucares reductores.

Fig. 58 Aumento de azucares reductores en la guayaba (ver tabla 39)

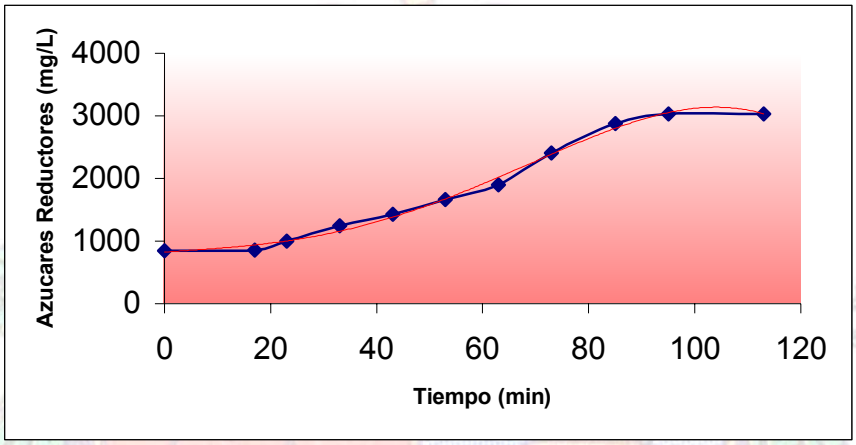
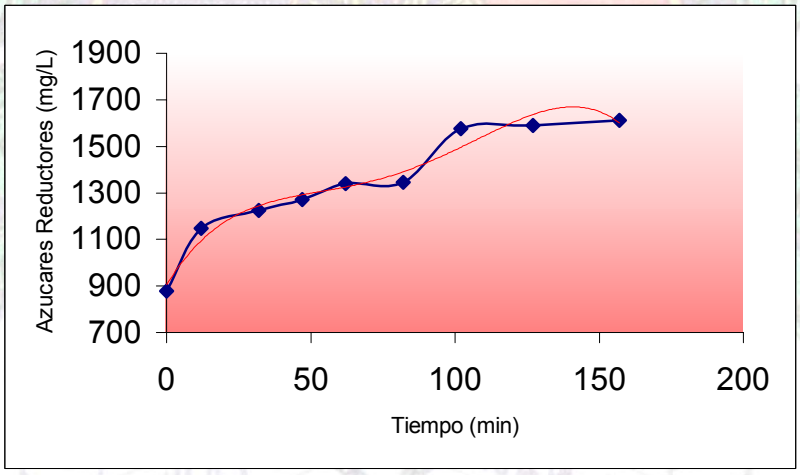


Fig. 59 Aumento de azucares reductores en la guayaba inmovilizada (ver tabla 40)



A pesar de que el protocolo de inmovilización no nos garantiza la mayor inmovilización de la Endo-celulasa presente en el cóctel enzimático, hay algún porcentaje de esta que se inmovilizo. La forma de mostrar la aseveración anterior es el efecto en el aumento de azúcares reductores a lo largo del tiempo de pérdida de viscosidad de los ensayos anteriores. Como se observa de las gráficas 58 y 59, el aumento de azucares reductores para ambos casos, muestra una tendencia

exponencial de crecimiento en la concentración de azucares reductores con un tiempo de estabilización a medida que la viscosidad se acerca a un valor estable.

4.11 VISUALIZACION DE LA INMOVILIZACION Y EL EFECTO DEL BRAZO ESPACIADOR .

4.11.1 Poro de quitina antes y después de la inmovilización

Para iguales condiciones controladas de vacío (1.2 Torr) y potencia del haz de electrones (15 Kw), se observa la cavidad del poro (5μm) con un aumento de 3826 veces. Estas mismas condiciones, se aplicaron al mismo poro pero con la enzima fijada producto del proceso de inmovilización como se puede observar en la figura 63, donde los cúmulos adheridos al poro permiten visualizar el conjunto enzima-soporte.

Fig. 60 Poro de quitosano antes de la inmovilización

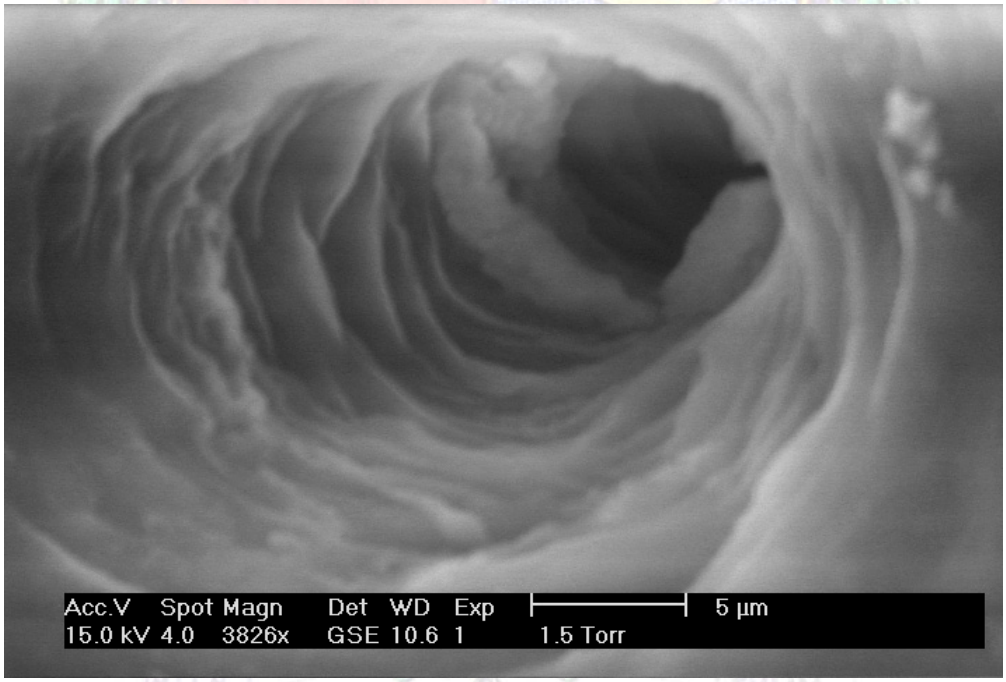
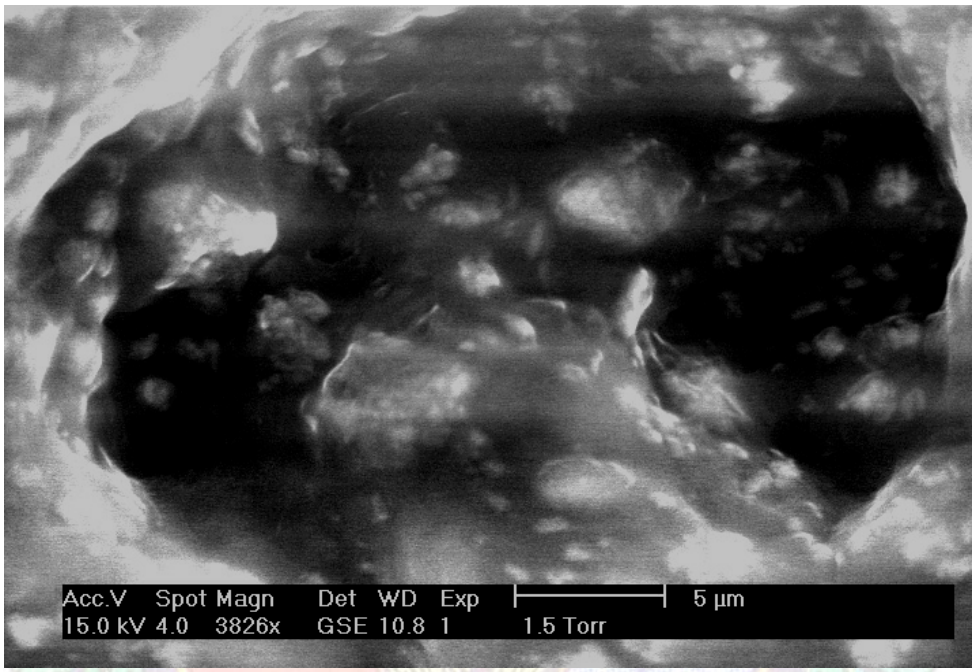


Fig. 61 Poro de quitosano después del proceso de inmovilización



4.11.2 Inmovilización con y sin brazo espaciador

Como uno de los objetivos era evaluar la conveniencia del uso de un brazo espaciador (glutaraldehido), las gráficas siguientes nos permiten visualizar bajo las mismas condiciones como los nódulos mostrados en la figura 62 son dispersos y achatados. En el caso del uso de brazo espaciador (Fig. 63), se pueden observar también nódulos en mayor densidad, con formación de racimos y mucho más redondeada; lo que nos demuestra que el uso del brazo espaciador promueve una mejor fijación.

Fig. 62 Inmovilización sin brazo espaciador

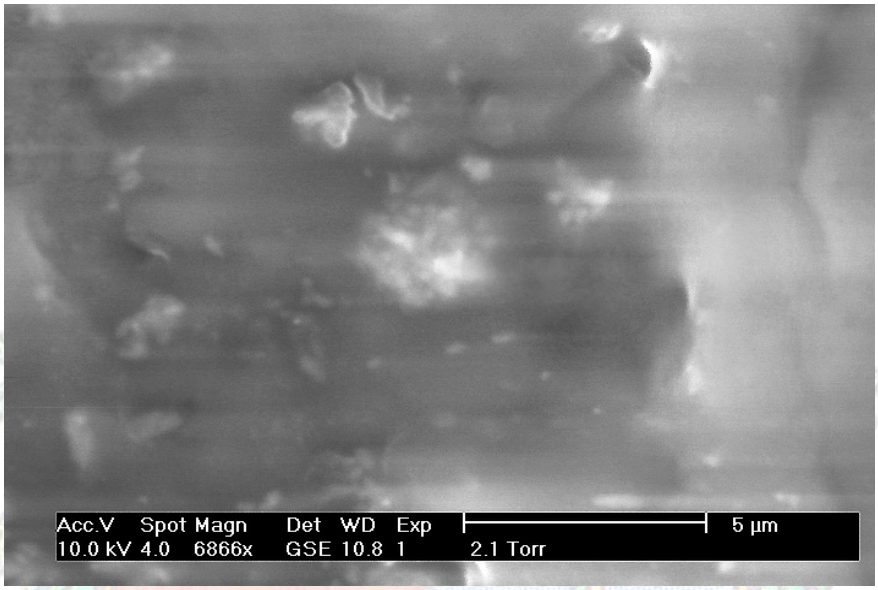
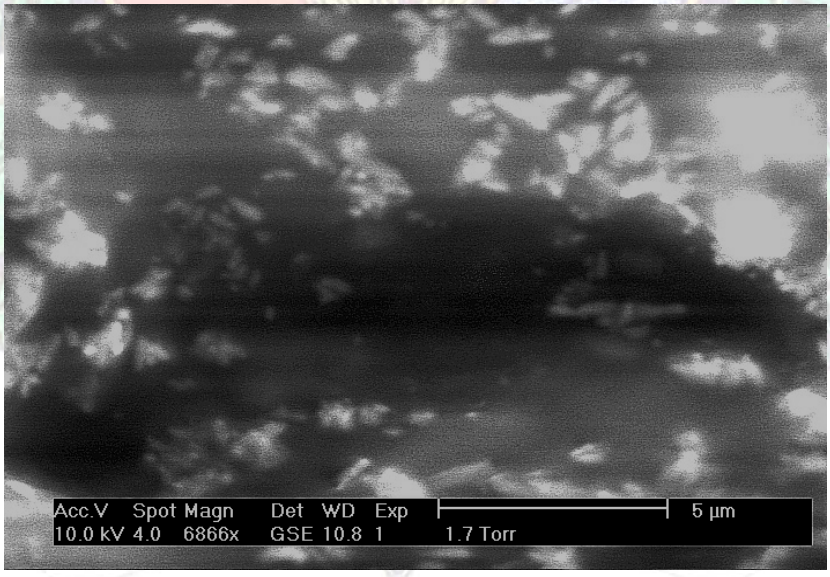


Fig. 63 Inmovilización con brazo espaciador



4.11.3 Influencia del brazo espaciador en el efecto conformacional

Los efectos conformacionales se deben a la modificación química de la proteína enzimática durante el proceso de inmovilización. Estos efectos pueden ser

especialmente dramáticos sobre la actividad cuando se toman restos de aminoácidos en la inmovilización que forman parte del sitio activo o que son importantes para el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína. Es así como cuando no se utiliza brazo espaciador, la forma globular de la enzima fijada al soporte tiende a ser achatada lo que indica que el área superficial de fijación es grande lo que conlleva a la perdida de actividad catalítica (Fig. 64), en comparación con los racimos y nódulos bien formados cuando se utiliza brazo espaciador con áreas de fijación menores (Fig. 65). Estas dos figuras, son los correspondientes aumentos de las figuras 64 y 65 (6826 aumentos contra 45542 respectivamente).

Fig. 64 Acercamiento a una estructura de proteína sin brazo espaciador

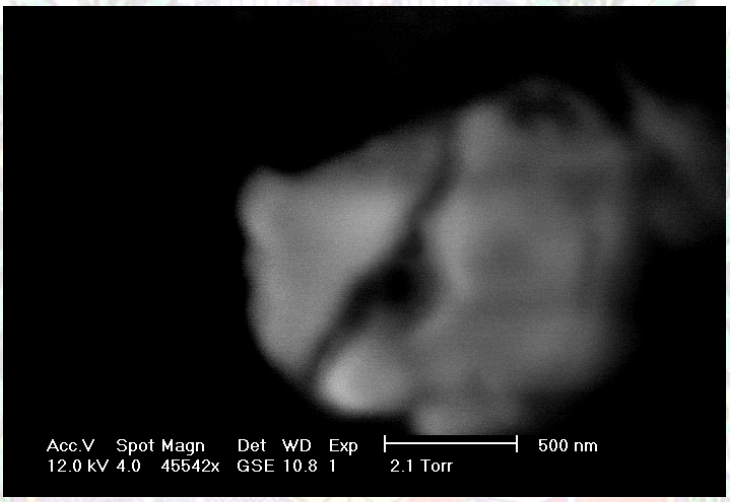
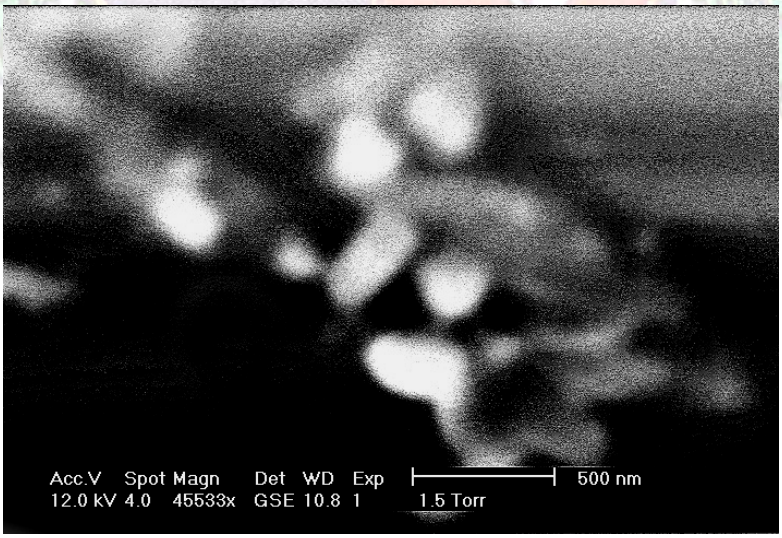


Fig. 65 Acercamiento a una estructura de proteína con brazo espaciador



4.12 COSTOS DE PREPARACIÓN DEL SOPORTE

El costo total de inmovilización de pectinasa y celulasa sobre 0.3979 gramos de quitina para obtener una reducción en viscosidad del 76.47% por un tiempo de dos horas en 100 mL de jugo de guayaba es de $800,52. Para obtener una reducción de 92.354% por medio de la enzima libre en el mismo lapso de tiempo, el costo fue de $8.05. De lo anterior se deduce que es más barato la utilización de la enzima libre en comparación de la inmovilizada, pero como la actividad catalítica de la enzima-soporte se puede reutilizar hace posible que lo costos de procesamiento se reduzcan.

Algunos autores reportan la utilización del conjunto inmovilizado bajo condiciones similares hasta 60 veces [22] y en nuestro caso la simulación del PFR se encontró que la mayor parte de la actividad catalítica, se estabilizo en alrededor de 10.2 horas con un flujo total alimentado de 830 mL de solución de pectina al 1% simulando el jugo, lo que demuestra la reutilización del conjunto enzima-soporte.

Un análisis más detallado de los costos se muestran en la tabla 43.

Tabla 43. Costo por paso en el proceso de inmovilización (costo por gramo de quitina)

Paso	Material	Costo en pesos colombianos
Costos de preparación para la quitina	Hidróxido de sodio	82.844
	Ácido clorhídrico	116.928
	Ácido acético	13.457
	Cloruro de sodio	0.3866
Activación del soporte	Ácido acético	91.71
Fijación del brazo espaciador	Glutaraldehido	63.99
Incubación	Buffer	33.29
	Enzima	1609.29
	TOTAL COSTOS	**$ 2011.90**

5. CONCLUSIONES

La quitina mostró propiedades que hacen plausible su utilización como soporte adecuado para la inmovilización de enzimas por medio de enlace covalente, previa activación por medio del ácido acético; lo que hace que estas condiciones no sean muy severas con todo el potencial para la utilización en la industria alimenticia.

Con la realización de este trabajo se comprobaron las propiedades que poseen las enzimas inmovilizadas sobre quitina (pectinasas y celulasas) y la posible utilización en el proceso de la industria de jugos para la disminución en viscosidad y licuefacción de la pared celular de la guayaba.

Se demostró la importancia de la utilización de un brazo espaciador como el glutaraldehido y sus repercusiones en el aumento significativo de la actividad catalítica del conjunto inmovilizado, lo que permite que la superficie de reacción sea extensa y a su vez disminuya los impedimentos estéricos y conformacionales lo que asegura que exista una alta probabilidad de unión de las enzimas sobre la superficie y que el sustrato pueda acceder a esta de una forma más efectiva.

El protocolo de inmovilización obtenido mediante el diseño factorial, da las mejores condiciones para la inmovilización de pectinasa sobre quitosano. Las condiciones óptimas de inmovilización para la pectinasa obtenidas por medio del plan pueden variar de acuerdo a la necesidad. Si se desea una mayor cantidad de proteína inmovilizada el protocolo permite obtener esas condiciones y si lo que se desea es una mayor efectividad catalítica del soporte también se pueden obtener por medio de las ecuaciones matemáticas encontradas. Para el presente caso las condiciones encontradas por medio del diseño 2^3 para un peso de quitina de 0.5 gramos son: concentración de ácido acético (4%), temperatura de activación del soporte (45ºC) y volumen de glutaraldehido (1.6 mL).

A través de las graficas comparativas de la enzima libre versus inmovilizada se observa que el proceso de inmovilización para la pectinasa y la celulasa proporciona una estabilidad extra a las enzimas, ya que se observa de estos gráficos una estabilización de la actividad catalítica en rangos muy amplios de pH (3 - 5) y temperatura (35 - 45 ºC) en comparación con los picos de la libre (pH 3.7 y temperatura de 37ºC). Lo anterior indica que el uso del conjunto inmovilizado sobre un jugo de guayaba debe ser más prolongado que el uso de la enzima libre.

Diversos autores han tratado de explicar el comportamiento del pH de las enzimas inmovilizadas, así, se atribuyen los cambios directamente al micro ambiente. Se encuentra que este fenómeno es el resultado de una desigual distribución de los

iones hidrógeno e hidroxilo y la carga de los sustratos. La concentración local de iones hidrógeno en las cercanías del soporte-enzima, depende de la carga del soporte, si este, esta cargado negativamente ocurrirá una acumulación de iones hidrógeno en su superficie; si su carga es positiva, se acumularan iones hidroxilo. Por ello, en la superficie del soporte donde la enzima esta localizada, el pH será mayor o menor que en el seno de la solución, creando un aparente cambio en el perfil del pH [18]. Aunque para algunos casos de inmovilización, la explicación anterior se cumple, el desplazamiento del pH una vez ocurra la inmovilización, depende principalmente de la carga del conjunto enzima soporte. Aún más, si la enzima esta ligada al soporte directamente, dicha carga afectará la carga neta del conjunto inmovilizado, haciendo que el desplazamiento del pH no sea el esperado. Como de antemano se sabe, la quitina es positiva, una vez es activada la superficie con el ácido acético, se esperaría que el desplazamiento del pH fuera hacia un pH ácido por lo anteriormente expuesto, cosa que no ocurre debido a que tal vez la carga neta del conjunto enzima soporte es negativa [2]. Como se observa en la figura 36, el lado izquierdo del incremento del pH hasta llegar al óptimo muestra una pendiente alta, lo que indica que este se alcanza iniciando con una baja actividad hasta llegar a la actividad máxima [23] (fase de activación de la enzima). Lo mismo para el lado derecho de la curva que corresponde a la desnaturalización de la enzima, en el caso de la figura 37, se observa que esta curva no es tan pronunciada, lo que produce un incremento en el rango de trabajo para el pH; ya que se observa que un rango de pH entre 4 y 5, no se difiere en más de un 10% con respecto al óptimo, debido a esto la utilización del conjunto inmovilizado a escala industrial es adecuado debido a que los cambios de pH que puedan ocurrir en el proceso, no van a afectar tanto la actividad, como si ocurriría con la libre.

La dependencia del pH se debe a los cambios en los estados de ionización de los aminoácidos del sitio activo de la enzima [12], lo que provoca el desplazamiento de la gráfica de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre. Esto permite que las enzimas inmovilizadas puedan ser utilizadas por un largo tiempo bajo condiciones más severas que en las que normalmente ellas trabajan.

En cuanto a la actividad de la pectinasa libre e inmovilizada frente a la temperatura la estabilización que se observa en el caso de la inmovilizada se debe a que el proceso de inmovilización ha tenido un efecto de estabilidad adicional a la enzima. La proteína se ha estabilizado de tal manera que se debe de tener una temperatura superior en el caso de la inmovilizada frente a la libre para que el sustrato posea una mayor movilidad y pueda así acceder al sitio activo. La inmovilización permite a su vez obtener un rango de trabajo mucho más amplio (35 – 45 ºC) con un promedio de actividad del 85%; en comparación con un óptimo puntual para 37 ºC en la libre. Este beneficio implica una ganancia en la posible operación de un reactor a nivel industrial donde se tiene variaciones de temperatura permanentes.

Las enzimas pectinasa y celulasa inmovilizadas cumplen al igual que las enzimas libres con una cinética michaeliana, lo cual demuestra que la afinidad que poseen dichas enzimas por el sustrato no se pierde totalmente en el proceso de inmovilización. La pérdida de actividad enzimática después de una inmovilización depende del método utilizado, en este caso comparando las actividades máximas de la enzima libre y de la inmovilizada; se puede deducir que 14.4168 mg de proteína inmovilizada equivalen o actúan con la misma eficiencia que 1 mg de enzima libre. El resultado anterior puede mostrar que la pectinasa inmovilizada sobre quitina, no posee una actividad catalítica alta, sin embargo esta se ve compensada en el sentido que la enzima inmovilizada, se puede reutilizar lo que no ocurre con la libre.

En el caso de la estabilidad operacional Vaillant [22] reporta una vida media para el conjunto quitina-pectinasa de 407 horas, bajo condiciones operacionales muy similares al del presente trabajo pero con una diferencia muy significativa, el tamaño de partícula; que para el caso de Vaillant lo sitúa en un rango de 10-50 μm, mientras que en el presente trabajo el tamaño de partícula promedio oscila entre 50 y 100 mm. Esta diferencia en el tamaño de partícula incide directamente en las restricciones difusionales, que aparecen cuando el sustrato debe difundir hacia la enzima inmovilizada. Estos dos efectos son llamados efecto difusional externo e interno, los cuales se pueden disminuir pero no evitar; el primero se hace pequeño, aumentando la velocidad de flujo en un reactor tubular; mientras que la limitación difusional interna surge a raíz del tamaño pequeño y tortuoso de los poros del soporte, que impide que el flujo de fluido pase al interior de los poros o gránulos, lo que da lugar a una disminución localizada del coeficiente de difusión. Para disminuir estas restricciones difusionales internas en la mayoría de los casos, se utiliza un sustrato de bajo peso molecular, una concentración de biocatalizador baja o como en el caso más general; partículas de soporte muy pequeñas y muy porosas en la que los poros sean grandes, no tortuosos e interconectados lo más posible [18]. La baja estabilidad operacional (tiempo), encontrada en este trabajo se atribuye a las restricciones difusionales internas explicadas anteriormente; sin embargo la tendencia de los gráficos de estabilidad operacional se asemejan en su comportamiento con los reportados en la literatura.

Debido a la disponibilidad actual de equipos como el ESEM, se pudo realizar el seguimiento de un parámetro tan importante como la utilización del brazo espaciador en el proceso general de inmovilización y la importancia que este tiene en el efecto conformacional de las enzimas y la comprobación practica en el laboratorio de la disminución de actividad catalítica.

6. RECOMENDACIONES

A partir de un analisis comparativo de los resultados encontrados en este trabajo y los hallados en la literatura, el comportamiento general de las curvas principalmente para la estabilidad operacional es el mismo diferenciándose en los valores cuantitativos, por lo que se sugiere disminuir el tamaño de partícula ya que este factor incide directamente sobre el proceso de inmovilización haciendo que la actividad catalítica permanezca durante un tiempo mayor. Se decidió trabajar con un tamaño de partícula mayor, ya que no cuenta actualmente con el montaje que haga posible el manejo de las caídas de presión en el caso de la simulación del reactor PFR, al utilizar un tamaño de partícula en alrededor de 10 y 50 μm como lo sugiere la literatura.

Con la metodología mostrada en este trabajo, en especial la utilización del plan de experiencia factorial para encontrar las mejores condiciones de inmovilización y con la posible disminución del tamaño de partícula al rango recomendado, se sugiere la búsqueda de parámetros cinéticos que permitan con todo lo anterior realizar un modelamiento matemático del mismo, además de la posible configuración de uno o dos reactores en serie, paralelo o combinados; que permitan optimizar la actividad catalítica del conjunto inmovilizado en una posible aplicación de un reactor para la industria de jugos.

BIBLIOGRAFIA

1. Ashurst,P:R; “Producción y Envasado de Zumos y Bebidas de Frutas sin Gas”. Ed Acribia S.A 1995.

2. Benavides Mariano, Quitina-Quitosano “Los Polimeros del Futuro” SENA Bogota, Marzo de 2002.

3. Bickerstaff, Gordon. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa NJ 1997.

4. Bobbie, L. Bioquímica. Ed Reverte 1997

5. Campbell,J. “Biochemica et Biophysica Acta”, 975, 384,307

6. Carrara, C. Inmmobilization of Galactosidase on Chitosan. Biotechnol. Prog. 1994, 10, 220-224

7. Dornier J e-mail : dornier@cirad.fr Cirad (Centre Internacional de Recherche Agronomique pour le Développement) 34032 Montpellier France Cedex 01

8. Frettinger, A; Caracterización Enzimática de la Pared Vegetal de Frutas Tropicales. Luminum ediciones 1997.

9. Gacesa,P “Tecnología de las Enzimas”. Ed Acribia S.A 1990

10. Instituto colombiano de normas técnicas. Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos segunda actualización. Santa fe de Bogota NTC 404.

11. Kennedy,J,F. Melo, E,H,M. Immobilized enzymes and Cells. Chemical Enginnering Progress. Julio 1990

12. Lehninger, A. “Bioquímica”, Ed Omega, 2 ed, España, 1987, 273-4

13. López Olga Beatriz. “Utilización de Enzimas en el Procesamiento de Frutas”. Revista NOOS. Universidad Nacional de Colombia. Junio de 2000.

14. López Olga Beatriz, Giraldo Gloria Inés. Extracción de Pectinas de Guayaba, Tomate de Árbol y Maracuyá. Universidad Nacional de Colombia 1994.

15. Lozano,P; Advances in food technology, 1987,3,2169

16. Miller GL. Used of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959; 31-426-8

17. Montgomery, D. Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial iberoamericana 1991.

18. Peter S.J. Chetam. Principios de Biotecnología Cap 7. Ed Acribia 1994.

19. Salvat Editores "Enciclopedia Salvat diccionario" Barcelona: Salvat Ed, 1971, 729,20808

20. Skoog A. Analisis instrumental. Ed Mc Graw Hill 1996

21. Strayer,L. "Bioquímica", Barcelona: Reverte, 1995, 473-4

22. Vaillant,F "Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin an nylon supports", Elsevier Process Biochemistry (2000) 989-996

23. Whitaker, J "Microbial Pectinolytic Enzymes", Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier Applied Science, London, 1990, 113-169

24. Worthigton Von, Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corporation, Lakewood NJ USA.

ANEXO 1

MÉTODO DE BIURET

Los compuestos que tienen dos o más enlaces peptídicos, dan un color rosado o lila característico, cuando se tratan con sulfato de cobre en solución alcalina. El color es debido al complejo de coordinación del ión cúprico con cuatro átomos de hidrógeno, provenientes de los enlaces peptídicos, dos de cada péptido. Los espectros de absorción de los complejos de cobre formados por diferentes proteínas son similares y por consiguiente es posible utilizar una proteína cualquiera como patrón de coloración.

La técnica de análisis cuantitativo basada en la espectroscopia y absorción se conoce como Espectrofotometría y se basa en la ley de Lambert-Beer la cual establece que la energía absorbida por una sustancia (absorbancia) a cualquier longitud de onda, depende de la concentración de material absorbente y del espesor de la disolución atravesada por la luz o paso óptico[1].

Preparación de la solución de Biuret[1]

Se disuelven 1,5 g de $CuSO_4$, 0,5 g de H_2O y 6,0 g de $NaKC_4H_4O_6$ en 500 mL de agua destilada. Luego se adiciona 300 mL al 10% de NaOH con agitación constante. Diluya 1 a 1 con agua destilada y deje en reposo en una botella de polietileno.[25]

Procedimiento para curva de calibración:

Para la determinación de las proteínas del líquido, se realiza una curva de calibración utilizando soluciones de albúmina de diferente concentración obtenidas de una solución patrón de albúmina de 6,00 mg/mL.

Tabla 10: Diseño para la curva de calibración.

Muestra/Tubo	Blanco	1	2	3	4	5
Patrón de Albúmina		0,20	0,4	0,6	0,8	1,00
Agua destilada	2,00	1,80	1,6	1,4	1,2	1,00
Biuret	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Se rotulan 6 tubos de ensayo y se dejan en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente o por 10 minutos a 30°C para el desarrollo del color, del complejo cuproprotéico.

Leer en cada tubo el porcentaje de transmitancia a 540 nm, usando el blanco para ajustar el 100% de la transmitancia. El porcentaje de transmitancia debe leerse con una cifra decimal.

Ya hecha la curva de calibración se puede correr la muestra problema y de esta forma determinar la concentración de proteína presente en la muestra.

$$\text{Absorbancia} = A = \text{Log}\ (I_0/I) \qquad (1)$$
(medida de la energía absorbida)

$$A = abC \text{ Ley de Lambert-Beer} \qquad (2)$$

Donde A = Coeficiente de extinción

En un experimento dado a y b son constantes de tal manera que

$$A = KC \qquad (3)$$

El valor de K puede determinarse con patrones de concentración conocida midiendo la absorbancia correspondiente a diferentes concentraciones y construir una grafica que generalmente es una recta de pendiente K. Para medir la concentración de la solución desconocida, basta con medir la absorbancia y/o calcular C interpolando en la recta (C = A/K)

[1] The Food Chemistry Laboratory, CRC Press 1992 Pág. 58

ANEXO 2

MÉTODO DEL DNS PARA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

El ácido dinitrosalicílico, es un reactivo desarrollado por Sumner y se utiliza para la determinación de azucares reductores, esta compuesto de ácido dinitrosalicílico, tartrato de sodio y potasio, fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio.

El tartrato de sodio y potasio es introducida para prevenir que el reactivo disuelva oxígeno, el fenol incrementa el color producido; el bisulfito estabiliza el coor obtenido en presencia del fenol. La alcalinidad es requerida para producir la reducción de la glucosa y de esta forma tener un mayor efecto del ácido dinitrosalicílico.

La química en la prueba del DNS, es la reducción que sufre este por la glucosa; el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido al compuesto 3-amino-5-nitrosalicílico a causa del grupo aldehído que se oxida a su vez a grupo carboxilo.

Preparación del reactivo:

- Solución A: Hidróxido de sodio 13,5 g en 300 mL de agua destilada
- Solución B: Se disuelven 8,8 g de DNS, con 32,5 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 800 mL de agua destilada.
- Solución C: Mezcla de las soluciones A y B
- Solución D: Se pesa 2.2 g de NaOH, con 10m g de fenol en cristales en 100 mL de agua destilada.
- Solución de bisulfito de sodio: Se disuelve 5 g de $NaHSO_3$ en 25 mL de agua destilada.
- El reactivo DNS es preparado adicionando a la solución C 69 mL de la solución D y 23.2 mL de solución de bisulfito de sodio

Preparación de la curva[2] :

Se prepara una curva patrón de glucosa entre 0 y 250 mg/mL. Por ejemplo para el primer patrón se toman 0.5 mL de la solución de glucosa y se adiciona 1.5 mL de reactivo DNS y se lleva a un baño en ebullición por 5 minutos para que genere la reacción de color, inmediatamente después la muestra se lleva a un baño de agua hielo por otros 5 minutos. Después se adicionan 9.5 mL de agua deionizada y 0.5 mL; se espera30 minutos con el fin de que haya estabilización de la reacción.

Una vez transcurrido este tiempo, se lleva a la lectura del espectrofotómetro a 540 nm.

[2] Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Gail Miller Analitical Chemistry Vol 31 No 3 Marzo de 1959.

ANEXO 3

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA (PECTINASA Y CELULASA)

Actividad de pectinasa

La pectinliasa corta la pectina por β-eliminación. La reacción produce azucares que presentan un enlace doble C_3-C_5, los cuales presentan un máximo de absorción entre 232 y 235 nm, debido al doble enlace. El valor del coeficiente de extinción molar del compuesto insaturado (5500 $M^{-1}cm^{-1}$), que varia con el pH y el grado de metilación de la pectina. En condiciones estándares, la medida de la actividad pectinasa se hace a pH 4 y una temperatura de 40°C, sobre una solución de pectina altamente metilada.

Preparación del buffer Acetato pH 4.0, 0.1 M

41 mL de solución de ácido acético 0.2 M y 9 mL de acetato de sodio 0.2M, se introducen en un balón volumétrico de 100 mL y se afora con agua destilada.

Preparación del sustrato

Se introducen en un balón volumétrico de 200 mL, un gramo de pectina comercial y 1.16 gramos de cloruro de sodio en 150 mL de buffer acetato pH 4.0, 0.1M y se afora hasta 200 mL. Esto se hace para tener una referencia conocida en cuanto a cantidad de pectina para poder estandarizar el método

En cuanto al jugo de guayaba se acondicionará en cuanto a características físicas y se ejecutara el mismo procedimiento anterior para observar el efecto de las pectinasas inmovilizadas y libres en el jugo.

Determinación de la actividad pectinasa libre

Dentro de un tubo de ensayo de 10 mL de capacidad, adicionar 2 mL de substrato (0.5% w/ Volumen de pectina) y 2 mL de buffer acetato pH 4.0, 0.1 M e incubara 40°C en baño termostático durante 10 minutos. Al tiempo cero añadir 1 mL de solución de la preparación enzimática en buffer, agitar inmediatamente y leer a 235 nm en el espectrofotómetro (Ao). Devolver la solución de nuevo al baño termostático y 15 minutos después añadir la preparación enzimática, leer en el espectrofotómetro 235 nm (Am) [24]

La actividad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Pectinasa} = (Am - Ao)*0.0606/\text{mg Prot} \quad (UI/mg)$$

Determinación de la actividad de la pectinasa inmovilizada

En un Beaker de 50 mL agregar 10 mL de substrato y 15mL de buffer acetato pH 4.0, 0.1 M e incubar a 40°C en baño termostático durante 10 minutos (en agitación). Leer a 235 nm (Ao). Al tiempo cero añadir el conjunto inmovilizado y 15 minutos después leer en el espectrofotómetro, después de filtrar (Am), el sólido se seca y pesa (w) [24].

La actividad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad PL} = (Am-Ao)*0.303/w \quad (UI/g)$$

Actividad de la celulasa

La enzima es incubada en presencia de una solución de Carboximetil celulosa (CMC). El resultado de la hidrólisis se evalúa por la cantidad de azucares reductores formados en el curso de la reacción con la ayuda del reactivo Ácido Dinitro Salicílico (DNS) [24].

El sustrato es una solución de CMC 22.5 mg/mL en buffer acetato pH 4.0

Determinación de la actividad celulasa libre

En un tubo de ensayo de capacidad 15 mL, se adiciona 0.5 mL de sustrato CMC que se incuba en baño termostático a 39°C durante 10 min. Adicionar al tubo 0.5 mL de la preparación enzimática e incubar por una hora. Adicionar 0.5 mL de NaOH 1M para detener la reacción. Adicionar al tubo 1.5 mL de DNS y llevar a un baño en ebullición durante 5 min. Enfriar el tubo en un baño de agua–hielo y adicionar 9.5 mL de agua destilada y leer en el espectrofotómetro a 540 nm en celdas de vidrio (Am) frente a un blanco preparado a condiciones similares (Ao).

La actividad celulasa de la enzima se realiza por extrapolación de una curva patrón de azucares reductores preparada a partir de glucosa entre 0 y 250 mg/mL

$$\text{Actividad CX libre} = (Am-Ao)*0.07535/\text{mg de proteína}$$

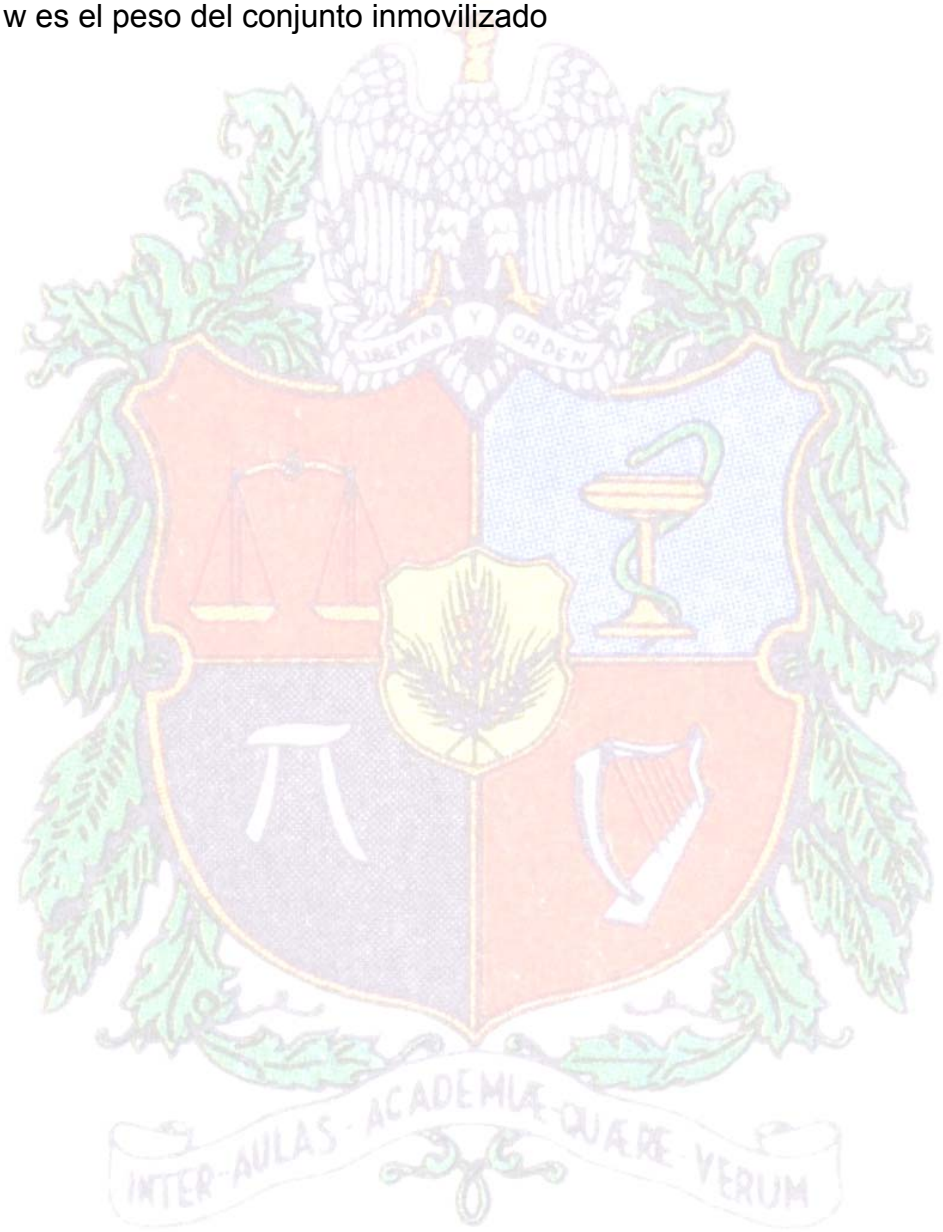
Determinación de la actividad celulasa inmovilizada

En un tubo de ensayo de capacidad 15 mL, se adiciona 0.5 mL de sustrato CMC y 4.5 mL de buffer acetato pH 4.0. Se incuba en baño termostático a 39°C durante 10 minutos. Se adiciona al tubo 0.05 g del conjunto enzima soporte y se incuba por una hora. Adicionar 0.5 mL de NaOH 1M para detener la reacción. Adicionar al tubo 1.5 mL de DNS y llevar a un baño en ebullición durante 5 minutos. Enfriar el

tubo en un baño de agua hielo y adicionar 9.5 mL de agua destilada y leer en el espectrofotómetro a 540 nm (Am) frente a un blanco preparado a condiciones similares (Ao) [24].

$$\text{Actividad CX inmovilizada} = (Am-Ao)*0.37675/w$$

Donde w es el peso del conjunto inmovilizado



ANEXO 4
TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 22: Datos para generar la curva de Pectinasa libre Vs pH

pH	Absorbancia Final	Absorbancia Inicial	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
2.6	3.5656	3.1002	0.02820324	51.26
3.0	3.7793	3.1504	0.03811134	69.27
3.2	3.7994	3.1632	0.03855372	70.08
3.5	3.8717	3.1468	0.04392894	79.85
3.7	3.9966	3.0888	0.05501268	100.00
4.0	3.8661	3.1277	0.04474707	81.33
4.5	3.7936	3.0681	0.0439653	79.91
5.0	3.6961	3.1389	0.03928092	71.40
5.5	3.7845	3.1485	0.03854	70.05
6.0	3.7871	3.0851	0.0370266	67.30
7.0	3.6823	3.1819	0.030324	55.12

Tabla 23: Datos para generar la curva de la pectinasa inmovilizada vs pH

pH	ΔAbsorbancia	Gramos de Quitina	Actividad (U / g de quitina)	Porcentaje de Actividad
3.0	0.4532	0.1333	1.0301545	62.55
3.7	0.4700	0.1005	1.4170149	86.05
4.0	0.5330	0.1102	1.4655081	88.99
4.2	0.4826	0.0997	1.466678	89.06
4.5	0.4211	0.0852	1.4975739	90.94
5.0	0.3663	0.0664	1.6467195	100
5.5	0.2515	0.0712	1.0702879	64.99
6.0	0.2649	0.0788	1.0185875	61.85
6.5	0.4017	0.1203	1.011763	61.44
7.0	0.2605	0.1407	0.5609914	34.06

Tabla 24 Datos para generar la curva Pectinasa libre Vs Temperatura

T ºC	Absorbancia Final	Absorbancia Inicial	Actividad (UI/mg)	% Actividad
20	3.4561	3.2297	0.01371984	14.00
25	3.5521	3.0847	0.02832444	29.20
30	3.8323	3.0764	0.04580754	47.22
35	3.9413	3.0397	0.05463696	56.33
37	4.7221	3.1215	0.0969936	100.0
40	3.6476	2.9414	0.04279572	44.20
45	3.6658	3.0069	0.03992934	41.16
50	3.7751	3.1425	0.03833556	39.52
55	4.0055	3.7876	0.01320474	13.61

Tabla 25. Datos para generar la curva de la pectinasa inmovilizada frente a la temperatura

Temperatura (ºC)	∆ absorbancia	Peso de Quitina (g)	Actividad (UI/mg)	% Actividad
20	0.1064	0.1456	0.000221423	60.54
25	0.1440	0.1703	0.0002562066	70.06
30	0.107	0.1317	0.000246173	67.31
35	0.910	0.0832	0.0003314062	90.62
40	0.1330	0.1102	0.0003656896	100
45	0.1544	0.1455	0.000321534	87.92
50	0.0661	0.0669	0.0002898451	79.25
55	0.0228	0.0346	0.0001996647	54.59
60	0.0349	0.0943	0.0001121389	30.66
65	0.0742	0.1778	0.000127164	34.77
70	0.0028	0.0594	0.0000142828	3.90

Tabla 26: Datos para generar la curva de pectinasa libre Vs Concentración de Sustrato

Concentración (w/v)	∆ absorbancia	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
0.05	1.1065	0.0670539	59.04
0.1	1.2681	0.07684686	67.67
0.2	1.3305	0.0806283	71.00
0.3	1.5847	0.09603282	84.56
0.4	1.6740	0.1014444	89.33
0.5	1.7316	0.10493496	92.40
0.6	1.8739	0.11355834	100.00

Tabla 27. Datos para generar la curva Pectinasa Inmovilizada frente a la concentración de sustrato

Pectina % (w/v)	∆Absorbancia	Gramos de Quitina	Actividad (UI / g)	% de Actividad
0.1	0.4686	0.1105	1.2849393	16.35
0.2	0.6919	0.0921	2.2762833	28.97
0.3	0.8712	0.1101	2.3975830	30.52
0.4	1.3727	0.1280	3.2494382	41.36
0.5	1.5963	0.1411	3.4279156	43.63
0.6	1.5326	0.1282	3.6222917	46.11
0.7	1.7678	0.0784	6.8321862	86.97
0.8	2.7740	0.1070	7.8553457	100

Tabla 28 Doble recíprocos para generar la grafica de lineweaber **(pectinasa libre)**

Inverso de la Concentración	Inverso de la Actividad (mg/UI)
20	14.9133
10	13.0128
5	12.4025
3.3333	10.4131
2.5	9.8576
2	9.5297
1.6666	8.8060

Tabla 29. Dobles recíprocos para generar lineweaber de la pectinasa inmovilizada

Inverso de la Concentración	Inverso de la Actividad
10	778.246
5	439.312
3.3333	417.087
2.5	307.745
2	291.7224
1.6666	276.068
1.4285	146.366
1.25	127.301

Tabla 30. Datos obtenidos para generar la curva celulasa libre frente al pH

pH	A_m-A_0	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
2.6	0.5094	0.03838329	61.19
3.0	0.7200	0.05425200	86.49
3.2	0.7747	0.0583736	93.07
3.5	0.8119	0.0611766	97.53
3.7	0.8048	0.0606416	96.68
4.0	0.7959	0.0599710	95.61
4.5	0.8324	0.0627200	100
5.0	0.7776	0.0584716	93.22
5.2	0.6723	0.0506578	80.76
5.5	0.6403	0.0482466	76.92
6.0	0.6303	0.0474931	75.72
6.5	0.5717	0.0430775	68.68
7.0	0.5091	0.0383606	61.16

Tabla 31. Datos para generar la curva de Celulasa inmovilizada frente al pH

pH	Δ Absorbancia	Quitina (g)	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
3.0	0.0096	0.0948	0.0000381518	79.90
3.7	0.0056	0.0516	0.0000408875	85.63
4.0	0.0102	0.0806	0.0000476774	99.85
4.2	0.0073	0.0576	0.0000477465	100
4.5	0.0070	0.0553	0.0000476889	99.87
5.0	0.0084	0.0727	0.0000435309	91.17
5.5	0.0097	0.1127	0.0000325249	68.11
6.5	0.0063	0.0753	0.0000315205	66.01
7.0	0.0097	0.1201	0.0000307249	64.45

Tabla 32. Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa Libre frente a la concentración de Sustrato

Concentración de Sustrato (mg/mL)	A_m-A_0	Actividad (UI/mg de proteína)	% de Actividad
0.1	0.6145	0.04645328	79.68
0.2	0.6476	0.04879666	83.70
0.3	0.65055	0.04901189	84.07
0.4	0.66895	0.05040538	86.46
0.5	0.6882	0.05185587	88.94
0.6	0.7187	0.05410884	92.81
0.7	0.7265	0.05474178	93.89
0.8	0.7442	0.05607547	96.18
0.9	0.7557	0.05694200	97.67
1.0	0.7737	0.05829820	100

Tabla 33. Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa Inmovilizada frente a la concentración de Sustrato

Concentración de Sustrato (mg/mL)	Δ Absorbancia	Quitina (g)	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
0.01	0.0267	0.1487	0.0000676476	15.44
0.02	0.0130	0.0646	0.0000758157	17.30
0.03	0.1419	0.1791	0.0002984969	68.14
0.04	0.0783	0.0916	0.0003220469	73.52
0.05	0.4360	0.0365	0.0004380346	100

Tabla 34. Datos lineweaber para celulasa libre

Inverso de la Concentración	Inverso de la Actividad
10	21.52
5	20.49
3.33	20.40
2.5	19.83
2	19.28
1.66	18.48
1.42	18.26
1.25	17.83
1.11	17.56
1	17.15

Tabla 35. Datos lineweaber para celulasa inmovilizada

Inverso de la Concentración	Inverso de la Actividad
100	14782.49
50	13189.88
33.33	3350.11
25	3105.13
20	2282.92

Tabla 36. Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa libre frente a la Temperatura

T ºC	A_m-A_0	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
20	0.4031	0.03037359	80.42
30	0.4833	0.03641666	96.42
35	0.5012	0.03776542	100
37	0.4493	0.03385476	89.64
40	0.4277	0.0322272	85.33
45	0.4244	0.03197854	84.67
55	0.3943	0.02971051	78.67

Tabla 37. Datos obtenidos para generar la curva Actividad Celulasa Inmovilizada frente a la Temperatura.

Temperatura (ºC)	Δ Absorbancia	Quitina (g)	Actividad (UI/mg)	% de Actividad
20	0.0029	0.0618	0.000017679	37.87
25	0.0046	0.0712	0.0000243398	52.14
30	0.0128	0.1107	0.0000435627	93.32
35	0.0111	0.0948	0.0000441128	94.49
40	0.0099	0.0799	0.0000466808	100
45	0.0066	0.0606	0.0000410313	87.89
50	0.0113	0.1131	0.000037641	80.63
55	0.0033	0.0594	0.0000209292	44.83
60	0.0007	0.0468	0.0000056346	12.07
65	0.0002	0.576	0.0000013072	2.80

Tabla 38. Estabilidad Operacional

Tiempo (min)	Actividad (U/g)	% de Actividad	Ln (% de Actividad)
0	0.136687	100	4.6051
7	0.110645	80.94	4.3937
13	0.060721	44.42	3.7937
16	0.068243	49.92	3.9004
20	0.049871	36.48	3.5967
41	0.0437791	32.02	3.4663
48	0.036690	26.89	3.2898
58	0.034455	25.20	3.2268
63	0.04225	30.91	3.4310
67	0.0365426	26.73	3.2857
72	0.032728	23.94	3.1755
81	0.0348792	25.51	3.2391
90	0.0373796	27.34	3.3084
98	0.0362354	26.5	3.2771
105	0.0384709	28.12	3.3364
113	0.0371253	27.16	3.3017
118	0.0353877	25.88	3.2534
126	0.0334806	24.49	3.1983
134	0.0354725	25.95	3.2562
142	0.0321880	23.54	3.1587
150	0.0430268	31.47	3.4490
159	0.0368499	26.95	3.2939
168	0.0358115	26.19	3.2653
171	0.0357480	26.15	3.2638
178	0.0315629	23.09	3.1394
185	0.03080	22.53	3.1148

191	0.0312768	22.88	3.1303
199	0.0314669	23.01	3.1359
207	0.0354195	25.91	3.2546
214	0.0295074	21.58	3.0717
223	0.03187	23.31	3.1488
232	0.0316582	23.16	3.1425
240	0.0352394	25.78	3.2495
247	0.0326436	23.88	3.1730
256	0.0345189	25.25	3.2288
266	0.0314887	23.02	3.1367
273	0.0306729	22.44	3.1108
280	0.0296240	21.67	3.0759
284	0.0260216	19.03	2.9460
291	0.027028	1977	2.9841
Tiempo (min)	Actividad (U/g)	% de Actividad	Ln (% de Actividad)
299	0.0227477	16.64	2.8118
305	0.0246019	17.99	2.9952
311	0.0342541	25.06	3.2212
320	0.0270811	19.81	2.9861
324	0.0252588	18.47	2.9161
329	0.0256720	18.78	2.9327
336	0.0246125	18	2.8903
343	0.0372525	27.25	3.3051
349	0.0276851	20.25	3.0081
356	0.02651	19.4	2.9652
362	0.0231715	16.95	2.8303
368	0.0230868	17.05	2.8362
372	0.0227265	16.02	2.8106
377	0.0326648	23.89	3.1734
383	0.0267951	19.6	2.9755
398	0.0231609	16.94	2.8296
404	0.0192489	16.93	2.8290
408	0.019142	16.93	2.8290
414	0.0192725	15	2.7081
424	0.018128	14.09	2.6454
436	0.01813	13.26	2.5847
445	0.0182	13.27	2.5855
449	0.017471	13.31	2.5885
453	0.017206	12.78	2.5478
459	0.017376	12.58	2.5321
466	0.026445	12.71	2.5423
473	0.01882	19.34	2.9621
480	0.0253224	13.77	2.6225
487	0.0160516	18.50	2.9188
495	0.0247608	11.74	2.4630
501	0.028935	18.11	2.8964
506	0.027695	21.16	3.0521

512	0.02648	20.26	3.0086
518	0.027997	19.37	2.9637
524	0.0260852	20.48	3.0194
530	0.02660	19.08	2.9486
536	0.02733	19.46	2.9683
542	0.02396	19.99	2.9952
547	0.01765	17.53	2.8639
553	0.01505	11.01	2.3988
559	0.01479	13.82	2.3814
Tiempo (min)	Actividad (U/g)	% de Actividad	Ln (% de Actividad)
565	0.01738	12.71	2.5424
571	0.02476	18.04	2.8926
579	0.01496	10.94	2.3924
588	0.0238476	17.44	2.8587
596	0.01811	13.25	2.5839
605	0.0167615	12.33	2.5120
612	0.0096	12.26	2.5063
622	0.0010054	7.08	1.9572
631	0.009652	7.35	1.9947
641	0.009323	7.06	1.9544
652	0.009175	6.82	1.9198
662	0.008317	6.71	1.9035
670	0.008052	6.08	1.8050
674	0.007967	5.82	1.7613
679	0.006633	4.86	1.5810
685	0.006452	4.72	1.5518
693	0.008062	5.69	1.7733
698	0.006961	5.09	1.6272
703	0.005415	5.09	1.6272
709	0.0004661	0.34	1.6171
715	0.0001440	0.1	
721	0.0001218	0.087	
724	0.0003496	0.2557	
771	0.00347	0.2557	

Tabla 39. Datos para la reducción de viscosidad jugo guayaba (enzima libre)

Tiempo (min)	Viscosidad (cP)	% Reducción de Viscosidad	Azucares Reductores (mg/L)
0	2610	100	846.56
17	1840	70.49	856.39
23	1380	52.87	997.99
33	1160	44.44	1248.4
43	1130	43.30	1431.4
53	900	34.48	1662
63	840	32.18	1901
73	760	29.11	2407
85	380	14.55	2874.4
95	310	11.87	3025.7
113	210	8.00	3026.9
123	200	7.66	3027.2

Tabla 40. Datos para la reducción de viscosidad jugo guayaba (enzima inmovilizada)

Tiempo (min)	Viscosidad (cP)	% Reducción de viscosidad	Azucares Reductores (mg/L)
0	2820	100	878.22
12	2640	93.61	1148.9
32	1240	43.97	1225.6
47	1230	43.61	1272.3
62	1200	42.55	1340.3
82	1010	35.81	1345.2
102	980	34.75	1576.9
127	720	25.53	1589.6
157	690	24.46	1610.3
187	600	21.27	1611.7
217	550	19.50	1611.9
247	400	14.18	1612.0
277	390	13.82	1612.0

INTER-AULAS · ACADEMIA · QUAERE · VERUM

Naturalzyme 200 XL

Pectinasa para el procesamiento de fruta

Proenzimas
Cll 56 N 5N-65
Bodega 4 La Flora Industrial
Cali-Colombia

Naturalzyme 200 XL es un cóctel enzimático grado alimenticio proveniente de una cepa seleccionada de Aspergillius Níger.

Naturalzyme 200 XL depolimeriza y baja la viscosidad de la pulpa tratada.

- Actividad: 200.000 AJDU
- Contenido: Pectinasa
- Kosher: Producto certificado
- Proteína: 32.04 mg/mL

Un AJDU (Apple Juice Depectinit Unit) es una unidad degradadora de pectina estandarizada sobre un sustrato definido (Jugo de manzana).

Dosis: 10-40 mL de cóctel por tonelada de fruta

Inactivación: Naturalzyme 200 XL se inactiva fácilmente a pH 7.0 o condiciones de temperatura de 70°C por 10 minutos.