

14-A  
2eje



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores  
"Cuautitlán"

"ELECCION DE UN REACTOR A NIVEL LABORATORIO PARA  
LA INMOVILIZACION DE LA ENZIMA INVERTASA, DONDE  
SE LLEVE A CABO UN PROCESO DE HIDROLISIS CONTINUA  
DE SACAROSA EN FRUCTUOSA Y GLUCOSA."

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JOAQUIN MARTINEZ RODRIGUEZ

ASESOR: I.B.Q. J. FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLANIZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAINE KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FEG-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Elección de un reactor a nivel laboratorio para la inmovili-  
zación de la enzima invertasa, donde se lleve a cabo un proce-  
so de hidrólisis continua de sacarosa en fructuosa y glucosa.

que presenta el pasante: Joaquín Martínez Rodríguez.

con número de cuentas: 8640587-0 para obtener el TITULO de:  
Ingeniero en Alimentos.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Diciembre de 1993.

PRESIDENTE I.B.Q.J. Francisco Montiel Sosa

VOCAL O.F.B. Susana Patricia Miranda Castro.

SECRETARIO M. en C. Luis Cedeño Caero.

PRIMER SUPLENTE Dr. José Luis Arjona Román.

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Ricardo P. Hernández García.

## **Dedicatorias.**

**A mis padres:**

**Con todo mi amor y agradecimiento,  
ya que gracias a Ustedes  
he llegado hasta este lugar**

**A mis hermanos (Vero, Marco A., Paulo, Laura P.):**

**Por estar conmigo aún en la distancia.**

**A mi novia Blanca Liliانا.**

**Gracias mi amor por tu apoyo  
y comprensión. SIEMPRE.**

**A mis tíos (Mary, Miguel):**

**Por su amor y comprensión  
sin el cual me hubiese sido  
imposible alcanzar mis metas.**

**GRACIAS.**

**A la familia G. Montoya.**

**Con todo cariño y respeto  
por abrirme las puertas  
de su hogar y brindarme  
todo su apoyo.**

**A mis amigos:**

**Mauricio, Beto, Luis Antonio,  
Armando, por su gran amistad.**

**A un amigo que se ha ido  
pero sigue vivo en mis  
recuerdos.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**A la UNAM.**

**Por haberme dado  
las herramientas necesarias  
para desarrollarme en la vida.**

**A todos mis profesores  
de la FESC  
y en especial a  
I.B.Q. Francisco Montiel.  
Q.F.B. Patricia Miranda C.  
M. en C. Luis Cedeño C.  
Dr. José Luis Arjona R.  
M. en C. Ricardo P. Hernandez.**

# **INDICE**

## **CAPITULO I. Generalidades de las enzimas.**

<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Características generales de las enzimas.</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Enzima Invertasa.</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1 Propiedades y usos de la invertasa.</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Cinética Enzimática.</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Inmovilización de enzimas.</b>	<b>45</b>

## **CAPITULO II. Reactores enzimáticos.**

<b>2.1 Tipos de reactores. (RTCA, L.E.F., PISTÓN, LECHO FLUIDIZADO Y RESIDENCIA).</b>	<b>69</b>
<b>2.2 Criterios para la selección de reacciones.</b>	<b>100</b>
<b>2.3 Ec. de diseño para reactores ideales.</b>	<b>104</b>

## **CAPITULO III. Elecciones del reactor para inmovilización de la enzima invertasa.**

<b>3.1 Determinación de la actividad enzimática.</b>	<b>115</b>
<b>3.2 inmovilización. de la enzima.</b>	<b>119</b>
<b>3.3 Elección del reactor.</b>	<b>120</b>
<b>3.4 Ecuación de diseño para reactor de lecho empacado.</b>	<b>131</b>
<b>3.5 Estrategias de operación.</b>	<b>141</b>
<b>3.6 Estimación de costos del sustrato.</b>	<b>148</b>
<b>3.7 Recomendaciones.</b>	<b>149</b>
<b>3.8 Conclusiones.</b>	<b>150</b>

## **OBJETIVO GENERAL**

**Realizar un estudio bibliográfico que permita elegir un reactor a nivel laboratorio para inmovilizar a la enzima invertasa, que lleve a cabo la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa.**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.-Exponer las ventajas y desventajas en los procesos de inmovilización enzimática.**
- 2.-Proponer un método de inmovilización para la enzima invertasa, que proporcione una buena actividad enzimática.**
- 3.-Señalar los diferentes tipos de reactores existentes para procesos enzimáticos.**
- 4.-Analizar los parámetros que intervienen en la elección de un reactor enzimático.**
- 5.-Proponer un reactor enzimático de acuerdo a las características de reacción de la enzima invertasa.**

## CAPITULO I

# INTRODUCCION

A últimas fechas la tecnología enzimática ha tenido un gran impacto en la sociedad debido a las múltiples aplicaciones de las enzimas. La biotecnología ha sido definida como la aplicación de los principios ingenieriles y científicos tradicionales que incluyen procesos de fermentación y catálisis por enzimas aisladas, células y partículas subcelulares en sus formas libres o inmovilizadas.

Nosotros debemos prestar atención al término "Ingeniería Enzimática" que es frecuentemente utilizado para identificar a éstas como parte de la ingeniería bioquímica.

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica producidos por los organismos vivos y los cuales regulan la gran cantidad de reacciones químicas que ocurren en la célula. Pero éstas no sólo son importantes desde el punto de vista biológico, sino desde un punto de vista práctico. Las enzimas han sido utilizadas ampliamente en la producción de numerosos productos alimenticios por muchos años. Sus aplicaciones prácticas en productos fermentados como queso, pan y bebidas alcohólicas data de muchos siglos atrás, mucho antes de que la naturaleza y función de las enzimas o aún de los mismos microorganismos, fueran conocidos o entendidos (33).

Sólo en el principio de este siglo, las enzimas fueron mostradas como los agentes responsables de todos los procesos de fermentación, incluyendo los productos alimenticios fermentados. En 1926, la primera enzima ( Ureasa ) fué cristalizada. Con esto se estableció que son compuestos químicos diferentes con propiedades físicas y químicas bien definidas.

Ahora es conocido que todas las enzimas son proteínas compuestas de grandes cadenas de aminoácidos. Paralelo a las investigaciones sobre su estructura, los aspectos cinéticos y termodinámicos de las reacciones catalizadas por enzimas han sido estudiados con mayor detenimiento .

Con la comprensión de la naturaleza enzimática y su poder catalítico la industria ha comenzado a explotar estas características tan singulares. Las enzimas ofrecen un gran número de ventajas como catalizadores industriales sobre los tradicionales catalizadores inorgánicos. El alto grado de especificidad por el sustrato elimina la producción de productos indeseables y de esta forma los costos del proceso disminuyen. Las enzimas además reducen los requerimientos de energía en los procesos, ya que actúan a condiciones suaves de temperatura y presión.

A pesar de estas ventajas, su uso en aplicaciones industriales ha sido limitado a solo pocos productos alimenticios y farmacéuticos .

Primero el costo de la enzima aislada y purificada es todavía alto. Esto es debido principalmente a la dificultad de su extracción de las células, ya que se requieren grandes cantidades de masa celular para obtener razonables rendimientos de la enzima de interés.

Por otro lado la mayoría son inestables cuando son removidas de las células vivas. Otro punto importante es que muchas enzimas son empleadas en forma soluble en medios acuosos, y es muy difícil y económicamente prohibitivo recobrarlas de los efluentes del reactor y al final de los procesos catalíticos.

Como ejemplo de la aplicación industrial de la catálisis enzimática tenemos a la industria panadera que utiliza enzimas como la amilasa y proteasas para el mejoramiento y ablandamiento de la masa, la industria cervecera utiliza la amiloglucosidasa para remover dextrosa y la  $\beta$  - glucanasa para disminuir la viscosidad, la industria azucarera que utiliza la amiloglucosidasa y amilasa para convertir almidón a jarabes glucosados y fructosados. Esta última utiliza la invertasa para producir azúcares reductores a partir de sacarosa ( 92 ).

La hidrólisis de sacarosa por invertasa ha sido seleccionada como una reacción de interés a nivel laboratorio por las características de reacción de la enzima, la obtención de sus productos de hidrólisis ( glucosa y fructosa ) de mayor poder edulcorante que la sacarosa misma y su posible uso dentro de la industria. Por lo tanto la elección de un reactor es un elemento importante en el desarrollo del proceso de hidrólisis en el cual se pretendan utilizar a la enzima inmovilizada.

## ***1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS***

Las enzimas más simples son proteínas de peso molecular de 12 000 hasta 40 000. Las proteínas están compuestas de pequeños bloques o residuos conocidos como aminoácidos (a.a.) cuyo peso molecular abarca de 75 hasta 200.

Por consiguiente, la mayoría de las enzimas simples están construidas por 100 o 400 residuos de aminoácidos.

Debido al gran número de a.a. que la naturaleza ha escogido para construir moléculas de enzimas, las propiedades de una molécula enzimática dependerán en gran medida de la secuencia de residuos de a.a. en la molécula enzimática final. La larga cadena de a.a. que constituye la molécula no se dobla libremente. Más bien adquiere una estructura tridimensional definida. Un aspecto que contribuye a la estabilidad de esta estructura tridimensional en la mayoría de las enzimas son los enlaces disulfuro (covalente) entre residuos de cisteína que actúan como uniones entre diferentes regiones polipeptídicas.

Durante muchos años los químicos han deducido a partir de sus estudios que las enzimas tienen un sitio activo donde realmente ocurre la catálisis. Este es un surco a lo largo de un lado de la molécula en el cual encaja la molécula de sustrato y es mantenida fuertemente. Algunas enzimas grandes contienen más de un sitio activo por molécula. Aquellos son a menudo agregados de subunidades idénticas teniendo peso molecular entre 25 000 y 50 000 con un sitio activo por subunidad ( 87 ).

anteriores.

**1.- OXIDORREDUCTASAS:** Se refiere a las reacciones redox en la cuál los átomos de oxígeno, hidrógeno o los electrones son transferidos entre las moléculas. Esta clase incluye las deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas y peroxidadas.

**2.- TRANSFERASAS:** Estas enzimas catalizan la transferencia de un átomo o grupo de átomos ( acil, alquil y grupos glicosil ), entre dos moléculas.

**3.- HIDROLASAS:** Las cuáles llevan acabo reacciones de hidrólisis. Este tipo de enzimas son las más encontradas en el campo de la tecnología enzimática e incluye las esteradas, las glicosidasas, lipasas y proteasas.

**4.- LIASAS:** Estas enzimas están relacionadas con reacciones de eliminación en las cuáles un grupo de átomos es removido del sustrato. Este grupo incluye las aldolasas, descarboxilasas, desidratadas y algunas pectinasas pero no incluye hidrolasas.

**5.- ISOMERASAS:** Estas enzimas catalizan isomerizaciones moleculares e incluye las epimerasas, racemasas y transferasas intramoleculares.

**6.- LIGASAS:** Tán la energía necesaria para llevar a cabo la unión de las primeras, como ejemplo pequeño de enzimas que permiten la unión de dos moléculas con ruptura de A P, el que proporciona grandes grupos de acuerdo a los parámetros de este tipo de enzimas tenemos la glutation sintetasa (47).

## **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Las actividades enzimáticas son usualmente medidas en términos de actividad (U), la cuál es definida como la cantidad de enzima capaz de transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo condiciones estándar. Típicamente esto representa  $10^{-4}$  a  $10^{-11}$  kg. para enzimas puras y  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  kg. para preparaciones industriales de enzimas. Otras unidades de actividad enzimática han sido recomendadas. Uno de éstas es el katal (Kat) el cuál se define como la cantidad de enzima capaz de transformar una mol de sustrato por segundo (1 Kat = 60 000 000 U). Esta es una unidad no práctica y no ha sido todavía muy bien aceptada. En algunas ocasiones unidades de actividad no estándares son usadas como el Soxhlet, Anson y unidades kilo novo, las cuáles son basadas en cambios físicos como baja viscosidad y son por lo general utilizadas en la industria (47).

La actividad es una medida del contenido de enzima, la cuál es obviamente de mayor interés cuando la enzima es usada en un proceso. Por esta razón, las enzimas son usualmente vendidas en términos de actividad en lugar de peso. La actividad de una enzima puede variar dependiendo de la aplicación particular de la enzima. En ocasiones, preparaciones con la misma actividad específica pueden diferir con respecto a la estabilidad y tener una productividad catalítica (Sustrato total convertido a producto durante el tiempo de vida de el catalizador bajo condiciones específicas) completamente diferentes. Las condiciones para una actividad máxima inicial no son necesariamente las mismas para una estabilidad máxima. La cantidad de enzima presente o utilizada en un proceso es difícil de determinar en términos absolutos (p.ej. gramos), debido a que su pureza es frecuentemente baja y una proporción puede estar en un estado inactivo o parcialmente activo ( 92-93 ).

## **APLICACIONES GENERALES DE LAS ENZIMAS**

Las enzimas usadas en la industria se obtienen de animales y tejidos vegetales así como de microorganismos (m.o.). Durante años recientes los m. o. se han venido convirtiendo en importantes productores de enzimas para la industria y en general la mayoría de las enzimas usadas hasta ahora en la industria son de origen microbiano.

Una vez que las enzimas han sido purificadas y concentradas, el principal objetivo de su manufactura es retener la actividad.

Las enzimas para uso industrial son vendidas sobre las bases de una actividad general, es decir, el conjunto de éstas.

Frecuentemente es encontrada una mayor actividad que la establecida por el fabricante. Esto es hecho para asegurar que la preparación de enzimas tiene garantizada la vida de almacenamiento. El fabricante usualmente recomienda condiciones de almacenamiento y la pérdida de actividad bajo estas condiciones. Esto es de primordial importancia para el vendedor y el comprador de enzimas, que éstas retengan su actividad durante el almacenamiento y durante su uso. Algunas enzimas retienen su actividad bajo condiciones de operación por semanas y aún por meses, aunque la mayoría no lo hace (66).

La clave para mantener la actividad enzimática es mantener la conformación, prevenir el desdoblamiento y cambios en su estructura covalente. Tres soluciones son posibles:

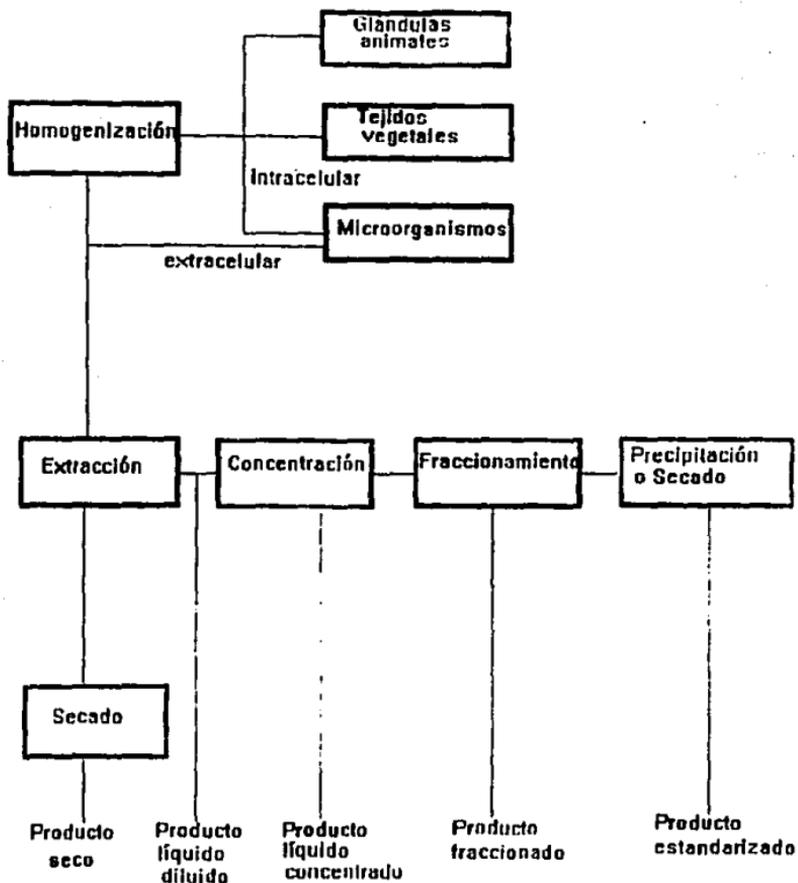
- 1) **Uso de aditivos**
- 2) **Control de la modificación covalente**
- 3) **Inmovilización enzimática**

La separación y purificación de una enzima que proviene de un organismo requiere primeramente de la ruptura celular, eliminar los residuos de ésta así como los ac. nucleicos, precipitación de proteínas, ultrafiltración de la enzima deseada, separación cromatográfica (opcional), cristalización y secado. El proceso varía dependiendo de si la enzima es obtenida intra o extracelularmente. Entre las diferentes enzimas producidas a gran escala tenemos las proteasas, hidrolasas (pectinasas, lipasas, lactasa), isomerasas (glucosa-isomerasa) y oxidasas (glucosa oxidasa). Estas enzimas son producidas por ciertos microorganismos como *Bacillus*, *Aspergillus*, *Rhizopus* en el caso de las proteasas, o el *Flavobacterium arborescens* que produce la glucosa isomerasa. Un diagrama de flujo general para la producción de enzimas industrialmente es mostrado en la fig. 1.1.1.

El primer paso en la producción a gran escala de enzimas es cultivar el microorganismo productor de éstas. La producción puede ser regulada y las condiciones de fermentación deben ser optimizadas para la producción de la enzima. Dependiendo de la naturaleza intra o extracelular de la enzima en la célula, el siguiente paso es separar y purificar la enzima (enzimas extracelulares)

Para recobrar enzimas intracelulares el proceso es más complicado e involucra la ruptura de las células y la eliminación de residuos, así como de los ácidos nucleicos. Las enzimas intracelulares pueden ser obtenidas incrementando la permeabilidad de la membrana celular. Algunas sales como el  $\text{CaCl}_2$  y otras químicas como el dimetil sulfóxido ( DMSO ) así como también el pH pueden ser utilizados para este propósito. Si la enzima no es obtenida completamente una ruptura posterior de la célula puede ser esencial .

# FIG. 1.1.1 PRODUCCION INDUSTRIAL Y PURIFICACION DE ENZIMAS



Las enzimas son utilizadas en diferentes ramas de la industria alimentaria. A continuación se muestra una tabla ( 1.1.1 ), en la que se ilustran sus diferentes usos :

TABLA 1.1.1		
PRINCIPALES USOS DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA (27)		
INDUSTRIA	ENZIMA	USOS
<u>AZUCARERA</u>	AMILASA	HIDROLIZA ALMIDON.
	AMILOGLUCOSIDASA	COMPLETA LA CONVERSION DE ALMIDON EN JARABE.
	INVERTASA	PRODUCCION DE DULCES CON CENTRO SUAVE.
	GLUCOSA- ISOMERASA	OBTENCION DE FRUCTOSA APARTIR DE GLUCOSA.
<u>AVICOLA</u>	GLUCOSA-OXIDASA	ELIMINACION DE GLUCOSA ANTES DEL SECADO DEL HUEVO PARA EVITAR REACCIONES DE MAILLARD.
	PROTEASAS	MEJORAR PROPIEDADES DEL HUEVO DURANTE EL SECADO. ALARGAR LA VIDA DE ANAQUEL DEL HUEVO SECO COMO DEL FRESCO.

TABLA 1.1.1 ( continuación )

PRINCIPALES USOS DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

INDUSTRIA	ENZIMA	USOS
<u>CEREALES</u>	AMILASA	CONVERSION DE ALMIDON A DEXTRINA, INCREMENTO DEL AGUA DE ADSORCION.
	PENTOSANASA	RECUPERA EL ALMIDON DE LA SEMI- LLA DE TRIGO EN LA MOLIENDA.
<u>CARNES Y PESCADOS</u>	PAPAINA	ABLANDAMIENTO DE LA CARNE. RECUPERACION DE PROTEINA DE LOS HUESOS DE CARNE Y PESCADO.
	BROMELINA	ABLANDAMIENTO DE LA CARNE.
<u>CERVECERA</u>	AMILASA	CONVIERTE ALMIDON A MALTA Y ELI- MINA TURBIDEZ.
	CELULASA	HIDROLIZA LOS COMPLEJOS CARBOHI- DRATADOS.
	TANASA	ELIMINA LOS COMPUESTOS POLIFENO- LICOS.
	FOSFATASA	HIDROLIZA LOS COMPUESTOS FOSFA- TADOS.

TABLA 1.1.1 ( continuación )

PRINCIPALES USOS DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

INDUSTRIA	ENZIMA	USOS
<u>FRUTOS Y HORTALIZAS</u>	NARANGINASA	ELIMINA EL SABOR AMARGO DE LOS CITRICOS.
	PECTINASA	AUMENTA EL RENDIMIENTO EN LA OBTENCION DE JUGO Y ABLANDAMIENTO DE FRUTAS.
	POLIFENOL-OXIDASA	PRODUCE OSCURECIMIENTO Y PERDIDA DE VITAMINAS.
<u>PRODUCTOS LACTEOS</u>	LACTASA	HIDROLISIS DE LACTOSA.
	RENINA	COAGULA LA CASEINA PARA LA FABRICACION DE QUESOS.
	FOSFATASA	AYUDA AL CONTROL EFECTIVO DE LA PASTEURIZACION.
<u>PANADERIA</u>	PROTEASA	FACILITA EL MANEJO DE LA MASA DANDO ELASTICIDAD Y TEXTURA.
	AMILASAS	INCREMENTA EL CONTENIDO DE AZUCARES PARA LA FERMENTACION DE LA LEVADURA.

TABLA 1.1.1 ( continuación )

PRINCIPALES USOS DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

INDUSTRIA	ENZIMA	USOS
<u>VINICOLA</u>	PECTINASAS	SE UTILIZA PARA CLARIFICACION DE VINOS.
	GLUCOSA-OXIDASA	PREVIENE LA OXIDACION DE VINOS.
<u>DIVERSOS</u>	LISOZIMA	HUMANIZACION DE LA LECHE DE VACA, CONSERVACION DEL CAVIAR, INHIBE EL CRECIMIENTO DE <u>C. BOTULINUM</u> .

## 1.2. ENZIMA INVERTASA

La enzima invertasa fue conocida a mediados del siglo XIX. En 1860 Berthelot descubrió una enzima en la levadura la cuál fue nombrada invertasa debido a sus características de cambiar la dirección de rotación óptica de una solución de sacarosa (Hidrólisis a glucosa y fructosa). Es conocida como  $\beta$  - D - Fructofuranosidasa, fructohidrolasa, EC 3.2.1.26., invertasa, invertina y/o sacarasa.

Esta enzima fue muy popular ya que su acción catalítica puede ser seguida continuamente con el uso de un polarímetro. Fue una de las enzimas reportadas por Sorensen en 1909, y se hablaba del efecto del pH sobre la actividad enzimática, esta enzima fue estudiada después por Michaelis-Menten en 1913.

Los problemas que presenta esta enzima para su obtención son debidos a la naturaleza glucoproteica de la molécula.

La reacción catalizada por la enzima es mostrada a continuación, donde los números bajo los compuestos representan la rotación específica.



La velocidad de la reacción puede ser seguida más convenientemente en un polarímetro desde que existe un cambio molar neto en la rotación de  $87^\circ$ . Debido a la inversión de la rotación ( $+66.5^\circ$  a  $-20.5^\circ$ ) de la solución durante la reacción, a la enzima se le dio el nombre de invertasa.

Una mol de sacarosa produce una mol de glucosa y una mol de fructosa, 342g. de sacarosa producen 360g. de azúcar invertido. La velocidad de producción de glucosa puede ser también seguida por el método de cromatografía de glucosa - oxidasa - peroxidasa ( 87 ).

$\beta$ -Fructofuranosidasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y está presente en plantas, animales y microorganismos. Se ha encontrado la enzima en la saliva de algunos invertebrados.

Existen dos tipos de enzimas,  $\beta$  - Fructofuranosidasa y  $\alpha$  - Glucosidasa, las cuáles hidrolizan la sacarosa. La unión glucosídica en la sacarosa contiene los grupos reducidos de D - Glucosa, y D - Fructosa. Un tipo de enzimas hidroliza la unión entre el C(2) - O( $\beta$  - Fructofuranosidasa ) y la otra hidoliza la unión entre el C(1) - O (  $\alpha$  - Glucosidasa ).

La mejor forma de distinguir entre las dos enzimas es utilizando dos trisacáridos, rafinosa y melesitosa.  $\alpha$  - Glucosidasa dirige su especificidad hacia la molécula de glucosa de la sacarosa incluyendo la posición del Carbono-6.

La modificación del Carbono-6 de esta molécula evita que  $\alpha$  - Glucosidasa puede hidrolizar al sustrato. En la melesitosa el residuo glucosídico unido a la fructosa no es modificado, y así, la  $\alpha$  - Glucosidasa puede hidrolizar a la melesitosa. La conversión la realiza la verdadera  $\beta$  - Fructofuranosidasa. Su especificidad es dirigida hacia la molécula de fructosa de la sacarosa y la modificación de esta molécula, como en la melesitosa, evita que el compuesto sirva como sustrato.

La principal fuente de obtención de la invertasa es la levadura. Dentro de los microorganismos productores de esta enzima se pueden mencionar:

**Saccharomyces cerevisiae**

**Saccharomyces carlbergensis**

**Saccharomyces pastorianum**

**Candida utilis**

**Candida monilia**

## **1.2.1. PROPIEDADES Y USOS DE LA INVERTASA**

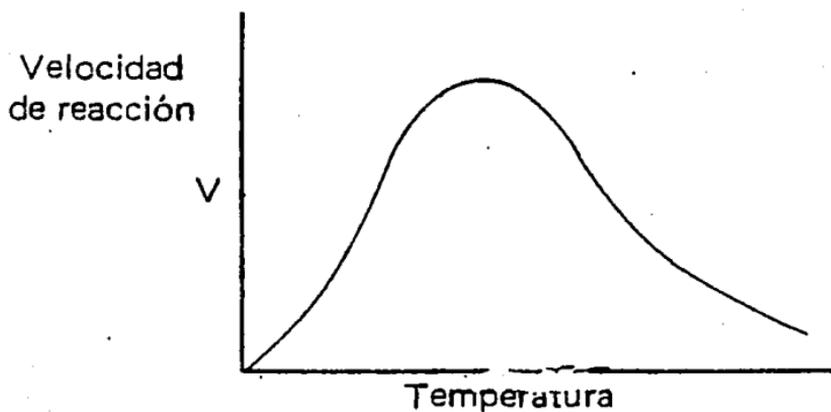
Las siguientes propiedades han sido descritas para  $\beta$ -Fructofuranosidasa. Los valores de Km para sacarosa y rafinosa son de 0.016 M y 0.024 M respectivamente. Para poder apreciar la actividad sobre la rafinosa, se deben tomar altas concentraciones de sustrato. El pH óptimo de la enzima se encuentra en un rango de 4.5 a 5.5. La temperatura de la enzima se encuentra en un rango de 15°C a 30°C, aunque se ha observado que la enzima es estable alrededor de los 35°C.

La enzima es inhibida por yodo, por iones de metales pesados ( $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+1}$ ,  $Cu^{+2}$ ), anilina, m-toluidina, alcohol en concentraciones de 20 a 30% destruye en un 50% la actividad de la invertasa. El yodo acetato y el ferrocianuro tienen muy poco efecto en su actividad. Se ha demostrado que la invertasa es inhibida por el sustrato (sacarosa) a altas concentraciones (por arriba del 20%) y sus productos de hidrólisis. La  $\beta$ -fructofuranosidasa, no presenta actividad sobre el isómero de la sacarosa, en el cual la fructosa está en forma de piranosa.

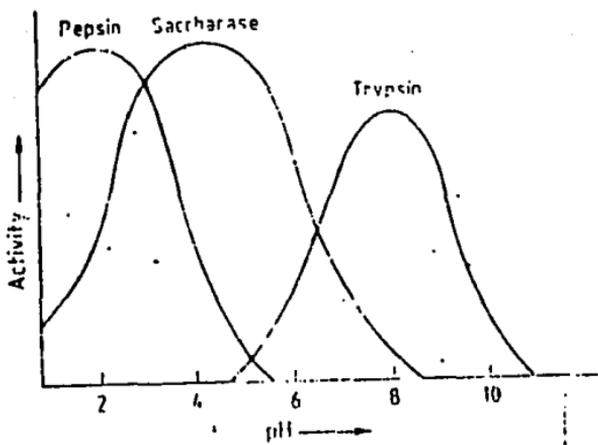
Industrialmente la invertasa se obtiene a partir de Saccharomyces Cerevisiae, su peso molecular es de 270 000 D y ha sido determinado por la media del equilibrio de sedimentación. Su alto peso molecular se debe a la presencia de carbohidratos en un 50% unidos a ella, predomina manosa y en pequeño porcentaje la glucosamina, la cual como ya se mencionó con anterioridad se define como una glucoproteína (87).

En la fig. 1.2.1. se muestra la temperatura óptima para la actividad de la enzima y en la fig. 1.2.2. se observa la actividad de varias enzimas en función de pH.

**FIG. 1.2.1. TEMPERATURA OPTIMA  
PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE  
LA INVERTASA**



**FIG. 1.2.2. ACTIVIDAD DE LA INVERTASA EN FUNCION DEL PH**



En la tabla siguiente ( 1.2.1 ) se muestran las principales propiedades y características de la invertasa .

**TABLA 1.2.1**

**PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LA INVERTASA (90)**

ENZIMA	FUENTE	$10^3 V$ (RELATIVA) DALTONS	$K_m$ mol/l	$pH_{opt}$ .	SUBSTRATO
INVERTASA*	LEVADURA	270	-----	$9.1 \cdot 10^{-3}$	3.4-4 SACAROSA
" "	LEVADURA	270	-----	$9.1 \cdot 10^{-3}$	3.4-4 RAFINOSA
" "	LEVADURA(A)	---	-----	-----	5.4 SACAROSA
" "	NEUROSPORA CRASSA (B)	---	-----	-----	7.5 SACAROSA
" "	LEVADURA	---	-----	$9.1 \cdot 10^{-3}$	4.6 SACAROSA
" "	ILTUBEROSUS	---	1.00 0.27 0.01	----- ----- -----	5 SACAROSA 5 RAFINOSA 5 MELOSITASA
" "	N. CRASSA	---	1.00 0.22 0.30	$6.1 \cdot 10^{-3}$ $6.5 \cdot 10^{-3}$ $3.33 \cdot 10^{-2}$	5 SACAROSA 5 RAFINOSA 5 B-METIL.

\* ASPECTO Y MANEJO

A) ESTA ENZIMA ES UN GLUCOPROTEINA QUE CONTIENE ALREDEDOR DE 40% DE CARBOHIDRATO

B) N. CRASSA CONTIENE DOS FORMAS ACTIVAS DE LA INVERTASA

## **USOS MAS COMUNES DE LA INVERTASA**

La principal aplicación de la invertasa es en la producción de azúcar invertido. Es utilizada en la industria pastelera, en la producción de licores, en helados donde debe evitarse la cristalización de los azúcares, en el relleno de chocolates, para evitar cristalización de jarabes y en fabricación de mieles artificiales.

La hidrólisis de la sacarosa por invertasa ha sido seleccionada como una reacción modelo de interés industrial por lo que ha sido ampliamente estudiada, y se han requerido de nuevos métodos como la inmovilización en su utilización.

Una propiedad de la sacarosa anteriormente mencionada es su capacidad de hidrolizarse, ya sea por acción enzimática o por acción ácida, aunque ésta última produce un color rojizo en el azúcar invertido obtenido, hay caramelización, característica que no se presenta en la hidrólisis enzimática.

El azúcar invertido ( glucosa- fructosa ) es conocido dentro de la industria confitera como dextrosa y levulosa respectivamente. Una de las principales razones del uso de azúcar invertido es que puede prevenir o ayudar a controlar el grado de cristalización de la sacarosa. Existen dos causas:

- Tanto la levulosa como la dextrosa se cristalizan más lentamente que la sacarosa, de modo que la sustitución de una parte de sacarosa por azúcar invertido disminuye la cristalización rápida durante el enfriamiento de los jarabes, cuando la mayoría de los cristales se forma y durante el almacenamiento subsecuente, cuando más cristales se agrandan y precipitan.

Una mezcla de sacarosa y azúcar invertido es más soluble en agua que la sacarosa sola. El aumento en la solubilidad equivale a una disminución en la cristalización.

Como se mencionó con anterioridad la sacarosa puede ser hidrolizada por un medio ácido o por enzimas. El producto consiste en una mezcla 1:1 de glucosa y fructosa estos productos de hidrólisis son más dulces que la misma sacarosa. La hidrólisis enzimática, llevada a cabo por invertasa, produce un producto de mayor pureza que la hidrólisis ácida. Aún pensando que la producción de azúcar invertido con enzimas solubles es relativamente barato, se han realizado ciertos intentos por inmovilizar la enzima para la producción en continuo de jarabes con azúcar invertido. La invertasa es una enzima relativamente estable y su inmovilización da como resultado tiempos mayores de vida ( 71 ).

## **INMOVILIZACION DE LA INVERTASA**

En 1916, Nelson y Griffin observaron que la invertasa de levadura ( EC 3.2.1.26. ) adsorbida en carbón podía catalizar la hidrólisis de sacarosa ( 87 ). La invertasa proveniente de levadura fue atrapada en fibras de triacetato de celulosa y evaluada para su uso industrial ( 49 ).

En su forma inmovilizada la enzima tuvo una actividad y estabilidad aceptable bajo condiciones de operación, especialmente a altas concentraciones de sacarosa donde la enzima en solución mostró una severa inhibición por el sustrato. Se concluyó que se observaron diferencias entre la invertasa libre y atrapada debido a efectos difusionales.

En un estudio de invertasa proveniente de Candida utilis inmovilizada en celulosa porosa, se concluyó que los impedimentos difusionales ayudan a minimizar la inhibición por sustrato ( 19 ). Bajo las condiciones utilizadas, las barreras de difusión internas y externas contribuyeron a este efecto. Así, las barreras de difusión, las cuáles normalmente son una desventaja para la utilización práctica de enzimas inmovilizadas, en esos casos, influyeron sobre el comportamiento cinético de la invertasa inmovilizada de una manera positiva.

Invertasa, atrapada en poliacrilamida, retuvo 90% de su actividad inicial después de estar en operación continua por 450 días a 30°C ( 40 ). Altas concentraciones de sacarosa ( 30-50% ) dieron como resultado un incremento en la resistencia al flujo en una columna de operación debido al aumento de la viscosidad de la solución ( sustrato ).

Estos y otros estudios sobre invertasa inmovilizada indican el interés y el potencial uso de preparaciones para la producción continua de azúcar invertido a nivel industrial. Sin embargo, el escalamiento de procesos para la utilización de la enzima, no han sido a la fecha reportados.

A continuación se presenta una tabla ( 1.2.2. ) en la que se presentan diferentes formas de inmovilización de la invertasa así como las características más importantes.

**TABLA 1.2.2**

**INMOVILIZACION DE LA INVERTASA**

SOPORTE/METODO DE INMOVILIZACION	RENDIMIENTO	COMENTARIOS REF. % ACTIVIDAD		
AMBERLITA	ADSORCION	50	NO HUBO DESORCION EN EL REACTOR, SI MANTUVO 1 MES A PH=3.4 A 30°C.	(8)
VIDRIO POROSO	ADSORCION	0.9	_____	(54)
DIAZ-CELULOSA	ADSORCION	45-80	COMPLEJO ESTABLE POR 9 DIAS, A 30°C Y PH=5-7.	(48)
VIDRIO POROSO RESINA DE INTERCAMBIO ANIONICO (AMI-1)	ENLACE COVALENTE	0.9-1 0.61-0.93	CON LOS ENLACES IONICOS SE MANTIENEN LOS SITIOS ACTIVOS DIALTERADOS, PERO HAY DENATURALIZACION DE LA ENZIMA.	(23)
VIDRIO POROSO	ENLACE IONICO	55.5	PH OPTIMO= 4.5, EFECTO DE DIFUSION PUE MAS ESTABLE QUE LA ENZIMA NATIVA.	(19)
FIBRAS DE ATRAPAMIENTO (TRIACTATO DE CELULOSA)	ATRAPAMIENTO	35-85	VIDA MEDIA DE 5100 DIAS MAS ESTABLE QUE LA NATIVA, PH=4.5 A 35°C.	(49)
DIAZ-CELULOSA	ADSORCION	50	_____	(79)

**TABLA 1.2.2. ( continuación )**  
**INMOVILIZACION DE INVERTASA**

SOPORTE	METODO DE INMOVILIZACION	ACTIVIDAD%	COMENTARIOS	REF.
VIDRIO POROSO	ENLACE COVALENTE	60	VIMA MEDIA INMOVILIZACION 40 DIAS VALORES CINETICOS IGUALES LA ENZIMA LIBRE INMOVILIZADA	(54)
VIDRIO POROSO ACTIVADO	ENLACE COVALENTE	58	MAS ESTABLE QUE VIDRIO POROSO SIN ACTIVAR Y ENZIMA NATIVA	(82)
VIDRIO POROSO (SILANO-GLUTARALDEHIDO)	ENLACE COVALENTE	56		(82)
VIDRIO POROSO DE INTERCAMBIO IONICO	ENLACE COVALENTE	60	ENLACE IONICO DA MAYOR PERDIDA QUE ENLACE COVALENTE	(64)
GEL DE POLIACRILAMIDA Y CM-GELULOSA	ATRAPAMIENTO Y ADSORCION	50	LA ENZIMA ATRAPADA PRESENTA MENOR INHIBICION POR CLOROMERCUBENZATO Y PLATA QUE LA ADSORBIDA	(57)
ALUMINA	ADSORCION POR ENLACE COVALENTE	-	AL COMPARAR LA CINETICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA CON LA ENZIMA EN SOLUCION SE ENCONTRARON VALORES DE Km, K1, Kp MAYORES EN UN 24.44, 36% RESPECTIVAMENTE SE LOGRO UNA MAYOR ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE LA ENZIMA EN SOLUCION, LA CUAL DISMINUYO SU ACTIVIDAD EN 14% EN 22 DIAS	(16)

**TABLA 1.2.2 ( continuación )**

**INMOVILIZACION DE INVERTASA**

SOPORTE METODO DE INMOVILIZACION-	ACTIVIDAD	COMENTARIOS	REF.
FIBRAS DE ALGODON	ENTRECruzAMIENTO	40	SE LOGRO UNA MAYOR ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA Y MANTENIDA A 50°C - RETUVO 40% DE SU ACTIV. POR 30 DIAS. SE LOGRA UNA MAYOR ESTABILIDAD DE LA ENZIMA EN PRESENCIA DE SACAROSA. (30)
MEMBRANAS DE COLAGENO	ATRAPAMIENTO	-	SE REALIZO UN ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PRESION SOBRE LA VELOCIDAD DE HIDROLISIS DE SACAROSA. (36)
AMBERLITA* RESINA DE INT. IONICO	ADSORCION	21	EL PH OPT. VARIA DESDE 3.2-5. LA ACTIV. ENZIMATICA ES ESTABLE AL REDEDOR DE 1 MES. (8)
(IR 120) CON GRUPO FUNCIONAL - SULFONICO	ADSORCION	21	(8)
(IR 50) CON GRUPO FUNCIONAL CARBOXYLICO	ADSORCION	28	(8)
(IR 410) CON GRUPO FUNCIONAL AMINACUATERNARIA	ADSORCION	13	(8)
(IR 45) CON GRUPO FUNCIONAL AMINATERCIARIA	ADSORCION	20	(8)

**TABLA 1.2.2 ( continuación )**  
**INMOVILIZACION DE INVERTASA**

SOPORTE	METODO DE INMOVILIZACION	ACTIVIDAD	COMENTARIOS	REF.
200** GRUPO FUNCIONAL SULFONICO	ADSORCION		12	(8)
(IRA 90) GRUPO FUNCIONAL AMINA CUATERNARIA	ADSORCION		51	(8)
(IRA 93) GRUPO FUNCIONAL AMINA TERCIARIA	ADSORCION		50	NO OCURRE DESORCION A 30°C CON BUFFER DE ACETATO DE SODIO A PH=5. (8)
SULFATO DE - CELULOSA	ENCAPSULACION		2-20	TEMPERATURA OPTIMA DE LA INVERTASA SOLUBLE 60°C Y LA OPTIMA DE LA ENCAPSULADA DE 60-65°C A ALTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO LA ACTIV. DISMINUYE CONSIDERABLEMENTE DESDE UN 15-65%

\* RESINAS TIPO GEL

\*\* RESINAS TIPO MACRORETICULARES

### **1.3. CINETICA ENZIMATICA**

La cinética enzimática estudia las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas. Es conveniente, por lo tanto, tener conocimiento del tipo de reacciones que se desarrollan en procesos catalizados por ellas. Estos pueden ser:

#### **REACCIONES SIMPLES**

La reacción más sencilla para un proceso catalizado por una enzima corresponde a :



#### **REACCIONES DE ORDEN CERO**

Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas son de orden cero ( con respecto al sustrato ) cuando la enzima se encuentra saturada con el sustrato y la cantidad de producto formado por unidad de tiempo resulta dependiente de la concentración de enzima.

$$(E_0)K = (P)/t = K_0 \tag{1}$$

En donde  $K_o$  ( Constante observada de la velocidad de reacción ) es una constante que cambia con la concentración de la enzima mientras que  $K$  es una constante verdadera independiente de dicho valor. La velocidad de reacción de orden cero es independiente de dicho valor. La velocidad de reacción de orden cero es independiente de la concentración de sustrato. Su formula general puede escribirse como :

$$-dc / dt = K_o = K_o C \quad (2)$$

En donde  $C$  es la concentración inicial de sustrato que decrece con el tiempo ( 29, 51 ).

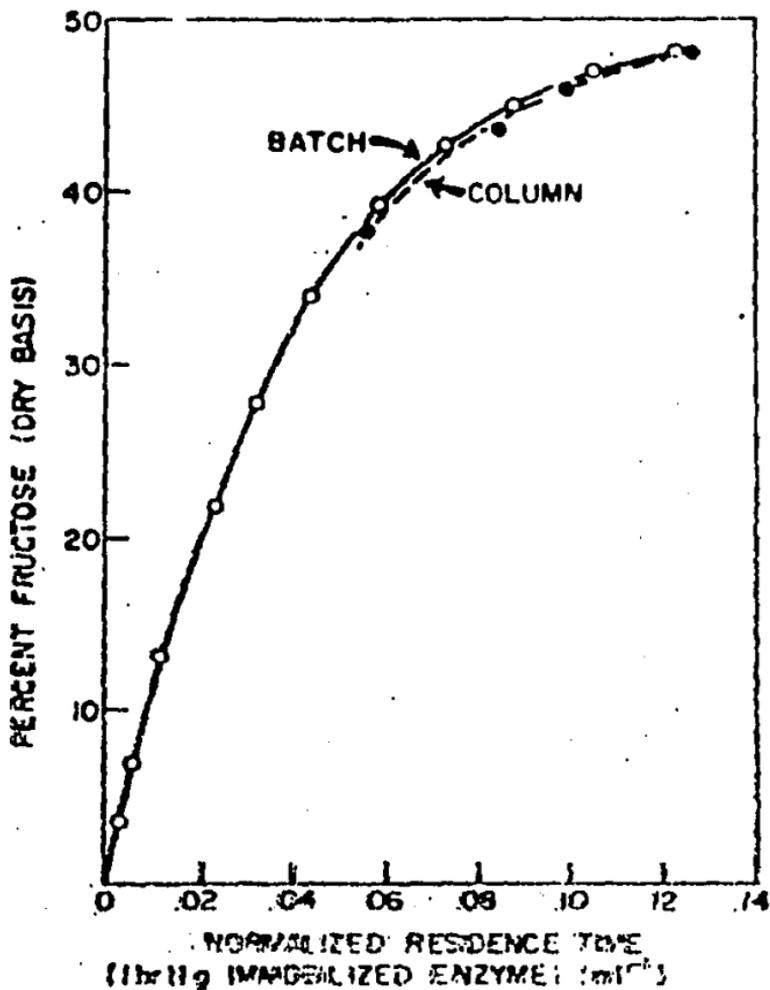
### **REACCIONES DE PRIMER ORDEN**

Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas son de primer orden ( con respecto al sustrato ), cuando la enzima se encuentra saturada con el sustrato en proporciones menores al 5% y la velocidad de reacción observada resulta dependiente de la concentración de enzima y sustrato.

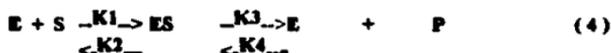
$$(E_o) K = (2.3 / t) \log (S_o / S) - K_o \quad (3)$$

En una gráfica del producto formado contra el tiempo de una reacción catalizada por una enzima, se obtiene una curva semejante a la de la fig. 1.3.1

**FIG. 1.3.1 PRODUCTO VS. TIEMPO**



La primera parte, conocida con el nombre de estado preestable, corresponde a un período de tiempo corto en el que se equilibran las reacciones correspondientes a la ecuación general:



La segunda parte, corresponde a una reacción de orden cero, ya que la enzima se encuentra totalmente saturada con el sustrato.

La tercera parte de velocidad decreciente, puede corresponder a una reacción de primer orden, ya que factiblemente su pérdida de velocidad se debe a que la enzima se encuentra cada vez menos saturada con el sustrato ( 29, 51 ).

Como se mencionó con anterioridad las enzimas son sustancias altamente complejas, de alto peso molecular, de gran tamaño, de composición difícil de precisar y además presentan el fenómeno de saturación por sustrato y producto. Por lo tanto no es difícil de extrañar que muchos parámetros afecten la velocidad de reacción. Entre los más importantes se encuentran la temperatura, pH, concentración de sustrato.

Para explicar la actividad enzimática, en la cuál se forma un producto a partir de la interacción enzima-sustrato, tenemos el modelo cinético propuesto por Michaelis-Menten (M.M.)

$$v = \frac{V_{max} S}{S + K_m} \quad (5)$$

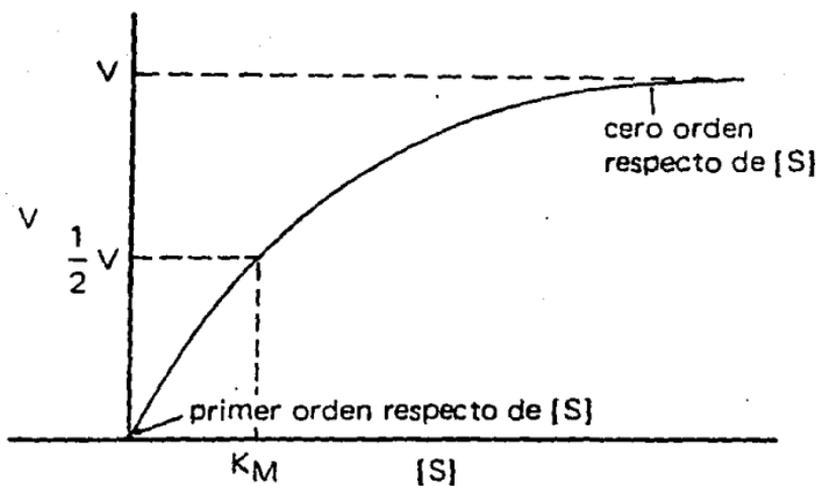
Donde:

S	=	Concentración del sustrato
V <sub>max</sub>	=	Velocidad máxima.
K <sub>m</sub>	=	Constante de Michaelis - Menten
v	=	Velocidad inicial de reacción con una concentración determinada

La ecuación de Michaelis-Menten describe el comportamiento que presenta la mayor parte de las enzimas con respecto a la concentración de sustrato. La constante K<sub>m</sub> se define como la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima. Por lo tanto, si una enzima tiene un valor pequeño de K<sub>m</sub>, consigue una eficiencia catalítica máxima a bajas concentraciones de sustrato. La magnitud de K<sub>m</sub> varía ampliamente con la enzima y con la naturaleza del sustrato,

La fig. 1.3.2. es la forma esquemática de la ecuación de Michaelis-Menten, se grafican la velocidad de reacción y la concentración de sustrato. Podemos observar que el orden de la reacción va cambiando de acuerdo con la concentración de sustrato respecto a K<sub>m</sub>. En el inicio tenemos una reacción de primer orden donde la concentración de sustrato < K<sub>m</sub>, al incrementarse la concentración del sustrato se produce un cambio en el orden de la reacción, es decir, una reacción de orden cero [S] > K<sub>m</sub>, lugar donde se tiene una V<sub>max</sub> de reacción.

**FIG. 1.3.2. GRAFICA DE MICHAELIS -  
MENTEN**



Un método mejor para determinar los valores de  $V_{max}$  y de  $K_m$  fué formulado por Hans Lineweaver y Dean Burk en el que utilizaron el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten. La ecuación obtenida es:

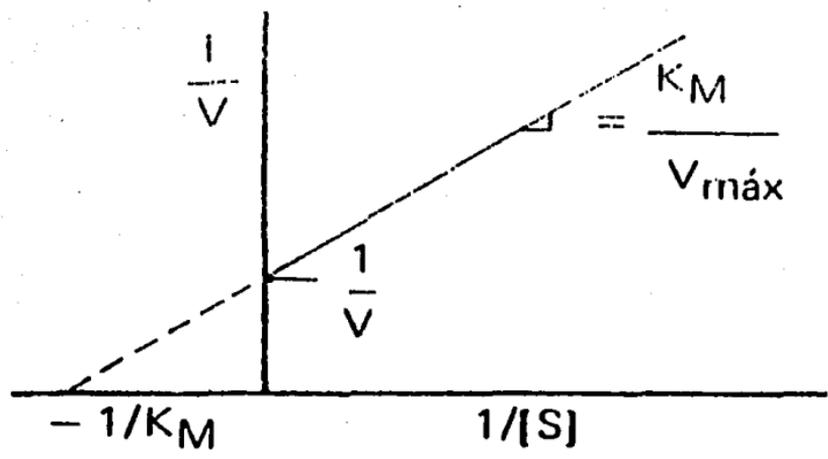
$$1/v = 1/V_{max} + (K_m / V_{max})(1/S) \quad (6)$$

Esta es una ecuación lineal en  $1/V$  y  $1/[S]$ . Si se representan estas cantidades, el método de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos, la pendiente de la línea recta es  $K_m/V_{max}$ , la intersección en  $1/V$  es  $1/V_{max}$  y la intersección con la abscisa es  $-1/K_m$  ( fig. 1.3.3. ).

Una desventaja de esta representación es que la mayoría de medidas experimentales implican  $[S]$  relativamente elevadas que se acumulan en la parte izquierda de la grafica. Además, para valores pequeños de  $[S]$ , pequeños errores en  $v$  conducen a grandes errores en  $1/V$  y de ahí se obtienen grandes errores en  $K_m$  y  $V_{max}$ .

En general, los gráficos de Lineaweaver-Burk son valiosos para la presentación visual de los datos cinéticos y son además, útiles en el análisis de datos cinéticos de enzimas que requieren más de un sustrato.

**FIG. 1.3.3. GRAFICA DE LINEWEAVER & BURK**

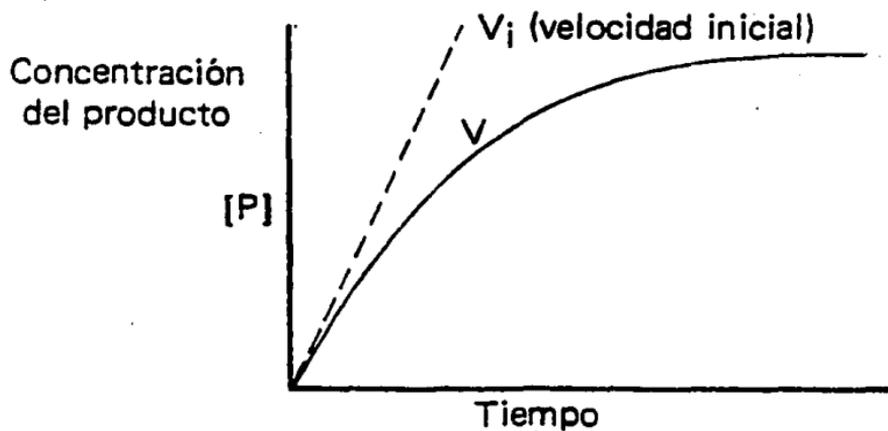


## **EFEECTO DEL TIEMPO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Cuando se efectúa una reacción enzimática, se observa un aumento en la concentración del producto y una disminución en la concentración de sustrato hasta que la reacción termina o alcanza su punto de equilibrio. El cambio observado en la concentración inicial respecto al tiempo se denomina velocidad inicial de reacción y, en general, se expresa en unidades internacionales o moles de producto por minuto.

La fig. 1.3.4. representa la curva obtenida en una reacción enzimática y su dependencia del tiempo. Como podemos observar, la concentración del producto se va incrementando con el tiempo hasta llegar a un punto máximo en el cual la curva se mantiene constante y ya no existe ningún incremento en la concentración del producto con el paso del tiempo.

### FIG 1.3.4 EFECTO DEL TIEMPO EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA



## EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA Y EN LA ACTIVIDAD INICIAL

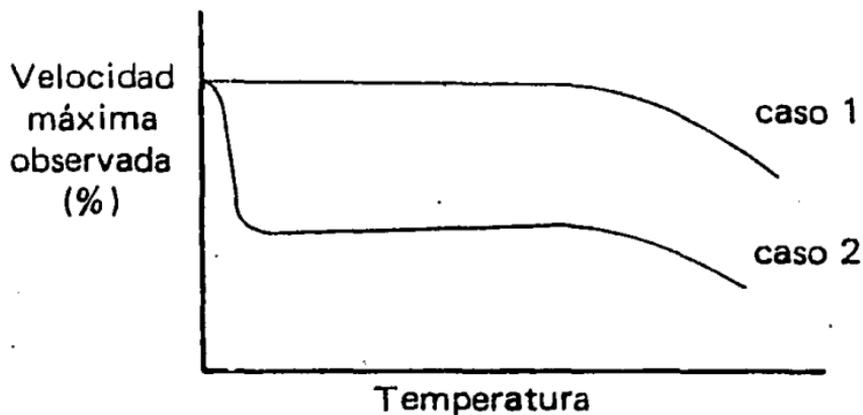
A medida que se aumenta la temperatura ocurren dos reacciones simultáneas:

1.- La velocidad de reacción aumenta como sucede en todas las reacciones químicas normales.

2.- La estabilidad de la enzima disminuye por inactivación térmica. Las constantes de reacción aumentan con la temperatura. Este efecto fué descrito por Arrhenius ( teoría de colisiones ) mediante la ecuación  $K = A \exp(-E/RT)$ , donde K es la constante de velocidad, E es la energía de activación, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. La cantidad A ( constante de Arrhenius ) representa la frecuencia total de colisiones entre las moléculas que reaccionan. El factor exponencial (  $-E/RT$  ) representa la fracción de colisiones moleculares que posee una energía de activación igual o mayor que la energía de activación E . En las reacciones catalizadas por enzimas la energía de activación oscila entre 4 000 y 20 000 cal / mol .

En la fig. 1.3.5. se muestra el resultado de estas dos reacciones. En la curva podemos contemplar que al principio hay un aumento en la velocidad de reacción debido al incremento de la temperatura, hasta llegar a una temperatura óptima de reacción donde se observa la máxima velocidad, al superar esta temperatura la velocidad de reacción disminuye hasta llegar a un nivel mínimo, esto es debido principalmente a la inactivación térmica de la enzima.

**FIG. 1.3.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA**



## **EFEECTO DEL PH**

Las enzimas son moléculas anfotéricas que contienen un gran número de grupos ácidos y básicos, situados principalmente en la superficie. Los cambios sobre estos grupos varían, de acuerdo a sus constantes de disociación y el pH del medio. Esto afectará la carga neta total de la enzima y la distribución de cargas en la superficie exterior de éstas, además de la reactividad de los grupos catalíticamente activos.

Existe un pH característico para cada enzima, en el cuál la carga neta de la molécula es cero. Este es conocido como el punto isoelectrico ( PI ), en el cuál la enzima generalmente tiene una mínima solubilidad en soluciones acuosas. De una forma similar ocurre en las enzimas, la distribución de cargas sobre el sustrato, producto y coenzimas será también afectado por cambios en el pH.

Existe también un pH óptimo, en el cuál la actividad de la enzima es máxima, por encima o por debajo del cuál, la actividad disminuye (47).

Cuando se hacen modificaciones del pH alrededor del sitio óptimo, la actividad de la enzima se modifica, pero se vuelve a la normal si el pH regresa al óptimo. En otros casos una modificación amplia del pH puede provocar la desnaturalización de la proteína con destrucción irreversible de la actividad enzimática. Algunas enzimas muestran rangos amplios de pH en los que actúan a  $V_{max}$ .

El pH óptimo varía de una reacción reversible y una reacción no reversible. La variación de actividad con el pH, se encuentra en un rango de 2 - 3 unidades de pH, cambiando así el PI de la enzima, esto se presenta principalmente en procesos reversibles. Condiciones extremas de pH, causan una dependencia del tiempo-temperatura y conllevan a una desnaturalización irreversible ( 47 ).

Cuando las enzimas son inmovilizadas se producen cambios en el pH óptimo de éstas. La explicación de estos cambios se atribuyen al microambiente de la enzima. Este fenómeno es debido a la desigual distribución de los iones hidrógeno, hidróxilo y la carga de los sustratos. La concentración local de iones hidrógeno en la cercanía del soporte-enzima depende de la carga del soporte. Si esta cargado negativamente ocurrirá una acumulación de iones hidrógeno en su superficie, si su carga es positiva, se acumularán iones hidróxilo.

Por ello, en la superficie del soporte donde se encuentra localizada la enzima, el pH será mayor o menor que en el seno de la solución, creando un cambio en el perfil de pH.

Otros muchos factores ambientales pueden afectar la actividad enzimática, éstos incluyen la fuerza iónica del medio, la presión (especialmente si uno de los reactivos es gaseoso ), los buffers empleados, la pureza de los reactivos y de la enzima, etc. Todos ellos deben determinarse experimentalmente, o por lo menos escogerse arbitrariamente y mantenerlos constantes durante cualquier estudio enzimático (94).

#### **1.4. INMOVILIZACION DE ENZIMAS**

Desde un punto de vista práctico, el término enzima inmovilizada, puede ser definido como un sistema o preparación en el cuál una enzima es fijada en una región definida en el espacio.

La enzima puede ser fijada por uno de los muchos mecanismos existentes a la superficie de un soporte sólido, o limitado físicamente en un medio sólido o a una barrera líquida. El uso de enzimas en aplicaciones industriales ha sido limitado a ciertos productos alimenticios y farmacéuticos por muchos factores.

Primero, el costo actual de la obtención y purificación de enzimas es todavía elevado. La fuente principal de las enzimas son las células vivas, por lo tanto se necesita primeramente realizar una preparación de éstas. Tomando en cuenta que cada célula contiene alrededor de 1000- 2000 enzimas, se requieren grandes cantidades de masa celular para obtener una razonable producción de la enzima de interés. En adición a lo anterior, se necesita de métodos de separación muy delicados para obtener la enzima de los residuos celulares sin dañarla.

Segundo, la mayoría de las enzimas son inestables cuando son separadas de las células.

Tercero, muchas enzimas son empleadas en forma soluble en medios acuosos, lo que hace difícil y económicamente prohibitivo recuperarlas de los efluentes del reactor al final de un proceso catalítico.

Muchas de esas limitaciones pueden ser evitadas con el uso de enzimas inmovilizadas, durante la última década la ingeniería enzimática ha mostrado un interés creciente en esta tecnología.

Si comparamos las ventajas de las enzimas inmovilizadas sobre las enzimas solubles se puede explicar este creciente interés. Las enzimas que son muy caras, cuando son inmovilizadas, pueden ser reutilizadas. Los procesos que involucran enzimas inmovilizadas pueden ser operados continuamente y controlados más fácilmente, además, los productos son separados sencillamente de la enzima que cataliza la reacción y en algunos casos las propiedades de la enzima (estabilidad) pueden ser alterados favorablemente por la inmovilización, se ha encontrado también que se reduce favorablemente la inhibición por producto.

A la fecha solo pocos procesos basados sobre enzimas inmovilizadas son operativos a escala industrial ( tabla 1.4.1). Todas estas aplicaciones son ejemplos de simples reacciones enzimáticas como la hidrólisis y la isomerización. Reacciones más complejas hacen necesario el uso de coenzimas que no han sido todavía desarrolladas para uso industrial. Estas reacciones, sin embargo, tienen un gran potencial para la utilización en la catálisis industrial ( 36 ).

**TABLA 1.4.1.**

**APLICACIONES POTENCIALES DE CELULAS Y ENZIMAS  
INMOVILIZADAS EN LA INDUSTRIA**

- PRODUCCION DE L- AMINOACIDOS
- PRODUCCION DE JARABE DE MAIZ RICO EN FRUCTOSA
- MODIFICACION DE PENICILINA
- CONVERSION DE ACIDO FUMARICO A ACIDO ASPARTICO
- SINTESIS DE ACIDO MALICO APARTIR DE ACIDO FUMARICO
- INVERSION DE SACAROSA
- CONVERSION DE ALMIDON A GLUCOSA
- CLARIFICACION DE JUGOS Y VINOS.
- ELABORACION DE QUESO
- INCREMENTO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE LA LECHE
- HIDROLISIS DE PROTEINAS
- PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO
- MODIFICACION DE ESTEROIDES
- HIDROLISIS DE LACTOSA EN LECHE Y SUERO
- TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

## **TECNICAS DE INMOVILIZACION ENZIMATICA**

La actividad catalítica de una enzima reside en su sitio activo, que es el lugar en el cuál la molécula de sustrato se une a la enzima y es convertido en su consecuente producto. El sitio activo consiste por lo general en la unión de muchos aminoácidos en una relación espacial específica.

La conformación tridimensional ( estructura 3ª ) de la enzima es también muy importante en la acción catalítica de la enzima. Consecuentemente, para la expresión de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, es necesario retener la misma estructura sin alterar los residuos de aminoácidos del sitio activo o afectar su estructura terciaria. Por esta razón los métodos de inmovilización enzimática requieren de condiciones extremadamente precisas.

Por lo tanto es necesario realizar las reacciones de inmovilización bajo condiciones suaves de operación ( temperatura por abajo de los 100°C, presión atmosférica y pH casi neutros).

Las reacciones a temperaturas altas, los tratamientos ácido-alkali y las altas concentraciones de sal deben ser evitadas para conservar la integridad de la estructura de la enzima.

Los métodos de inmovilización enzimática se agrupan bajo cuatro categorías básicamente. Sin embargo, en algunos casos, el método usado es una combinación de dos o más de estas categorías ( 70 ):

**1.- Adsorción en una superficie sólida.**

**2.- Unión covalente.**

**3.- Atrapamiento o encapsulación.**

**4.- Entrecruzamiento ( frecuentemente utilizado en combinación con 1 y 3 ).**

## **ADSORCION**

Este es probablemente el más simple de todos los métodos. La enzima adsorbida es retenida sobre un soporte sólido por fuerzas diferentes a la de unión covalente, fuerzas físicamente débiles como las de Van der Waals o fuerzas de dispersión. El sitio activo de la enzima adsorbida no es afectado y conserva toda su actividad durante la adsorción( fig. 1.4.1.). Sin embargo, la enzima puede ser fácilmente desorbida por cambios en el ambiente, como pH, fuerza iónica y/o temperatura.

Debido a lo anterior se debe tener un control estricto de las condiciones de proceso para evitar una desorción de la enzima. Una gran ventaja de este método, es la simplicidad en preparar la inmovilización de la enzima. La adsorción puede ser estabilizada por entrecruzamiento con glutaraldehído.

En la mayoría de los casos la inmovilización es alcanzada rápida y sencillamente, sólo con poner en contacto la solución donde se encuentra contenida la enzima con la superficie adsorbente. El adsorbente debe poseer una gran afinidad por la enzima y causar una mínima desnaturalización. Debe tener también una gran capacidad de unión proteica. Las enzimas han sido adsorbidas sobre muchos soportes diferentes como polímeros orgánicos, sales minerales, óxidos metálicos, carbón activado y gran cantidad de resinas de intercambio iónico.

Las resinas de intercambio iónico ( DEAE-Sephadex y DEAE-Celulosa ) han sido utilizadas exitosamente como adsorbentes para enzimas en procesos industriales.

Utilizando los principios de cromatografía de afinidad, se han desarrollado técnicas más específicas para la adsorción de enzimas.

Existen muchos ejemplos de preparaciones de enzimas adsorbidas.

Estos incluyen la adsorción de :

- a) Ribonucleasas sobre Dowex-50 resina de intercambio iónico.
- b) Asparaginasa, quimotripsina y tripsina sobre CM-celulosa.
- c) Aminoacilasa, pepsina y varias proteasas sobre DEAE-celulosa.
- d) Invertasa sobre carbón.

Algunos de los soportes más utilizados para la adsorción de enzimas

son entre otros :

ALUMINA	GELES DE FOSFATO
AMBERLITA	CARBON ACTIVADO
BENTONITA	CM-CELULOSA
COLAGENO	CM-SEPHADEX
DEAE-CELULOSA	DEAE-SEPHADEX
VIDRIO	SILICA-GEL

Las ventajas y desventajas más comunes de la inmovilización por adsorción son :

- Bajo costo.
- Método sencillo.
- La estructura de la enzima no se modifica.
- Pueden existir la adsorción en multicapas, lo que limita el acceso de sustrato a las capas internas.
- Se pueden presentar problemas de altas caídas de presión en reactores biológicos.
- Puede ocurrir desorción de la enzima.
- La enzima adsorbida esta en equilibrio con la enzima en solución y puede ser desplazada por otras especies iónicas ( protefmas o sustratos ).

## **ENLACE COVALENTE**

Este es el método más ampliamente estudiado para la inmovilización de enzimas ( fig. 1.4.1. ).

Como consecuencia de la unión covalente de las proteínas a uno de los soportes sólidos, una o más cadenas de aminoácidos de la proteínas son modificados. Esta modificación no debe ocurrir en los aminoácidos que son esenciales para la actividad enzimática.

Para retener la actividad enzimática después de la inmovilización es conveniente elegir una reacción de acoplamiento que no afecte el sitio activo de la enzima. Este, puede ser protegido llevando a cabo la inmovilización en presencia de un sustrato o inhibidor competitivo. Las enzimas inmovilizadas por entrecruzamiento, donde las moléculas están unidas covalentemente a otras, utilizando agentes bifuncionales como el glutaraldehído o el bis diazo benzídico -2-2- ácido disulfónico, se han preparado en tres diferentes maneras:

- (1) Enzimas con enlace entrecruzado con glutaraldehído para formar un agregado insoluble.
- (2) Adsorción de una enzima sobre una superficie acompañada de un enlace entrecruzado.
- (3) Impregnación de un material poroso con la enzima, seguida de un enlace entrecruzado.

Existen varios grupos funcionales de la enzima que podrían reaccionar con soportes activados, en la práctica sólo cuatro han sido utilizados.

- 1) **FUNCIONES AMINADAS**
- 2) **GRUPOS CARBOXILO**
- 3) **ANILLOS FENOLICOS DE LA TIROSINA**
- 4) **GRUPOS SULFHIDRILO DE LA CISTEINA**
- 5) **GRUPOS OXHIDRILO DE LA SERINA, TREONINA Y TIROSINA**
- 6) **GRUPOS IMIDAZOL DE LA HISTIDINA**
- 7) **GRUPOS INDOL DEL TRIPTOFANO**

Como se mencionó anteriormente los más utilizados han sido los amino, carboxilos, o los anillos aromáticos de la tirosina y la histidina.

Las reacciones más comunes que se emplean son :

- 1) **Reacciones de acilación.-** En éstas intervienen los grupos amino de las proteínas y grupos acilantes del polímero como son el cloruro de azida o anhídridos de ácido. Estas reacciones se llevan a cabo a pH entre 7.5 -8.5 y a 4°C.
- 2) **Reacciones de arilación y alquilación.-** En éstas probablemente intervienen los grupos amino de las proteínas y sustituyentes en los polímeros derivados del anillo aromático que tienen halógenos como sustituyentes y otros adicionales.

3) **Método de bromuro cianógeno.-** Este es el método más empleado para la preparación en el laboratorio de enzimas inmovilizadas así como para preparar adsorbentes insolubles para cromatografía de afinidad. El polisacárido se hace reaccionar con el bromuro de cianógeno a pH entre 10 y 11.5.

4) **Reacciones de carbamitación y tiocarbamitación.-** Muchos polímeros contienen como grupos funcionales isocianatos, isotiocianatos los que han sido utilizados como reactivos para la carbamitación o la tiocarbamitación para acoplar proteínas al soporte.

5) **Reacciones de amidinación.-** Recientemente se han empleado polímeros que contienen grupos imido éster para la inmovilización de proteínas. Estos reactivos pueden ser preparados tratando nitrilos de polímeros con alcoholes y HCl.

6) **Reacciones con grupos aldehído del polímero.-** Se han descrito varios polímeros que contienen como grupo funcional un aldehído. Los grupos aldehído reaccionan con los grupos amino de la proteína para formar una base de Schiff, los grupos sulfhidrilo e imidazol pueden sufrir reacciones similares. Las reacciones secundarias pueden tener efectos dañinos sobre la actividad de la enzima.

- 7) **Reacciones con glutaraldehído.-** Este reactivo bifuncional puede reaccionar con polímeros que contengan grupos amino primarios para obtener matrices que contengan a la función aldehído.
  
- 8) **Reacción de diazociación.-** Este tipo de reacciones puede efectuarse entre la proteína y un polímero que contenga grupos funcionales aril-diazonio.
  
- 9) **Reacciones de intercambio tiol-disulfuro.-** Los derivados poliméricos de disulfuros pueden ser usados para las reacciones reversibles de acoplamiento a los grupos sulfhidrilo de la proteína a través de la reacción de intercambio tiol-disulfuro.
  
- 10) **Reacciones de condensación de cuatro componentes.-** En este tipo de reacciones se condensan cuatro componentes como carboxilato, amino, aldehído e isocianato para formar una amida N-sustituida.

### ***VENTAJAS DE LA INMOVILIZACION POR ENLACE COVALENTE***

- a) **Método útil para la inmovilización de enzimas de alto costo.**
- b) **Método útil para evitar la presencia de enzimas en el producto.**
- c) **Se puede aumentar la estabilidad de la enzima.**

### ***DESVENTAJAS DE LA INMOVILIZACION POR ENLACE COVALENTE***

- a) **Las enzimas pueden ser desnaturalizadas por solventes orgánicos.**
- b) **Las enzimas pueden ser desnaturalizadas por las condiciones de reacción en que se efectúe el enlace.**
- c) **Los rendimientos de inmovilización son menores por que las cantidades de enzima inmovilizada son pequeñas.**

## **ATRAPAMIENTO Y ENCAPSULACION**

La inmovilización por atrapamiento o encapsulación (fig. 1.4.1.) difiere de otros métodos de inmovilización en el aspecto en que las moléculas de la enzima están libres en solución, pero restringidas dentro del espacio intersticial de geles o membranas. La estructura del polímero de atrapamiento debe ser suficientemente estrecha para prevenir que la enzima se filtre a través de él y al mismo tiempo debe ser suficientemente dispersa para permitir al sustrato y al producto la penetración.

Consecuentemente, sólo las reacciones que utilizan reactivos relativamente pequeños pueden ser utilizadas exitosamente utilizando preparaciones para enzimas atrapadas.

La técnica de atrapamiento más ampliamente utilizada ha sido la oclusión de enzimas o células microbianas en poliacrilamida. Las enzimas pueden ocluirse dentro de geles de matrices entrecruzadas llevándose acabo la reacción de polimerización, permitiendo así la formación de un gel en solución acuosa que contiene a la enzima. El gel resultante puede ser mecánicamente dispersado en partículas de tamaño definido. La polimerización del glóbulo ( Bead polimerization ) es realizada en un sistema de dos fases. Una solución acuosa que contiene la enzima y un monómero acrílico que esta dispersado en una fase hidrófoba ( p. ej. tolueno o cloroformo ) y la subsecuente polimerización de la emulsión produce las partículas esféricas bien definidas ( 35,59 ).

Las enzimas atrapadas en fibras porosas pueden ser alcanzadas de la siguiente forma (20): Un solvente orgánico ( no miscible en agua ) que contiene un polímero formado por fibras es emulsificado con una solución acuosa de la enzima y esta emulsión pasa a través de finos poros dentro de un coagulante el cual precipita el polímero en una forma filamentosa. El polímero más comunmente utilizado es el triacetato de celulosa, pero también otros derivados de celulosa pueden ser usados.

Finalmente, las enzimas pueden ser encapsuladas en microcápsulas semipermeables de nylon ( 11 ) o en liposomas ( 28 ). Las preparaciones de enzimas microencapsuladas sólo han sido utilizadas en aplicaciones médicas.

Entre las ventajas y desventajas de este método tenemos:

- a) **Baja actividad enzimática sobre macromoléculas.**
- b) **Puede ocurrir pérdida de la enzima en condiciones drásticas de formación de gel.**
- c) **La estructura de la enzima no se ve modificada.**
- d) **Toda la cantidad de enzima que se pone en contacto con el gel es inmovilizada.**
- e) **Las propiedades mecánicas del gel dificultan su manejo en la industria.**
- f) **No se pueden predecir cambios en las propiedades intrínsecas de la enzima.**
- g) **La actividad de la enzima inmovilizada depende en forma importante del método de preparación.**

## **ENTRECRUZAMIENTO**

Las enzimas pueden ser inmovilizadas por entrecruzamiento intramolecular dentro de largos agregados utilizando reactantes bi o multifuncionales. Aunque este método es relativamente simple, no ha sido utilizado ampliamente debido a las dificultades en controlar el tamaño y las propiedades mecánicas del gel.

El entrecruzamiento de la enzima ( fig. 1.4.1. ), sin embargo, ha probado su valor en combinación con otras técnicas de inmovilización. Las enzimas adsorbidas en soportes sólidos han sido entrecruzadas para incrementar la estabilidad de la enzima inmovilizada y de esta forma minimizar la filtración de la enzima a través del soporte ( 83 ): El entrecruzamiento de enzimas atrapadas ha mejorado la estabilidad de éstas ( 12).

El entrecruzamiento intramolecular entre la enzima de interés y una proteína inerte como el colágeno ( 39 ), gelatina ( 75 ) o la quitina ( 76 ) han recibido mayor atención a últimas fechas.

Este método es en general, una forma de enlace covalente a un soporte insoluble.

En cada uno de estos casos el agente de entrecruzamiento generalmente utilizado es el glutaraldehído, un dialdehído que reacciona con las aminas primarias para formar uniones estables. La naturaleza exacta de este tipo de unión no ha sido todavía bien establecida.

Ha sido sugerida la posible adición de un grupo amino hacia las dobles cadenas etílicas del alfa-3-insaturado oligomérico de glutaraldehído.

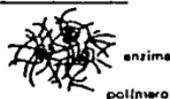
La inmovilización de enzimas por unión covalente o por entrecruzamiento intramolecular elimina algunas de las dificultades relacionadas con otras formas de inmovilización. A la inversa, la unión covalente altera la química de las enzimas y puede afectar su reactividad. En algunos casos, el sitio activo de la enzima puede ser afectado por la reacción de fijación al soporte, llevando esto a la pérdida de actividad enzimática.

# FIG. 1.4.1. METODOS DE INMOVILIZACION ENZIMATICA

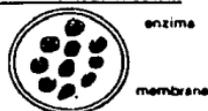
## ADSORCION



## ATRAPAMIENTO



## MICROENCAPSULACION



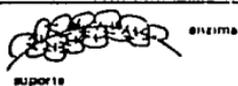
## INTERCAMBIO IONICO



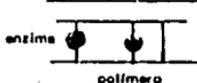
## ENTRECRUZAMIENTO



## ADSORCION Y ENTRECRUZAMIENTO



## COPOLIMERIZACION



## UNION COVALENTE



**TABLA 1.4.2****COMPARACION DE DIFERENTES TECNICAS DE INMOVILIZACION ( 66 )**

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>ADSORCION</b>	<b>UNION COVALENTE</b>	<b>ATRAPAMIENTO Y ENCAPSULACION</b>	<b>ENTRECRUZAMIENTO</b>
<b>PREPARACION</b>	SIMPLE	DIFICIL	DIFICIL	REGULAR
<b>FUERZA DE UNION</b>	DEBIL	FUERTE	REGULAR	FUERTE
<b>ACTIVIDAD DE LA ENZIMA</b>	REGULAR	ALTA	BAJA(a)	BAJA
<b>REGENERACION DEL SOPORTE</b>	POSIBLE	DIFICIL(b)	IMPOSIBLE	IMPOSIBLE
<b>COSTO DE LA INMOVILIZACION</b>	BAJO	ALTO	REGULAR	REGULAR
<b>APLICACION</b>	SI	NO	SI	NO
<b>PROTECCION DE LA ENZIMA VS. ATAQUE MICROBIANO O PROTEOLITICO</b>	NO	NO	SI	UN POCO

a) ACTIVIDAD ESPECIFICA BAJAS OBSERVADO FRECUENTEMENTE DEBIDO A BARRERAS DIFUSIONALES.

b) ALGUNOS SOPORTES PUEDEN SER REGENERADOS (VIDRIO POROSO).

**TABLA 1.4.3.**  
**ENZIMAS INMOVILIZADAS**

ENZIMAS	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN	REFERENCIAS
ALCOHOL DESHIDROGENASA	GEL DE POLIACRILAMIDA	(56)
AMINOACILASA	ADSORCIÓN A DEAE-CELULOSA	(3)
ALFA-AMILASA	INCLUSIÓN EN GEL DE POLIACRILAMIDA	(53)
ALFA-AMILOGLUCOSIDASA	ADSORCIÓN A DEAE-CELULOSA	(1)
ASPARAGINASA	ENLACE ENTRECROZADO	(5)
BROMELINA	ENLACE COVALENTE (CMC-AZIDA)	(85)
CATALASA	CELULOSA	(42)
CREATIN-QUINASA	DEAE-CELULOSA	(21)
COLINESTERASA	INCLUSIÓN EN RESINA SILÍSTICA	(67)
DIASTASA	GEL DE POLIACRILAMIDA	(2)
ENOZASA	INCLUSIÓN EN GEL DE POLIACRILAMIDA	(6)
FICCINA	CMC-AZIDA	(15)
B-GALACTOSIDASA	ADSORCIÓN A DEAE-CELULOSA	(74)
PAPAINA	ENLACE COVALENTE	(13)
PEROXIDASA	ENLACE COVALENTE (CMC)	(55)
RENINA	CELAROSA	(13)
URIASA	MICROCAPSULA (NYLON Y COLOIDON) ADSORCIÓN EN ESTEREOATO DE BARIO	(14)
QUIMOTRIPSINA	ENLACE COVALENTE	(6)

## ***CARACTERISTICAS DE ENZIMAS INMOVILIZADAS***

Las propiedades de una enzima inmovilizada pueden ser un poco diferentes a las características de la enzima en forma soluble. Los cambios pueden ser atribuidos a alteraciones de la molécula de la enzima o a la naturaleza física y química del soporte. Por lo tanto, la transformación de la enzima de una catálisis homogénea a heterogénea puede producir ciertos cambios en las propiedades catalíticas.

La estabilidad es la parte medular de una enzima inmovilizada para operar un proceso a gran escala. La mayoría de las enzimas incrementan su estabilidad cuando son inmovilizadas. Este incremento de la estabilidad puede ser el resultado de reducir la inactivación por la conformación de la enzima, así como a una reducción en el ataque de solutos reactivos debido a una protección estérica.

La estabilidad operacional es un parámetro muy importante dentro de un proceso que emplea sistemas con enzimas inmovilizadas. El incremento en la estabilidad no solo reduce el costo de la enzima, sino también reduce el costo de operación, ya que el reactor se necesita recargar con ésta en un número menor de ocasiones.

La estabilidad de operación es expresada como el tiempo medio de vida, el cuál es el tiempo requerido para que se pierda el 50% de la actividad inicial. El tiempo medio de vida, puede ser expresado, como una ecuación de velocidad incorporando la constante de desactivación.

La estabilidad de almacenamiento adquiere gran importancia cuando la preparación de la enzima es usada sólo intermitentemente o durante un almacenamiento prolongado. Si se observa una buena estabilidad de almacenamiento, grandes lotes de enzimas pueden ser producidos y de esta forma, el costo de preparación se verá reducido.

Las enzimas inmovilizadas pueden también mostrar cambios en la estabilidad térmica y de pH.

### ***COMPORTAMIENTO CINETICO***

Cuando una enzima es inmovilizada a un soporte sólido los parámetros cinéticos de la reacción son alterados de una forma considerable. Los parámetros cinéticos básicos como  $K_m$  y  $V_{max}$  son diferentes. Los cambios son causados por efectos estéricos, microambientales y resistencias difusionales.

Las limitaciones estéricas que afectan la actividad enzimática son especialmente observadas cuando la enzima inmovilizada esta catalizando una reacción donde el sustrato posee un alto peso molecular. Ha sido mostrado que se obtienen diferentes tamaños de péptidos cuando la misma proteína fué hidrolizada por una enzima inmovilizada que por una enzima en solución ( 46 ).

Así, el comportamiento cinético puede ser modificado y obtenerse un producto de composición completamente diferente cuando una enzima inmovilizada cataliza la reacción.

El ambiente alrededor de una enzima inmovilizada frecuentemente difiere al de la enzima en solución. Si la enzima es unida a un soporte polielectrolítico, las interacciones electrostáticas conducirán a una distribución desigual de iones entre la fase del soporte y la fase líquida. En un soporte polianiónico, la concentración de iones con cargas positivas será mayor que en la solución externa. Consecuentemente, el pH dentro de un polímero será menor que el del medio y el pH de la enzima inmovilizada tenderá a tener un mayor valor. En un polímero policatiónico, la situación opuesta prevalece, el pH óptimo para la enzima inmovilizada es menor que para la enzima en su estado natural.

Los efectos electrostáticos pueden ser frecuentemente reducidos o eliminados, ajustando la fuerza iónica del "buffer".

Debido a la naturaleza heterogénea de las enzimas unidas a un soporte, la reacción catalítica es solo una parte en una secuencia de pasos importantes que dan como resultado la transformación global de sustrato a producto.

Primero, el sustrato, los iones, inhibidores y cofactores, se difunden a través de la capa del fluido alrededor del soporte sólido ( difusión externa ). Este paso es seguido por la reacción con la superficie de la enzima unida al soporte ( difusión interna ).

Con estos pasos en mente, se puede identificar un gran número de factores que afectan la cinética de las enzimas inmovilizadas, factores que pueden causar un comportamiento diferente en relación con las enzimas en solución. Estos factores pueden ser agrupados en dos categorías básicamente:

*1) Efectos de inmovilización sobre la molécula de la enzima.*

*2) Efectos sobre el microambiente de las enzimas inmovilizadas.*

Dentro del primer punto nosotros podemos considerar los cambios conformacionales, interacciones con el soporte, efectos estéricos los cuales pueden no sólo afectar la velocidad de la reacción sino también la especificidad y estabilidad.

El segundo grupo de factores, frecuentemente llamados " Efectos microambientales " incluyen efectos de partición electrostáticos y resistencias difusionales tanto interna como externa.

Las limitaciones en la transferencia de masa pueden causar alteraciones en la dependencia a la temperatura de la enzima inmovilizada, variación en la velocidad de reacción con el sustrato, producto, "buffer", aún más, cambios en la estabilidad operacional de la enzima.

## **CAPITULO II**

### **REACTORES ENZIMATICOS**

El diseño, operación, simulación y escalamiento de bioreactores constituye el elemento esencial de un gran número de bioprocesos, cuya eficiencia depende de un adecuado diseño y operación del sistema de reacción. El diseño de reactores donde el elemento catalítico es constituido por una enzima, se ve influenciado por una gran diversidad de factores que afectan de manera importante su funcionamiento.

#### **2.1. TIPOS DE REACTORES**

Diferentes tipos de reactores pueden ser utilizados para procesos con enzimas en estado libre o inmovilizadas.

El uso de enzimas en solución por lo general se lleva a cabo en operaciones batch en tanques con agitación. Para procesos continuos con enzimas en solución se puede utilizar una membrana de ultrafiltración en el proceso.

Un gran número de diferentes tipos de reactores han sido utilizados con enzimas inmovilizadas a nivel laboratorio y a nivel industrial. La clasificación de éstos puede ser hecha de acuerdo al modo de operación ( reactores discontinuos y continuos ).

## **REACTORES DISCONTINUOS**

El reactor discontinuo, es el tipo de reactor más comunmente utilizado cuando enzimas solubles son utilizadas en la catálisis. En la mayoría de los casos no se intenta recobrar la enzima.

El reactor discontinuo, es sencillo y necesita un equipo experimental reducido. Los reactores discontinuos ( fig. 2.1.1. ), son esencialmente tanques agitados en los cuales la enzima y el sustrato se introducen a un mismo tiempo, se mezclan, se deja que reaccionen un tiempo determinado, y finalmente el reactor es drenado, para una posterior separación de la enzima y el producto. Esta es una operación no estacionaria en la que la composición va variando con el tiempo, aunque en cada instante es uniforme en todos los puntos del reactor. Si se emplean enzimas solubles, éstas son separadas por una desnaturalización térmica generalmente. Este método es económico cuando la enzima es barata. Por otro lado, cuando enzimas de un costo elevado son utilizadas en una operación discontinua, una separación adicional es requerida para recobrar la solución donde se encuentra la enzima. Durante el proceso en el que se intenta recobrar la enzima en solución existe una apreciable pérdida de la enzima inmovilizada, así también, puede ocurrir una desactivación de la enzima, debido a los repetidos ciclos de recuperación. Es por lo tanto, obvio que este tipo de reactores tienen un potencial limitado en la industria donde se utilicen enzimas inmovilizadas para la catálisis. Además, el uso de reactores discontinuos no aprovecha las ventajas de la operación en continuo, que es una de las mayores ventajas de los sistemas con enzimas inmovilizadas.

Existe una amplia variedad de métodos para recobrar enzimas inmovilizadas de operaciones discontinuas. En algunos casos la enzima puede ser recuperada por ultrafiltración sin haber sido inmovilizada. Se han recuperado enzimas en solución, utilizando polímeros de alto peso molecular, los cuáles permitieron la separación por ultrafiltración aún en la presencia de los productos de la reacción y que éstos tenían un peso molecular relativamente alto ( 62 ).

Las enzimas inmovilizadas también pueden ser recuperadas por filtración y sedimentación. También se han inmovilizado enzimas sobre partículas magnéticas, las cuáles son posteriormente recuperadas magnéticamente utilizando la tecnología existente.

Otros estudios han incluido el uso de reactores con tanque agitado en el cuál la enzima inmovilizada fué encerrada en contenedores de malla fijada al agitador para así obtener una agitación sin desgaste de la enzima inmovilizada ( fig. 2.1.1.)( 30 ).

La compañía italiana Snam Progetti, ha elegido el uso de reactores con recirculación para explotar su proceso de atrapamiento de enzimas en los poros de fibras sintéticas húmedas de hilo ( como el triacetato de celulosa o el trimetil-poliglutamato ).

Muchas de estas técnicas pueden ser utilizadas para retener la enzima inmovilizada en reactores continuos de tanque agitado ( RTCA ). En general, la mayoría de los ejemplos anteriores fueron originalmente usados en RTCA.

## **REACTORES DE FLUJO CONTINUO**

Los reactores de flujo continuo pueden ser agrupados en dos tipos básicamente: El reactor continuo de tanque agitado ( RTCA ) y el reactor de flujo pistón ( RFP ).

El reactor de flujo pistón ( fig. 2.1.1.), es también conocido como reactor de flujo tapón, de flujo tubular ideal, y de flujo uniforme. Se caracteriza porque el flujo del fluido a través de él es ordenado, sin que ningún elemento del mismo sobrepase o se mezcle con cualquier otro elemento situado antes o después de aquél, en realidad, en este reactor puede haber mezcla lateral de fluido, pero nunca ha de existir mezcla o difusión a lo largo de la trayectoria del flujo. La condición necesaria y suficiente para que exista flujo en pistón es que el tiempo de residencia en el reactor sea el mismo para todos los elementos del fluido, es decir, se debe tener la misma velocidad y gradiente de concentración sólo en la dirección del flujo.

Un método para el uso de enzimas inmovilizadas es empaacar el catalizador dentro de una columna y hacer que el sustrato fluya a través de la columna, el producto es obtenido a la salida. Reactores de este tipo son conocidos como " Reactores de Lecho Empacado ". Este tipo de reactor es ideal cuando el perfil de velocidad de flujo a través de la sección transversal de la columna es completamente plano ( flujo pistón ). En la práctica, el flujo de sustrato puede entrar por la parte superior o inferior de la columna.

Quando el sustrato es adicionado por la parte alta de la columna las partículas empacadas tienden a juntarse, obstruyendo la misma.

En los reactores de lecho empacado, cargados con partículas catalíticas, los siguientes mecanismos tienen lugar:

- 1.- *Dispersión en la fase principal del fluido.*
- 2.- *Transferencia de masa del sustrato a la superficie externa de la partícula catalizadora.*
- 3.- *Difusión interna del sustrato en los poros del catalizador.*
- 4.- *Adsorción sobre los sitios activos en la superficie del poro.*
- 5.- *Reacción en la superficie del poro seguida de la difusión de los productos de la reacción.*

Si la velocidad de difusión en el poro es menor a la de la velocidad intrínseca de la reacción, los gradientes de concentración se producirán en el poro de la partícula y consecuentemente la velocidad observada será diferente comparada con la velocidad evaluada en la concentración en la superficie. El factor de efectividad ( $\eta$ ) se define como la relación de la velocidad de reacción observada (con limitación por difusión) y la velocidad de reacción sin limitaciones difusionales. El valor de  $\eta$  es una medida de la limitación por difusión. Para  $\eta < 1$  la conversión es limitada por la difusión, para  $\eta = 1$  la conversión es limitada por la velocidad de reacción y las limitaciones por difusión son despreciables.

Para sistemas que tienen elevados valores de calores de reacción, los gradientes de temperatura se desarrollan a través de la interfase y la partícula. Por lo que el factor total de efectividad dependerá de los gradientes térmicos así como de los gradientes de concentración.

La mayoría de los lechos empacados son formados por la aglomeración de partículas porosas, en los cuales existen estructuras de este tipo bidispersas. Los poros de las partículas son llamados microporos y los poros entre el aglomerado de partículas se conocen como macroporos. Para cada sistema la resistencia a la difusión en las regiones de macro y microporo pueden tener un efecto significativo sobre la velocidad de reacción.

Las resistencias difusionales pueden ser observadas a diferentes niveles en enzimas inmovilizadas. Estas resistencias varían dependiendo de la naturaleza del material donde son empacadas (poroso o no poroso), condiciones hidrodinámicas alrededor del lecho y distribución de la enzima en éste.

Si la resistencia a la difusión tiene un efecto significativo sobre la velocidad de la reacción enzimática, esta dependerá de la velocidad relativa de la velocidad de reacción y velocidad de difusión la cual es expresada por el número de Damkohler ( $Da$ ).

$$Da = \frac{\text{Velocidad máxima de reacción}}{\text{Velocidad máxima de difusión}} = \frac{V_m}{K_L[S_b]} \quad (1)$$

Donde  $V_m$  = Velocidad máxima de reacción.

$S_b$  = Concentración de sustrato.

$K_L$  = Coeficiente de transferencia de masa

La velocidad de conversión enzimática puede ser limitada por la difusión del sustrato o reacción dependiendo del número de Damkohler. Si  $Da \gg 1$ , la velocidad de difusión es la limitante; para  $Da \ll 1$ , la velocidad de reacción es la limitante y para  $Da \text{ aprox. } = 1$  las resistencias difusionales y la velocidad de reacción son comparables.

La selección del tipo de empaque para la enzima y que posteriormente se utilizará en un reactor depende de varios factores. Las propiedades deseables son:

- 1.- Volumen desocupado grande para disminuir la caída de presión.*
- 2.- Químicamente inerte al sustrato.*
- 3.- Área superficial grande por unidad de empaque.*
- 4.- Peso ligero pero resistente.*
- 5.- Buena distribución del fluido.*
- 6.- Buen humedecimiento.*

Además de dichas propiedades, existe una limitación del empaque y es que su tamaño no debe ser mayor que un octavo del diámetro de la torre. Si el tamaño del empaque para una torre es demasiado grande, provocará una disminución en el rendimiento de operación debido al escalamiento a lo largo de la pared de la columna del reactor.

Los factores principales que influyen en la caída de presión son : el tamaño y forma del empaque , la densidad y velocidad de masa del sustrato. El principal efecto de la velocidad del líquido es llenar los espacios vacíos y, de este modo, disminuir el espacio posible para el flujo de gas ( aire ). Al sustrato retenido en los poros del empaque se le conoce como retención dinámica. Para una velocidad de sustrato constante, la caída de presión aumenta con el incremento del gasto del aire. Si la cantidad de aire llega a ser lo suficientemente grande, se alcanza una región en la que ocurre una retención significativa del sustrato en el lecho.

Esta se define como la región de carga. Después de alcanzar el punto de carga de la columna, la caída de presión aumenta más rápidamente con el aumento del flujo de gas hasta que se alcanza el punto de inundamiento. El inundamiento se conoce como la condición a la cual todo el espacio vacío en el empaque se llena con el sustrato y este no fluirá a través de la columna. Esto produce una caída de presión de 2 a 3 in de agua por pie ( 1.63 a 2.45 kPa/ m ) de la profundidad del lecho. En estas condiciones no se puede operar un reactor de lecho empacado. Una gran reducción del régimen de flujo, que por lo general se conoce como la relación de disminución, provocará el acanalamiento a través del lecho empacado y con frecuencia tendrá como efecto un pobre rendimiento del reactor. Sin embargo esto depende del rango de operación.

## **DISPERSION AXIAL**

Como se ha visto con anterioridad el reactor de flujo pistón se basa en la suposición de que el sustrato fluye a través de éste, con un perfil plano de velocidades, y que cada porción del sustrato permanece el mismo tiempo en el reactor. Pero en la práctica muchas veces este no es el caso. La no uniformidad del empaque, la mala distribución del líquido, diferentes velocidades de flujo, la difusión turbulenta y molecular, pueden llevar a trayectorias preferentes, o a regiones en donde el flujo del líquido es anormalmente grande. Como resultado, no ocurre únicamente el flujo de tipo pistón dentro del fluido, hay además, un movimiento relativo, paralelo al eje de la torre, este movimiento se describe en forma diferente como "Dispersión axial" y "Retromezclado".

El modelo de dispersión es utilizado para describir los reactores tubulares no ideales, en este modelo existe una dispersión axial del sustrato, es decir, hay una prolongación del tiempo de permanencia en el flujo unidireccional, debido al alejamiento del fluido de tipo tapón, las partículas del fluido se mueven hacia adelante, pero a diferentes velocidades.

El número de Peclet (  $Pe$  ) es un número adimensional que relaciona :

$$Pe = \frac{\text{Transferencia de masa por convección}}{\text{Transferencia de masa por difusión}} = \frac{(V)(L)}{Da} \quad (2)$$

Donde:  $V$  = Velocidad superficial

$Da$  = Coeficiente de dispersión efectiva

$L$  = Longitud del reactor

Existen dos tipos diferentes de número de Pe en uso común. Nosotros podemos llamar  $Pe_r$  al número de Peclet para el reactor, este utiliza el largo del reactor (  $L$  ) para nombrar así las características de longitud en éste. El otro tipo de número de Pe puede ser llamado el no. de Peclet para fluidos  $Pe_f$ , este utiliza las características de longitud que determina el comportamiento mecánico del fluido, en un lecho empacado esta longitud es el diámetro de la partícula (  $dp$  ). Para lechos empacados es preferible utilizar el promedio de la velocidad intersticial  $=V / \epsilon$  este es comunmente utilizado como el término de velocidad para lecho empacado.

El no. de Pe, por lo tanto, para lechos empacados es igual a :

$$Pe = \frac{V \cdot dp}{\epsilon Da} \quad (3)$$

Donde  $\epsilon$  = Fracción de espacios vacíos.

El número de Peclet se encuentra en la mayoría de las correlaciones relacionado con el no. de Reynolds (  $Re$  ), debido a que ambas entran dentro del comportamiento mecánico del fluido.

$$Re = \frac{dp \cdot V \cdot \rho}{\mu} = \frac{\text{Fuerzas de inercia}}{\text{Fuerzas viscosas}} \quad (4)$$

Al recíproco del no. de  $Pe = Da / (V) (L)$  se le conoce como número de dispersión.

RETROMEZCLADO

Una fuente común de ineficiencia en los reactores que utilizan el flujo pistón es el retromezclado. El retromezclado es el flujo en retroceso en una dirección opuesta a la del flujo neto.

El significado del retromezclado, el cuál se encuentra presente en todos los reactores reales, puede ser evaluado calculando el número de dispersión (44). El número de dispersión es definido como  $D_a / V L_c$ , donde  $D_c$  es el coeficiente de dispersión,  $u$  es la velocidad intersticial y  $L_c$  es la profundidad del lecho.

El número de dispersión puede ser escrito en términos del número de Peclet :

$$D_a / V L_c = d_p / L_c NPe \quad (5)$$

Una correlación basada en datos experimentales entre el número de Peclet y el número de Reynolds para lechos empacados (17):

$$NPe \theta / Z = 0.20 + 0.11 NR_e^{0.48}$$

(6)

Donde:  $Z = 1$  para lecho empacado

Para número de Reynolds menores a 10 en lechos empacados el número de Peclet es aproximadamente igual a 0.5. Este resultado puede ser obtenido de la ecuación (6) sin tomar en cuenta el término donde se encuentra el número de Reynolds ( cuando éste es muy pequeño) y tomando una fracción de espacios vacíos de 0.4.

## **DISTRIBUCION DE TIEMPOS DE RESIDENCIA PARA REACTORES DE LECHO EMPACADO**

### **GENERALIDADES**

En los reactores que son empacados con enzimas, el sustrato usualmente no tiene un flujo uniforme a través de éste. Más aún, pueden existir secciones en el lecho empacado las cuales ofrecen poca resistencia al flujo, esto da como resultado que una porción del fluido pueda tener " Trayectorias preferentes ". Consecuentemente las moléculas que siguen estas trayectorias no permanecen mucho tiempo en el reactor, como aquellas que fluyen a través de las regiones de alta resistencia al flujo. Nosotros podemos observar que existe un distribución de tiempo ( fig. 2.1.2.) en el que las moléculas del sustrato permanecen en el reactor en contacto con el catalizador ( tiempo de residencia ).

En un reactor de flujo pistón ideal todas las moléculas del sustrato dejan el reactor exactamente en la misma cantidad de tiempo. El tiempo en que éstas permanecen dentro del reactor es conocido como tiempo de residencia de las moléculas de sustrato en el reactor.

La distribución de tiempos de residencia puede afectar el funcionamiento del reactor.

## **DETERMINACION EXPERIMENTAL DE TIEMPOS DE RESIDENCIA**

La distribución experimental de tiempos de residencia es realizada inyectando un químico inerte ( indicador ), al reactor a un tiempo  $t = 0$  y después se mide la concentración trazada (  $C$  ), en la línea de flujo como una función del tiempo. El indicador debe poseer propiedades físicas similares a las del sustrato y debe ser completamente soluble, además, no debe ser adsorbido por las paredes u otras superficies en el reactor. Los materiales coloreados son comunmente utilizados.

### **CARACTERISTICAS DE LA DISTRIBUCION DE TIEMPOS DE RESIDENCIA**

La fig. ( 2.1.3a ) representa la distribución de tiempos de residencia cerca de la idealidad para un reactor empacado de flujo pistón. La fig. ( 2.1.3.b ) representa la distribución de tiempos de residencia para un reactor de lecho empacado con canalizaciones y zonas muertas. La forma en que esto puede ocurrir es mostrado en la siguiente figura ( 2.1.3c ). Las zonas muertas sirven para reducir el volumen efectivo del reactor, indicando que el volumen activo del reactor es menor que el esperado.

A la fecha, el tipo de reactor más ampliamente utilizado en operaciones a nivel industrial, es el reactor de lecho empacado. Por ejemplo, The Clinton Corn Processing Company que utiliza glucosa- isomerasa inmovilizada para la conversión de glucosa a fructosa y Tanabe Seiyaku Company con aminoacilasa unida a DEAE- Sephadex para la obtención de D-L- aminoácidos hacen uso de reactores tipo lecho empacado.

Debido a su alta eficiencia y facilidad de operación, el reactor de lecho empacado probablemente continuará dominando las aplicaciones comerciales a gran escala.

Se han estudiado y operado reactores tubulares de membrana para la hidrólisis de almidón por  $\beta$ -Amilasa. El almidón y la enzima fueron contenidos por la membrana, la cuál retuvo el almidón, pero fué permeable a el producto (maltosa) ( 9 ). Existen variantes a este tipo de reactor como el monolito, desarrollado para catálisis automáticas, o los sistemas de membrana enrollada y retromezclado, que poseen una estructura más abierta con un mayor volumen ( 25, 38 ). Esta estructura puede ser una ventaja en el caso de enzimas con una actividad específica alta donde las distancias difusionales cortas darán un factor de efectividad mayor. Para enzimas costosas, un factor de efectividad alto, puede ser esencial para aceptar ciertos procesos comerciales desde un punto de vista económico. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones industriales que utilizan compuestos enzimáticos tienen un factor de efectividad alto, con un tamaño de partícula aceptable. En este caso, la actividad por unidad de volumen, será mayor que para un reactor de diseño abierto.

Otra vez lo sencillo y el bajo costo de el lecho empacado son atractivos. Para el caso de partículas inorgánicas que pueden ser regeneradas para su reutilización, el costo del soporte puede ser en algunos casos mínimo.

Reactores tubulares con paredes enzimáticamente activas son claros ejemplos de reactores de lecho empacado. En aplicaciones analíticas donde la eficiencia no es importante o en aplicaciones biomédicas donde bajas caídas de presión y baja turbulencia es necesaria, los reactores tubulares pueden ser usados.

## **REACTORES DE LECHO FLUIDIZADO.**

En un reactor de lecho fluidizado como el que se muestra en la figura (2.1.1. ), el líquido fluye hacia arriba a través de un cilindro vertical largo. Las enzimas inmovilizadas son suspendidas por fuerzas de arrastre ejercidas por el sustrato, el cuál pasa de la parte más baja a la parte más alta de columna a una velocidad fija, la cual debe ser lo suficientemente grande para subir y mezclar las partículas de la enzima inmovilizada en la columna. Debido a que las partículas de la enzima inmovilizada son más densas que el medio de reacción ellas permanecen en la parte baja de la columna, a pesar de que la velocidad de flujo es elevada y estas pudieran ser transportadas a la parte más alta. Así, de esta manera realizando un balance cuidadoso entre las condiciones de operación y las características de la enzima inmovilizada, estas son retenidas en el reactor mientras el medio fluye a través de la torre continuamente.

De esta forma cuando el sustrato es introducido a la columna como una línea de flujo el lecho de partículas es transformado a un estado de fluidización, haciendo que las partículas de la enzima inmovilizada se separen y muevan en la columna. La columna adquiere la apariencia de un líquido hirviendo. Este efecto produce el mezclado del catalizador con el sustrato.

De acuerdo con las características físicas de un sistema con enzima inmovilizada y de el sustrato empleado en el reactor, dos problemas pueden presentarse. El primero es que la reacción pueda ser altamente exotérmica, lo que conduce a un sobrecalentamiento. El segundo es que grandes capas de sustrato puedan estar presentes alrededor de las partículas catalizadores, resultando en un ineficiente mezclado de este con las enzimas.

Ambos problemas pueden resolverse, incrementado la velocidad de flujo a través del reactor. Esto conlleva a una reducción del tiempo de residencia en el reactor, por lo tanto se obtendrá un grado menor de conversión del sustrato. Esta disminución en el grado de conversión, puede resolverse empleando un reactor más largo, o una serie de reactores interconectados. Otra alternativa, es la de reciclar parte de la línea del producto en el reactor, el tiempo de residencia efectivo del sustrato dentro de este aumentará, a pesar de las altas velocidades de flujo a un costo menor del que si se tuvieran que usar varios reactores.

## REACTOR DE TANQUE AGITADO CONTINUO.

El reactor de tanque continuo agitado (RTCA) fig. ( 2.1.1. ), se le conoce también como reactor de mezcla completa, reactor de retromezcla y como su nombre lo indica es el reactor en el que su contenido esta perfectamente agitado y su composición en cada instante es la misma en todos los puntos del reactor. Por consiguiente, la corriente de salida de este reactor tiene la misma composición que la del fluido dentro del mismo.

En este tipo de reactores la velocidad de reacción es afectada por la velocidad de agitación y la velocidad de flujo. La velocidad de flujo controla el tiempo de residencia de la enzima-sustrato. Es muy importante la elección del tamaño del tanque, la actividad enzimática, y la velocidad de adición del sustrato, ya que el porcentaje de conversión de sustrato a producto puede ser ajustado según las necesidades, p. ej. para velocidades bajas de flujo, un tamaño de reactor grande ( tiempos de residencia elevados ) y una elevada actividad enzimática nos conducirá a altas cantidades de producto.

Otro factor importante es la velocidad de agitación, ya que esta afecta directamente la velocidad de difusión del sustrato a la enzima, por lo que el reactor aumentará su eficiencia. La agitación, sin embargo puede causar la ruptura del soporte debido a las fuerzas de agitación o por el choque continuo de una partícula con otra.

Algunas enzimas necesitan de oxígeno para poder realizar su actividad catalítica, por lo que es necesario suministrar el gas dentro del reactor.

Existen varios tipos de agitadores como los de propela, turbina, paleta etc. El flujo modelo puede ser dependiente del tipo de agitación. En el caso de utilizar el RTCA para reacciones líquido-gas, la fase líquida y las partículas son bien mezcladas en un tanque a una velocidad de agitación lo suficientemente elevada para obtener una mezcla homogénea, mientras que la fase gaseosa puede ser inyectada en un flujo pistón.

La enzima inmovilizada puede permanecer dentro del reactor por filtración de la línea de producto, incorporando a este un tanque, donde la enzima inmovilizada sobre partículas magnéticamente activas y reteniendo la enzima en un campo magnético ( lo cuál también sirve para agitar las partículas) o inmovilizar la enzima en las paletas del agitador figura ( 2.1.1.a ).

Los RTCA pueden ser combinados con procesos de ultrafiltración que permiten el uso de enzimas inmovilizadas solubles en el reactor fig.( 2.1.1.b ). Esta clase de operación resultaría útil cuando el sustrato es insoluble o coloidal.

## **CONSIDERACIONES TEORICAS.**

En ocasiones las enzimas utilizadas para diferentes procesos necesitan la presencia de oxígeno por lo que se hace necesario la inyección de éste al reactor. En casos donde la enzima sea aerobia el reactor más recomendado es el de tanque agitado con suministro de oxígeno ( aereación ).

## **AERACION.**

La velocidad de transferencia de masa entre las fase líquida y gaseosa esta fuertemente influenciado por la solubilidad del gas en el líquido. El oxígeno es poco soluble en soluciones acuosas, en consecuencia en muchos procesos aerobios el suministro de oxígeno es el factor crucial determinante de la velocidad de reacción por lo que la transferencia de masa del oxígeno tiene un papel importante en el diseño del reactor.

La transferencia de oxígeno a la enzima durante la aereación del reactor implica la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire a la solución, la transferencia de este gas a través del medio a la célula y finalmente la absorción de oxígeno por la enzima.

La velocidad de transferencia de masa esta dada por la diferencia que existe en la concentración de oxígeno disuelto entre la interfase líquido gaseosa y el volumen total del líquido.

$$\text{Velocidad de transferencia de masa} = ( K_L ) ( \text{Area} ) ( C_I - C_L ) \quad (7)$$

Donde:

$C_I$  = Concentración de oxígeno disuelto en la interfase líquido - gas

$C_L$  = Concentración de oxígeno disuelto en la superficie del líquido.

$K_L$  = Coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida.

En los procesos de transferencia de masa, la masa de material ( C ), transferido a través del área interfacial por unidad de tiempo es llamado " flux de masa " de C el cual se escribe por  $N_c$ :

$$N_c = K_L ( C_l - C_L ) \quad (8)$$

La transferencia de masa es afectada por elementos de líquido ricos en C en la interfase siendo remplazada por bajas concentraciones de C de la superficie total del líquido. Lo que nos lleva a la siguiente ecuación:

$$K_L = 2 \sqrt{ ( D_C / \pi t_{tr} ) } \quad (9)$$

Donde :

$D_C$  = Coeficiente de difusión de C en el líquido.

$t_{tr}$  = Es el tiempo para el cual cada elemento es expuesto a la interfase líquido-gas.

Para evaluar el coeficiente de transferencia de masa (  $K_L$  ), se necesita el valor de tiempo de exposición (  $t_{tr}$  ), el cual debe ser medido experimentalmente o calculado de las propiedades físicas del sistema. Una forma común de estimar  $t_{tr}$  en un sistema con burbujas es, por ejemplo, tomar el tiempo en que una burbuja recorre una distancia igual a su propio diámetro. El valor del tiempo de exposición es por lo tanto el diámetro de la burbuja dividido entre su velocidad.

El recipiente el cual contiene a la enzima inmovilizada es usualmente un cilindro con el agitador montado a través del eje del mismo, la forma básica del recipiente es descrito por la relación entre la altura y el diámetro. El tipo más barato de construcción tiene una relación de aproximadamente uno, debido a que de esta forma el cilindro necesita una menor área superficial para contener un volumen dado.

## **AGITACION.**

El agitador esta constituido por lo general de una o más turbinas montadas sobre un soporte alineado con el eje del cilindro. El soporte es usualmente suspendido sobre el recipiente y entra a través del mismo por medio de un sello mecánico.

Para que el mezclado se mantenga homogéneo, es preferible un diámetro largo, una baja velocidad del agitador con un número pequeño de hojas. Sin embargo, si se necesita disolver el aire, la acción del agitador rompe el flujo de éste en burbujas y previene que estas mismas se aglomeren en unas de mayor tamaño, por lo cual un sistema con elevada velocidad de agitación y una velocidad del agitador menor con un número elevado de hojas es preferible.

## SELECCION DEL AGITADOR.

Un método para seleccionar el sistema de dispersión aire-líquido consiste en calcular el poder de disipación del gas como una función de la velocidad superficial del mismo y la velocidad de el agitador, así como de el diámetro de este, estos factores son comúnmente utilizados en las correlaciones para controlar el nivel de oxígeno disuelto.

La siguiente correlación muestra un ejemplo de lo descrito con anterioridad:

$$KLa = P^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5} \quad (10)$$

Donde:

**P** = Poder de disipación del agitador

**V<sub>s</sub>** = Velocidad superficial del gas

**N** = Velocidad del agitador en revoluciones por unidad de tiempo.

## **TRANSFERENCIA DE CALOR.**

Para que las reacciones se produzcan a velocidades deseadas, debe suministrarse o eliminarse energía del reactor. Durante los procesos de control de la temperatura existe una transferencia de calor. En la catálisis se produce energía que se disipa en forma de calor lo que tiende a elevar la temperatura del proceso. También se puede generar calor como resultado de la energía mecánica necesaria para los procesos de aereación y agitación. Cuando los bioreactores funcionan a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, se necesita una fuente de calor para mantenerla. Las exigencias netas del calentamiento o enfriamiento del reactor se determinarán realizando un balance entre los procesos que generan y consumen calor siendo necesario usualmente utilizar intercambiadores.

En los reactores la transferencia de calor se produce mediante circulación de agua a través de una chaqueta por el exterior del recipiente o mediante serpentines situados dentro de los reactores. Las reacciones aerobias son usualmente exotérmicas y las reacciones anaerobias presentan un caracter endotérmico.

## **PRINCIPIOS BASICOS DE TRANSFERENCIA DE CALOR.**

La ecuación que define a la transferencia de calor puede ser expresada

como:

Velocidad de transferencia = Coef. de transf. de calor (Area de transferencia) (Fuerza transmisora)

(11)

En el caso de transferencia de calor, la fuerza transmisora es la diferencia de temperaturas ( $\Delta T$ ), como por ejemplo, entre la superficie fría y el fluido que es enfriado, de forma que la velocidad de transferencia de calor ( $q$ ), a través del área ( $A$ ), es dada por:

$$q = h A (\Delta T) \quad (12)$$

Donde:

$h$  = Coeficiente de transferencia de calor entre el fluido y la superficie

El valor del coeficiente de transferencia de calor depende de varios factores, como la conductividad térmica, calor específico, la densidad y viscosidad del fluido, así como del grado de agitación.

## GRUPOS ADIMENSIONALES

Los grupos dimensionales, que son importantes en los procesos donde se utilicen reactores de tanque agitado, involucran la transferencia de masa y la transferencia de calor..

a) Número de Sherwood ( Sh ).- Es la relación entre la transferencia de masa total y la transferencia de masa difusional. El número de Sh se define como:

$$(13) \quad Sh = KLdL/D_c = (\text{Coeficiente de transferencia de masa}) (\text{Características de longitud}) / \text{Difusividad}$$

b) Número de Schmidt ( Sc ).- Significa la relación entre el momentum de difusividad y la difusividad de la masa. Este número esta descrito por las propiedades físicas del fluido, por lo tanto es constante para un fluido newtoniano a temperatura, presión y composición constante. Por ejemplo Sc es aproximadamente 400 a 25°C para un sistema oxígeno-agua, para fluidos no newtonianos se debe utilizar la viscosidad aparente (  $\mu_A$  ):

$$Sc = \mu / \rho D_c = \text{viscosidad} / (\text{densidad}) (\text{difusividad}) \quad (14)$$

c) Número de Péclet ( Pe ).- Es la relación entre la transferencia de masa por convección y transferencia de masa difusional:

$$Pe = V dL / D_c = (\text{Velocidad}) (\text{diámetro}) / \text{Difusividad} \quad (15)$$

d) **Número de Reynolds ( Re ).-** Representa la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas, en sistemas con agitación el número de Reynolds que se utiliza es el del agitador, el cual incluye la velocidad de este ( N ) en revoluciones por unidad de tiempo.

$$Re = dV\rho / \mu = N D^2\rho/\mu = ( \text{Velocidad} \times \text{diámetro} \times \text{densidad} ) / \text{Viscosidad} \quad (16)$$

e) **Número de la potencia ( Np ).-** Significa la relación del poder disipado dentro del sistema ( P ) por un agitador hacia el poder inercial, expresado en términos del diámetro del agitador ( Di ), velocidad del agitador ( N ) y densidad del fluido ( ρ ).

$$Np = P / \rho N^3 Di^5 \quad (17)$$

f) **Número de aeración ( NA ).-** Muestra la relación entre la velocidad del flujo volumétrico de gas (G) y la capacidad del agitador para dispersar el gas dentro del líquido:

$$NA = G / NDi^3 = \frac{\text{Velocidad volumetrica del flujo gaseoso.}}{\text{Capacidad de dispersión del agitador}} \quad (18)$$

g) **Número de Nusselt ( Nu ).-** Relaciona la transferencia de calor por convección y conducción:

$$Nu = h D / k = \frac{\text{Coeficiente convectivo de transferencia de calor ( Diámetro )}}{\text{Conductividad térmica}} \quad (19)$$

## DISTRIBUCION DE TIEMPOS DE RESIDENCIA EN RTCA.

En un RTCA donde se emplee un gas ( oxígeno ), la superficie gaseosa entra al reactor en forma de burbuja mientras que el sustrato es alimentado al reactor por medio de una tubería. La reacción tiene lugar en la interfase líquido -gas de las burbujas. La fase líquida continua puede ser considerada como una mezcla perfecta y la velocidad de reacción es proporcional al área superficial de la burbuja que entra en contacto con la enzima. El área superficial de una burbuja en particular depende del tiempo en que ésta permanezca en el reactor.

Algunas burbujas de gas escapan del reactor casi inmediatamente, mientras que otras pasan suficiente tiempo dentro de él, de forma que estas son completamente consumidas. El tiempo que la burbuja permanece en el reactor es conocido como tiempo de residencia del gas en el reactor.

En el RTCA la alimentación introducida dentro del reactor a un tiempo dado se mezcla completamente con el material alrededor del mismo, en otras palabras, parte del sustrato que entra al RTCA lo deja casi inmediatamente, debido a que el material es continuamente desalojado del reactor, otra parte del sustrato permanecerá en el reactor casi siempre debido a que todo el material nunca es removido totalmente del reactor a un solo tiempo. La distribución de tiempos de residencia de un reactor de tanque continuo agitado es una característica de la mezcla que ocurre en el reactor.

## FIG. 2.1.1. TIPOS DE REACTORES



De lota



Continuo agitado

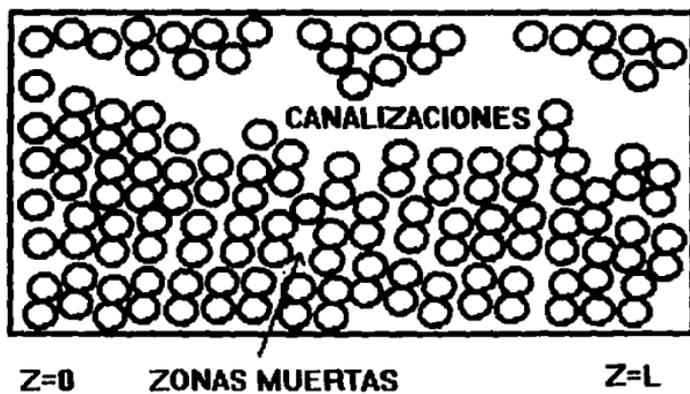


Lecho  
fluidizado

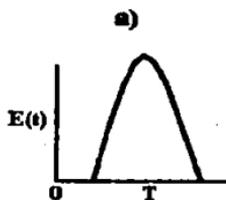


Lecho  
empacado

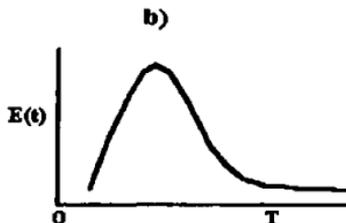
FIG. 2.1.2. TIEMPOS DE RESIDENCIA



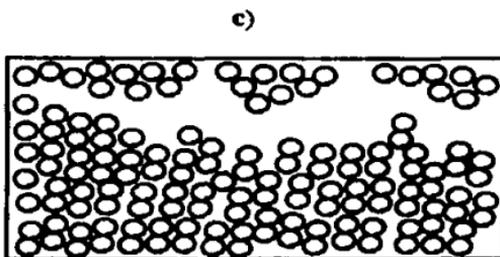
## FIG. 2.1.3. DISTRIBUCION DE TIEMPOS DE RESIDENCIA



REACTOR CERCA DE LA IDEALIDAD



REACTOR DE LECHO EMPACADO CON ZONAS MUERTAS Y CANALIZACIONES



REACTOR DE LECHO EMPACADO

## **2.2. CRITERIOS PARA LA SELECCION DE REACTORES**

En el diseño de un proceso, una de las primeras decisiones que debe ser hecha es si el reactor operará en continuo o discontinuamente. Por lo visto con anterioridad es obvio que en la mayoría de los casos es preferible un proceso en continuo. Sin embargo, el capital que se necesita para un proceso en continuo es mucho mayor que el que se necesita para un proceso discontinuo. También debe ser tomado en cuenta que un reactor batch tiene una mayor flexibilidad y puede ser usado en varios procesos, mientras que un proceso en continuo requiere de un diseño más específico del reactor.

Muchos factores influirán en el tipo de reactor continuo que sea escogido, a continuación se muestra una tabla en la que se mencionan las características más importantes en la elección de un reactor.

TABLA 2.2.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ELECCIÓN DE UN REACTOR PARA

ENZIMAS INMOVILIZADAS

**FENÓMENOS DE FLUJO**

- Agitación para un reactor RTCA
- Aeración
- Flujo pistón ( reactor de lecho empacado )

**TRANSFERENCIA DE CALOR**

Reacciones endotérmicas o exotérmicas  
Diseño de sistemas de enfriamiento o de generación de calor.

**TRANSFERENCIA DE MASA**

- Si la enzima es aerobia o anaerobia (Transferencia de oxígeno)
- Resistencias difusionales en la enzima inmovilizada

**CARACTERÍSTICAS INTRÍNECAS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA**

- Tipo de inmovilización ( membranosa, fibrosa esférica )
- Reemplazo y/o regeneración de la enzima
- pH óptimo
- Temperatura óptima
- Cinética de reacción

**COSTOS**

Volumen del reactor en función de la cantidad a procesar.  
Material de construcción.

Desde el punto de vista de la cinética de reacción, los reactores de lecho empacado tienen ventajas sobre los reactores de tanque agitado para la mayoría de las reacciones. Además la alta eficiencia de un reactor de lecho empacado, el cual frecuentemente aprovecha el funcionamiento del flujo pistón, que tiene una gran ventaja sobre los demás.

En un RTCA, donde se lleve a cabo una reacción con cinética normal, la velocidad promedio de reacción es menor que en un reactor de lecho empacado debido a las diferentes concentraciones operacionales de el sustrato.

El flujo pistón y los reactores batch son más eficientes que el reactor continuo de tanque agitado, cuando la cinética de reacción es mayor del orden cero. La ventaja del flujo pistón sobre el RTCA es aún mayor en el caso donde existe inhibición por el producto. Existen casos, como en el de inhibición por sustrato, donde los reactores de retromezclado son superiores, pero éstos son pocos en la práctica. El reactor de lecho empacado por lo general tiene una mayor pérdida de la enzima por unidad de volumen del reactor.

Un aspecto relacionado con la eficiencia y pérdida de la enzima es el de la limitación por transferencia de masa. Aunque en muchos casos prácticos, el lecho empacado no es una desventaja, los otros tipos de reactores pueden hacer uso de partículas más pequeñas para inmovilizar la enzima o membranas delgadas para evitar las limitaciones por difusión.

Los reactores con tanque agitado, ya sea continuo o batch y los de lecho fluidizado someten a la enzima inmovilizada a tratamientos más severos que los reactores de lecho empacado.

En un reactor de tanque agitado el riesgo de perder la actividad de la enzima debido a la desintegración o solubilización del soporte por el agitación mecánico es mucho mayor que en el reactor de lecho empacado. Por lo tanto, solo en preparaciones relativamente durables de enzimas inmovilizadas debe ser utilizado el RTCA.

Por otra parte, preparaciones de enzimas inmovilizadas sobre partículas muy pequeñas pueden dar como resultado caídas de presión inaceptables y problemas de taponamiento en reactores de lecho empacado. En este caso las complicaciones pueden ser evitadas utilizando un reactor de lecho fluidizado.

Los requerimientos operacionales no han sido todavía tomados en cuenta. En primer lugar un reactor batch presenta mayores ventajas para las reacciones que requieren transferencia de oxígeno o la adición de una base o un ácido para el control del pH. También el control de la temperatura es fácilmente alcanzado en un reactor de tanque agitado, así como en los reactores con recirculación y de lecho fluidizado. La estabilidad operacional es probablemente mayor en los reactores de lecho empacado.

Finalmente, las características del reactante pueden dictar la elección de un determinado tipo de reactor. Partículas, sustratos coloidales y productos son procesados preferentemente en reactores de lecho fluidizado o con tanque agitado, donde el taponamiento del reactor es probable que no suceda, como sucedería en un reactor de lecho empacado.

### 2.3. ECUACIONES DE DISEÑO PARA UN REACTOR IDEAL

El conocimiento de la cinética de reacción y la forma de operación del reactor puede ser usada para predecir el comportamiento de un reactor ideal para enzimas inmovilizadas.

Normalmente tres tipos de reactores ideales pueden ser encontrados: reactores batch ( bien agitados ), reactores de agitación continua y reactores de flujo pistón.

El siguiente tratamiento cinético, utiliza la cinética de Michaelis - Menten, pero el mismo tratamiento matemático se puede realizar para otros tipos de cinética enzimática . La velocidad de reacción para la ecuación irreversible de Michaelis-Menten puede ser escrita como:

$$v = \frac{k E S}{K_m + S} \quad (1)$$

Donde  $v = -V_s (dS / dt)$  (  $V_s$  es el volumen de la solución de sustrato y  $t$  es el tiempo ),  $k$  es el número de recambio ( constante ),  $E$  es la cantidad de enzima,  $S$  es la concentración de sustrato ( reactantes ),  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten.

La ecuación (1) puede ser integrada desde un tiempo cero hasta un tiempo  $t$  para obtener la siguiente expresión para una reacción batch.

$$kEt / V_s = S_0 X - K_m \ln ( 1 - X ) \quad (2)$$

Donde  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato y  $X = (S_0 - S) / S_0$ .

Para un reactor ideal de flujo pistón donde cada elemento de volumen del fluido a través del reactor se comporta como un reactor batch infinitesimal, no existe mezcla con los elementos adyacentes del fluido, la ecuación (2) puede ser escrito de la siguiente manera:

$$kE / Q = S_0 X - K_m \ln (1 - X) \quad (3)$$

Donde  $Q$  es la velocidad del flujo volumetrico

Para un reactor continuo, un balance de materia da la siguiente expresión:

$$v = Q (S_0 - S) \quad (4)$$

Donde  $S_0$  es la concentración del sustrato a la entrada del reactor y  $S$  es la concentración en el reactor y a la salida de éste.

El lado derecho de las ecuaciones (1) y (4) puede ser igualado de la siguiente forma:

$$Q (S_0 - S) = k E S / K_m + S \quad (5)$$

Esta ecuación puede ser rearmada y el término de conversión fraccional  $X$  sustituido para dar la ecuación final:

$$k E / Q = X [ K_m / (1 - X) + S_0 ] \quad (6)$$

Ecuaciones similares para la cinética de Michaelis-Menten en las que hay inhibición por sustrato e inhibición por producto son mostradas en la tabla (2.3.1.)

Generalmente las ecuaciones de velocidad o los datos de operación de un reactor pueden ser expresados gráficamente como conversión vs tiempo de residencia. En el caso de catálisis heterogénea, como en la catálisis de la enzima inmovilizada, el tiempo de residencia debe ser normalizado de forma que refleje la cantidad de enzima presente. El tiempo de residencia normalizado puede ser expresado en muchas formas. Para un reactor batch, la ecuación puede ser expresada como :

$$Wt/V_s \text{ ó } E_a t / V_s \quad (7)$$

Donde  $W$  = Peso de la enzima inmovilizada y  $E_a$  = Actividad enzimática total. Para un reactor continuo, el tiempo de residencia normalizado puede ser escrito como:

$$W/Q \text{ ó } E_a/Q \quad (8)$$

**TABLA 2.3.1**

**ECUACIONES INTEGRADAS PARA REACTORES ENZIMATICOS, TIPO  
DE CINETICA Y ECUACION DE VELOCIDAD**

**MICHAELIS - MENTEN**

$$v = k E S / K_m + S$$

**FLUJO PISTON:**

$$k E / Q = S_0 X \cdot K_m \ln (1 - X)$$

**FLUJO CONTINUO:**

$$k E / Q = X [ K_m / (1 - X) + S_0 ]$$

**MICHAELIS MENTEN ( REVERSIBLE ) .**

$$v = \frac{k E (S - P/K)}{K_m + S + K_m P / K_p}$$

**FLUJO PISTON:**

$$k E / Q = X_e S_t' [ (1 - K_m / K_p) (X_t' - X_i) + K_m / S_t' + (1 - X_e) (K_m K_e / K_p) \ln (X_e - X_i / X_e - X_t) ]$$

**FLUJO CONTINUO:**

$$k E / Q = \frac{(X_t' - X_i) (K_m + S_t' - K_t' S_t' + K_m S_t' X_t' / K_p)}{(1 - X - X_t' / K)}$$

**INHIBICION POR SUSTRATO**

$$v = k E / (1 + K_m / S + S / K_m)$$

**FLUJO PISTON:**

$$k E / Q = S_0 X - K_m \ln (1 - X) + S_0^2 X / K_m - S^2 X^2 / 2 K_m$$

**FLUJO CONTINUO:**

$$k E / Q = X S_0 [ 1 + K_m / S_0 (1 - X) + S_0 (1 - X) / K_m ]$$

TABLA 2. 3. 1. (continuación)

ECUACIONES INTEGRADAS PARA REACTORES ENZIMATICOS TIPO DE  
CINETICA Y ECUACION DE VELOCIDAD

INHIBICION COMPETITIVA POR PRODUCTO

$$v = kES / [ S + Km(1 + P/Ki) ]$$

**FLUJO PISTON:**

$$kE/Q = So(1 - Km/Ki)(X' - Xi) - (Km + Km St'/Ki) \ln(1 - Xe)/(1 - Xi)$$

**FLUJO CONTINUO:**

$$kE/Q = (X' - Xi) [ St'(1 - X') + (Km + km X' St') / Ki ] / (1 - X')$$

Donde :

$k$  = Número de recambio

$Ki$  = Constante de inhibición por producto.

$Km$  = Constante de Michaelis-Menten

$Km'$  = Constante de inhibición por sustrato

$Kp$  = Constante ( Tipo Michaelis - Menten pero para la reacción en sentido contrario)

$$Xi = (St' - So) / St'$$

$Xe$  =  $Xi'$  en el equilibrio

$$Xi' = (St' - S) / St'$$

## **TRANSFERENCIA DE MASA**

### ***Transferencia de masa interna***

Los efectos de resistencia a la transferencia de masa interna surgen cuando la enzima queda atrapada en un polímero. Si la reacción es realizada por una enzima inmovilizada en un material poroso, el gradiente de concentración de sustrato es hacia el centro del poro, la concentración es mayor en la superficie y va disminuyendo al aumentar la distancia. Para la mayoría de sistemas con enzimas inmovilizadas con limitaciones por difusión en el poro, es razonable asumir que existen condiciones en estado estacionario.

La ecuación diferencial que describe la difusión en estado estacionario de una reacción química en una esfera:

$$d^2S / dr^2 + (2/r)(dS / dr) = v_i / D_{eff} \quad (9)$$

Donde  $r$  es la distancia radial de la esfera,  $v_i$  es la velocidad intrínseca de la reacción ( usualmente es una función de la concentración del sustrato ), y  $D_{eff}$  es la difusividad efectiva. Esta ecuación puede ser resuelta analíticamente solo cuando  $v_i = K_v S^m$ , donde  $m$  es una constante. Los casos como la cinética de Michaelis - Menten deben ser resueltos numéricamente.

La relación entre la velocidad de reacción observada (  $V_{max}$  obtenida) y la velocidad si no hubiese limitación por difusión (  $V_{max}$  teórica ), se denomina factor de efectividad (  $\eta$  ), en los sistemas enzimáticos el factor de efectividad puede ser menor a uno.

Se han desarrollado un gran número de gráficas relacionando el factor de efectividad con diversos tipos de módulos generalizados. Estos módulos se clasifican en dos grupos principalmente, los que dependen del conocimiento intrínseco de la cinética y los que utilizan la información de la velocidad de reacción observada.

El factor de efectividad (  $\eta$  ) es expresado gráficamente como una función del módulo general (  $M$  ), el cuál puede ser aplicado a cinética tipo Michaelis - Menten asumiendo  $Deff$  como una constante a varios niveles de  $S / K_m$  ( 7 ). Este módulo el cuál relaciona las constantes intrínsecas de reacción, para geometría plana es:

$$M = L ( V_m / 2K_m Deff )^{1/2} ( S / K_m + S ) [ S / K_m - \ln ( 1 + S / K_m ) ]^{1/2}$$

(10)

Donde  $M$  es mayor que 2, (  $\eta$  ) =  $1 / M$ . La gráfica para varios niveles es mostrada en la fig. ( 2.3.1 a).

Un ejemplo del mismo tipo de gráficas para un módulo que depende de las velocidades de reacción observadas es mostrado en al fig. (2.3.1 b) (68).

El módulo es el siguiente:

$$\phi_1 = L^2 / Deff [ 1 / Vc (dn / dt) ] 1 / S' \quad (11)$$

El cuál puede ser modificado para una geometria esférica,  $Deff$  es una constante = Difusividad efectiva, y  $L$  = espesor medio de la particula . Este módulo en particular es muy útil en la práctica debido a que el término  $(1 / Vc)( dn / dt)$  se obtiene fácilmente, ya que es la velocidad de reacción observada por unidad de volumen del soporte poroso. La siguiente correlación empírica es útil para la estimación de la difusividad efectiva (72):

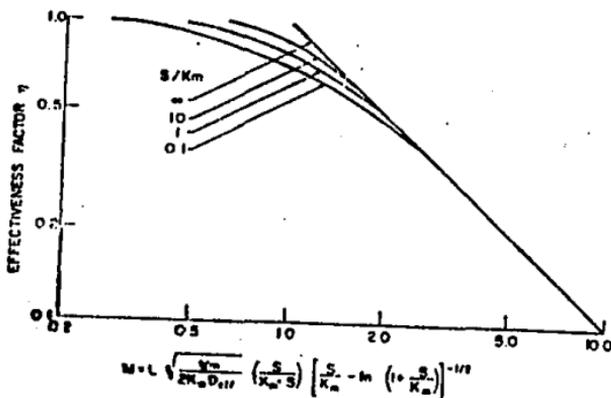
$$\log ( Deff / Do\theta ) = -2.0 \xi \quad (12)$$

Donde :  $Do$  = Difusividad,  $\xi$  = Relación entre el diámetro critico del soluto que se difunde y el diámetro del poro,  $\theta$  = Porosidad ( fracción de espacios vacios ).

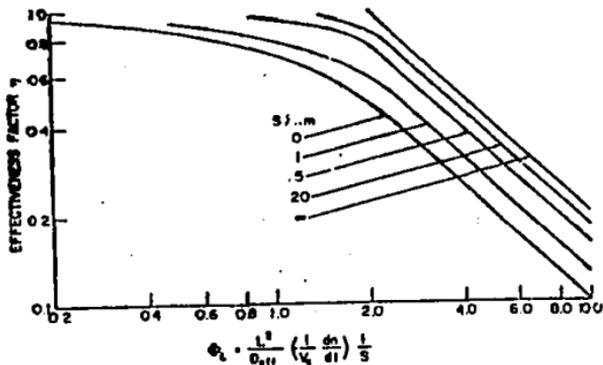
Para cada tipo de módulo el mayor problema es determinar o estimar la difusividad efectiva. Si el diámetro de la molécula de sustrato que se difunde es una fracción significativa del diámetro del poro, la difusividad efectiva disminuirá.

# FIG. 2.3.1 FACTOR DE EFECTIVIDAD

## a) Cinética tipo Michaelis-Menten



## b) En función de las velocidades de reacción



## **TRANSFERENCIA DE MASA EXTERNA**

Los efectos difusionales de transferencia de masa externa provienen de la presencia de una película del líquido alrededor de la partícula de enzima inmovilizada.

Existen varios métodos para determinar los efectos de la transferencia de masa externa sobre las velocidades aparentes de reacción.

La velocidad de transferencia de masa ( $v$ ) sobre la superficie hasta el total de la solución puede ser escrita como:

$$v = K_m a_m (S_b - S_s) \quad (13)$$

Donde :  $K_m$  es el coeficiente de transferencia de masa ,  $a_m$  es el área superficial por unidad de volumen,  $S_b$  es la concentración total de sustrato, y  $S_s$  es la concentración de sustrato en la superficie. La velocidad de transferencia de masa, bajo condiciones en estado estacionario, debe ser igual a la velocidad de reacción de la partícula en la superficie o la velocidad aparente en la partícula. El coeficiente de transferencia de masa ( $h$ ) puede ser estimado por diferentes correlaciones. Una de las más reciente es la siguiente ( 89 ):

$$\text{Para } 0.0016 < NRe < 55 \text{ y } 0.035 < \phi < 0.75 \quad (14)$$

$$h = ( 1.09 / 0 ) NRe^{-2/3}$$

Para  $55 < NRe < 1500$

$$h = (0.250 / \theta) NRe^{-0.31} \quad (15)$$

Donde:  $NRe = d_p G / \mu$ ,  $J = K_m \rho / NSc^{2/3}$ ,  $NSc = \mu / D_o \rho$  es la viscosidad del líquido,  $G$  es la velocidad de masa por unidad superficial a través de la sección transversal del lecho,  $\rho$  es la densidad del líquido,  $D_o$  es la difusividad del sustrato,  $\theta$  es la fracción de espacios vacíos, y  $d_p$  es el diámetro de la partícula.

El problema de transferencia de masa ha sido estudiado en reactores de lecho fluidizado (72), para los cuales se cita la siguiente correlación:

$$(K_m d_p / D)^2 = 4.0 + 1.21 NPe^{2/3}, \quad (16)$$

Donde:  $NPe = d_p u / D$  y  $u$  = velocidad del fluido. Otra correlación encontrada es (72):

$$K'_m (NSc)^{2/3} = 0.38 \frac{(g_m \Delta \rho)^{1/3}}{\rho^2} \quad (17)$$

Donde  $K'_m$  es el valor de  $K_m$  para una esfera a velocidad terminal,  $\Delta \rho$  es la diferencia entre la densidad ( $\rho$ ) de la partícula y el fluido, y ( $g$ ) es la aceleración de la gravedad.

En reactores con tanque agitado, la partícula atrapada en el fluido puede limitar la velocidad de transferencia de masa, aún más, si la velocidad de agitación aumenta.

## **CAPITULO III**

# **ELECCION DEL REACTOR PARA LA INMOVILIZACION DE LA ENZIMA INVERTASA**

### **3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA**

El efecto del pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de sustrato y producto sobre la enzima inmovilizada son ejemplos de parámetros cinéticos que deben ser determinados y comparados con los datos obtenidos para la enzima libre.

Estos estudios deben ser realizados de la misma forma para la enzima libre y para la enzima inmovilizada.

Se pueden realizar ciertas predicciones de como serán afectados algunos parámetros, particularmente cuando la enzima es adsorbida en un soporte con cierta carga eléctrica. El pH y la estabilidad de una enzima adsorbida iónicamente puede cambiar a un pH más alcalino o más ácido dependiendo si el soporte es cargado negativamente o positivamente. El cambio es atribuido a el microambiente entre el soporte cargado y la enzima.

La determinación inicial de el valor de  $K_m$  de la enzima es importante, y la inmovilización de ésta puede dar como resultado el aumento o disminución de éste parámetro. Un valor más bajo de  $K_m$  al momento de la inmovilización puede tener ventajas prácticas ya que la velocidad de reacción aumentará a bajas concentraciones de sustrato. Por otro lado, un incremento en el  $K_m$  al momento de la inmovilización significa que se necesita una concentración mayor de sustrato para alcanzar la misma velocidad de reacción que en la enzima libre.

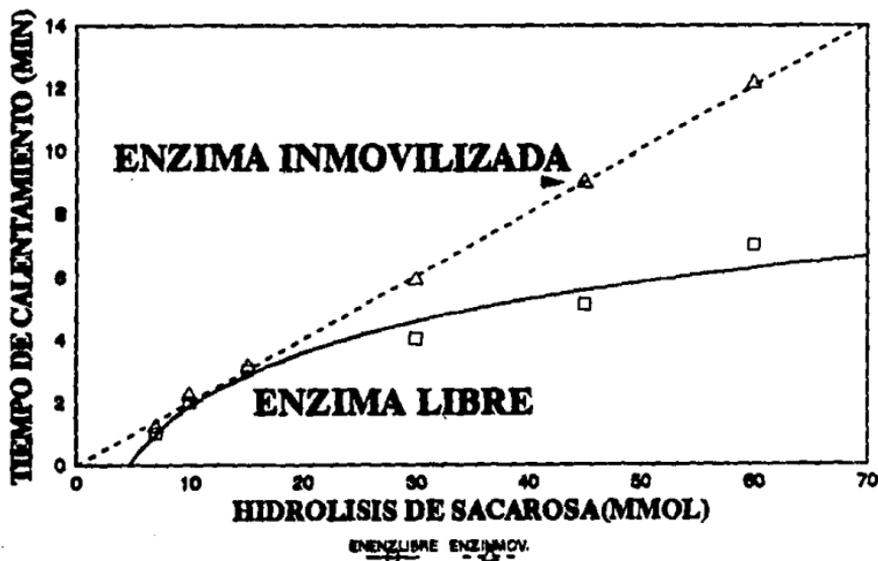
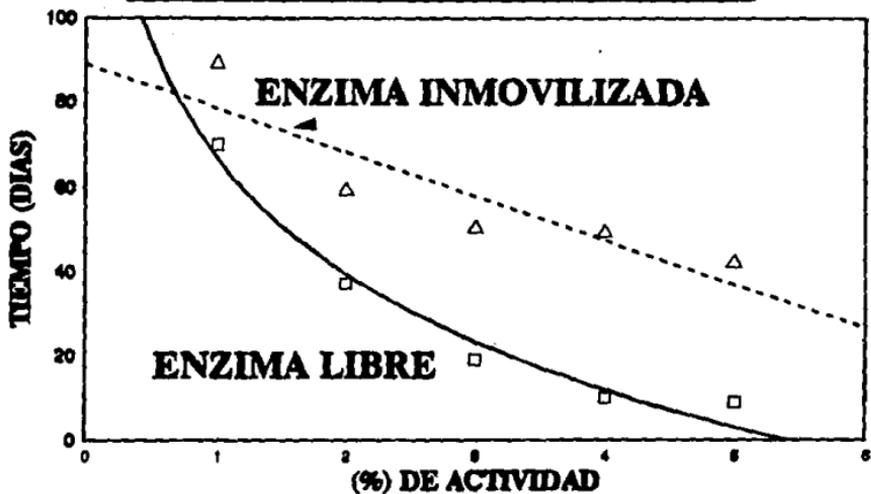
Otra vez, los cambios de este parámetro son atribuidos a los efectos del microambiente en la región donde se encuentra la enzima inmovilizada. Este efecto puede ser demostrado reduciendo el tamaño de la partícula en la que la enzima es inmovilizada o incrementando la velocidad de agitación de las partículas, lo cuál disminuye el valor de  $K_m$ . La naturaleza iónica del soporte puede influenciar en los valores de  $K_m$ , particularmente cuando el sustrato posea una carga. El valor de  $K_m$  de una enzima inmovilizada puede disminuir si las cargas del soporte y el sustrato son opuestas. Si las cargas son iguales, el valor de  $K_m$  será mayor.

Cuando una enzima es inmovilizada en algún soporte se espera un incremento en la estabilidad térmica, lo cuál, por supuesto, prolongará la actividad de la enzima. Sin embargo, es difícil predecir, si un método en particular aumentará la estabilidad térmica de una enzima. Un incremento en la temperatura óptima de la enzima inmovilizada no significa necesariamente que su estabilidad térmica haya aumentado.

Aunque la temperatura óptima puede verse incrementada entre 10-20°C, la enzima inmovilizada puede ser inestable a temperaturas mayores y perder su actividad rápidamente aunque la velocidad inicial de reacción se incremente.

Los datos que se muestran en la figura 3.1.1.(a) muestran un ejemplo de lo dicho con anterioridad. En esos datos, la invertasa muestran un incremento en la estabilidad cuando es adsorbida, y cuando es unida covalentemente a celulosa microcristalina. La fig. 3.1.1. (b) muestra que la enzima inmovilizada es más estable durante la operación que la enzima libre ( 34 ).

**FIG. 9.1.1 INMOVILIZACION DE LA INVERTASA**



### **3.2. INMOVILIZACION DE LA ENZIMA**

Como hemos podido observar en capítulos anteriores, dependiendo del tipo de inmovilización al que se somete una enzima se puede obtener una mayor o menor actividad de la misma.

De acuerdo al estudio bibliográfico realizado, se encontraron dos métodos de inmovilización ( adsorción y enlace covalente ) en los cuáles la invertasa presenta una mayor actividad con respecto a otras formas de inmovilización.

Debemos agregar que los métodos de inmovilización por adsorción y enlace covalente han sido utilizados para operar diversos tipos de reactores (19, 49, 79), por lo cuál es factible su utilización para una operación en continuo de hidrólisis de sacarosa. Por lo tanto, teniendo como base el estudio bibliográfico previamente realizado y de acuerdo a las características de la invertasa, se proponen estos dos métodos de inmovilización para ser implementados en el reactor enzimático.

### **3.3. ELECCION DEL REACTOR**

Para la elección del reactor donde el elemento catalítico sea una enzima (invertasa), existen una gran diversidad de factores que afectan su funcionamiento. Dentro de estos factores tenemos los siguientes:

a) **Naturaleza del biocatalizador.**- La enzima puede estar disponible en forma de un producto comercial soluble o bien de un biocatalizador donde las enzimas o células completas que contienen han sido insolubilizadas.

b) **Características cinéticas del proceso.**- La enzima puede tener un comportamiento cinético simple, obedeciendo el modelo de Michaelis- Menten o bien estar sujeta a diferentes tipos de inhibiciones ( por sustrato o por producto). Puede igualmente presentar reacciones laterales o cierto grado de reversibilidad. Para la invertasa es sabido que presenta una inhibición por sustrato a concentraciones por arriba del 20% aunque cuando la enzima es inmovilizada la inhibición por sustrato se ve ampliamente disminuida y se puede trabajar a concentraciones de hasta 30 y 50 % (22), la enzima además presenta una inhibición por sus productos de hidrólisis.

Se ha encontrado que la enzima invertasa presenta inhibiciones a altas concentraciones de sustrato y por sus productos de hidrólisis ( 87 ). Por lo tanto será necesario tomar en cuenta estos parámetros al momento de la elección del reactor.

c) **Características fisicoquímicas del proceso.-** Existen diferentes factores de importancia a considerar.

i) **Temperatura y pH.-** La reacción puede ser exotérmica o endotérmica o bien requerir la regulación del pH.

ii) **Presencia de varias fases.-** La generación de gases en la reacción, el uso de solventes orgánicos, la presencia de sustratos o productos insolubles. En el caso de la reacción de hidrólisis de sacarosa vía catálisis enzimática, no hay generación de gases y el sustrato y producto son solubles.

iii) **Estabilidad de la enzima.-** La invertasa es una enzima que presenta estabilidad operacional siempre y cuando se mantenga a temperaturas de operación en un rango de 40 a 55 °C y pH entre valores de 3.5 - 4.5 (62,22,19).

Para la elección del reactor en el cuál se lleve acabo la reacción de hidrólisis de sacarosa, haremos primeramente la comparación entre la forma de operación de los reactores batch y continuo.

El reactor batch por lo general se utiliza cuando enzimas en solución son necesarias para la catálisis, ya que por lo general no se recupera la enzima. En el caso de utilizar enzimas inmovilizadas, se necesita de una separación adicional para recuperar las mismas, esto además de incrementar el costo del proceso, se refleja en una pérdida de actividad de la enzima. Además la importancia de la inmovilización radica en las ventajas operacionales que representa un proceso en continuo.

Dado lo anterior, se propone un reactor que opere en forma continua. Entre los reactores de flujo continuo tenemos principalmente el reactor continuo perfectamente agitado ( RTCA ) y el reactor de flujo pistón de lecho empacado ( RE ).

El costo de una enzima es quizás la parte más importante dentro del análisis económico total de un proceso. A continuación se muestra un estudio en cuanto al requerimiento de enzima de los dos tipos de reactores mencionados con anterioridad ( RTCA ) y ( LE ) ( 93 ).

Dependiendo de la ecuación cinética de la enzima, la constante de equilibrio, la conversión deseada y los efectos de inhibición por sustrato y producto, la conversión puede diferir ampliamente de un reactor a otro.

### **CINETICA DE LA ENZIMA**

La cinética de una enzima puede ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = V_{max} S / K_m + S \quad (1)$$

Donde:  $v$  = Velocidad de reacción

$V_{max}$  = Velocidad máxima de reacción

$S$  = Concentración de sustrato

$K_m$  = Constante de Michaelis-Menten

A altas concentraciones de sustrato ( $S \gg K_m$ ) la velocidad de reacción es de orden cero mientras que cuando  $S \gg 0$  ( $S < K_m$ ) la reacción se aproxima a las características de primer orden.

Para reacciones con inhibición por sustrato, una disminución en la velocidad de reacción de la enzima es observada a altas concentraciones de sustrato. Con inhibición competitiva la ecuación (1) se lee:

$$v = V_{max} S / (K_m + S(1 + S / K_{is})) \quad (2)$$

Donde:  $K_{is}$  es la constante para la inhibición por sustrato.

Entre más pequeñas es la relación  $K_{is} / K_m$ , es mayor la disminución en la velocidad de reacción.

La reacción con inhibición competitiva por producto puede ser escrita como:

$$v = V_{max} S / (K_m (1 + P / K_{ip}) + S) \quad (3)$$

Donde:  $P$  es la concentración del producto,  $K_{ip}$  es la constante para inhibición por producto.

Por lo tanto un incremento en la concentración del producto conduce a una disminución en la velocidad de reacción. Similar a la inhibición por sustrato, el efecto de la inhibición por producto aumenta cuando disminuye la relación entre  $K_{ip} / K_m$ .

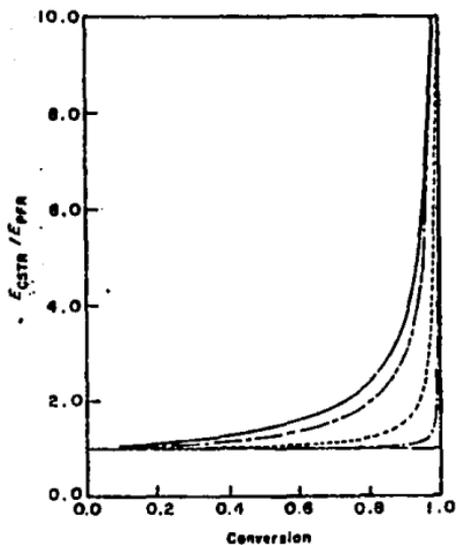
El funcionamiento de un reactor (RTCA) y el de flujo pistón, es analizado comparando la cantidad de enzimas requerida para cada reactor a un cierto grado de conversión ( X ) definido como:

$$X = (S_0 - S) / S_0 \quad (4)$$

Donde:  $S_0$  = concentración inicial ( entrada del reactor),  $S$  = concentración final ( salida del reactor ).

Como se observa en la fig. 3.3.1. para una reacción de primer orden el reactor de flujo pistón es mucho más eficiente que el (RTCA). Para el caso de concentraciones iniciales de sustrato menores a  $100 K_m$ , aún a bajas conversiones es considerablemente menor la cantidad de enzima que necesita un reactor de flujo pistón que la necesaria para el (RTCA). Por ejemplo cuando tenemos  $S_0 / K_m = 0.1$  y se desea una conversión de 73% se necesita dos veces más enzima en el (RTCA) que en el reactor flujo pistón. Para conversiones de 90 a 99% se necesitan aproximadamente de cuatro a veintidos veces mayor cantidad de enzima en un (RTCA) que en un reactor de flujo pistón (37).

### FIG. 3.3.1. REACCION DE PRIMER ORDEN PARA REACTORES (RTCA) Y FLUJO PISTON



Como hemos podido ver es importante la concentración inicial de sustrato en la elección de un reactor. Por lo tanto, si se desean obtener altas conversiones a bajas concentraciones de sustrato un reactor de flujo pistón siempre requiere de menor cantidad de enzima que el (RTCA) y la influencia de la inhibición por sustrato o producto no tiene importancia.

Ahora bien en el (RTCA) la enzima estará en presencia de la máxima concentración posible de producto, por lo que de esta forma se generan las condiciones del máximo efecto inhibitor. Evidentemente en este caso también el reactor más conveniente es el de flujo pistón, donde solo la enzima ubicada en la última parte del reactor estará sujeto a la inhibición por producto.

Una forma clara de apreciar las diferencias en los dos sistemas básicos de reacción en continuo, es mediante un análisis de gráficos como los que se muestran en la fig. 3.3.2.. En éstos, el tipo de gráfica depende del comportamiento cinético y de acuerdo con las ecuaciones de diseño de los reactores es posible determinar gráficamente los tiempos de residencia.

Para la cinética representada en la gráfica 3.3.2. en las figuras a y b se muestra que para ir de una concentración inicial de sustrato ( $S_0$ ) a una concentración final ( $S_f$ ), en el caso del (RTCA) se requiere de un tiempo de residencia mayor, y por lo tanto de un reactor más grande que si se emplea un reactor empacado.

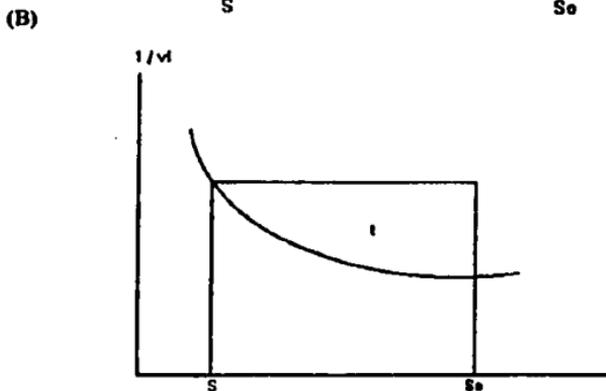
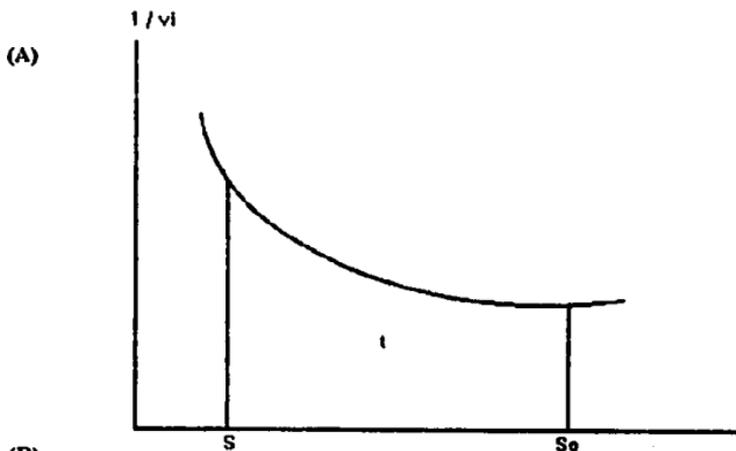
Una comparación de las ecuaciones de diseño para los dos tipos de reactores, permite establecer las ventajas del reactor empacado (RE) con respecto al (RTCA).

$$\frac{\text{RTCA}}{\text{RE}} = \frac{K_2 E t = S_0 X - K_m X / (1 - X)}{K_2 E t = S_0 X - K_m \ln (1 - X)} \quad (5)$$

Donde  $K_2$  = actividad de la enzima,  $E$  = concentración de la enzima,  $X$  = conversión deseada,  $S_0$  = concentración inicial de sustrato,  $t$  = tiempo de residencia.

Mientras la reacción se mantiene en orden cero el término multiplicado por  $K_m$  es despreciable, por lo que para altas concentraciones de sustrato se requiere de volúmenes iguales de ambos reactores para una determinada conversión. Sin embargo, para bajas concentraciones de sustrato, o altas conversiones aún a altas concentraciones de sustrato el volumen requerido de (RTCA) es muy superior al del reactor empacado para una determinada operación.

**FIG. 3.3.2 REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ESCUACIONES DE DISEÑO PARA REACTORES IDEALES (A) REACTOR EMPACADO, (B) REACTOR CONTINUO DE TANQUE AGITADO**



Siguiendo con el estudio de los dos tipos de reactores, tenemos que tomar en cuenta otro factor de gran importancia, la inmovilización de la enzima, es decir, que la actividad catalítica de la enzima no se ve afectada por el funcionamiento del reactor.

Los métodos de inmovilización propuestos son el de adsorción en DEAE SHEPADEX y enlace covalente en un soporte de vidrio poroso. En un (RTCA) debido a las altas velocidades de agitación y a que ésta es constante se puede producir una desorción de la enzima, en cambio en el RE la enzima queda fija al lecho y al no existir una agitación de este la enzima presenta una mayor estabilidad.

Otro factor que hay que tener en consideración es la necesidad de una operación adicional para recuperar la enzima inmovilizada en el (RTCA), ya sea colocando un filtro a la salida del reactor o una membrana de ultrafiltración lo que conlleva a un incremento en el costo del reactor.

En cuanto a las características fisicoquímicas del proceso éstas son más fácilmente controladas en un (RTCA) aunque también pueden ser evaluadas en el reactor de lecho empacado.

Después de la comparación entre los reactores (RTCA) y de lecho empacado flujo pistón podemos concluir, que para la hidrólisis continua de sacarosa en fructosa y glucosa, el reactor que ofrece mayores ventajas en cuanto a consumo de enzima, volumen del reactor, cinética de la enzima, tiempos de residencia e inmovilización es el reactor de lecho empacado, por lo tanto para la inmovilización de la enzima invertasa y su operación en continuo se propone un reactor de este tipo.

### **3.4. ECUACIONES DE DISEÑO PARA UN REACTOR IDEAL DE FLUJO**

#### **PISTON (LECHO EMPACADO)**

Las variables de diseño que controlan el funcionamiento de un reactor con una enzima inmovilizada son (a) Tiempo de residencia, (b) Concentración de sustrato, (c) Cantidad de enzima inmovilizada, (d) Temperatura y pH de la reacción. El funcionamiento del reactor puede ser analizado por la conversión final (X) definida como:

$$X = S_0 - S / S_0 \quad (6)$$

Donde:  $S_0$  = Concentración a la entrada del reactor.

$S$  = Concentración del sustrato a la salida del reactor

Para un reactor empacado la suposición de idealidad consiste en establecer un flujo pistón dentro de la columna. De esta forma la concentración de sustrato en la dirección radial es la misma, solo modificándose en la dirección axial como consecuencia del desplazamiento de flujo. Otro efecto que se considera despreciable es la difusión en la dirección axial, fenómeno que se conoce como retromezclado.

En este reactor el tiempo de residencia está definido por la ecuación:

$$t = \theta V / Q \quad (7)$$

Donde:  $V$  = Volumen del reactor

$Q$  = Velocidad de flujo

El factor de porosidad ( fracción vacía  $\theta$  ) es necesario incorporarlo a la ecuación anterior debido a que corresponde al porcentaje del volumen que queda libre cuando la enzima inmovilizada es empacada en el reactor.

Lo primero que se realiza es un balance de materia en el reactor empacado, dadas las condiciones cambiantes a lo largo del reactor, se realiza un balance en un elemento diferencial de volumen  $dV$  :

$$\begin{array}{rclcl} \text{Entrada} & - & \text{Salida} & = & \text{Consumo} & (8) \\ Q S_0 (1 - X) & & Q S_0 (1 - X - dX) & & (-v_i) dV & \end{array}$$

$$Q S_0 dX = (-v_i) dV$$

$$\begin{array}{rclcl} V & & X & & & \\ 0 & dV / Q S_0 = & 0 & dX / (v_i) & & (9) \end{array}$$

Donde:  $Q$  = Gasto de alimentación del sustrato

$-v_i$  = Modelo enzimático de Michaelis-Menten

$X$  = Conversión deseada

La ecuación anterior puede representarse gráficamente en la fig.3.3.2 (A), donde el área bajo la curva equivale al tiempo de residencia. Para resolver la ecuación (9) tomamos el modelo de la ecuación de Michaelis-Menten donde:

$$v_i = K_2 E S / K_m + S \quad (10)$$

Sustituyendo la ecuación (10) en (9) e integrando obtenemos la ecuación que describe el comportamiento del reactor empacado.

$$K_2 E \theta t = S_0 X - K_m \ln (1 - X) \quad (11)$$

Donde:  $K_2$  = Actividad de la enzima

$E$  = Concentración de la enzima

$K_m$  = Constante de Michaelis - Menten

De acuerdo a la literatura revisada la invertasa presenta inhibición por sustrato, aunque se ha encontrado que la enzima inmovilizada presenta una actividad satisfactoria bajo condiciones operacionales, especialmente en altas concentraciones de sacarosa donde la enzima libre mostró una fuerte inhibición por el sustrato (49,87, 90).

Para una cinética de orden cero  $S_0 \gg K_m$  donde la conversión está dada por:

$$X = t K_2 E / S_0 \quad (12)$$

Cuando  $S_0 \ll K_m$  la ecuación (11) se reduce a:

$$K_2 E \theta t = -K_m \ln (1 - X) \quad (13)$$

## TRANSFERENCIA DE MASA

Para obtenerse las condiciones en que debe operarse un reactor empacado de manera de evitar las resistencias difusionales externas, éste se opera a diferentes gastos y para diferentes concentraciones de sustrato. Si el sistema se encuentra limitado difusionalmente la ecuación del reactor estará definida por pseudoconstantes ( $K_2''$  y  $K_m''$ ) del modelo de Michaelis - Menten y dependientes del gasto:

$$S_0 X = K_m'' \ln(1 - X) + K_2'' E t \quad (14)$$

Rearreglando la ecuación:

$$S_0 X / t = K_m'' \ln(1 - X) / t + K_2'' E \quad (15)$$

En la fig.3.4.1. se presenta gráficamente la ecuación (15), donde los puntos experimentales se arreglan en líneas de isoconcentración, es decir agrupando en una línea los resultados de conversión obtenidos para una concentración dada a diferentes gastos.

La pendiente de estas líneas está dada por:

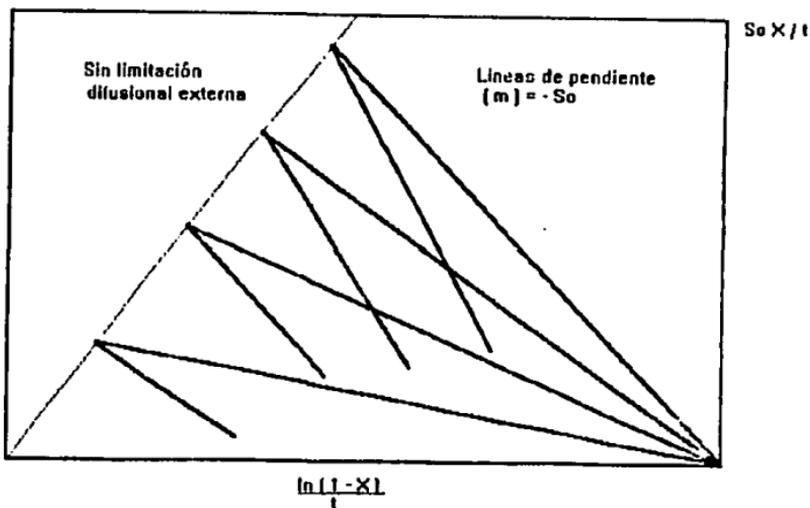
$$m = S_0 X / \ln(1 - X) \quad (16)$$

Siendo posible demostrar que:

$$\lim_{x \rightarrow 0} S_0 X / \ln(1 - X) = -S_0 \quad (17)$$

Las líneas con pendiente  $-S_0$ , que parten del origen son líneas que se obtienen cuando  $x \rightarrow 0$ , el flujo al infinito y por lo tanto en ausencia de problemas difusionales. En la fig. 3.4.1 se trazan estas líneas. Los puntos de intersección se unen entre sí para generar una nueva línea correspondiente a las condiciones libres de problemas difusionales de cuya pendiente e intersección se obtienen  $K_m''$  y  $K_2''$ .

**FIG. 3.4.1 METODO GRAFICO PARA LA DETERMINACION DE CONSTANTES DE MICHAELIS - MENTEN A PARTIR DE DATOS EXPERIMENTALES EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO LIMITADO POR LA DIFUSION EXTERNA**



Recientemente se ha desarrollado un modelo para la determinación de los efectos por difusión externa e interna (37). Para el caso de un reactor que opera bajo condiciones de estado fijo en donde el flux de masa através de la capa limite es igual que dentro de la membrana, por lo tanto:

$$J = K_L (S_b - S_s) = \eta L K_m S_s \quad (18)$$

Donde:  $J$  = Flux de masa en estado fijo

$K_L$  = Coeficiente de transferencia de masa

$S_b$  = Concentración de sustrato dentro de la membrana

$S_s$  = Concentración de sustrato en la membrana (superficie)

$L$  = Espesor medio de la membrana

$K_m$  = Pseudoconstante que determina la velocidad en una reacción de primer orden que es igual a  $K_2 E / K_m$

$\eta$  = Factor de efectividad =  $\tanh \Theta$

$\Theta$  = Módulo de Thiele =  $L (K / D_e)^{1/2}$

$D_e$  = Difusividad efectiva

$K$  = Constante de la velocidad para reacciones de primer orden

La ecuación (18) puede ser escrita como:

$$S_b - S_s = 1/KL; \text{ y } S_s/J = 1/\eta K_o L \quad (19)$$

De lo cual se obtiene:

$$S_b/J = 1/KL + 1/\eta K_o L \quad (20)$$

$$\text{ó } 1/K' = 1/KL + 1/\eta K_o L \quad (21)$$

Donde:  $K' = J/S_b$

$K' =$  Coeficiente combinado de transferencia de masa.

Así este modelo puede ser representado para una serie de resistencias, desacoplando los efectos de difusión y reacción. Nosotros podemos escribir la siguiente ecuación para el funcionamiento en general de un reactor de lecho empacado:

$$\ln(1 - X) = -K' a t \quad (22)$$

Donde:  $a =$  Área superficial de catálisis por unidad de volumen del reactor, la constante general de transferencia de masa - cinética ( $K$ ), es obtenida experimentalmente conociendo  $X$  y  $t$  que es el grado de conversión y el tiempo de residencia respectivamente.

El coeficiente de transferencia de masa  $K_L$  está en función de la velocidad lineal. Por lo tanto una correlación de datos experimentales entre  $K'$  y velocidad de flujo pueden ser desarrollados.

Un método práctico para estimar los efectos por difusión por el poro es comparando la variación de la velocidad de reacción o la actividad con la temperatura para enzimas inmovilizadas vs la enzima soluble. Si la gráfica de Arrhenius ( log de la velocidad de reacción vs el recíproco absoluto de la temperatura ) para la enzima inmovilizada da una línea recta con una pendiente similar a la de la gráfica para la enzima soluble, esto indicará que no existen limitaciones por difusión del poro. Las limitaciones por difusión interna por lo general dan una pendiente menor a bajas temperaturas. Se ha encontrado que el factor de efectividad cae por debajo de la unidad, cuando la energía de activación también disminuye ( 86).

Para poder estudiar los efectos de transferencia de masa externa en un reactor de lecho empacado se puede cambiar la profundidad de el lecho mientras se mantienen el mismo tiempo de residencia. Si los efectos de difusión de la capa son significantes, el cambio en la velocidad lineal causará un cambio en la conversión del reactor aún cuando sea el mismo tiempo de residencia. Se debe observar un rango lo suficientemente amplio en la velocidad lineal para detectar si existe algún efecto presente.

A altas concentraciones de sustrato (  $S > K_m$  ), la reacción sigue una cinética de Michaelis - Menten de orden cero y las conversiones no son afectadas por el retromezclado.

## **EFFECTOS DE LA TEMPERATURA**

Como se vió con anterioridad la actividad de la enzima se ve muchas veces reducida por los efectos de la temperatura. Generalmente la dependencia de la temperatura puede se descrita por la ecuación de Arrhenius. Las energias de activación se encucntran generalmente en un rango entre 5 a 20 Kcal / g. mol , mientras que la energia de desactivación se encuentra en rangos de 10 a más de 100 Kcal / g. mol.

### **3.5 ESTRATEGIA DE OPERACION**

Es claro que el funcionamiento de un reactor con enzima inmovilizada se verá influenciado no solo por las características de inmovilización del agente catalítico sino también de la manera en que es empacado dentro del reactor y la operación de éste. La uniformidad a la hora de empacar el lecho es muy importante para alcanzar una buena distribución del flujo. Estudios por separado sobre las distribución de tiempos de residencia han establecido que el lecho, cuando es empacado correctamente tiene una vida operacional mayor que cuando éste no se realiza apropiadamente.

En una operación donde el flujo vaya hacia abajo el sustrato se filtrará a través de el lecho empacado por gravedad, para realizar esto, es necesario tener una cantidad suficiente de líquido arriba del lecho y ser mantenida todo el tiempo. La alimentación a la entrada y salida deben ser diseñados de forma de mantener el lecho empacado siempre húmedo.

Es necesario operar el reactor de manera de obtener un producto final de calidad uniforme y un contenido constante de glucosa y fructosa.

Usualmente es deseable maximizar la cantidad de alimentación procesado por unidad de enzima, volumen de reactor o alguna variable que minimice el costo del proceso.

La producción total  $P_t$  de un reactor durante un periodo de tiempo  $t_p$  a una velocidad de alimentación  $Q$  puede definirse como:

$$P_t = \int_0^{t_p} Q S_0 X dt \quad (23)$$

Sin embargo, la principal característica que limita la operación de un reactor enzimático es la vida del catalizador. Es imprescindible conocer el comportamiento de una enzima en lo que se refiere a la estabilidad en operación, no solo para un diseño adecuado del reactor, sino por que éste será el criterio que permite establecer una estrategia de operación.

Por lo tanto, es requisito efectuar estudios de estabilidad de almacenamiento con la enzima, incubando a diferentes temperaturas y siguiendo la evolución de la actividad con el tiempo. Esta información es de utilidad pero se requiere efectuar estudios de estabilidad en operación, con el fin de analizar el efecto estabilizador del sustrato. De ésta manera la estabilidad de la enzima puede expresarse de acuerdo con los modelos de orden cero, de primer orden o mediante modelos más complejos. En nuestro caso se analizará el caso de una enzima que es desactivada de acuerdo a un modelo de primer orden.

En este caso la actividad de la enzima ( $K_2$ ) puede expresarse como:

$$K_2 = K_{20} \exp(-Kt) \quad (24)$$

Donde:  $K_{20}$  = Actividad inicial

$K_2$  = Actividad al tiempo (t)

$K$  = Constante de desactivación de primer orden

## CAIDA DE ACTIVIDAD EN OPERACION

Considerando un reactor empacado con una enzima que se deactiva de acuerdo con el modelo de la ecuación (24) y que sigue un comportamiento cinético tipo Michaelis - Menten. De acuerdo con las ecuaciones anteriormente analizadas, la conversión a la salida del reactor estará descrita por la ecuación (11). Si en ella introducimos la ecuación (24) para tomar en cuenta la deactivación del catalizador, obtenemos:

$$K_2 \exp(-Kt) E = S_0 X - K_m \ln(1 - X) \quad (25)$$

La ecuación (25) describe la caída de la conversión con el tiempo en un reactor empacado operando en continuo.

Dado que la conversión no puede despejarse de la ecuación es necesario resolverla en forma iterativa. Si consideramos orden cero, entonces :

$$X = K_2 \exp(-Kt) / S_0 \quad (26)$$

Al sustituir la ecuación ( 25 ) en ( 27 ), tendremos la cantidad de producto obtenido durante el tiempo de procesamiento  $t_p$ . Nuevamente la ecuación resultante solo puede resolverse numéricamente, por lo que tomemos el caso de la ecuación ( 26 ), para orden cero:

$$P_t = \int_0^{t_p} \frac{Q \cdot S_0 \cdot K_2 \exp(-Kt)}{S_0} dt$$

que resulta en:

$$P_t = Q \cdot K_2 [ 1 - \exp(-Kt_p) ] / K \quad (27)$$

(143)

## OPERACION A CONVERSION CONSTANTE

Es evidente que en muchos procesos, no es conveniente dejar disminuir la conversión conforme transcurre el tiempo. Una alternativa para mantener la conversión a la salida del reactor constante, a pesar de la desactivación de la enzima, consiste en disminuir el gasto en la alimentación. Será necesario hacer una programación del gasto, que será ahora en función del tiempo. Para ello consideremos la ecuación (24) para la estabilidad del biocatalizador y que  $t = 0 \quad V / Q$ . Sustituyendo en la ecuación de diseño:

$$K_2 \exp(-Kt) E V / Q(t) = S_0 X - K_m \ln(1 - X)$$

Despejando el gasto:

$$Q(t) = \frac{K_2 \exp(-Kt) E_0 V}{S_0 X - K_m \ln(1 - X)} \quad (28)$$

Al tiempo cero, el gasto inicial está dado por:

$$Q_0 = \frac{K_2 \exp(-K \cdot 0) E_0 V}{S_0 X - K_m \ln(1 - X)} \quad (29)$$

Sustituyendo en (27):

$$Q(t) = Q_0 \exp(-Kt) \quad (30)$$

La ecuación (30) describe la programación del gasto durante la operación del reactor, necesaria para mantener una conversión constante.

Si sustituimos en la ecuación (23), obtendremos la producción del sistema:

$$P_t = \int_0^{t_p} Q_0 \exp(-Kt) S_0 X \, dt$$

$$P_t = Q_0 S_0 X [1 - \exp(-Kt_p)] / K \quad (31)$$

Otra solución al problema de disminuir la velocidad de flujo o la velocidad de producción es utilizando un sistema múltiples de reactores. Estos reactores los cuáles arrancan en forma escalonada a tiempos programados con anterioridad pueden ser operados en serie o paralelo. La velocidad de producción puede ser mantenida a un nivel específico utilizando un número suficiente de reactores. El número de reactores que se requieren para mantener la velocidad de producción en un nivel establecido de tolerancia que está en función del número de vidas medias para el cuál el reactor es operado antes que la enzima inmovilizada sea reemplazada (31).

$$R_p = \exp(-H \ln 2) / N \quad (32)$$

Donde: N = Número de reactores

H = Número de vidas medias de la enzima inmovilizada.

R<sub>p</sub> = Velocidad de producción desde un máximo a un mínimo

## **DETERMINACION DE CONSTANTES CINETICAS**

Tradicionalmente la cinética de la enzima ha sido determinada utilizando gráficas lineales de datos de velocidad inicial. Tres tipos de gráfica han sido utilizadas. La más común es la gráfica de Lineaweaver - Burk ( $1/V$  vs  $1/S$ ), la gráfica de Hofstee ( $v$  vs  $v/s$ ) y la gráfica de Eadie - Hanes ( $S/V$  vs  $S$ ) éstas dos últimas son las menos utilizadas.

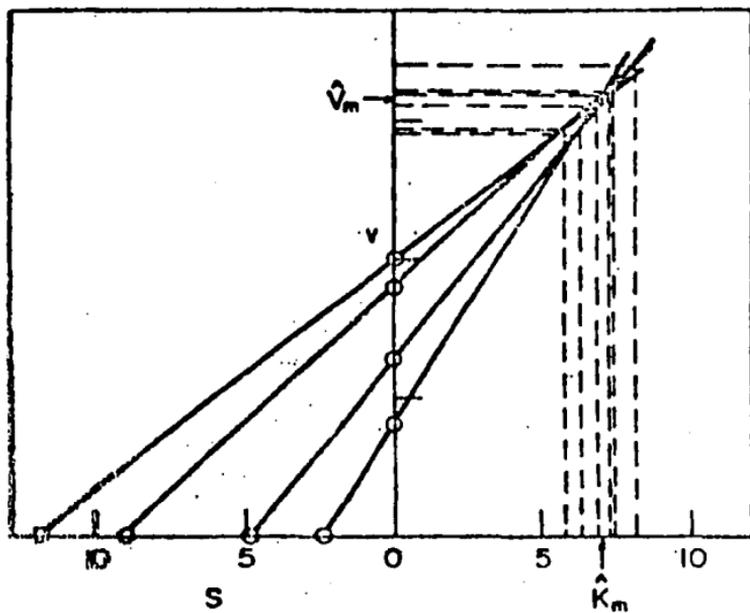
Para aplicaciones comerciales, los sistemas con enzimas inmovilizadas son normalmente estudiados bajo condiciones similares a las de operación. Los niveles de conversión son por lo general altos.

Un procedimiento simple para graficar y estimar las constantes cinéticas de la enzima, es el ejemplo de la fig. 3.5.1., el punto de la velocidad de reacción sobre el eje vertical es unido con el punto de concentración de sustrato sobre el eje horizontal para cada velocidad medida. Cada punto de intersección es una estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Las mejores estimaciones de  $K_m$  y  $V_{max}$ , son tomadas como la media para cada grupo de estimaciones ( 24 ).

Uno de los factores que hay que recordar cuando se aplique cualquier técnica para tratamiento de datos de la cinética de la enzima inmovilizada es que, aunque la cinética de la enzima soluble puede ser obtenida fácilmente, las limitaciones por transferencia de masa pueden cambiar la cinética aparente de la enzima.

Sin embargo, con los criterios apropiados de escalamiento, los gráficos de conversión vs los tiempos normalizados de residencia deberán dar siempre una descripción exacta del comportamiento de la reacción.

**FIG. 3.5.1 ESTIMACION DE LAS  
CONSTANTES CINETICAS**



### **3.6. ESTIMACION DE COSTOS DEL SISTEMA**

Para determinar la viabilidad de un sistema en el cual se emplean sistema con enzimas inmovilizadas, se debe hacer una preestimación de costos. El primero es el de la inmovilización de la enzima. Para esto se debe evaluar el valor del soporte los costos de la enzima y su inmovilización.

Evaluando los datos de costos de inmovilización y funcionamiento del reactor se puede relacionar la producción total y la cantidad de enzima inmovilizada utilizada. Así el costo del proceso atribuible a la inmovilización de la enzima puede ser calculado por unidad de producto.

### **3.7 RECOMENDACIONES**

Un uso potencial de la invertasa en México sería la obtención de azúcar invertida a partir de la caña de azúcar, debido a que la sacarosa es comercializada en forma cristalina, siendo la mayoría de sus aplicaciones en forma soluble, de tal manera que se podría comercializar en forma de azúcar invertido teniendo como ventaja un ahorro en el proceso de cristalización que es el paso más costoso dado el alto consumo de energía.

Para un mejor funcionamiento del reactor es necesario realizar un estudio a fondo sobre los parámetros cinéticos y de transferencia de masa en la columna empacada, así como un análisis para las resistencias difusionales externas.

Otro aspecto muy importante es el de analizar la estabilidad del biocatalizador y la forma de incrementarla, ya que la principal característica que limita la vida operacional de un reactor es la vida del catalizador.

Es recomendable tomar en cuenta la caída de actividad de operación de la enzima, para realizar modificaciones en el reactor tratando de mantener una concentración constante de producto aún con la caída de actividad de la enzima.

En la práctica se deben de realizar experimentos para estimar las condiciones que prevalecen en un reactor de lecho empacado antes de que las constantes intrínsecas sean determinadas

Sería importante realizar estudios manteniendo la producción constante, mediante el uso de columnas empacadas en serie o paralelo.

### **3.8 CONCLUSIONES**

Se debe prestar mayor atención al campo de la biotecnología, ya que tiene un enorme potencial de aplicaciones en la industria alimentaria, sin que éste haya sido explotado hasta la fecha.

La inmovilización de enzimas es un método que presenta alternativas a la industria para una mayor utilización de éstas, ya que con la inmovilización se ve disminuido el costo del proceso.

Para la elección de un reactor es muy importante tomar en cuenta las características de inmovilización de la enzima, ya que uno está en función del otro en aspectos de eficiencia y costos del sistema en general.

El uso de reactores con enzimas inmovilizadas muestra amplias expectativas de desarrollo dentro de la industria alimentaria, ya que con un estudio más a fondo de los mismos se puede lograr una disminución en los costos de producción, donde se empleen enzimas.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Bachler, M.J., G.W. Strandberg, K.L. Smiley. *Biotech. Bioeng.*, 12, 85 (1970).
- 2.- Bar., Eli, A. and E. Katchalski *J. Biol. Chem.* , 238, 1690 ( 1963 ).
- 3.- Baum, G. and M. Lynn. *Process Biochem. J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4024 ( 1959 ).
- 4.- B. Atkinson. *Biochemical Reactors Series Editor J. R. Lagnado, London* ( 1974 ).
- 5.- Bergmeyer, H. U. and G. Michal *Industrial Aspects of Biochem.* (1974).
- 6.- Bernfeld, P. and R.E. Bieber. *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 587 (1969).
- 7.- Bischoff, K.B. *AichE J.* 11, 351 (1965).
- 8.- Boundrant, J., C. Cheffel. *Biotech. Bioeng.* 17, 827 ( 1975).
- 9.- Closset, G.P., Shah, Y.T., Cobb, J.T. *Biotech. Bioeng.* 15, 441 (1973).
- 10.- Cornish, Bowden A., Eishental, R. *Biochem. J.* 139, 721 ( 1974).
- 11.- Chang, T.M.S., *Methods in Enzymology.* N.Y. Academic Press. 44, 218
- 12.- Chang, T.M.S., *Biochem. Biophys Res. Commun.* 44, 1531 (1971).
- 13.- Chang, T.M.S., L.J. Johnson and O.J. Ransome. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45, 705 ( 1966).
- 14.- Chang, T.M.S. and M.J. Poznansky. *Nature.* 218, 242 (1968).
- 15.- Chow, C. C., M.R. Ladisch and G.T. Tsao. *Appl. Environm. Microbial.* 32, 489 ( 1976).
- 16.- Christie J. Geankoplish, Edwin R. Haering and Michael C. Hu. *Ind. Eng. Chem.* 26, 1810 (1987).
- 17.- Chung, S.F. Wen, C. Y. *AichE J.* 14, 857 ( 1968 ).
- 18.- Dahlgren Cordwell, K. Axen, R. Bergwall, M. Porath. *J. Biotech. Bioeng.* 18, 1573 ( 1976).
- 19.- Dickensheets, P.A., Chen, L.F., Tsao, G.T. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 365 ( 1977).

## BIBLIOGRAFIA

- 20.- Dinelli, D., Marconi, W., Morisi, F. *Methods in Enzymology*. N.Y. Academic Press 44, 227 (1976).
- 21.- Dische, Z. and E. Borenfreund. *J. Biol. Chem.* 192, 583 (1951)
- 22.- Dogu, Timur, Kaletuna, Ganul, Caglar Arif. *Canadian J. Chem. Eng.* 63, 67 (1985).
- 23.- Doshima, H., M. Sakimoto, Y., Harana. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2169 (1980).
- 24.- Eisinger, R., Cornish-Bowden, A. *Biochem. J.* 139, 715 (1974)
- 25.- Emery, A. H. *Enzyme Engineering*. N.Y. Plenum Press 2, 269 (1974).
- 26.- Ghosh, D'Souza S.F. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 376 (1989).
- 27.- Gilbón Acevedo A. *Inmovilización de Glucosa-Isomerasa*. Tesis, Fac. Química, UNAM (1978).
- 28.- Gregoriadis G. *Methods in Enzymology*. N.Y. Academic Press. 44, 218 (1976).
- 29.- Harow, B. Manzur, A. *Textbook of Biochemistry*. M.B. Saunders Co. (1973).
- 30.- Havewala, N.B., Weetall, H.H.U.S. Pat. 3767535 (1973).
- 31.- Havewala, N.B., Pitcher, W.H. *Enzyme Eng.* N-Y. Plenum Press. 2, 315 (1974)..
- 32.- Hjerten, S. J. *Chromatografia*. 87, 325 (1973).
- 33.- Humprey, A. *Encyclopedia. Chem. Process Design*. N. Y. 4, 359. (1977).
- 34.- J. Woodward. *Immobilised Cells and Enzymes*. R.L. Press (1985).
- 35.- Johansson, A. C., Mosbach, K. *Biochim. Biophys. Acta.* 370, 339 (1974).
- 36.- K. Venkatasubramanian and W. R. Vieth. *Biotech. and Bioeng.* 15, 583 (1973).

## BIBLIOGRAFIA

- 37.- K. Venkatasubramanian and W.R. Vieth. *Enzyme Processing*. 4, 359 ( 1977).
- 38.- K. Venkatasubramanian. *Food Processing*. 2, 162 ( 1980).
- 39.- K. Venkatasubramanian and W.R. Vieth. *Methods in Enzymology*. N.Y. Academic Press. 44,  
243 ( 1976).
- 40.- Kreen, M., Kostner , A., Kask, K. Tr. Tallin Politekh. Inst. 331, 131 ( 1973).
- 41.- Lee, Y., Wun, K., Tsao, G.T. *AichE ( 77th National Meeting, Pitsburg )*(1974).
- 42.- Leinhard, G. E. *Science*. 180, 149 ( 1973).
- 43.- Lehninger Albert L. *Principles of Biochemistry*. N.Y. Worth ( 1982).
- 44.- Levenspiel, O. *Chemical Reaction Engineering*. N.Y. Wiley ( 1962 ).
- 45.- Lineweaver, H. and Burk. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658 ( 1934).
- 46.- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G., Baker, H. J. *Mol. Biol.* 42, 1 (1969).
- 47.- M.F. Chaplin and C. Bucke. *Enzyme Technology*. Cambridge University, Press ( 1990 ).
- 48.- Maedah, H., H. Suzuki, Sakimae. *Biotech. and Bioeng.* 15, 403 ( 1973).
- 49.- Marconi, N.S., Gulinelli, F. Morisi. *Biotech. and Bioeng.* 16, 501 ( 1974).
- 50.- M. Dixon and E.C. Webb. *Enzymes*. Academic Press N.Y. (1964).
- 51.- Maron and Prutton. *Fundam. de Fisicoquímica*. Ed. Limusa, México (1973).
- 52.- Marsden J.C. and C.F. Stoneman. *Enzymes and Equilibria*. Heineman Educatinal Books.  
Londree (1974).

## **BIBLIOGRAFIA**

- 53.- Mitz, M.A. and R.J. Schluter. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 4024 (1959).
- 54.- Masson, R.D., H. Weetall. *Biotechnology and Bioeng.* 14, 637 ( 1972 ).
- 55.- Monod, J., J. Wyman and J.P., Changerox. *J. Mol. Biol.* 12, 88 ( 1965 ).
- 56.- Mosbach, K., H. Gilford, P.O. Larsson, R. Ohlson and M. Scott. *Biochim. J.* 125, 20 (1971).
- 57.- Nakagawa, H., T. Arao, T. Matsuzawa, S. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1 ( 1975 ).
- 58.- Nakajima, Mitsutoshi, Jimbo Naoyoki. *Process Biochem.* 23, 32 ( 1988 ).
- 59.- Nilsson, H. Mosbach, P., Mosbach, K. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 253 ( 1976 ).
- 60.- **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemistry. (AOAC), 11a. Ed. 1970.**
- 61.- Olsson, B. O., Oegren Lars. *Anal. Chim. Acta.* 145, 87 ( 1983 ).
- 62.- Olvera Treviño Ma. de los Angeles Patricia. **Inmovilización de la Enzima Invertasa. Tesis, Fac. Química, UNAM ( 1981 ).**
- 63.- O'Neill, S.P., Wykes, J.R., Dunnill, P., Lilly, M.D. *Biotechnol. Bioeng.* 13, 319 (1971).
- 64.- Ooshima, H., M. Sakimoto, Y. Hakana. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 2155 (1980).
- 65.- Ooshima, H., M., Harano, Yoshio. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 143 (1983).
- 66.- P. Brodelius. *J. Adv. Biochemistry.* 15, 76 ( 1986).
- 67.- Pennington, S.N., H.D. Brown, *Biochim. Biophys Acta*, 167, 479 (1968).
- 68.- Pitcher, W., H.Jr. **Inmobilised Enzymes for Industrial Reactors. R.A. Messing (Ed.), N.Y. Academic Press ( 1975).**
- 69.- Quintero Ramírez Rodolfo. **Ing. Bioquímica. Ed. Alhambra, México (1981).**

## BIBLIOGRAFIA

- 70.- R.A. Messing. *J. Adv. Biochemistry*. 1, 52 ( 1982 ).
- 71.- Reed, Gerald. *Enzymes in food Processing*. N.Y. Academic Press ( 1973 ).
- 72.- Satterfield, C.N., Colton, C.K., Pitcher, W. *AichE J.* 19, 628 (1973).
- 73.- Schneider, Francois, Maczac. *Biochem. Educ.* 19, 83 ( 1991 ).
- 74.- Sharp, A.K, and M. D. Lilly. *Biotech. Bioeng.* 11, 337 ( 1969 ).
- 75.- Solomon, B., Levin, V., *Biotech. Bioeng.* 16, 139 (1974).
- 76.- Stanley, W.L., Watters, G.G., *Biotech. Bioeng.* 17, 315 (1975).
- 77.- Stauffer, Clyde, E. *Enzyme assays for food scients*. N.Y. Van Nortrand Reinhold ( 1989 ).
- 78.- Steffuca, Vladimir, Gemeiner, Peter, Blades, Vladimir. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10, 306 (1988 ).
- 79.- Suzuki, H., Ozawa, Y., Maeda. *Agr. Biol. Chem.* 30, 807 ( 1966 ).
- 80.- S.S. Godbale, B.S., Kubal and S.F., D'Souza. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12, 214 (1990).
- 81.- Taylorides, L. L., Haas W.R. *Enzyme Eng.* 279 ( 1974 ).
- 82.- Thornton, D.A., Flynn, D.B., Johnson, P.D., Ryan. *Biotech. and Bioeng.* 17, 1679 ( 1975 ).
- 83.- Van Leemputten, E., Hariaberger, M. *Biotech. and Bioeng.* 17, 385 ( 1974 ).
- 84.- V., J., Aloyo, Geller, C.J., Marcus and W.L., Byrne. *Biochem. Biophys. Acta.* 289.
- 85.- Wharton, C. W., E.M. Crook. *European J. Biochem.* 6, 565 ( 1968 ).
- 86.- Wheeler, A. *Adv. Catal.* 3, 249 ( 1951 ).

## **BIBLIOGRAFIA**

- 87.- Whitaker, J. R. Principles of Enzimology for the food Sciences. Inc. N.Y. ( 1972 ).
- 88.- White, Abraham. Biochem. Engin. Academic Press N. Y. ( 1973 ).
- 89.- Wilson, E. J. Geankoplis C. J. Ind. Eng. Chem. Fundam. 5, 9 ( 1966 ).
- 90.- Wingard, Lemuel, B. Enzyme Technology. Academic Press N.Y. ( 1979 ).
- 91.- Wiseman, Alan ( Ed. ). Hand book of Enzyme Biotech. Halstead Press N.Y. ( 1975 ).
- 92.- Wolfgang, Gerhartz. Enzymes in Industry, Production and Applications. 96, 130 ( 1978 ).
- 93.- W., Howaldt, Michael, Klaus, D. Kulbe. Enzyme Microb. Technol. 8, 627 ( 1986 ).
- 94.- W. W., Cleland. The Enzyme, 3a. Ed., Academic Press N. Y. ( 1970 ).