

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,  
para la obtención del Grado Académico de: Doctor

En el campo de: Ingeniería Química

**ESTUDIO DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS  
PARA LA HIDRÓLISIS DE LACTOSA**

**Enrique José Mammarella**

**Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología  
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET)**

Directora de Tesis: Dra. Amelia C. Rubiolo

Codirector de Tesis: Dr. Osvaldo H. Campanella

Miembros del jurado de Tesis:

Dr. Jorge Lozano

Dr. Orlando Alfano

Dr. Oscar Iribarren

En primer lugar, quiero expresar mi sincera gratitud a la Dra. Amelia Rubiolo por el empuje que siempre me ha transmitido, por su guía incesante y por todo el apoyo brindado durante el curso de este estudio, además de la libertad científica que me ha proporcionado a la que considero como un premio en sí misma.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Osvaldo Campanella, quien a pesar de las distancias y de sus ocupaciones, me ha brindado su tiempo para desarrollar numerosas, fructíferas y estimulantes discusiones científicas, que han contribuido en forma especial en mi formación.

Quiero agradecer al INTEC, por brindarme el lugar para desarrollar esta labor; y al Conicet, a la Universidad Nacional del Litoral y a la sociedad toda que con su esfuerzo sostiene la Educación Pública, por permitirme la oportunidad de continuar mi formación.

Agradezco, además, a los miembros del jurado, por la deferencia de participar en la evaluación de la tesis.

Un párrafo especial merecen todos mis amigos y compañeros de trabajo del grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología del INTEC por la ayuda y amistad, y, en especial, a la Dra. Susana Zorrilla por sus valiosos comentarios sobre esta tesis.

También, aunque no menos importante es mi gratitud a mi esposa, Alicia, por su apoyo, cariño, respeto y colaboración durante todo este proceso. Por compartir las alegrías, las penas y por siempre tener palabras de aliento. Por estar a mi lado en los tiempos difíciles y por el cuidado de nuestros tres cariñosos niños: María Florencia, Luciano y Gonzalo. A mis padres por haberme enseñado a conducirme y crecer en la vida. Por enseñarme que la victoria no es llegar, sino saber cómo llegar y valorar el sentido de cada esfuerzo realizado.

Por último, quiero agradecer a todos aquellos que de una u otra manera se sienten identificados con la culminación de esta realidad, a quienes me resulta imposible incluir pero que están presentes en mi pensamiento.

**A mis padres y a mi familia**

En el presente trabajo se estudió la reacción de hidrólisis de la lactosa, empleando preparaciones comerciales de enzimas adecuadas para el tratamiento de leche fluida y suero neutro de quesería, inmovilizadas en geles de hidrocoloides. La aplicación de un proceso enzimático en un sistema heterogéneo de alta complejidad como la leche o el suero neutro, asegura especificidad en la reacción buscada, alta velocidad de conversión y que no se vean alterados los otros componentes presentes, mientras que la inmovilización de las enzimas permite su reutilización en un sistema continuo.

En los ensayos experimentales se caracterizaron distintas preparaciones de enzimas comerciales en base a: pH y temperaturas óptimas de operación, efecto de distintas sustancias sobre la actividad y estabilidad de la enzima en estado libre para seleccionar la de mejor comportamiento en las condiciones de reacción establecidas. A la preparación seleccionada se la caracterizó cinéticamente adoptando un modelo de reacción del tipo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto.

Asimismo, se estudió y modeló matemáticamente el mecanismo de gelificación de los hidrocoloides utilizados para la inmovilización, con el fin de predecir, tanto el tiempo de formación según la composición de la mezcla que gelifica, como los puntos óptimos para conseguir la estructura más resistente con mayor rendimiento en el proceso de hidrólisis. Se obtuvieron y caracterizaron distintos biocatalizadores en base a: actividad, estabilidad, resistencia mecánica, temperatura y pH óptimos, características cinéticas, resistencias a la difusión de sustrato y productos y rendimientos para seleccionar el de mejor comportamiento en las condiciones de reacción establecidas.

El catalizador elegido fue utilizado como relleno en un reactor tubular de lecho fijo, estudiando su comportamiento bajo distintas condiciones de caudal y concentraciones

de lactosa, considerando además la vida útil del biocatalizador. A partir del balance de materia en el reactor, se elaboró un modelo matemático que considera condiciones de flujo pistón isotérmico con dispersión axial en estado estacionario. El modelo incluye la estimación en las condiciones de reacción, de la resistencia a la transferencia de materia desde el seno del líquido hacia la superficie del soporte y luego al sitio activo en el interior del soporte, donde se produce la reacción. Finalmente, el modelo completo fue corroborado por los datos experimentales.

Los estudios realizados permitieron obtener un catalizador con un rendimiento aceptable con la técnica empleada y un modelo matemático de un reactor tubular de lecho fijo con dispersión axial, con una cinética más compleja que los encontrados comúnmente en la literatura.

	Página
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. La lactosa .....	2
1.2. La hidrólisis de la lactosa .....	3
1.3. El uso de enzimas para la hidrólisis de la lactosa .....	4
1.4. La inmovilización de enzimas .....	6
1.5. Características del sistema reaccionante .....	7
<b>2. Objetivos</b> .....	9
<b>3. Fundamentos</b> .....	12
3.1. Características de las enzimas .....	13
3.2. Características de los métodos de inmovilización .....	17
3.3. Características de los compuestos utilizados como soporte .....	19
3.3.1. Características de los alginatos .....	21
3.3.2. Características de las carrageninas .....	22
3.3.3. Características del proceso de gelificación .....	23
<b>4. Consideraciones teóricas</b> .....	26
4.1. Cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima $\beta$ -Galactosidasa .....	27
4.1.1. Integración de la ecuación cinética en un intervalo de tiempo .....	29
4.1.2. Influencia del pH sobre la cinética de reacción .....	30
4.1.3. Influencia de la temperatura sobre la cinética de reacción ..	30
4.1.4. Influencia de la presencia de efectores sobre la cinética de reacción .....	31
4.1.5. Obtención y tratamiento de los datos cinéticos .....	32
4.2. Factores que afectan la cinética de las enzimas inmovilizadas .....	33
4.2.1. Pérdida de actividad y vida media de las enzimas inmovilizadas .....	34
4.3. Mecanismo de gelificación .....	36
4.4. Desarrollo del modelo para el sistema estudiado .....	39
4.4.1. Estimación del coeficiente de transferencia externa de materia .....	46
4.4.2. Determinación del coeficiente de dispersión axial .....	47
4.4.3. Determinación de los coeficientes de difusión en el biocatalizador .....	47

<b>5. Materiales y métodos .....</b>	<b>51</b>
5.1. Caracterización de las enzimas utilizadas .....	52
5.1.1. Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	54
5.1.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	54
5.1.3. Influencia del medio salino sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	54
5.1.4. Determinación de las constantes cinéticas de la enzima libre .....	56
5.2. Preparación y caracterización del soporte .....	56
5.2.1. Estudio del mecanismo de formación de geles .....	56
5.2.2. Comportamiento de los geles a la compresión .....	58
5.2.3. Comportamiento de los geles en las condiciones de reacción .....	58
5.3. Preparación y caracterización de los biocatalizadores .....	61
5.3.1. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada .....	62
5.3.2. Determinación de las características de los biocatalizadores .....	63
5.3.3. Determinación de la pérdida de enzima de los biocatalizadores .....	63
5.3.4. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores .....	64
5.4. Determinación de los coeficientes de difusión .....	65
5.5. Estudio del comportamiento de los biocatalizadores en el reactor .	66
<b>6. Resultados y discusión .....</b>	<b>68</b>
6.1. Caracterización de las enzimas en estado libre .....	69
6.1.1. Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	69
6.1.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	70
6.1.3. Influencia del medio salino sobre la actividad de las enzimas utilizadas .....	72
6.1.4. Determinación de las constantes cinéticas de la enzima libre .....	76
6.2. Preparación y caracterización del soporte .....	80
6.2.1. Estudio del mecanismo de formación de geles .....	80

---

6.2.2. Comportamiento de los geles a la compresión .....	84
6.2.3. Comportamiento de los geles en las condiciones de reacción .....	89
6.3. Preparación y caracterización de los biocatalizadores .....	94
6.3.1. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada .....	99
6.3.2. Determinación de la actividad de los biocatalizadores .....	100
6.3.2.1. Influencia del pH sobre la actividad de los biocatalizadores .....	100
6.3.2.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de los biocatalizadores .....	101
6.3.3. Determinación de las constantes cinéticas de los biocatalizadores .....	102
6.3.4. Determinación de la pérdida de enzima de los biocatalizadores .....	107
6.3.5. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores .....	109
6.3.6. Determinación del coeficiente de dispersión axial del reactor .....	110
6.4. Determinación de los coeficientes de difusión .....	111
6.5. Estudio del comportamiento de los biocatalizadores en el reactor .	112
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>117</b>
7.1. Respecto a la enzima libre .....	118
7.2. Respecto a la producción del soporte para la inmovilización .....	118
7.3. Respecto a los biocatalizadores .....	119
7.4. Respecto al sistema de reacción .....	120
<b>Anexo I</b> .....	<b>121</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>129</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>133</b>

## 1.1. La lactosa

La lactosa o azúcar de la leche es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches. De los componentes de la leche es el más abundante (40% de los sólidos de la leche de vaca), el de estructura química más simple y el más constante en proporción. La lactosa es menos dulce y soluble que la sacarosa y no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano.

Excepto en la leche, la lactosa es un azúcar muy raro en la naturaleza. Se sintetiza en la mama a partir de la glucosa sanguínea y en los rumiantes, a partir de ácidos volátiles, siendo éste el factor que limita la producción de leche. Para los seres humanos y para numerosos animales, la lactosa es prácticamente la única fuente de galactosa (Alais, 1971).

La lactosa, 4-O-( $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), es una hexobiosa de fórmula condensada  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , con un peso molecular de 342 g/g-mol. Existe como dos formas isómeras:  $\alpha$  y  $\beta$ , que se diferencian únicamente en la posición de un grupo -OH en el carbono  $C_1$  de la glucosa (isomería ciclánica) (Figura 1.1). Además, se conoce la forma hidratada  $\alpha C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ .

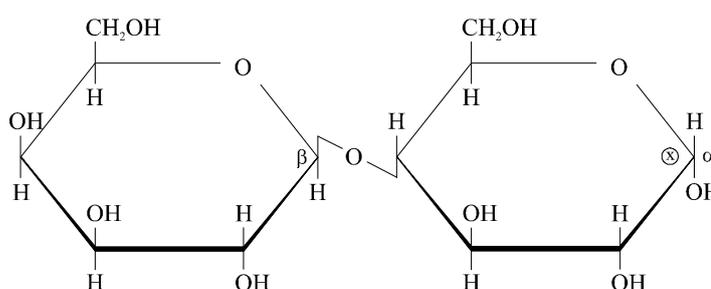
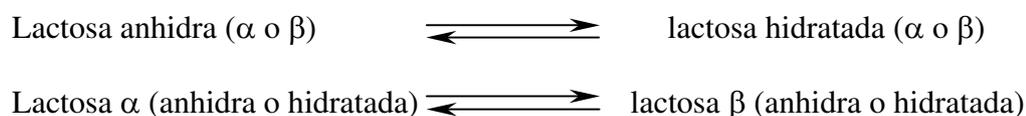


Figura 1.1. Estructura molecular de la lactosa.

Según Zadow (1984), estas tres formas existen en equilibrio de acuerdo a las condiciones físicas del medio, probablemente en un doble equilibrio:



Por lo tanto, la lactosa está formada por la unión de una molécula de  $\beta$ -galactosa y una molécula de glucosa  $\alpha$  o  $\beta$ . El grupo aldehídico de la primera está unido al enlace y el segundo está libre (en forma pseudo-aldehídica).

Al hidrolizarse, la lactosa libera glucosa y galactosa, cuyo poder edulcorante combinado es de aproximadamente el 80% del de la sacarosa. Este hidrolizado es también unas 3 ó 4 veces más soluble que la lactosa y además, los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa por la mucosa digestiva (Zadow, 1984).

## **1.2. La hidrólisis de la lactosa**

La hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa es interesante desde tres puntos de vista.

En primer lugar, un porcentaje significativo de la población mundial (75% de la población negra, 90% de los orientales e indígenas americanos, menos del 20% de la población caucásica originaria del noroeste de Europa y gran parte de la población infectada con el virus del SIDA) es intolerante a la lactosa, por lo que no puede beber leche sin sufrir diarreas y problemas gastrointestinales (Barnes, 1994; Walker y Smith, 1988; Lloyd-Still, 1979; Greene y Ghishan, 1982). Esta intolerancia tiene consecuencias muy importantes para la salud, puesto que puede conducir a la mal nutrición en aquellas personas afectadas que deben suspender la ingesta de leche y en consecuencia la ingesta de importantes nutrientes.

En segundo lugar, la lactosa es un azúcar relativamente insoluble (aproximadamente 10 veces menos soluble que la sacarosa) y origina muchos problemas al cristalizar durante el almacenamiento, particularmente si está concentrado, por lo que no se utiliza como edulcorante (Hobman, 1984). Con la lactosa no se pueden obtener jarabes espesos ni confituras estables a la temperatura ordinaria. Las soluciones concentradas de lactosa quedan en estado de sobresaturación durante la refrigeración. A 25 °C, la solubilidad límite de la lactosa es de 22 g por 100 ml de agua.

En tercer lugar, la producción de quesos deja como subproducto al suero, que contiene concentraciones relativamente altas de lactosa. De esta forma, anualmente se generan grandes cantidades de suero, lo que implica graves problemas para su

eliminación como así también la pérdida de hidratos de carbono. En nuestro país se desechan anualmente más de 2.000.000 de litros de suero que poseen una demanda biológica de oxígeno (DBO) de aproximadamente 35.000 mg O<sub>2</sub>/lt de suero (Hobman, 1984). La problemática es tal que verter un litro de suero supone la muerte por asfixia de todos los peces contenidos en 10 toneladas de agua.

Debido a la legislación vigente que prohíbe el volcado de efluentes de alta carga orgánica sin tratamiento previo a los cursos de agua, inicialmente parte del suero se suministraba a los animales en granjas en reemplazo del agua y parte se arrojaba sobre el campo pero se ocasionaron problemas tales como trastornos digestivos, dado la falta de hábito de los animales para consumir un producto con elevado contenido de lactosa o problemas tales como contaminación ambiental, ya que con la formación de charcos se produce mal olor y presencia de insectos, o se puede elevar la acidez del suelo.

Surge así la necesidad de implementar metodologías de tratamiento del suero como efluente o deshidratarlo para usos posteriores, pero los costos de instalación y los demandados para eliminar grandes volúmenes de agua hacen también difícil esta operación. Sumado a ello, los grandes volúmenes de suero producidos superan la capacidad ociosa de las plantas de secado, y por lo tanto el suero actualmente es directamente eliminado como efluente.

La lactosa se puede hidrolizar mediante ácidos fuertes, resinas de intercambio iónico o por enzimas, siendo este último método el que asegura un proceso de hidrólisis sin afectar los otros componentes presentes en la leche. La enzima utilizada para dicha hidrólisis se denomina  $\beta$ -Galactosidasa o más comúnmente lactasa (Wingard y otros, 1980; Yang y Tang, 1988).

### **1.3. El uso de enzimas para la hidrólisis de la lactosa**

Las principales fuentes comerciales de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa son los microorganismos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*. Las preparaciones de lactasa pura se obtienen a partir de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis*, *Zymomonas mobilis*, *Sacharomyces anemesis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces*

*marxianus* y hongos. Las lactasas obtenidas de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis* y *Zymomonas mobilis* se utilizan mayoritariamente en química analítica. Entre las lactasas obtenidas de *Kluyveromyces*, la lactasa de la levadura de la leche *Kluyveromyces lactis* es por el momento la más utilizada a escala comercial. Las condiciones óptimas de acción de las lactasas de *Kluyveromyces* (35-40 °C, pH 6,6-7,3) son similares a las condiciones de la leche, por lo que son muy útiles en el tratamiento de ésta y de sueros no ácidos (Mahoney y Adamchuk, 1980).

La segunda preparación de lactasa más conocida consiste en una lactasa fúngica derivada del *Aspergillus niger*, cuyas condiciones óptimas de trabajo son de aproximadamente 50 °C y pH de 3,5-4,5. La aplicación de esta lactasa está limitada al suero ácido. La enzima procedente de ambas fuentes es inhibida por el producto de la hidrólisis, la galactosa, de forma que es muy difícil conseguir la hidrólisis completa de la lactosa (Wiseman, 1991).

Bajo ciertas condiciones, la  $\beta$ -Galactosidasa cataliza la formación de oligosacáridos, llegando en algunos casos hasta el 40% del contenido total de azúcar en la solución, dependiendo de la fuente de la enzima y las condiciones de reacción, efecto que es necesario disminuir para aprovechar al máximo el poder edulcorante del producto resultante.

La actividad y la estabilidad de la enzima libre pueden modificarse con el agregado de ciertos cationes en determinadas concentraciones (Rickenberg, 1959; Becker y Evans, 1969; Mahoney y Whitaker, 1977). Se determinó, en particular, que los iones  $K^+$  poseen un efecto positivo sobre la actividad de la enzima, mientras que elevadas concentraciones de iones  $Ca^{2+}$  disminuyen la actividad de la enzima, variando la intensidad de su incidencia con el origen de la enzima y las condiciones de trabajo.

Las lactasas se aplican en diversos campos (Richmond y Gray, 1981; Patocka y Jelen, 1988):

- ★ Leches sin lactosa para regímenes especiales, principalmente de niños.
- ★ Leches destinadas a la elaboración de quesos y yogures.
- ★ Producción de edulcorantes y jarabes de suero hidrolizado soluble y/o lactosa.
- ★ Productos concentrados, como leches condensadas, dulce de leche y helados elaborados con lactosa, para evitar la textura arenosa.

#### **1.4. La inmovilización de enzimas**

La hidrólisis discontinua no es viable comercialmente excepto en el caso en que las lactasas se añadan a los contenedores de la leche durante el envasado, de forma que la lactosa se hidrolice durante el transporte y almacenamiento de la leche. Por esta razón, se han realizado considerables esfuerzos para inmovilizar la lactasa.

Los métodos de inmovilización, a través de mecanismos físicos y/o químicos, consiguen retener una o varias enzimas en un sistema sólido, conservando parcialmente sus propiedades biológicas y permitiendo el transporte del o los sustratos y el o los productos entre la fase móvil y el material activo.

Para seleccionar un método de inmovilización se deben conocer los cambios en las propiedades físicas y químicas que pueden producirse durante la inmovilización de la enzima y las posibles modificaciones del soporte o interacciones enzima-soporte que pueden ocurrir.

Un soporte ideal a utilizar en la inmovilización debe poseer las siguientes características: gran superficie por unidad de volumen y alta permeabilidad, grupos funcionales para la inmovilización de enzimas, elevado carácter hidrofílico, insolubilidad en agua, estabilidad química y térmica, resistencia mecánica y posibilidad de formación de partículas, resistencia al ataque microbiano, posibilidad de regeneración, debe ser no tóxico y de bajo precio.

Respecto del método de inmovilización, resulta muy difícil a priori, definir la conveniencia de uno u otro en una aplicación específica. Por lo tanto, para cada aplicación se debe encontrar un procedimiento de inmovilización sencillo y barato con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y que tenga elevada estabilidad operacional (Wiseman, 1991).

La enzima  $\beta$ -Galactosidasa obtenida de distintas fuentes, ha sido inmovilizada con relativo éxito en una gran variedad de soportes a escala de laboratorio: en soportes inorgánicos, colágeno, agarosa, así como en geles de poliacrilamida y fibras de acetato de celulosa (Okos y otros, 1978; Hannibal-Friedrich y otros, 1980; Bernal y Pavel, 1985; Siso, 1993; Wang y Ruckenstein, 1993; Carrara y Rubiolo, 1994). Células microbianas productoras de  $\beta$ -Galactosidasa se han inmovilizado en geles de

poliacrilamida. El soporte a utilizar, el método de inmovilización escogido y la aplicación que se le dé a la preparación influyen en la elección de la fuente enzimática (Roberts, 1977).

### **1.5. Características del sistema reaccionante**

Considerando las características de la reacción de hidrólisis de la lactosa en la que interviene la  $\beta$ -Galactosidasa produciendo glucosa y galactosa (sustrato y productos de tamaño pequeño), la presencia de macromoléculas en el medio donde se encuentra el sustrato (leche fluida o suero de quesería) y la posibilidad de alteración de la enzima por contaminación microbiológica, el entrapamiento es uno de los métodos más adecuados para la inmovilización de la enzima (Banerjee y otros, 1984). En el tratamiento de suero se soluciona además, el problema de obstrucción por los sólidos no disueltos que deben ser filtrados o centrifugados cuando se aplican otros métodos de inmovilización. El método de entrapamiento, que retiene la enzima dentro de la estructura interna del material utilizado y no afecta a los elementos que intervienen en la reacción al ser de tamaño pequeño, posee la ventaja de producir una menor alteración de la sustancia activa.

En esta técnica de inmovilización se han utilizado muy frecuentemente los hidrocoloides, resultando el alginato de calcio adicionado de  $\kappa$ -carragenina una matriz muy conveniente (Mammarella y otros, 1991). Estos polisacáridos presentes en las algas marinas producen, en bajas concentraciones, soluciones de alta viscosidad y geles. En solución, las cadenas lineales de polisacáridos se encuentran en forma desordenada, mientras que con la adición de un catión forman una matriz con una estructura específica, debido a las interacciones entre cadenas y con el catión (puentes de hidrógeno, interacciones entre dipolos, iónicas y de solvatación) (Davidson, 1980; Glicksman, 1983).

El alginato gelifica como alginato de calcio en un medio rico en calcio y la  $\kappa$ -carragenina puede formar geles en presencia de iones potasio produciendo el endurecimiento con encogimiento y expulsión de agua. Se ha observado que los iones calcio incrementan la resistencia del gel hasta un valor máximo a partir del cual un aumento en su concentración no ejerce más influencia (Mammarella y otros, 1999). Si

la enzima se disuelve en una solución de hidrocoloides, resulta atrapada en la matriz donde las reacciones de gelificación tienen lugar.

Los geles de carragenina son muy débiles y fácilmente quebradizos, limitando su utilización en la inmovilización de enzimas (Luong, 1985). Sin embargo, la  $\beta$ -Galactosidasa inmovilizada en un gel de  $\kappa$ -carragenina incrementa su actividad debido a la presencia de iones  $K^+$ . Si se utiliza una mezcla de hidrocoloides para formar la matriz-soporte, ellos pueden actuar sinérgicamente otorgando los beneficios de los cationes y la necesaria resistencia mecánica (Glicksman, 1983).

La velocidad de la reacción es modificada por la transferencia de materia hacia y desde el biocatalizador debido a la resistencia externa de la película y a la difusión de sustrato/s y producto/s (Merchant y otros, 1987). El tipo de gel influye en la acción de la enzima, ya que afecta al material biológicamente activo retenido y en la interacción de los componentes (Hulst y Tramper, 1989). Para esto, resulta importante contar con un modelo sencillo que permita predecir la formación de los geles y determinar el tiempo en el que se produce el entrecruzamiento completo del hidocoloide y la cantidad de iones necesarios.

Por otro lado, como la estructura formada con el hidocoloide se puede modificar con las condiciones de reacción (tiempo-temperatura) y con el contacto del soporte con el fluido (Luh y otros, 1977) produciendo efectos de hinchamiento y debilitamiento del soporte y alterando el funcionamiento del biorreactor (pérdida de enzima, aumento de la pérdida de carga, obstrucción, etc.) (Woodward y otros, 1982), se deben encontrar las proporciones óptimas de los componentes de la matriz que minimicen los cambios y permitan que el catalizador tenga un largo período de estabilidad (Hossain y Do, 1992). Por lo tanto, como esta compleja situación no ha sido estudiada, resulta importante caracterizar los factores que influyen mayoritariamente en dicho proceso y encontrar las condiciones óptimas que aseguren un biocatalizador de amplia utilidad para la industria láctea.

Por último, para garantizar la utilidad del biocatalizador en un reactor continuo, se debe conocer cómo difunde el sustrato desde el seno del líquido hacia la superficie del soporte y luego al sitio activo en el interior del soporte, mientras los productos realizan el camino inverso, determinando los correspondientes coeficientes de difusión. Los modelos planteados consideran la difusión de un único componente (Handriková y otros, 1996) cuando en realidad los productos que se obtienen, generalmente de menor tamaño, pueden ser afectados por el ingreso de sustratos de mayor tamaño y viceversa, disminuyendo o acelerando la velocidad de difusión. Por lo tanto, la predicción de los comportamientos de las principales variables de control debe ser realizada teniendo en cuenta estos posibles efectos.

En consecuencia, se planteó como objetivo general de este trabajo:

- ★ Estudiar y caracterizar el comportamiento de la reacción de la  $\beta$ -Galactosidasa,

inmovilizada a partir de preparaciones comerciales en geles de hidrocoloides.

★ Obtener un modelo para un reactor tubular de lecho fijo que permita predecir el comportamiento en el tiempo del biocatalizador elegido en el sistema de reacción.

Se plantearon los siguientes objetivos parciales:

★ Caracterizar distintas preparaciones de enzimas comerciales sobre la base de su actividad, estabilidad, pH y temperaturas óptimas de operación, efecto de distintas sustancias sobre la actividad y estabilidad de la enzima en estado libre, para seleccionar la de mejor comportamiento en las condiciones de reacción establecidas.

★ Estudiar y modelar matemáticamente el mecanismo de gelificación de los hidrocoloides para predecir, tanto el tiempo de formación según la composición de la mezcla que gelifica, como los puntos óptimos para conseguir la estructura más resistente que permita obtener un mayor rendimiento en el proceso de hidrólisis.

★ Obtener y caracterizar distintos biocatalizadores sobre la base de su actividad, estabilidad, resistencia mecánica, temperatura y pH óptimos, características cinéticas, resistencias a la difusión de sustrato y productos, y rendimientos, para el estudio del reactor.

★ Modelar matemáticamente el comportamiento del biocatalizador seleccionado en un reactor tubular de lecho fijo para determinar las mejores condiciones de funcionamiento del biorreactor en función del caudal de trabajo, concentración de sustrato y vida útil del biocatalizador.

### **3.1. Características de las enzimas**

Una enzima es una proteína o sustancia proteica formada por largas cadenas de aminoácidos ligados mediante enlaces peptídicos. Las enzimas actúan como catalizadores de una reacción específica en procesos metabólicos de organismos vivos. Esto quiere decir que, sin ser consumidas durante el proceso, las enzimas alteran la velocidad a la cual una reacción química tiene lugar, acelerando procesos químicos que de otra manera no se producirían o serían muy lentos. En principio, este mecanismo podría continuar indefinidamente, pero en la práctica la mayoría de los catalizadores tienen vida limitada dado que en algunas circunstancias su actividad llega a ser tan baja que su empleo no resulta beneficioso. Consecuentemente, la mayoría de las enzimas industriales se usan durante un período limitado y luego son descartadas (Wiseman, 1991).

Contrariamente a los catalizadores químicos inorgánicos ordinarios, como algunos ácidos, bases, metales y óxidos metálicos, las enzimas son muy específicas. Es decir, cada enzima degrada o sintetiza un compuesto químico en particular. En ciertos casos, incluso limitan su acción a enlaces específicos en los compuestos con los que reaccionan. En los procesos industriales, la acción específica de las enzimas permite obtener buenos rendimientos con un mínimo de subproductos no deseados.

Provenientes de células vivas, las enzimas actúan a presión atmosférica y en condiciones suaves de pH y temperatura. Debido a que las enzimas cumplen roles importantes en los seres que las producen, resulta que una misma enzima obtenida de distintas fuentes presenta distintas condiciones óptimas de funcionamiento, las cuales corresponden a las de funcionamiento de las mismas para el mejor desarrollo del organismo que la produce. Así, las enzimas obtenidas de hongos funcionan mejor a pH ácidos, mientras que las obtenidas de levaduras y bacterias actúan mejor a pH cercanos a la neutralidad (Reed, 1975; Birch y otros, 1981).

Las enzimas se denominaron en general, adicionando el sufijo “asa” al nombre del sustrato sobre el cual actuaban o a un término que describe las reacciones que catalizan. Para evitar problemas de multiplicidad de nombres para una misma enzima, un comité de la Unión Internacional de Bioquímica determinó un esquema de clasificación que asigna un código con cuatro números a cada enzima y clasifica a las enzimas en seis

grupos importantes de acuerdo a la clase general de reacciones químicas que catalizan (primer número). Estas clases a su vez se encuentran divididas en subclases de acuerdo al enlace o grupo sobre el que actúa la enzima o el grupo o enlace que participa en la reacción (segundo número) y en sub-subclases que identifican a qué grupo pertenece ese enlace (tercer número). El cuarto número corresponde al orden dentro del conjunto o de la combinación de los tres números anteriores (Horton y otros, 1995).

Debido a su eficacia, su acción específica, las condiciones de funcionamiento y su alta biodegradabilidad, las enzimas son aptas para una amplia gama de aplicaciones industriales. Sin embargo, no se utilizan con su fuente por cuanto deben ser sometidas a un proceso de extracción y purificación. Las enzimas pueden extraerse de glándulas animales, tejidos vegetales o microorganismos, aunque la fuente más importante de obtención de enzimas son los cultivos microbianos. Existen muchos microorganismos que producen la misma enzima, pero al seleccionar el más conveniente se deben tener en cuenta factores como: la facilidad del cultivo del microorganismo; la concentración de la enzima respecto de otros componentes del cultivo; la presencia o ausencia de factores indeseables en el microorganismo, tales como su carácter patógeno; la formación de productos tóxicos, la presencia de enzimas indeseables y la estabilidad del microorganismo (si es capaz de realizar una producción consistente de la enzima deseada sin posibilidad de una mutación espontánea) y, por último, la facilidad de remover la actividad deseada de la masa celular. Puede emplearse el cultivo de microorganismos estándares o mutaciones de los mismos conseguidos a través de la ingeniería genética. Para obtener un buen rendimiento deben controlarse rigurosamente las variables ambientales del cultivo: temperatura, pH, composición del medio (incluyendo la presencia de surfactantes), aireación, etapa del ciclo de crecimiento del microorganismo y la adición de inductores.

La obtención de enzimas a partir del cultivo de microorganismos a escala industrial puede realizarse por dos procesos principales: el cultivo en superficie o el cultivo sumergido. Ambos métodos requieren que el medio nutriente sea esterilizado y que suministre adecuadamente los carbohidratos y nitrógeno necesarios para el desarrollo del microorganismo. En ambos métodos el medio de cultivo debe ser inoculado con los microorganismos seleccionados y tanto el adecuado suministro de aire, como el control

estricto de la temperatura, son requeridos para obtener una óptima producción de la enzima en el cultivo (Wiseman, 1991).

Frecuentemente, las enzimas se encuentran dentro de las células, razón por la cual se debe realizar una o más operaciones para extraerlas. Debe tenerse en cuenta que las proteínas son diferentes a la mayoría de las otras moléculas. En ellas, la estructura física es tan importante como la estructura química. Si la estructura de la proteína cambia, la proteína no tendrá la actividad buscada (Wingard, 1980).

En nuestro caso, la  $\beta$ -Galactosidasa es también conocida como lactasa porque utiliza lactosa como sustrato. La  $\beta$ -Galactosidasa cataliza la reacción de hidrólisis de los residuos terminales no reducidos de  $\beta$ -D-galactosa en compuestos  $\beta$ -D-galactósidos. Por este comportamiento se la puede clasificar, de acuerdo a la numeración establecida, como una enzima clase hidrolasa (3.-.-.), subclase glicosidasa (3.2.-.-), sub-subclase compuestos O-glicosílicos (3.2.1.-), y dentro de este subgrupo posee el número de orden 23. Así, de acuerdo a la clasificación internacional la  $\beta$ -Galactosidasa resulta una enzima 3.2.1.23 (Enzyme data bank, 1995).

La  $\beta$ -Galactosidasa puede obtenerse de diversas fuentes, pero su producción a escala industrial para aplicaciones en la industria alimenticia, solamente se realiza mediante el cultivo de microorganismos considerados seguros por organismos internacionales, tales como las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis* y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* (Office of Premarket Approval, 1998). La lactasa de *Escherichia coli* no es utilizada en el procesamiento de alimentos debido a su costo de producción y problemas de toxicidad al utilizar extractos crudos de coliformes (Gekas y Lopez-Leiva, 1985).

Las enzimas obtenidas de hongos se utilizan para tratar el suero ácido, mientras que para trabajar con leche y suero neutro, las enzimas más convenientes y utilizadas a escala comercial son las obtenidas de cepas de *Kluyveromyces* (Mahoney y Adamchuk, 1980; Ismail y otros, 1997; Mahoney y Wilder, 1989; Annunziato y Mahoney, 1987).

Para seleccionar una enzima se debe poseer la mayor información posible relacionada con su estructura para poder predecir su comportamiento en las condiciones de operación. Aunque no existe un conocimiento acabado de la estructura de las

distintas enzimas  $\beta$ -Galactosidasa, se dispone de un trabajo muy importante para la aproximación de la lactasa de la levadura de la leche *Kluyveromyces lactis* que puede utilizarse como base para predecir posibles alteraciones químicas en el medio de trabajo. En esta enzima, los 1025 aminoácidos que componen la cadena (ExPASy, 1999) se pueden clasificar como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Composición de aminoácidos presentes en la enzima  $\beta$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sp.

Aminoácido	N° de unidades	Porcentaje
<i>No polares</i>		
Alanina (Ala)	51	5,0
Valina (Val)	72	7,0
Leucina (Leu)	76	7,4
Isoleucina (Ile)	56	5,5
Prolina (Pro)	50	4,9
Metionina (Met)	9	0,9
Fenilalanina (Phe)	57	5,6
Triptofano (Trp)	19	1,9
<i>Polares, neutros</i>		
Cisteína (Cys)	7	0,7
Glicina (Gly)	68	6,6
Serina (Ser)	63	6,1
Treonina (Thr)	48	4,7
Tirosina (Tyr)	54	5,3
Asparagina (Asn)	59	5,8
Glutamina (Gln)	27	2,6
<i>Polares, ácidos</i>		
Ac. Aspártico (Asp)	75	7,3
Ac. Glutámico (Glu)	81	7,9
<i>Polares, básicos</i>		
Arginina (Arg)	34	3,3
Histidina (His)	38	3,7
Lisina (Lys)	81	7,9

Del análisis de la composición de aminoácidos presentada en la Tabla 3.1, se puede establecer para esta  $\beta$ -Galactosidasa un peso molecular de 117.618,78 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,42. De la misma manera que se cuenta con la composición de aminoácidos, existen algunos trabajos de decodificación genética que permiten postular la secuencia de aminoácidos para esta enzima, a la vez que se propone la existencia de

dos sitios activos, uno correspondiente a la posición 482, que actúa como donante de protones y es el responsable de la reacción de hidrólisis de la lactosa, y el otro que actúa como nucleófilo, en la posición 551 (Poch y otros, 1992).

Por otra parte, la enzima obtenida de *Kluyveromyces fragilis* posee parecido peso molecular y las mismas características que la de *Kluyveromyces lactis* por lo que puede considerarse, debido a su origen, como constituida en forma similar a ésta (Mahoney y Adamchuk, 1980; Mahoney y Whitaker, 1977).

Si bien se cuenta con importante información sobre la composición de la enzima a utilizar, resulta indispensable estudiar previamente su actividad y estabilidad en el medio de trabajo debido a que estos parámetros pueden modificarse, no sólo con el pH y la temperatura sino con el agregado de ciertos cationes en determinadas concentraciones (Rickenberg, 1959; Becker y Evans, 1969; Mahoney y Whitaker, 1977) y luego realizar su caracterización cinética.

Cualquiera sea el origen de la enzima, el mecanismo de reacción aceptado considera la formación de un complejo [enzima-sustrato] a través de la interacción de la galactosa con el sitio activo de la enzima. A partir de esto, se libera primero la glucosa y luego puede separarse la galactosa o la reacción del complejo [enzima-galactosa] con un mono o disacárido para producir un di u oligosacárido (Santos y otros, 1998; Mahoney, 1998). La galactosa, como producto de hidrólisis, puede interactuar nuevamente con el sitio activo de la enzima, compitiendo por el mismo con la lactosa (Weetall y Noshir, 1974; Mahoney y Whitaker, 1978). Este mecanismo se conoce como inhibición por producto.

El modelo más aceptado para establecer la relación entre los componentes de la reacción se obtiene planteando la cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto (Roberts, 1977).

### **3.2. Características de los métodos de inmovilización**

Los métodos de inmovilización se caracterizan por fijar una o varias enzimas activas, o células, dentro de un sistema insoluble que permite el transporte del o de los sustratos y del o de los productos de la fase móvil.

Las enzimas han sido reiteradamente inmovilizadas mediante métodos físicos o químicos. Sin embargo, estos métodos han mostrado algunas desventajas tal como la desactivación parcial de la enzima. Las modificaciones en las propiedades de las enzimas después de la inmovilización pueden deberse a factores tales como: cambios conformacionales en la enzima, difusión en la película y poros o acción de componentes y carga del soporte.

Los sistemas de enzimas inmovilizadas, basados en su capacidad de reutilización, se pueden clasificar en dos tipos: enzimas insolubles (utilizadas en reactores de lecho fijo, tanques continuos, etc.) y enzimas solubles (utilizadas en reactores de membrana semipermeable).

Las enzimas pueden inmovilizarse por dos vías: a) utilizando métodos químicos, que dependen de la formación de un enlace covalente, de la fijación a una matriz insoluble e inerte con un reactivo multifuncional (enlaces cruzados), o de la incorporación a la formación de un polímero (co-polimerización) y b) a través de métodos físicos, ya sea por adsorción sobre una matriz insoluble o por entrapamiento dentro de geles, fibras o microcápsulas.

Existe una amplia variedad de soportes y técnicas utilizados en la inmovilización de diferentes enzimas, debiéndose ensayar distintos soportes y técnicas para asegurar la mayor retención de la actividad de la enzima, su estabilidad y durabilidad. La matriz o soporte más adecuado es aquel que muestra una alta afinidad hacia las proteínas, posee grupos reactivos para favorecer la inmovilización, resulta de fácil utilización para preparar biocatalizadores de distintas formas y tamaños y no es tóxico. Por estas razones, el uso de biopolímeros ha encontrado aplicación en los últimos años en la inmovilización de enzimas, microorganismos y células vegetales, mediante la técnica de entrapamiento, o por fijación sobre la superficie del soporte, mediante la unión de compuestos activos.

El método de entrapamiento se basa en la capacidad de formación de estructuras tridimensionales (geles) que poseen algunos polímeros naturales (biopolímeros) bajo determinadas condiciones (Tabla 3.2) por las que pueden retener efectivamente dentro de la estructura interna del material utilizado, a enzimas o células. Este método es de

gran utilidad cuando los elementos que intervienen en la reacción son de tamaño pequeño y posee la ventaja de producir una menor alteración de la sustancia activa.

Tabla 3.2: Polímeros naturales empleados en la inmovilización de enzimas y/o células.

Polímero	Mecanismo de gelificación
Agar	Térmico
Agarosa	Térmico
Alginato	Interacciones iónicas
Carragenina	Interacciones iónicas (térmico)
Gelatina	Reticulación con glutaraldehído
Quitosano	Interacciones iónicas
Alginato/Quitosano	Interacciones iónicas entre sí y con otros iones

En el caso de alginatos, carrageninas y quitosano, cuando se encuentran en solución se comportan como polielectrolitos que gelifican, como se especifica en la Tabla 3.3, con el ión de carga opuesta (Knoor, 1982).

Tabla 3.3: Comportamiento de los biopolímeros en la gelificación

Polímero	Comportamiento	Ión empleado para formar el gel	
		Bajo peso molecular	Alto peso molecular
Alginato	Polianiónico	Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Quitosano
Carragenina	Polianiónico	K <sup>+</sup>	Quitosano
Quitosano	Policatiónico	Polifosfato	Alginato, Carragenina

### 3.3. Características de los compuestos utilizados como soporte

Los hidrocoloides son polímeros naturales de alto peso molecular que se pueden extraer de distintos materiales, de plantas superiores como en el caso de galactomananos y pectinas, de algas como las carrageninas y alginatos, de animales de donde se obtiene la gelatina y/o de microorganismos como la goma xántica. Químicamente, estos hidrocoloides pueden dividirse en dos clases distintas: polisacáridos y proteínas.

Los polisacáridos son polímeros de carbohidratos donde las unidades de azúcares se unen mediante enlaces glicosídicos. Una primera clasificación permite dividirlos en



Los geles formados son estables e insolubles bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y en ausencia de compuestos que pueden atacar su estructura.

### 3.3.1. Características de los alginatos

Los alginatos son un grupo de polisacáridos ácidos presentes en las algas marinas pardas, que forman geles por enlaces cooperativos con cationes bivalentes. Son polímeros lineales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-ácido manurónico y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-ácido galacturónico

Examinando la fórmula de Haworth (Figura 3.1), puede observarse que los dos residuos ácidos involucran epimerización en C-5. La única diferencia es la ocurrencia de la unión C-5 – C-6, encima o debajo del plano medio del anillo. La unidad de ácido  $\beta$ -D-manurónico adopta siempre la conformación  ${}^4C_1$ , mientras que el residuo ácido  $\alpha$ -L-galacturónico adopta la conformación  ${}^1C_4$ .

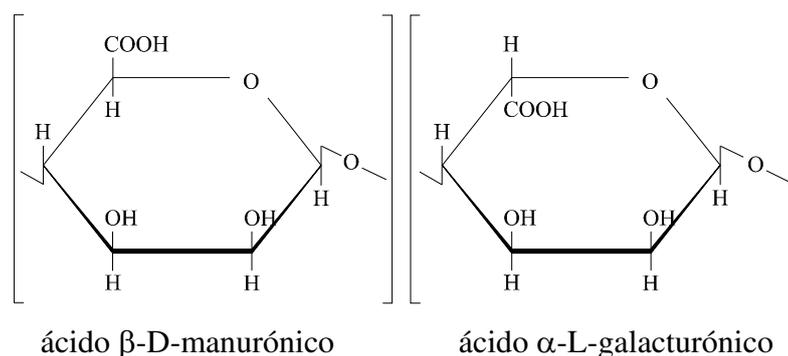


Figura 3.1: Fórmula de Haworth del ácido alginico

Investigaciones sobre la hidrólisis parcial (Whistler, 1973) y estudios más recientes de espectroscopía por resonancia magnética nuclear (Aspinall, 1985) muestran que los dos residuos monoméricos no presentan una distribución al azar, pudiendo presentarse distribuciones alternadas o por bloques de aproximadamente 20 unidades de acuerdo a las siguientes conformaciones:

- a) Secuencia homopolimérica de residuos de ác. manurónico: -M-M-M-M-
- b) Secuencia homopolimérica de residuos de ác. galacturónico: -G-G-G-G-
- c) Secuencia de los dos residuos alternados: -M-G-M-G-

Las macromoléculas son asociaciones de esos bloques que pueden presentarse en diversos grados dependiendo de la especie de alga utilizada y del grado de maduración alcanzado por el alga. La distribución de los residuos de los monómeros controla la capacidad del alginato para formar geles. Los bloques galacturónicos presentan una mejor conformación para la gelificación inducida por calcio (Danty y Goulding, 1986).

### **3.3.2. Características de las carrageninas**

Carragenina es el nombre dado a una familia de polisacáridos sulfonados lineales de alto peso molecular y de grado alimenticio obtenidos de las algas rojas. Ellas tienen la propiedad de formar una variedad casi infinita de geles a temperatura ambiente, rígidos o inconsistentes, resistentes o flácidos, con alto o bajo punto de fusión.

La gelificación no requiere de refrigeración y los geles pueden mantenerse estables a través de sucesivos ciclos de congelamiento-descongelamiento. Las soluciones de carrageninas pueden espesar, suspender y estabilizar tanto sea partículas, dispersiones coloidales o emulsiones agua/aceite. Las soluciones se fluidifican al someterse a un esfuerzo de corte, pero rápidamente recuperan la viscosidad y la fuerza de suspensión al detenerse el esfuerzo de corte.

Las carrageninas son polímeros constituidos principalmente por residuos de D-galactosa, unidos alternativamente en  $\alpha$ -(1→3) y  $\beta$ -(1→4) que se diferencian en el número y posiciones de grupos sulfatos y la presencia de un puente (3,6 anhidro).

La familia de las carrageninas posee distintas ramas denominadas kappa, iota, lambda, mu y nu, las que se pueden diferenciar muy bien en función de sus propiedades gelificantes y su reactividad a las proteínas. Las fracciones iota y kappa son las únicas con capacidad de gelificar. La kappa carragenina (Figura 3.2) produce geles firmes y rígidos, mientras que los producidos con productos iota son inconsistentes y flácidos. Si bien la lambda carragenina no gelifica en agua, interactúa fuertemente con las proteínas para estabilizar un amplio rango de productos lácteos.

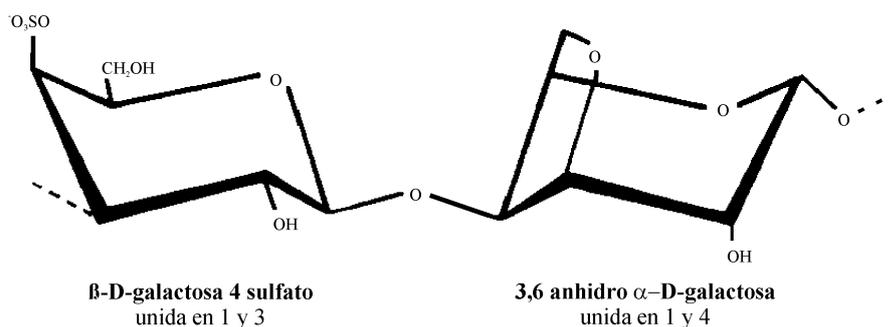


Figura 3.2: Estructura de la kappa-carragenina

### 3.3.3. Características del proceso de gelificación

La gelificación se produce por la formación de una red tridimensional. Las macromoléculas se asocian entre sí en ciertas regiones llamadas zonas de unión. Las regiones que quedan libres en la molécula, permiten el entrecruzamiento con muchas otras macromoléculas posibilitando la formación de una red tridimensional. La resistencia del gel y sus propiedades térmicas (reversibilidad térmica o no) están directamente relacionadas con la cantidad de zonas de unión formadas y con la naturaleza de los enlaces individuales involucrados en dichas zonas.

Generalmente, la gelificación (Figura 3.3) ocurre en dos etapas: primero se produce la solubilización de las macromoléculas (punto A, Figura 3.3) y luego las asociaciones de estas moléculas forman el gel (punto B, Figura 3.3). Este estado de transición se obtiene generalmente en el período posterior a un tratamiento de enfriamiento o con la presencia de un agente reticular, como por ejemplo los cationes en el caso de algunas macromoléculas aniónicas.

En estos casos, cuando las soluciones del hidocoloide y del catión se ponen en contacto, se forma inmediatamente un gel en la interfase. La propagación de la gelificación depende de la difusión de los cationes a través de la capa de gel, lo cual requiere tiempo. Cuando se utilizan sales poco solubles para formar los geles, la gradual puesta en libertad de los cationes resulta en un gradual fortalecimiento del gel.

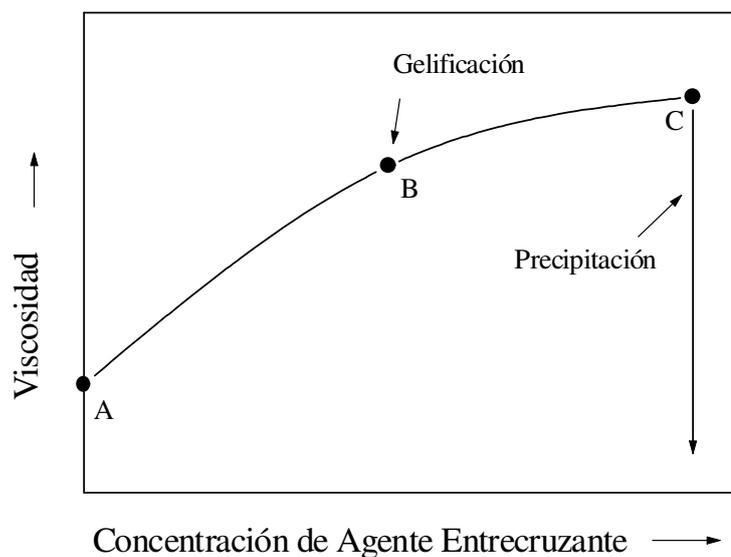


Figura 3.3: Mecanismo de gelificación de los hidrocoloides

Como las moléculas del hidrocoloide se van cerrando una con otra a través de las interacciones con los cationes, pueden formarse más fácilmente las uniones del tipo puente de hidrógeno que confieren al gel una mayor rigidez. Las zonas de la unión se obtienen muy a menudo por asociación intermacromolecular de segmentos regulares que existen en la estructura helicoidal o como cintas enroscadas. Los segmentos irregulares dan lugar a fragmentos libres que interrumpen las zonas de unión y permiten la formación de la red.

Consecuentemente, resulta imposible detener la interacción una vez que las soluciones del hidrocoloide y del catión han sido mezcladas. Por estos motivos, los

geles así producidos se comportan como sistemas dinámicos, es decir, su resistencia usualmente aumenta con el tiempo (después de varias horas). A su vez, los reacomodamientos estructurales producidos por las uniones puente de hidrógeno, permiten que continúe la incorporación de cationes en el gel otorgándole mayor rigidez, alcanzando el punto C de la Figura 3.3.

Las asociaciones entre cadenas en los alginatos muestran zonas plegadas y estabilizadas por los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada catión neutraliza dos cargas negativas en dos cadenas diferentes. A este modelo de gelificación (Figura 3.4 a) se lo llama modelo de “caja de huevos”. Estos geles pueden ser reversibles o irreversibles, dependiendo de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  presente y de la longitud de las zonas regulares.

Las macromoléculas de kappa-carragenina exhiben regiones arrolladas regularmente. Las zonas de unión entre dos cadenas tienen lugar por una asociación de esas zonas regulares para formar doble hélices (Figura 3.4 b). Esta estructura resulta estabilizada por puentes de hidrógeno, fácilmente destructibles por un aumento importante de la temperatura. Por esta razón este tipo de geles puede resultar térmicamente reversible.

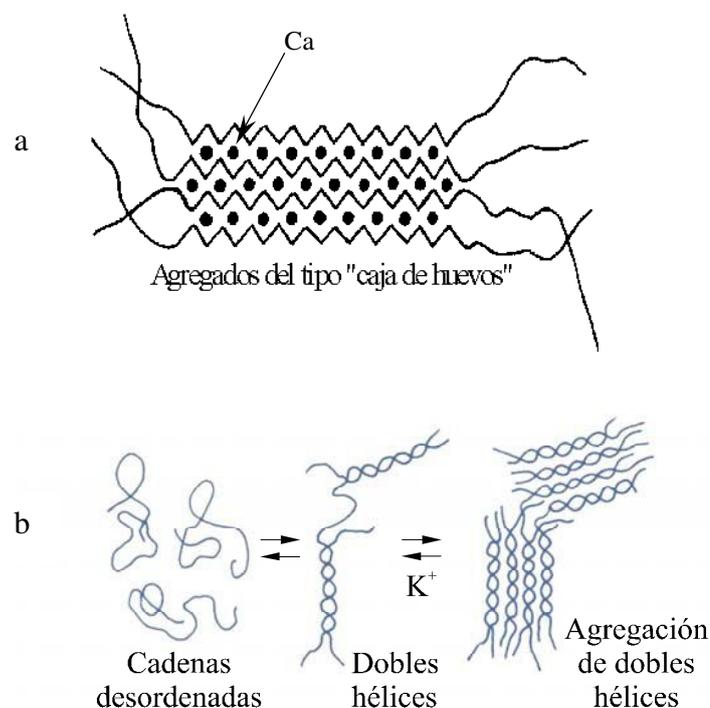


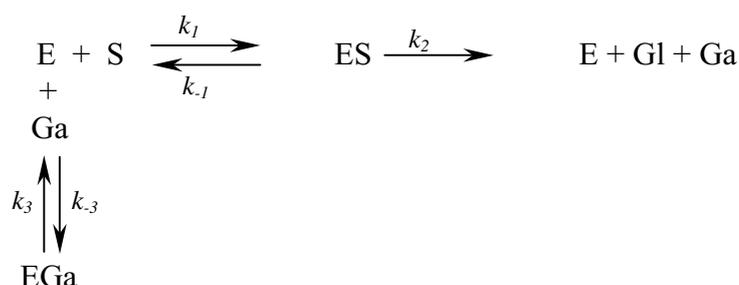
Figura 3.4: Modelo de gelificación del alginato y la kappa-carragenina.

#### 4.1. Cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima $\beta$ -Galactosidasa

El análisis cuantitativo del efecto de cada uno de los factores que intervienen en la reacción enzimática, es evaluado a través de la expresión de velocidad de reacción. Los factores más importantes son la concentración de enzima, de sustrato y de productos (inhibidores, activadores), el pH y la temperatura (Laidler y Bunting, 1973). Por otra parte, en el caso de cinética heterogénea, además se deben considerar los efectos de restricciones difusionales y de partición de las especies reactivas (Roberts, 1977).

El modelo más utilizado para describir la cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa por la enzima  $\beta$ -Galactosidasa es el conocido como de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. Una forma de análisis se basa en la teoría del estado estacionario que propone la existencia de un estado transiente muy breve (del orden de los  $\mu$ seg) y que la concentración del complejo [enzima-sustrato] es constante frente a la concentración de sustrato y producto (Weetall y Noshir, 1974; Roberts, 1977; Mahoney y Whitaker, 1978; Richmond y Gray, 1981; Kuo-Cheng y otros, 1985; Shang-Tian y Okos, 1989; Santos y otros, 1998).

El esquema de reacción que representa este modelo puede indicarse como:



donde E es la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, S es la lactosa, ES es el complejo enzima-sustrato ( $\beta$ -Galactosidasa-lactosa), Gl es la glucosa, Ga es la galactosa y EGa es el complejo enzima-producto ( $\beta$ -Galactosidasa-galactosa). La velocidad de consumo del sustrato puede expresarse por:

$$r_S = \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (4.1)$$

donde [E] es la concentración de enzima libre, [S] es la concentración de lactosa y [ES]

es la concentración del complejo enzima-sustrato.

En forma análoga y considerando estado estacionario se puede plantear la velocidad de consumo para el complejo enzima-sustrato:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [S][E] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad (4.2)$$

Por otra parte, teniendo en cuenta la concentración de enzima ligada a la galactosa, [EGa], la concentración total de enzima,  $[E^0]$ , puede expresarse como:

$$[E^0] = [ES] + [E] + [EGa] \quad (4.3)$$

Haciendo un planteo similar para la reacción de inhibición en estado estacionario:

$$\frac{d[EGa]}{dt} = -k_3 [EGa] + k_{-3} [E][Ga] = 0 \quad (4.4)$$

donde [Ga] es la concentración de galactosa. Despejando [EGa] de la ecuación (4.4) y [ES] de la ecuación (4.2), y reemplazando en la ecuación (4.3) se obtiene:

$$[E^0] = [E] \left( 1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + \frac{k_{-3}}{k_3} [Ga] \right) = [E] \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[Ga]}{k_i} \right) \quad (4.5)$$

donde  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ ,  $k_i = \frac{k_3}{k_{-3}}$ . Por último, despejando [E] de la ecuación (4.5),

suponiendo que  $[Ga] \approx [G]$ ,  $[Ga] = [S^0] - [S]$ , y reemplazando en la ecuación (4.1) tenemos:

$$v = - \frac{k_2 [E^0] [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[Ga]}{k_i} \right) + [S]} = - \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[S^0] - [S]}{k_i} \right) + [S]} \quad (4.6)$$

donde  $v = \frac{d[S]}{dt}$ ,  $V_{\max} = k_2 [E^0]$ .

Comparando la ecuación (4.6) con la ecuación de Michaelis-Menten, el efecto de la inhibición se observa como un incremento de  $K_m$  en un valor de  $[Ga]/k_i$  que dependerá de la concentración de galactosa pero no afecta a la velocidad máxima,  $V_{\max}$ , o sea que no interfiere en la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato.

La constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , es una constante característica de la enzima, independiente de la concentración de la enzima e indica la afinidad de la

enzima por el sustrato en las condiciones del medio de reacción (pH, fuerza iónica, presencia de activadores) y temperatura elegidos (Roberts, 1977).

#### 4.1.1. Integración de la ecuación cinética en un intervalo de tiempo

Cuando por las características de la reacción, no resulta posible determinar las velocidades iniciales, se puede extender el rango de tiempos y conversiones a utilizar integrando la ecuación (4.6) y considerando que  $[Ga] \approx [S^0] - [S]$ , de la siguiente forma:

$$\int_0^t [E^0] k_2 dt = - \int_{[S^0]}^{[S]} \left\{ \frac{K_m \left( 1 + \frac{[S^0] - [S]}{k_i} \right) + [S]}{[S]} \right\} d[S] \quad (4.7)$$

que reordenando, puede escribirse:

$$\int_0^t [E^0] k_2 dt = - \int_{[S^0]}^{[S]} \left\{ \left( 1 - \frac{K_m}{k_i} \right) + \left( K_m + \frac{K_m [S^0]}{k_i} \right) \frac{1}{[S]} \right\} d[S] \quad (4.8)$$

planteando a su vez la variación en términos de conversión, en lugar de concentración de acuerdo a la ecuación:

$$X_S = \frac{[S^0] - [S]}{[S^0]} \quad (4.9)$$

e integrando la ecuación (4.8) en términos de conversión resulta:

$$[E^0] t = \left\{ \left( \frac{k_i - K_m}{k_i} \right) \frac{[S^0]}{k_2} \right\} X_S - \left\{ \left( K_m + \frac{K_m [S^0]}{k_i} \right) \frac{1}{k_2} \right\} \ln(1 - X_S) \quad (4.10)$$

La ecuación (4.10) puede reescribirse en forma linealizada como:

$$\frac{[E^0] t}{X_S} = B - A \frac{\ln(1 - X_S)}{X_S} \quad (4.11)$$

donde A y B corresponden a:

$$A = \frac{K_m}{k_2} + \frac{K_m}{k_2 k_i} [S^0] = b_1 + a_1 [S^0] \quad (4.12)$$

$$B = \frac{k_i - K_m}{k_2 k_i} [S^0] = a_2 [S^0] \quad (4.13)$$

Por lo que las constantes cinéticas pueden obtenerse de las ecuaciones:

$$k_2 = \frac{1}{a_1 + a_2} \quad (4.14)$$

$$K_m = \frac{b_1}{a_1 + a_2} \quad (4.15)$$

$$k_i = \frac{b_1}{a_1} \quad (4.16)$$

#### **4.1.2. Influencia del pH sobre la cinética de reacción**

En general, las enzimas son activas en un rango limitado de pH, pudiéndose encontrar dentro de estos valores un pH óptimo. Este comportamiento es debido a la presencia de grupos ionizables de la enzima, de manera tal que los cambios de pH pueden alterar la conformación activa, su capacidad de unión con el sustrato y/o la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo. Los grupos ionizables del sustrato también pueden ser afectados por el pH, lo que puede resultar importante durante la formación del complejo enzima-sustrato, o el mismo complejo puede protonarse evolucionando hacia una forma inactiva. En general, todos estos efectos que se evidencian sobre los parámetros cinéticos,  $V_{\max}$  y  $K_m$ , tienen lugar simultáneamente, aunque también pueden producirse en forma aislada (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

Por otra parte, la estabilidad de la enzima puede verse afectada reversible o irreversiblemente por el tiempo en que la misma sea expuesta a un pH desfavorable, por lo tanto, el pH óptimo de trabajo se selecciona estableciendo un compromiso entre los efectos en la actividad y la estabilidad de la enzima (Bailey y Ollis, 1977; Doraiswamy, 1984).

#### **4.1.3. Influencia de la temperatura sobre la cinética de reacción**

En las reacciones catalizadas por enzimas al igual que en otras reacciones químicas, la velocidad de reacción aumenta al aumentar la temperatura; este aumento de temperatura incrementa la energía cinética de las especies reactivas y se produce un

mayor número de colisiones por unidad de tiempo. Como la actividad de una enzima depende de una estructura terciaria muy ordenada mantenida principalmente por enlaces no covalentes y que permite que el sustrato se acople a la enzima en el sitio activo, si la molécula adquiere suficiente energía, estos enlaces no covalentes pueden romperse (desnaturalización), perdiéndose la configuración de la estructura terciaria y, por lo tanto, la actividad catalítica.

El efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de reacción ha sido descrito por Arrhenius mediante la ecuación:

$$k_2 = \kappa_A e^{-E_a/RT} \quad (4.17)$$

donde:  $k$  es la constante de la velocidad de reacción,  $\kappa_A$  la constante de Arrhenius o factor preexponencial,  $E_a$  la energía de activación,  $R$  la constante universal de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. Como en el caso del pH, la temperatura también tiene influencia sobre los parámetros cinéticos ( $V_{\max}$  y  $K_m$ ) (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

Dado que en las reacciones catalizadas por enzimas, la energía de activación oscila entre 4 y 20 kcal/mol y que para producir la desnaturalización de la proteína se requiere una energía de activación de 40 a 130 kcal/mol, la temperatura óptima de reacción debe ser el resultado del compromiso entre estos dos efectos. Es decir, el empleo de temperaturas más altas incrementa la actividad de la enzima, pero en detrimento de su estabilidad (Bailey y Ollis, 1977).

#### **4.1.4. Influencia de la presencia de efectores sobre la cinética de reacción**

De la misma manera que algunas sustancias actúan como inhibidores de una reacción catalizada enzimáticamente, existen otros compuestos que afectan las constantes cinéticas de una reacción catalizada enzimáticamente. Dentro de estas sustancias, los cationes mono y divalentes son los que generalmente producen las mayores alteraciones, ocasionando fundamentalmente un aumento o disminución de  $K_m$  (Becker y Evans, 1969; Mahoney y Whitaker, 1977).

Existen diversas hipótesis para explicar estos efectos. Debido a que el sitio activo

de una enzima corresponde a una pequeña fracción de su estructura, compuesta por pocos aminoácidos ordenados de tal manera que existe una complementariedad en cuanto a tamaño, forma y naturaleza química de la molécula de sustrato, el mecanismo más aceptado implica la unión no covalente de estos grupos a la estructura de la enzima en las adyacencias del sitio activo, influyendo en las interacciones iónicas, hidrofóbicas, puentes de H, etc., a través de las cuales se forma el complejo enzima-sustrato (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

#### 4.1.5. Obtención y tratamiento de los datos cinéticos

Para la obtención de datos cinéticos se realiza una serie de determinaciones a distintas concentraciones iniciales de sustrato y de inhibidor manteniendo constante la cantidad inicial de enzima utilizada y determinando la velocidad inicial correspondiente a la ordenada al origen igual a cero, lo cual presupone que la velocidad de reacción permanece constante. Para considerar esta suposición, la concentración de sustrato debe permanecer prácticamente constante, lo que resulta difícil a bajas concentraciones de sustrato y por tanto debe ser verificado. El límite aceptable de utilización de sustrato es menor al 5 % (Laidler y Bunting, 1973; Roberts, 1977).

La forma más usual de determinar los parámetros cinéticos es graficar las velocidades iniciales (o su inversa) en función de la concentración de sustrato (o su inversa) para diferentes concentraciones de otras sustancias que afecten a la velocidad. De esta forma, la inversa de la ecuación (4.6) en condición isotérmica es:

$$-\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[Ga]}{k_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.18)$$

La pendiente de la recta varía con el valor de  $[Ga]$ , pero cualquiera sea este valor, la ordenada al origen será  $1/V_{\max}$ . El rango de concentración de sustrato recomendado a ensayar es de 0,2 a 5 veces  $K_m$  y los puntos deben estar uniformemente distribuidos en la linealización.

La determinación experimental de las velocidades de reacción puede llevarse a cabo en períodos muy disímiles de tiempo: cortos (30 segundos) o largos (1 hora) (Horton y otros, 1995), pudiéndose cometer errores en las mediciones. Para disminuir

posibles errores debidos a la falta de control de la conversión de sustrato, se pueden tomar los valores determinados por la linealización y realizar una regresión no lineal sobre la ecuación de Michaelis-Menten (Wilson y Hynn-Jael, 1971).

Si debido a las características de la reacción no es posible determinar velocidades iniciales, puede integrarse la ecuación (4.6) y por tanto, extenderse el rango de tiempos y conversiones a utilizar (Shang-Tian y Okos, 1989).

#### **4.2. Factores que afectan la cinética de las enzimas inmovilizadas**

El comportamiento cinético de una enzima inmovilizada puede ser significativamente diferente del que presenta cuando se encuentra libre en solución (Engasser y Hovarth, 1976). Asumiendo que la enzima luego del proceso de inmovilización se encuentra uniformemente distribuida en todo el volumen del catalizador, el cambio de comportamiento se debe principalmente a dos causas (Laidler y Buting, 1973; Toda, 1975; Patwradhan y Karanth, 1982): en primer lugar, existen cambios conformacionales en la estructura de la proteína, restricciones a la disponibilidad del sitio activo por parte del sustrato y/o interacciones directas entre [soporte-enzima] o [enzima-enzima] por el proceso de inmovilización. De esta manera, la actividad inicial de la enzima inmovilizada generalmente es menor que la correspondiente a la de la enzima libre.

En segundo lugar, debe considerarse la heterogeneidad del sistema. Cuando la reacción enzimática tiene lugar en un medio homogéneo, la concentración de todas las especies presentes es uniforme. Sin embargo, con una enzima inmovilizada, la concentración de las especies puede diferir desde el interior del soporte al seno de la solución, resultando afectada la velocidad de reacción. Esta diferencia de concentración de las especies en las proximidades de la enzima se puede producir por:

**Efecto de partición:** definido como la relación de la concentración de solutos entre la pared del catalizador y el líquido que lo rodea. Se produce debido a interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y electrostáticas entre soporte, sustrato, producto y/u otras especies presentes. Este fenómeno puede apreciarse al observar el desplazamiento del pico de actividad máxima en función del pH, de una enzima soluble respecto a una inmovilizada.

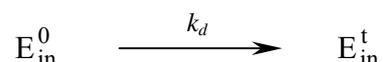
**Efecto difusional:** Alrededor de una partícula de catalizador en una solución de sustrato, se forma un film líquido estático, de espesor variable con la agitación, que el sustrato debe atravesar por difusión molecular para llegar al sitio de la reacción. La baja velocidad de difusión molecular y la alta actividad catalítica pueden producir un gradiente de concentración de sustrato desde el seno de la solución a la superficie del catalizador. En el caso de matrices porosas o geles, el sustrato debe difundir, además, al interior del soporte. Un efecto similar, pero en sentido inverso, se presenta para los productos de la reacción.

Dado que el comportamiento cinético de una enzima inmovilizada debe ser caracterizado por parámetros cinéticos intrínsecos que, según el sistema utilizado, pueden ser influenciados por los factores descritos, resulta necesario identificar y evaluar estos efectos. Los parámetros cinéticos intrínsecos de la enzima inmovilizada se indican con un apóstrofe [ $V'_{\max}$ ,  $K'_m$ ,  $k'_i$ ] para diferenciarlos de los correspondientes a la enzima soluble.

#### **4.2.1. Pérdida de actividad y vida media de las enzimas inmovilizadas**

La pérdida de actividad de una enzima inmovilizada puede deberse a cambios en su estructura terciaria o ruptura de sus cadenas polipeptídicas producidos por las condiciones de reacción, bloqueos permanentes de los sitios activos por parte de los inhibidores presentes, formación de agregados de moléculas de enzimas que pueden impedir el acceso del sustrato, pérdida de parte de la enzima fijada inicialmente al soporte, etc. Estas causas son difíciles de determinar en forma individual, por lo que resulta conveniente evaluarlas conjuntamente (Henley y Sadana, 1986; 1989).

El modelo más utilizado por su simplicidad, considera la disminución de actividad en el tiempo como una reacción irreversible de primer orden:



donde  $E_{in}^0$  representa a la enzima inmovilizada con actividad inicial;  $E_{in}^t$  la enzima inmovilizada desactivada a un tiempo  $t$  y  $k_d$  la constante de desactivación.

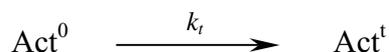
Para una concentración de enzima empleada, la velocidad de desactivación puede expresarse como:

$$\frac{d[E_{in}^t]}{dt} = -k_d [E_{in}^t] \quad (4.19)$$

Integrando esta ecuación se llega a una expresión exponencial para la concentración de enzima inmovilizada desactivada a un tiempo  $t$ ,

$$[E_{in}^t] = [E_{in}^0] e^{-k_d t} \quad (4.20)$$

Análogamente, se puede plantear en forma simple y conveniente la pérdida de actividad del catalizador como:



donde  $Act^0$  es la actividad inicial del catalizador;  $Act^t$  la actividad del catalizador a un tiempo  $t$  y  $k_t$  la constante de velocidad de pérdida de actividad. En este caso, la velocidad de pérdida de actividad del catalizador puede expresarse como:

$$\frac{dAct^t}{dt} = -k_t Act^t \quad (4.21)$$

Integrando esta ecuación se obtiene:

$$Act^t = Act^0 e^{-k_t t} \quad (4.22)$$

que nos permite obtener el valor de  $k_t$  por regresión lineal de los datos experimentales de  $[\ln Act^t/Act^0]$  vs.  $[t]$  cuando se emplean expresiones sencillas de cinéticas de reacción.

A fin de poder comparar distintos catalizadores, se determina el tiempo de vida media,  $\theta_{1/2}$ , que es el tiempo en que la actividad enzimática del biocatalizador disminuye hasta la mitad de su valor inicial ( $Act^t = 0,5 Act^0$ ). Este valor es tomado como control del rendimiento del proceso de inmovilización y evolución del biocatalizador (Wiseman, 1991).

### 4.3. Mecanismo de gelificación

Se consideró al proceso de gelificación como un proceso de difusión-reacción entre el catión disuelto (A) y el hidrocoloide (B) para producir un gel poroso (C) como se muestra en la siguiente ecuación:



Para la descripción de este proceso de entrecruzamiento se adoptó el modelo de núcleo contráctil (shrinking core model) que permite aplicar un procedimiento analítico-numérico y posibilita el análisis de casos generales.

Para este estudio se han realizado las siguientes consideraciones: proceso isotérmico, geometría cilíndrica, estado pseudo-estacionario, flujo convectivo despreciable, la difusión es el factor controlante de la velocidad de formación del gel, solamente existe difusión radial, la difusión de los iones entrecruzantes a través del gel cumple con la primer ley de Fick, coeficiente de difusión constante, los cationes difunden a través de la capa sólida hasta llegar a la interfase donde la reacción con los hidrocoloides se produce instantáneamente, el gel formado mantiene la forma y el tamaño inicial, y la concentración de hidrocoloides en el interior del gel [B] se mantiene constante. Así, el balance de materia en coordenadas cilíndricas puede expresarse como:

$$\frac{d}{dr} \left( r \frac{d[A]}{dr} \right) = 0 \quad (4.23)$$

con las siguientes condiciones de contorno:

$$r = R \quad \frac{d[A]}{dr} = \frac{k_1}{D_A} ([A_0] - [A]) \quad (4.24)$$

$$r = r_c \quad [A] = [A_i] = 0 \quad (4.25)$$

donde [A] es la concentración del catión en el interior del gel,  $k_1$  es el coeficiente externo de transferencia de materia y  $D_A$  es el coeficiente de difusión efectivo del catión en el gel.

Por otra parte, el movimiento de la frontera de gelificación puede expresarse por la siguiente expresión válida para  $r = r_c$ :

$$\frac{[B]}{b} \frac{dr_c}{dt} = -D_A \frac{d[A]}{dr} \quad (4.26)$$

con la siguiente condición inicial:

$$t_g = 0 \quad r_c = R \quad (4.27)$$

Integrando la ecuación (4.23) se tiene que:

$$\frac{d[A]}{dr} = \frac{\kappa_1}{r} \quad (4.28)$$

$$[A] = \kappa_1 \ln r + \kappa_2 \quad (4.29)$$

Reemplazando la ecuación (4.24) en la ecuación (4.28):

$$\left. \frac{d[A]}{dr} \right|_{r=R} = \frac{\kappa_1}{R} = \frac{k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \quad (4.30)$$

por lo que despejando se tiene:

$$\kappa_1 = \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \quad (4.31)$$

Reemplazando la ecuación (4.31) en la (4.29) y utilizando la ecuación (4.25):

$$[A]_{r=r_c} = \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \ln r_c + \kappa_2 = 0 \quad (4.32)$$

por lo que despejando se tiene:

$$\kappa_2 = - \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \ln r_c \quad (4.33)$$

Reemplazando las ecuaciones (4.31) y (4.33) en la ecuación (4.29):

$$[A] = \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \ln r - \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \ln r_c \quad (4.34)$$

Luego, calculando la concentración en la posición  $r = R$ ,  $[A]_{r=R}$ :

$$[A]_{r=R} = - \frac{R k_1}{D_A} ([A_0] - [A]_{r=R}) \ln \left( \frac{r_c}{R} \right) \quad (4.35)$$

despejando  $[A]_{r=R}$  se tiene:

$$[A]_{r=R} = \frac{-\frac{R}{D_A} k_1 [A_0] \ln\left(\frac{r_c}{R}\right)}{1 - \frac{R}{D_A} k_1 \ln\left(\frac{r_c}{R}\right)} \quad (4.36)$$

que reemplazando en la ecuación (4.34) permite obtener el perfil de concentraciones en el interior del gel:

$$[A] = \frac{k_1 R [A_0] \ln\left(\frac{r}{r_c}\right)}{D_A + k_1 R \ln\left(\frac{R}{r_c}\right)} \quad (4.37)$$

Reemplazando ahora, las ecuaciones (4.28), (4.31) y (4.36), para  $r = r_c$ , en la ecuación (4.26) se tiene:

$$\begin{aligned} \frac{[B]}{b} \frac{dr_c}{dt} &= -D_A \frac{d[A]}{dr} = -D_A \frac{k_1}{r_c} = \frac{-D_A R k_1}{D_A r_c} ([A_0] - [A]_{r=R}) = \\ &= \frac{-R k_1}{r_c} \left\{ [A_0] + \frac{\frac{R}{D_A} k_1 [A_0] \ln\left(\frac{r_c}{R}\right)}{1 - \frac{R}{D_A} k_1 \ln\left(\frac{r_c}{R}\right)} \right\} \end{aligned} \quad (4.38)$$

La ecuación (4.38) puede ser reescrita como:

$$r_c \left\{ 1 - \frac{R}{D_A} k_1 \ln\left(\frac{r_c}{R}\right) \right\} dr_c = -\frac{b R k_1 [A_0]}{[B]} dt \quad (4.39)$$

Integrando la ecuación (4.39) se tiene:

$$\frac{r_c^2}{2} \left( 1 + \frac{R}{D_A} k_1 \ln R \right) - r_c^2 \frac{R}{D_A} k_1 \left( \frac{\ln r_c}{2} - \frac{1}{4} \right) = \frac{-b R k_1 [A_0]}{[B]} t_g + \kappa_3 \quad (4.40)$$

Reemplazando la ecuación (4.27) en la ecuación (4.40):

$$\kappa_3 = \frac{R^2}{2} \left( 1 + \frac{R}{D_A} k_1 \ln R \right) - \frac{R^3}{D_A} k_1 \left( \frac{\ln R}{2} - \frac{1}{4} \right) = \frac{R^2}{2} + \frac{R^3}{4 D_A} k_1 \quad (4.41)$$

Reemplazando la ecuación (4.41) en la ecuación (4.40) y reordenando puede obtenerse la ecuación que representa el avance temporal del radio de gelificación:

$$r_c = \sqrt{\frac{2 \left\{ R^2 \left( \frac{D_A}{2 k_1 R} + \frac{1}{4} \right) - \frac{b D_A [A_0] t_g}{[B]} \right\}}{\left\{ \frac{D_A}{2 k_1 R} - \ln\left(\frac{r_c}{R}\right) + \frac{1}{2} \right\}}} \quad (4.42)$$

El tiempo necesario para producir la gelificación completa del hidrocoloide puede ser calculado a partir de la ecuación (4.42) como:

$$t_{gc} = \frac{[B] R^2}{b [A_0] D_A} \left( \frac{D_A}{2 k_1 R} + \frac{1}{4} \right) \quad (4.43)$$

Una ecuación simplificada para el espesor de gelificación puede ser obtenida de la ecuación (4.42) como la propuesta por Ak y otros (1989) y Chavez y otros (1994) que resulta válida para tiempos cortos:

$$\frac{R - r_c}{R} = \sqrt{\frac{4 b D_A k_1 [A_0]}{[B] R (2 D_A + k_1 R)}} \sqrt{t_g} = \kappa' \sqrt{t_g} \quad (4.44)$$

#### 4.4. Desarrollo del modelo para el sistema estudiado

Para la utilización en forma continua de la enzima inmovilizada por entrapamiento en geles se eligió un reactor tubular de lecho fijo isotérmico debido a que este tipo de reactor resulta más adecuado para su utilización en reacciones que presentan inhibición competitiva por producto (Lilly y Dunnill, 1976) por la presencia de un gradiente de concentración del producto a lo largo del reactor, mientras que en un reactor tanque agitado continuo la concentración de producto se mantendría constante en el valor más alto a alcanzar. Al mismo tiempo, un reactor tubular de lecho fijo permite obtener mayores conversiones de sustrato por unidad de volumen debido a la necesidad de contar con un menor volumen libre en el interior del reactor.

El comportamiento del reactor enzimático puede predecirse conociendo la expresión de la cinética de la reacción y el modo de operación del reactor. Con tal fin se

realiza un análisis de lo que sucede en la sección muy delgada del reactor, donde puede suponerse que la posición  $z$  prácticamente no varía, representada esquemáticamente en la Figura 4.1 y se plantea un balance de materia para el sustrato en la fase líquida.

La ecuación que representa la variación de la concentración de sustrato  $[S^b]$  en la fase líquida es (Doran, 1998):

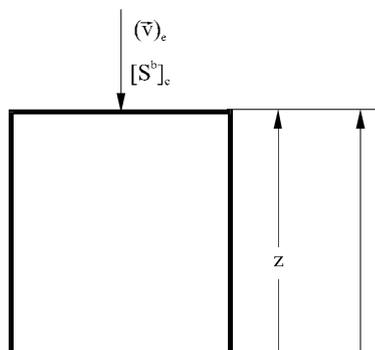
$$\frac{\partial(\varepsilon[S^b])}{\partial t} + \nabla \cdot (\varepsilon \vec{v} [S^b]) + \nabla \cdot (\varepsilon \vec{E} \cdot \nabla [S^b]) = \varepsilon v_S^{\text{Hom}} + a_{sl} k_l \nabla \cdot ([S^b] \vec{h})_{sl} \quad (4.45)$$

donde  $\varepsilon$  es la porosidad del lecho empacado,  $\vec{v}$  es el vector de velocidades,  $\vec{E}$  es el tensor de dispersión,  $v_S^{\text{Hom}}$  es la velocidad de desaparición del sustrato por reacción química en la fase líquida,  $a_{sl}$  es el área de la interfase biocatalizador-líquido,  $k_l$  es el coeficiente externo de transferencia de materia y  $\vec{h}$  es la normal al área de la interfase biocatalizador-líquido. Usualmente, la influencia del efecto de dispersión axial es mucho mayor que el radial y el tangencial, y para lechos con grandes relaciones altura/diámetro, la dispersión radial puede ser despreciada (Froment y Bischoff, 1990).

Considerando que el empaque del lecho es uniforme, que el reactor opera en estado estacionario y que no hay reacción química en fase homogénea, la ecuación del balance de materia en coordenadas cilíndricas para la dirección  $z$  queda:

$$\frac{\partial(\varepsilon v_z [S^b])}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left( \varepsilon E_z \frac{\partial [S^b]}{\partial z} \right) = a_{sl} k_l ([S^i] - [S^b]) \quad (4.46)$$

donde  $E_z$  es la componente axial del coeficiente de dispersión,  $v_z$  la componente de velocidad en la dirección  $z$  y  $[S^i]$  es la concentración de sustrato en la superficie del biocatalizador.



*Figura 4.1: Representación esquemática del reactor*

Teniendo en cuenta a su vez que  $u_s = \varepsilon v_z$ , donde  $u_s$  es la velocidad superficial en la dirección  $z$ , que puede considerarse constante a lo largo de todo el reactor y  $E_{z_{ef}} = \varepsilon E_z$ , donde  $E_{z_{ef}}$  es el coeficiente de dispersión axial efectivo, que puede considerarse constante, reordenando la ecuación (4.46) se obtiene finalmente:

$$E_{z_{ef}} \frac{d^2[S^b]}{dz^2} - u_s \frac{d[S^b]}{dz} - k_1 a_{sl} ([S^b] - [S^i]) = 0 \quad (4.47)$$

con las siguientes condiciones de contorno:

$$z = 0 \quad u_s ([S^b] - [S^0]) = E_{z_{ef}} \frac{d[S^b]}{dz} \quad (4.48)$$

$$z = Z \quad \frac{d[S^b]}{dz} = 0 \quad (4.49)$$

donde  $[S^0]$  es la concentración de sustrato en la entrada del reactor (aguas arriba) y  $Z$  es la longitud total del reactor.

Para poder resolver el sistema de ecuaciones resulta necesario conocer el valor de la concentración de sustrato en la superficie del biocatalizador  $[S^i]$ . Dado la

imposibilidad práctica de determinar el valor de dicha concentración, resulta conveniente incorporar al análisis lo que sucede a nivel de la partícula de biocatalizador (Rose, 1983; Tarhan, 1983).

En los sistemas heterogéneos, las velocidades de reacción y la transferencia de sustrato no son independientes. En el seno del líquido, el sustrato es arrastrado rápidamente por las corrientes de convección. Sin embargo, cuando las moléculas de sustrato se aproximan al sólido deben ser transportadas desde el seno del líquido, a través de una película estanca, hasta la superficie del sólido. Luego, como las enzimas están atrapadas en el biocatalizador, se produce la difusión del sustrato desde la superficie del sólido al interior de la partícula donde simultáneamente se produce la reacción de hidrólisis.

Además, puesto que el gel utilizado para la inmovilización contiene un elevado porcentaje de agua, el efecto de partición puede despreciarse y considerar que el coeficiente de reparto del sustrato es unitario.

El perfil de concentración de sustrato para el biocatalizador esférico presenta la forma esquematizada en la Figura 4.2.

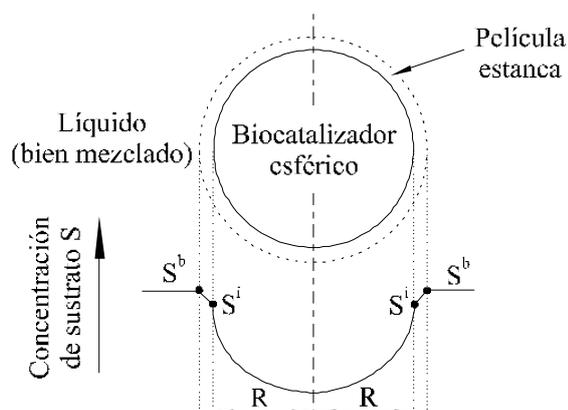


Figura 4.2: Representación esquemática del perfil de concentraciones en la partícula de biocatalizador

Planteando el balance de materia en estado estacionario y en condiciones isotérmicas para la especie sustrato en la partícula esférica de catalizador, suponiendo que la transferencia de los compuestos se produce únicamente por difusión en la

dirección radial, descrita mediante la ley de Fick con una difusividad efectiva constante y que la partícula es homogénea, se obtiene:

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 D_S \frac{d[S]}{dr} \right) = -v = \frac{V'_{max} [S]}{K' m \left( 1 + \frac{[Ga]}{k'_i} \right) + [S]} \quad (4.50)$$

donde [S] es la concentración de sustrato en el interior de la partícula de biocatalizador y  $D_S$  es el coeficiente de difusión efectivo del sustrato en la partícula.

A medida que se produce la reacción, la galactosa liberada difunde desde el interior del catalizador hacia la superficie del sólido y luego es transportada a través de la película estanca hacia el seno del líquido, donde es rápidamente arrastrada por las corrientes de convección. Por tal motivo, la concentración efectiva de galactosa en el interior de la partícula resulta muy difícil de determinar (Villora y López Cabanes, 1994). Si se considera que las velocidades de difusión de sustrato y productos son similares, podría asumirse que en el tiempo que se produce la reacción la concentración promedio efectiva de galactosa en el interior del biocatalizador (que afecta a la cinética de la reacción), puede ser aproximada directamente a la concentración que se encuentra en la corriente de líquido, de manera que:  $[Ga] = [S^0] - [S^b]$  (Narsimhan, 1981; Hossain y Do, 1989).

Por otra parte, teniendo en cuenta el modelo cinético propuesto, la expresión de la velocidad de desaparición del sustrato en las partículas esféricas de una dada cantidad de catalizador utilizado,  $p^{cat}$ , con una cantidad  $E_{i cat}^0$  de enzima inmovilizada inicialmente en un gramo de catalizador, resulta:

$$\frac{D_S}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{d[S]}{dr} \right) = \frac{E_{i cat}^0 e^{-k_d t} p^{cat} k'_2 [S]}{K' m \left( 1 + \frac{[S^0] - [S^b]}{k'_i} \right) + [S]} \quad (4.51)$$

con las siguientes condiciones de contorno:

$$r = 0 \quad \frac{d[S]}{dr} = 0 \quad (4.52)$$

$$r = R \quad \frac{d[S]}{dr} = \frac{k_1}{D_S} ([S^b] - [S^i]) \quad (4.53)$$

Haciendo las transformaciones:

$$\begin{aligned} \Phi^2 &= \frac{E_{i\text{cat}}^0 e^{-k_d t} p^{\text{cat}} k'_2 R^2}{[S^0] D_S}; \\ \sigma &= K'm \left( \frac{1}{[S^0]} + \frac{1}{k'_i} \right); \quad \sigma_2 = -\frac{K'm}{k'_i}; \\ \text{Pe} &= \frac{u_s Z}{E_{z\text{ef}}}; \quad \text{St} = \frac{k_1 a_{sl} Z}{u_s}; \quad \text{Sh} = \frac{k_1 R}{D_S} \end{aligned} \quad (4.54)$$

adimensionalizando con  $C = [S]/[S^0]$ ;  $C^* = [S^b]/[S^0]$ ;  $\alpha = [S^i]/[S^b]$ ;  $x = z/Z$ ; e  $y = r/R$ , el sistema (4.47) – (4.53) resulta:

Para el reactor:

$$\frac{1}{\text{Pe}} \frac{d^2 C^*}{dx^2} - \frac{dC^*}{dx} - \text{St} C^* (1 - \alpha) = 0 \quad (4.55)$$

con las siguientes condiciones de contorno:

$$x = 0 \quad C^* = 1 + \frac{1}{\text{Pe}} \frac{dC^*}{dx} \quad (4.56)$$

$$x = 1 \quad \frac{dC^*}{dx} = 0 \quad (4.57)$$

Para el biocatalizador:

$$\frac{1}{y^2} \frac{d}{dy} \left( y^2 \frac{dC}{dy} \right) = \frac{\Phi^2 C}{\sigma + \sigma_2 C^* + C} \quad (4.58)$$

con las siguientes condiciones de contorno:

$$y = 0 \quad \frac{dC}{dy} = 0 \quad (4.59)$$

$$y = 1 \quad \frac{dC}{dy} = \text{Sh} C^* (1 - \alpha) \quad (4.60)$$

Debido a la complejidad del sistema no se conoce la solución analítica de los sistemas compuestos por las ecuaciones (4.55) a (4.60) por lo cual se utilizó el método numérico propuesto para estos casos (Finlayson, 1980), de colocación ortogonal con seis puntos internos. Este método consiste en expresar en el dominio  $x$  (0,1) e  $y$  (0,1) las variables  $C^*$  y  $C$  en términos de  $x$  e  $y$  un polinomio de expansión de orden  $N = 6$  que satisface condiciones de contorno en los extremos del dominio (1 y 8) y es solución de la ecuación diferencial homogénea en los puntos intermedios (2 a 7).

El polinomio formado con expresiones que cumplen la condición de ortogonalidad, contiene 6 coeficientes determinados utilizando una función residual  $W$ , generalmente igual a uno, y las derivadas primera y segunda del polinomio generan las matrices de colocación  $A$  y  $B$  (Villadsen y Stewart, 1967).

La evaluación de la variable en los puntos interiores conociendo el valor en los extremos 1 y 8 se realiza transformando las ecuaciones (4.55) a (4.60) de la siguiente forma:

*En el reactor:*

Para  $j = 1$ :

$$x = 0 \quad C_1^* = 1 + \frac{1}{Pe} \sum_{k=1}^8 A_{k1}^* C_k^* \quad (4.61)$$

Para  $j = 2, \dots, 7$ :

$$\frac{1}{Pe} \sum_{k=1}^8 B_{kj}^* C_k^* - \sum_{k=1}^8 A_{kj}^* C_k^* - St C_j^* (1 - \alpha_j) = 0 \quad (4.62)$$

Para  $j = 8$ :

$$x = 1 \quad \sum_{k=1}^8 A_{k8}^* C_k^* = 0 \quad (4.63)$$

*En el biocatalizador:*

Para  $j = 1$ :

$$y = 0 \quad \sum_{k=1}^8 A_{k1} C_k = 0 \quad (4.64)$$

Para  $j = 2, \dots, 7$ :

$$\sum_{k=1}^8 B_{kj} C_k = \frac{\Phi^2 C_j}{1 + \sigma_2 C_j^* + \sigma C_j} \quad (4.65)$$

Para  $j = 8$ :

$$y = 1 \quad \sum_{k=1}^8 A_{k8} C_k = \text{Sh} C_j^* (1 - \alpha_j) \quad (4.66)$$

Estas expresiones representan un grupo de ecuaciones algebraicas no lineales que son resueltas por el procedimiento de Gauss. Con las ecuaciones (4.61) a (4.66) se halla el valor de la función en los 6 puntos interiores, pudiéndose luego calcular los coeficientes. Teniendo en cuenta que no interesa conocer el perfil de concentraciones dentro del reactor, sino la concentración de sustrato a la salida del mismo, se resolvió la serie de ecuaciones para obtener el valor de la variable solamente en dicho extremo sin el cálculo de los valores intermedios ni de los coeficientes.

#### 4.4.1. Estimación del coeficiente de transferencia externa de materia

El coeficiente de transferencia externa de materia puede estimarse usando correlaciones de la bibliografía (Geankoplis, 1999). Las correlaciones disponibles para convección forzada pueden generalizarse en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Sh} = K \text{Sc}^\beta \text{Re}_p^\lambda \quad (4.67)$$

donde Sh es el número de Sherwood ( $k_l D/D_{Sl}$ ), Sc es el número de Schmidt ( $\mu_l/\rho_l D_{Sl}$ ),  $\text{Re}_p$  es el número de Reynolds de partícula ( $D u_s \rho_l/\mu_l$ ) y K es una constante arbitraria.

La correlación propuesta por Chilton y Colburn establece para los coeficientes los siguientes valores:  $\beta = \lambda = 1/3$ ; y  $K = 1,09/\varepsilon$ , siendo  $\varepsilon$  la fracción volumétrica libre del reactor para el rango de valores:  $1,6 \cdot 10^{-5} < \text{Re}_p < 55$  y  $165 < \text{Sc} < 70600$ . Haciendo los reemplazos correspondientes, resulta finalmente:

$$k_1 = \frac{1,09}{\varepsilon} \left( \frac{D_{Sl}}{D} \right)^{2/3} u_s^{1/3} \quad (4.68)$$

donde  $D_{Sl}$  es el coeficiente de difusión del sustrato en la fase líquida,  $D$  es el diámetro de la partícula de catalizador y  $u_s$  es la velocidad superficial del líquido.

#### 4.4.2. Determinación del coeficiente de dispersión axial

El coeficiente de dispersión axial  $E_{z_{ef}}$  se determina experimentalmente con el método de Levenspiel (1979), inyectando una cantidad definida de un trazador (glucosa) en el ingreso del reactor y determinando la forma de salida del mismo por medio de un detector diferencial de índice de refracción. La señal obtenida en el tiempo adimensional se integra, dado que el área debajo de la curva resulta igual a la cantidad inyectada (Wen y Fan, 1975). Como en un flujo pistón, la concentración a la salida responde a una curva de Gauss, se puede calcular la simetría del pico de salida mediante el cálculo de la desviación estándar por el método de los momentos y con dicho valor, obtener el coeficiente de dispersión axial.

No obstante, para las velocidades de flujo utilizadas, el coeficiente de dispersión axial también puede estimarse a través de la ecuación:

$$E_{z_{ef}} = \frac{2 u_s D_S}{\varepsilon} \quad (4.69)$$

que resulta adecuada para valores de  $0,1 < Re_p < 50$  y que se utiliza para verificar el valor obtenido en forma experimental.

#### 4.4.3. Determinación de los coeficientes de difusión en el biocatalizador

El ingreso del soluto al interior del biocatalizador y la salida de los productos de la reacción al seno de la solución reaccionante, puede representarse como un fenómeno difusivo en el que el coeficiente de difusión es una de las propiedades necesarias para estimar las variables del proceso.

Uno de los métodos usado para la determinación de los coeficientes de difusión es el de la celda de difusión que consiste en cuantificar el cambio de concentración en una solución diluida debido al pasaje del soluto de interés a través de una placa del material en estudio desde una solución concentrada (Cussler, 1976; Djelveh y otros, 1989). Zorrilla y Rubiolo (1994, 1998) modificaron este sistema y obtuvieron las soluciones correspondientes para un material semirrígido.

Se supuso un fenómeno difusivo unidimensional en tres placas de espesores  $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$  que puede ser descrito por la segunda ley de Fick, considerando coeficientes de difusión efectivos del soluto I,  $D_{I_1}$ ,  $D_{I_2}$  y  $D_{I_3}$  constantes y coeficientes de reparto unitarios.

$$D_{I_j} \frac{\partial^2 [I_j]}{\partial x^2} = \frac{\partial [I_j]}{\partial t}; \quad L_{j-1} < x < \sum_{n=1}^j L_n; \quad L_0 = 0; \quad t > 0; \quad j = 1, 2, 3 \quad (4.70)$$

donde:  $[I_j]$  es la concentración del soluto I en la solución ocluida en la placa j. Las placas inicialmente no contienen soluto y sus superficies externas se mantienen a concentración constante,  $[I_0]$ , y cero para  $t > 0$ . Por lo tanto, las condiciones de contorno e inicial son:

$$[I_1] = [I_0]; \quad x = 0; \quad t > 0 \quad (4.71)$$

$$[I_1] = [I_2]; \quad D_{I_1} \frac{\partial [I_1]}{\partial x} = D_{I_2} \frac{\partial [I_2]}{\partial x}; \quad x = L_1; \quad t > 0 \quad (4.72)$$

$$[I_2] = [I_3]; \quad D_{I_2} \frac{\partial [I_2]}{\partial x} = D_{I_3} \frac{\partial [I_3]}{\partial x}; \quad x = L_1 + L_2; \quad t > 0 \quad (4.73)$$

$$[I_3] = 0; \quad x = L_1 + L_2 + L_3; \quad t > 0 \quad (4.74)$$

$$[I_j] = 0; \quad t = 0; \quad L_{j-1} < x < \sum_{n=1}^j L_n; \quad L_0 = 0; \quad j = 1, 2, 3 \quad (4.75)$$

Se presentaron algunas ecuaciones características para estimar el coeficiente de difusión conociendo la cantidad de soluto que pasa por unidad de área de placa en función del tiempo.

Se propone para la determinación del coeficiente de difusión en materiales semirrígidos, la determinación experimental de la cantidad total de soluto que pasa por unidad de área de placa ( $Q_3$ ) en un tiempo  $t$  para un sistema de tres placas, en la posición  $x = L_1 + L_2 + L_3$ . Cuando se alcanza el estado estacionario, la variación de  $Q_3$  con el tiempo es lineal según la ecuación:

$$Q_3 = \frac{[I_0]}{R_3} \left( t - \frac{B_3}{A_3} \right) \quad (4.76)$$

Cuando  $D_{I_1} = D_{I_3}$  y  $L_1 = L_3$ ,

$$R_3 = 2 \frac{L_1}{D_{I_1}} + \frac{L_2}{D_{I_2}} \quad (4.77)$$

$$\frac{B_3}{A_3} = \frac{L_2^2 L_1 + L_1^2 L_2 + \frac{D_{I_2}}{D_{I_1}} \left( \frac{4}{3} L_1^3 + L_1^2 L_2 \right) + \frac{1}{6} \frac{D_{I_1}}{D_{I_2}} L_2^3}{2 L_1 D_{I_2} + L_2 D_{I_1}} \quad (4.78)$$

$(B_3/A_3)$  es el valor del tiempo para el cual  $Q_3 = 0$ .

Para estimar el coeficiente de difusión en el material semirrígido se realiza una regresión lineal de los valores experimentales de  $Q_3$  en función de  $t$  cuando se ha alcanzado el estado estacionario. Se obtienen la ordenada al origen y la pendiente que se asocian a los correspondientes valores de la ecuación (4.75). Con el valor de la pendiente se puede estimar  $D_{I_2}$  según la ecuación (4.76). Por extrapolación de la recta hasta el punto de intersección con la abscisa ( $Q_3 = 0$ ) se determina un tiempo  $(B_3/A_3)$  que involucra también el cálculo de  $D_{I_2}$  según la ecuación (4.77). De manera que la ecuación (4.77) debe verificar el valor que se determina con la ecuación (4.76). Esto conduce a un cálculo iterativo de  $D_{I_2}$ . Previamente se debe determinar el coeficiente de difusión del soluto de interés en el material rígido ( $D_{I_1}$ ) con un ensayo de placa única (Djelveh y otros, 1989). En este caso:

$$Q = \frac{D_{I_1} [I_0]}{L} \left( t - \frac{L^2}{6 D_{I_1}} \right) \quad (4.79)$$

donde  $L$  es el espesor de la placa considerada;  $Q$  es la cantidad de soluto que atraviesa

la unidad de superficie de placa en  $x = L$  y  $[I_0]$  es la concentración de la solución concentrada.

Realizando las experiencias en condiciones similares a las de reacción, se puede considerar el efecto del movimiento del sustrato y de los productos y las posibles interferencias por diferencias de tamaños entre éstos, en la determinación de los coeficientes de difusión (Zorrilla y Rubiolo, 1994).

### 5.1. Caracterización de las enzimas utilizadas

Dado que el objetivo del presente trabajo es estudiar las condiciones de preparación y utilización de un biocatalizador de amplia utilidad para la industria láctea, las enzimas más convenientes son las obtenidas de cepas de *Kluyveromyces* cuyas condiciones óptimas de reacción se encuentran entre 35 y 40 °C de temperatura y a pH entre 6,6 y 7,3 (Mahoney y Adamchuk, 1980).

De todas las preparaciones enzimáticas obtenidas de cepas de *Kluyveromyces*, se ensayaron las formulaciones comerciales más utilizadas: Maxilact LX 5000 (Gist-brocades, DSM Group, Holanda) de extracto de *Kluyveromyces lactis* y Lactozym 3000 L (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) de extracto de *Kluyveromyces fragilis*.

Las características físicas de estas preparaciones se consignan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características físicas de las preparaciones comerciales elegidas

Característica	Maxilact LX 5000	Lactozym 3000 L
Presentación	Líquida	Líquida
Densidad	1,20 g/ml	1,20 g/ml
Actividad	5000 LAU/ml	3000 LAU/ml
Conc. proteínas	44,02 mg/ml	35,09 mg/ml

Para estas enzimas, la actividad se expresa a través del número de unidades de lactasa (LAU). A su vez, una LAU se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar un  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto bajo las siguientes condiciones consignadas en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Condiciones estándar para la determinación del número de LAU

Sustrato:	Sol. de lactosa 4,7% p/v
pH:	6,7
Temperatura:	37 °C
Conc. de enzima:	0,035 – 0,1 LAU/ml
Sistema tampón:	Tampón lácteo

La actividad de las enzimas fue medida siguiendo la hidrólisis de soluciones de lactosa. Se utilizó el método basado en la medición de las velocidades iniciales, que

indica que la cantidad de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo es proporcional a la cantidad de enzima puesta en juego. Dado que para la aplicabilidad de este método debe garantizarse que el sustrato esté en exceso con relación a la cantidad de enzima, y que la duración de la hidrólisis sea lo suficientemente corta para evitar, por un lado, la eventual desnaturalización, y por otro, la disminución de la velocidad de hidrólisis por disminución de la concentración de sustrato, las mismas se verificaron calculando el porcentaje de hidrólisis conseguido durante el ensayo, controlando que no excediera del 40 % del sustrato utilizado.

El grado de hidrólisis fue determinado midiendo la concentración de glucosa liberada por dosaje enzimático, utilizando un kit de reactivos de Wiener Lab para determinación enzimática de glicemia, midiendo la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic Genesys 5 y comparando con un estándar.

Conociendo la cantidad de enzima utilizada, se calcula la actividad específica de la siguiente forma:

$$\text{Act} = \frac{[\text{Gl}] V 10^6}{M t p^{\text{enz}}} \quad (5.1)$$

donde: Act es la actividad específica de la enzima definida como el número de  $\mu\text{moles}$  de glucosa liberada por min y por g de enzima; [Gl] es la concentración de glucosa (en g/lit) determinada en la muestra; V es el volumen (lit) de la mezcla reaccionante; M es el peso molecular de la glucosa (180 g/gmol); t es el tiempo (min) de la hidrólisis y  $p^{\text{enz}}$  es la masa (g) de enzima utilizada. Para permitir una rápida comparación entre diferentes condiciones, se calcula la actividad relativa, considerando la actividad desarrollada en las condiciones de utilización aconsejadas por el proveedor mediante la ecuación (5.2).

$$\text{Act}_{r\%} = \frac{\text{Act}_e}{\text{Act}_s} 100 \quad (5.2)$$

donde:  $\text{Act}_{r\%}$  es la actividad relativa porcentual de la enzima;  $\text{Act}_e$  es la actividad específica de la enzima en las condiciones ensayadas y  $\text{Act}_s$  es la actividad específica de la enzima en las condiciones estándares aconsejadas por el proveedor.

### **5.1.1. Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas utilizadas**

Se prepararon 6 soluciones de lactosa al 4,0% (p/v) en soluciones reguladoras de diferentes pH en el rango de 5,5 a 8,0 a partir de 50 ml de  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  0,1 M y distintos volúmenes de NaOH 0,1 M, completando con agua destilada a volumen final de 100 ml.

Posteriormente, en un tubo de ensayos con 10 ml de solución reguladora con lactosa al 4,0% (p/v) se agregan 25  $\mu\text{l}$  del preparado enzimático a ensayar y se los incubaba a 37 °C durante 15 minutos, agitando ocasionalmente con un agitador de tubos Vortex. La reacción de hidrólisis fue detenida por inactivación térmica, sumergiendo el tubo en agua hirviente durante 5 minutos.

A continuación, para cada ensayo se determinó la concentración de glucosa liberada y se calcularon la actividad específica y la actividad relativa. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### **5.1.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas utilizadas**

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima se evaluó midiendo la actividad conseguida incubando durante 15 minutos a 5 temperaturas diferentes en el rango de 27 a 47 °C, sendos tubos de ensayos con 10 ml de solución reguladora con lactosa al 4,0% (p/v) de pH 6,9 a los que se les agregaron 25  $\mu\text{l}$  del preparado enzimático a ensayar, agitando ocasionalmente con un agitador de tubos Vortex. La reacción de hidrólisis fue detenida por inactivación térmica, sumergiendo el tubo en agua hirviente durante 5 minutos.

Para calcular la actividad relativa se procedió de igual manera que para el estudio del efecto del pH. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### **5.1.3. Influencia del medio salino sobre la actividad de las enzimas utilizadas**

Teniendo en cuenta que los cationes producen diversos efectos sobre la actividad de las enzimas y su estabilidad (Jakubowski y otros, 1975; Mahoney y Adamchuk, 1980), se realizó una serie de determinaciones de la acción de distintos sistemas tampones con y sin agregado de cationes.

Para los ensayos se utilizaron cuatro sistemas reguladores distintos de pH 6,9 preparados en el laboratorio con reactivos de calidad p.a.:

A:  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  -  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,10 M

B:  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  -  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,05 M

C:  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  -  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,02 M

D:  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  - NaOH 0,05 M

Teniendo en cuenta las características de la leche, se estudió la influencia sobre la actividad de la enzima en el tiempo, de los cationes monovalentes  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  y de los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , por sí solos y en combinación, en un medio rico en iones fosfatos.

Las concentraciones de  $\text{K}^+$  variaron desde 0,0450 hasta 0,3333 M, mientras que para el  $\text{Na}^+$ , las concentraciones variaron entre 0,0450 y 0,2500. Además, la muestra con 0,1433 M de  $\text{K}^+$  se ensayó hasta transcurrido un período de 8 días de almacenamiento.

Para los cationes divalentes, se tomaron concentraciones entre 0,0005 y 0,3750 M. La muestra con 0,0005 M de  $\text{Mg}^{2+}$  se ensayó hasta transcurrido un período de 8 días de almacenamiento. Además, se ensayaron combinaciones de  $\text{K}^+$  con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en relaciones de concentraciones 1:1, 1:10 y 10:1. La muestra con 0,1807 M de  $\text{K}^+$  y 0,0181 M de  $\text{Mg}^{2+}$  se ensayó hasta transcurrido un período de 8 días almacenamiento.

Para este estudio, se prepararon los diferentes preparados de la enzima libre a partir de soluciones estándares en cada sistema regulador conteniendo los respectivos cloruros de los cationes a ensayar. Posteriormente, a los preparados enzimáticos en los que se desea conocer la actividad lactásica se les agrega una cantidad conocida de lactosa, de manera que su concentración sea del 4,0% (p/v), y se incuban durante 15 minutos. Las medidas de actividad se realizaron siempre colocando la mezcla reaccionante a pH 6,9 en un tubo de ensayos sumergido en un baño termostático a 37 °C y agitado ocasionalmente en un agitador de tubos Vortex. La reacción de hidrólisis fue detenida por inactivación térmica, sumergiendo el tubo en agua hirviendo durante 5 minutos.

Para calcular la actividad relativa porcentual se procedió de igual manera que para el estudio del efecto del pH. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### **5.1.4. Determinación de las constantes cinéticas de la enzima libre**

La determinación de las constantes cinéticas se realizó en forma similar a los ensayos de control de actividad, utilizando 20 y 40  $\mu\text{l}$  de enzima soluble en 20 ml de solución reguladora de pH 6,9 con lactosa como sustrato, en concentraciones de 2,5 - 5,0 - 7,5 y 10,0 % (p/v). Los tubos se incubaron a 37 °C, agitando ocasionalmente en un agitador de tubos Vortex. La reacción de hidrólisis fue detenida por inactivación térmica, sumergiendo el tubo en agua hirviente durante 5 minutos. Para los cálculos se determinó la concentración de glucosa liberada durante la reacción a los 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 minutos.

#### **5.2. Preparación y caracterización del soporte**

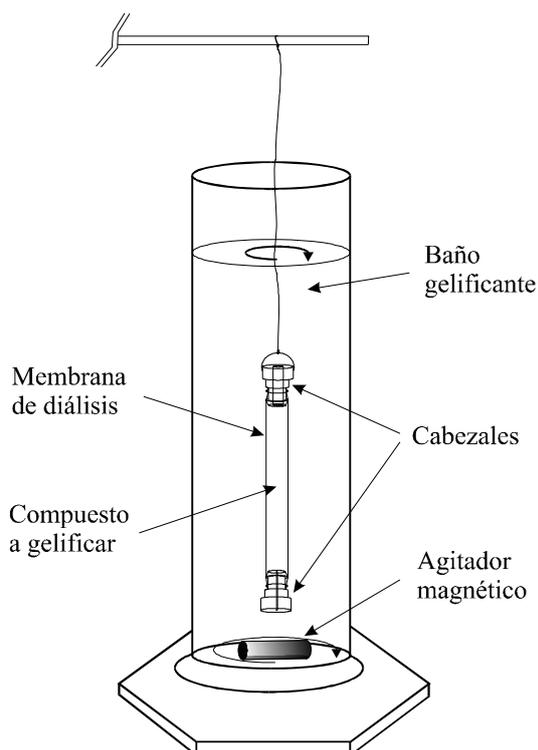
En la preparación de los soportes se utilizaron dos tipos de alginato de sodio provistos por Kelco (Chicago, Estados Unidos de América), de nombres comerciales *Keltone L.V.* (baja viscosidad) y *Keltone H.V.* (alta viscosidad) y  $\kappa$ -carragenina provistos por Biotec S.A. (Buenos Aires, Argentina) de nombre comercial *Gelacid C-3*, mientras que para suministrar los agentes entrecruzantes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$  necesarios para producir los geles, se utilizaron respectivamente las sales  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  y  $\text{KCl}$  de calidad p.a.

Para favorecer la dispersión y la posterior solubilización de los hidrocoloides utilizados, se mezclaron los componentes secos y se agregó el polvo resultante lentamente en el vórtice de la solución agitada vigorosamente mediante un agitador mecánico de alta velocidad, operando cuidadosamente a temperatura ambiente hasta que no se notara la presencia de partículas en suspensión.

##### **5.2.1. Estudio del mecanismo de formación de geles**

Para estudiar el proceso de gelificación, se prepararon soluciones de alginato de sodio de baja viscosidad al 2,4% (p/v) y de alginato de sodio de baja viscosidad y de  $\kappa$ -carragenina al 2,4% (p/v) y 1,0% (p/v) respectivamente, y se las introdujo en un dispositivo cilíndrico de 11,04 mm de diámetro y 120 mm de alto, formado por dos cabezales cilíndricos que sostienen una membrana de diálisis de un tamaño de poro nominal de 1000 Da de peso molecular.

Los cilindros conteniendo la solución de alginato de sodio fueron sumergidos en distintos baños agitados, a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), conteniendo 500 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1,0; 2,0 y 3,0% (p/v) como se muestra esquemáticamente en la Figura 5.1. De la misma manera se procedió con los que contenían la mezcla de alginato y carragenina que se sumergieron en soluciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{KCl}$  con las relaciones 1,0:2,0%, 2,0:4,0% y 3,0:6,0% (p/v).



*Figura 5.1: Dispositivo para la preparación de los geles*

Los cilindros parcialmente gelificados se extrajeron a intervalos predeterminados y se cortaron en rodajas transversales en las que se midió con un calibre el espesor de la capa sólida obtenida, fácilmente distinguible debido a su firmeza.

Al mismo tiempo, en cada muestra se determinó la concentración de los cationes incorporados usando un método basado en espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer modelo 5000). En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado.

### **5.2.2. Comportamiento de los geles a la compresión**

Para producir las muestras para los ensayos reológicos de compresión y relajación, se procedió de manera similar que para el estudio del mecanismo de gelificación, preparando los geles con una composición y condiciones de gelificación determinadas para conseguir la formación de un gel. Los rangos de concentraciones utilizadas fueron de 1,0 a 3,0 % (p/v) para el alginato de sodio de alta viscosidad, 0,0 a 1,0 % (p/v) para el alginato de sodio de baja viscosidad y de 0,0 a 1,0 % (p/v) para la  $\kappa$ -carragenina. Se utilizaron concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  entre 1,0 y 3,0 % (p/v), y en una relación 1:2 con KCl cuando la mezcla a gelificar contenía  $\kappa$ -carragenina, manteniéndose en todos los casos durante 3,0 h en el baño gelificante. Además, para la muestra de 2,0 % de alginato de sodio de alta viscosidad, se realizaron ensayos para tiempos de gelificación entre 0,5 y 3,0 h. Los cilindros gelificados se retiraron a los tiempos establecidos y luego de extraerse los extremos, se cortó de la parte interna de cada uno, un cilindro de 15 mm de alto. Se determinó el diámetro de cada muestra utilizando un calibre. Las muestras cilíndricas así obtenidas se ensayaron por triplicado a la compresión en una máquina universal de ensayos Shimadzu DSS-10TS equipada con una celda de carga de carga de 5,0 kg, operando a una velocidad de 10 mm/min para comprimir la muestra hasta alcanzar el 50% de la altura original y dejando relajar por espacio de 9 minutos. La adquisición de los datos se realizó en forma automática cada 0,5 segundos. De manera similar se operó con algunas de las muestras, comprimiendo hasta producir la fractura con el fin de estimar la resistencia mecánica del gel.

### **5.2.3. Comportamiento de los geles en las condiciones de reacción**

Debido a que la resistencia mecánica inicial a la compresión del hidocoloide, puede variar con las condiciones a que es sometido durante la reacción (tiempo-temperatura) y el contacto del mismo con el fluido, pudiéndose producir efectos de hinchamiento y debilitamiento de la estructura del soporte (pérdida de enzima, disminución del espacio de circulación del líquido, etc.), se realizó dicho estudio aplicando el diseño experimental y análisis del método estadístico de optimización conocido como método de superficie de respuesta (Pizarro y otros, 1997).

El rango de variación de las concentraciones de alginato de sodio de baja y alta viscosidad y de  $\kappa$ -carragenina, fue elegido considerando las condiciones límites de viscosidad en las que se puede trabajar apropiadamente en el laboratorio para obtener un gel (concentración de hidrocoloide  $\leq 5,0\%$ ). En este rango se definió el número de posibilidades que se deseaba ensayar, las que se denominaron niveles. Al fijar los niveles, se definió el modelo de diseño correspondiente.

Se adoptó un diseño de tres factores en cinco niveles; realizándose 20 experiencias por duplicado, ordenadas aleatoriamente, 15 que corresponden al diseño del modelo y 5 adicionadas para obtener aproximadamente igual precisión, para la estimación de las diez constantes. Se codificaron los factores para permitir que el diseño general pueda utilizarse en cualquier aplicación particular. Los factores codificados ( $x_i$ ) y no codificados, se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Concentraciones utilizadas en el estudio del soporte

Factor	Símbolo Codificado	Nivel				
		-1,682	-1	0	1	1,682
[Alg. L.V.] (% p/v)	$x_1$	0,00	0,41	1,00	1,59	2,00
[Alg. H.V.] (% p/v)	$x_2$	0,00	0,41	1,00	1,59	2,00
[ $\kappa$ -Carrag.] (% p/v)	$x_3$	0,00	0,20	0,50	0,80	1,00

Se prepararon las distintas soluciones, correspondientes a las combinaciones determinadas por el modelo empleado, y se las hizo gotear sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2,0% (p/v) y de  $\text{KCl}$  al 4,0% (p/v), a través de una aguja hipodérmica (Figura 5.2). Las esferas resultantes de la mezcla de alginatos y carragenina, fueron extraídas del baño gelificante después de 1 hora, lavadas con agua destilada y colocadas en agua destilada en la heladera (aproximadamente a 5 °C).

Los ensayos para analizar la performance del soporte se llevaron a cabo colocando las esferas, en períodos de 30 minutos por vez, en un reactor batch agitado conteniendo solución de lactosa al 4,0% (p/v), a 37 °C de temperatura y pH 6,9.

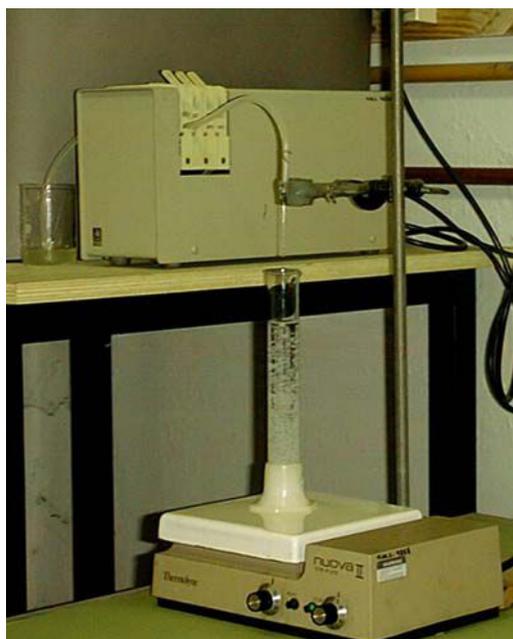


Figura 5.2: Dispositivo para la preparación de los catalizadores

El volumen inicial de las partículas del biocatalizador, se obtuvo con el valor promedio obtenido de la medición del diámetro de 20 esferas. Lo mismo se realizó al final de cada experiencia, observándose además si la cantidad de esferas deterioradas (partidas) no era superior al 30% de la muestra, valor considerado como límite aconsejado para su reutilización.

El valor de la respuesta variación promedio del volumen se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{V.P.V.} = \frac{\frac{4}{3} \pi \sum_{j=1}^n (r_{f_j}^3 - r_i^3)}{n} \quad (5.3)$$

donde  $r_{f_j}$  es el valor del radio de la esfera de la estructura analizada al finalizar cada experiencia,  $r_i$  el valor del radio de la esfera al iniciar la primer experiencia y  $n$  el número total de ensayos que resiste la matriz con la composición usada. Como valor de la respuesta duración se tomó directamente el número de ensayos que se realizaron con la matriz.

Aplicando técnicas gráficas de optimización de multi-respuestas e imponiendo los criterios de que la duración máxima del soporte superior a 30 corridas y que la variación

promedio del volumen mínima inferior a 0,20; a través de las gráficas de contornos generadas para cada nivel determinado se obtiene una región de condiciones óptimas de procesamiento, donde es posible producir un soporte de aceptable resistencia mecánica en las condiciones de reacción. Al mismo tiempo, este comportamiento en condiciones similares a la de reacción fue correlacionado con el comportamiento obtenido en los ensayos de compresión-relajación.

### 5.3. Preparación y caracterización de los biocatalizadores

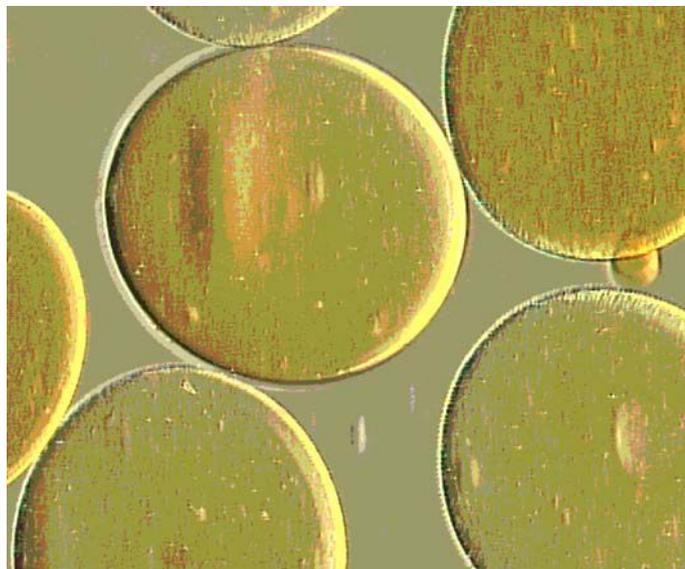
Se realizó un nuevo estudio para analizar las condiciones de inmovilización de la enzima que consiguen obtener un biocatalizador con aceptable actividad y estabilidad, involucrando en esta oportunidad a la enzima como factor de análisis y utilizando el mismo modelo de diseño, por lo cual se mantuvo invariable la composición del alginato de baja viscosidad por ser un factor muy poco significativo. Se adoptó nuevamente un diseño de tres factores en cinco niveles; realizándose 20 experiencias por duplicado, ordenadas aleatoriamente. Los factores se codificaron como se muestra en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Concentraciones utilizadas en el estudio de los biocatalizadores

Factor	Símbolo Codificado	Nivel				
		-1,682	-1	0	1	1,682
[Alg. L.V.] (% p/v)	x <sub>1</sub>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
[Alg. H.V.] (% p/v)	x <sub>2</sub>	1,00	1,20	1,50	1,80	2,00
[κ-Carrag.] (% p/v)	x <sub>3</sub>	0,00	0,10	0,25	0,40	0,50
[Enzima] (% p/v)	x <sub>4</sub>	5,00	11,11	20,00	28,90	35,00

Al igual que para el estudio del soporte, se prepararon las distintas soluciones, correspondientes a las combinaciones determinadas por el modelo empleado, y se las hizo gotear sobre una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2,0% (p/v) y de KCl al 4,0% (p/v), a través de una aguja hipodérmica. La regulación del caudal de goteo permite variar el tamaño final de la partícula de biocatalizador entre 1,1 y 3,3 mm. A medida que se produce la gelificación, las esferas van perdiendo su apariencia traslúcida para tornarse semiopacas con un leve tono ámbar (Figura 5.3). Las esferas de biocatalizadores, fueron extraídas

del baño gelificante después de 1 hora, lavadas con agua destilada y colocadas en agua destilada en la heladera (aproximadamente a 5 °C).



*Figura 5.3: Aspecto al microscopio de los biocatalizadores al final de la gelificación*

Los ensayos para analizar la performance del biocatalizador se llevaron a cabo de la misma forma que en el estudio de los soportes, a razón de 2 períodos diarios, hasta que la actividad del mismo disminuye al 50% de la actividad inicial. La actividad determinada inmediatamente después del proceso de inmovilización fue considerada como la actividad inicial.

Para posibilitar la comparación de la performance en el tiempo de los biocatalizadores se calculó el valor medio de la actividad obtenida en todos los ensayos en que se superó el valor límite del 50% de la actividad inicial y luego se definió la actividad relativa media porcentual como la relación entre el valor medio de actividad y la actividad inicial multiplicada por cien. El número de períodos de utilización hasta que la actividad decayó al 50% fue tomado como un índice de estabilidad del biocatalizador.

### **5.3.1. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada**

La cantidad de enzima inmovilizada se calculó mediante la determinación de proteínas según el método propuesto por Rojkin y Drappo (1974), utilizando un kit de reactivos de Proti-2 de Wiener Lab para la determinación de proteínas totales, midiendo

la absorbancia a 495 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic Genesys 5 y comparando con un estándar de caseína hidrolizada con un contenido de proteínas de 13,61% (p/p), determinado previamente por el método de Kjeldhal.

Se cuantificó el contenido proteico de la solución original de enzima y de la solución sobrenadante al final del proceso de inmovilización y teniendo en cuenta los volúmenes considerados, se calculó por diferencia entre el valor inicial y final la cantidad de proteína inmovilizada. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### **5.3.2. Determinación de las características de los biocatalizadores**

La actividad de los biocatalizadores se determinó de la misma forma que para la enzima libre, teniendo en cuenta la cantidad de enzima inmovilizada en cada caso. Para calcular la cantidad de enzima inmovilizada utilizada en el ensayo se tuvieron en cuenta las características y la fracción de biocatalizador interviniente.

Se analizó la influencia del pH y de la temperatura de manera similar a la empleada en el caso de la enzima libre, utilizando para ello  $0,50 \pm 0,01$  g del biocatalizador de mejor performance. El efecto de la temperatura se evaluó utilizando un período de incubación mayor, 30 minutos. La reacción de hidrólisis fue detenida retirando el biocatalizador del tubo e inactivando térmicamente la enzima que pudiese haberse desprendido mediante la inmersión del tubo en agua hirviendo durante 5 minutos.

La determinación de las constantes cinéticas de los biocatalizadores se realizó en un microrreactor batch agitado, utilizando  $0,40 \pm 0,01$  g y  $0,60 \pm 0,01$  g del biocatalizador de mejor performance.

### **5.3.3. Determinación de la pérdida de enzima de los biocatalizadores**

Para este estudio se procedió de manera similar a la empleada en el caso de la determinación de la cantidad de enzima inmovilizada. Se determinó la cantidad de proteína liberada por  $1,00 \pm 0,01$  g del biocatalizador de mejor performance colocado en un reactor batch agitado conteniendo solución de lactosa al 4,0% (p/v), a 37 °C de temperatura y pH 6,9, en períodos de 30 minutos por vez hasta que se alcanza el índice de estabilidad del biocatalizador. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 5.3.4. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores

Analizando los resultados de los ensayos realizados para posibilitar la comparación de la performance en el tiempo de los biocatalizadores, se pueden obtener los coeficientes de un polinomio de segundo orden que contemple la desactivación del biocatalizador en el tiempo que se mantiene sumergido en líquido, por desnaturalización de la enzima, efecto de hinchamiento y/o destrucción de la matriz del gel-soporte. Con estos valores, se puede predecir un tiempo de vida media, en el cual la actividad del biocatalizador decae al 50% del valor inicial, para cualquier composición del biocatalizador comprendida en el rango de concentraciones ensayado para cada componente. Con este valor, se puede estimar directamente la constante de desactivación, empleando la ecuación (4.22).

Al mismo tiempo, para verificar el cumplimiento de esta estimación se realizó otro ensayo experimental para determinar la constante de inactivación del biocatalizador elegido, ensayando directamente una carga del mismo en un reactor tubular alimentado con una solución de lactosa al 4,0% (p/v) en solución reguladora de pH 7,0 a un caudal de 250 ml/h, durante 24 períodos de 1 hora de duración cada uno (Yamane y otros, 1987). Dado que para el reactor utilizado, se considera que el estado estacionario se alcanza cuando a través de la columna ha pasado aproximadamente 10 veces el valor de su volumen libre, se determinaron los tiempos de muestreo para asegurarse que antes del tiempo de muestra el sistema alcanzó el estado estacionario.

Con los valores determinados se calculó la media y el intervalo de confianza ( $\pm$ ), utilizando la fórmula estadística propuesta por Caulett y Boddy (1983):

$$\delta = \bar{x} \pm t_{(n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5.4)$$

donde  $\bar{x}$  es la media ( $\sum x_i/n$ ),  $x_i$  son los valores determinados en las  $n$  determinaciones,  $t_{(n-1)}$  es el valor del test-t de dos lados con  $(n-1)$  grados de libertad para un 95% de confianza ( $t = 3,18$ ) y  $s$  es la desviación estándar.

Con el tratamiento de los datos obtenidos se realizó el cálculo de la constante de desactivación según la ecuación (4.22) para el catalizador usado. En todos los casos la temperatura utilizada fue de 37 °C.

#### 5.4. Determinación de los coeficientes de difusión

Se prepararon placas de geles de distintas composiciones inmediatamente antes de ser usadas. Soluciones de distintas composiciones de hidrocoloides se vertieron en moldes para preparar placas, se les agregó la respectiva solución gelificante y se dejó reaccionar por 48 h. Luego de la solidificación, se cortaron placas de 2,9 cm de diámetro.

Las placas rígidas se prepararon de agar-agar inmediatamente antes de ser usadas. Se pesaron 1,5 g de agar (Merk 1613, Buenos Aires, Argentina) y se llevaron a 50 g con agua destilada (3%). Se dejó reposar 16 horas, se calentó en baño maría durante 20 minutos y se vertió en un molde para preparar placas de 0,15 cm de espesor. Luego de la solidificación, se cortaron placas de 2,9 cm de diámetro.

La placa de gel se montó entre dos placas rígidas de agar-agar como se muestra esquemáticamente en la Figura 5.4 (Zorrilla y Rubiolo, 1998). Los experimentos fueron llevados a cabo a  $25 \pm 1$  °C. Uno de los compartimientos fue llenado con una solución concentrada de 40 g/l y el otro con agua destilada. En el caso de que la difusión se realizara en un medio con otros componentes, la concentración de éstos era igual en ambos lados. El volumen de líquido en ambos compartimientos al comienzo del experimento fue de  $350 \text{ cm}^3$ .

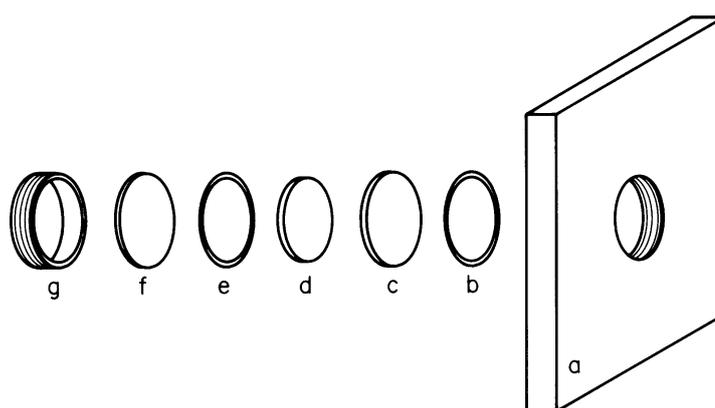


Figura 5.4: Esquema de la forma de soportar la muestra: (a) Tabique; (b) y (e) O-ring (diámetro interno: 2,5 cm); (c) y (f) Placas de agar (diámetro: 2,9 cm); (d) Muestra (diámetro: 2,5 cm); (g) Tornillo de ajuste

De cada compartimiento se retiraron simultáneamente muestras de 1 ml a intervalos de tiempo definidos para determinar la concentración. La agitación en ambos compartimientos fue realizada con agitadores de paletas a 45° a 200 rpm. El diámetro libre para la difusión fue de 2,5 cm.

Las concentraciones de lactosa, glucosa y galactosa fueron determinadas en un equipo de cromatografía líquida de alta precisión ISCO con una columna Waters  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> WAT 084040 a una temperatura de 55 °C, usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-agua (70:30) a un caudal de 1 ml/min y realizando la cuantificación a una temperatura de 50°C a través de un detector de índice de refracción Hewlett Packard Series 1100. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 5.5. Estudio del comportamiento de los biocatalizadores en el reactor

El biocatalizador elegido fue utilizado como relleno de un reactor tubular con camisa de circulación de agua para la regulación de la temperatura, conectada a un baño termostático (Figura 5.5). Las características del reactor y del relleno utilizado se presentan en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5: Características del reactor y de los biocatalizadores utilizados

Dimensiones de la columna	
Longitud:	34,00 cm
Diámetro:	1,47 cm
Volumen total:	57,70 cm <sup>3</sup>
Volumen libre:	21,64 cm <sup>3</sup>
Sección transversal:	1,70 cm <sup>2</sup>
Características del relleno	
Diámetro del biocatalizador:	0,24 cm
Densidad del biocatalizador:	1,08 g/cm <sup>3</sup>
Masa de catalizador en la columna:	38,94 g
Volumen de catalizador en la columna:	36,06 cm <sup>3</sup>
Porosidad ( $\epsilon$ ):	0,375
Área externa/unidad de volumen de reactor (a):	2,55 cm <sup>-1</sup>

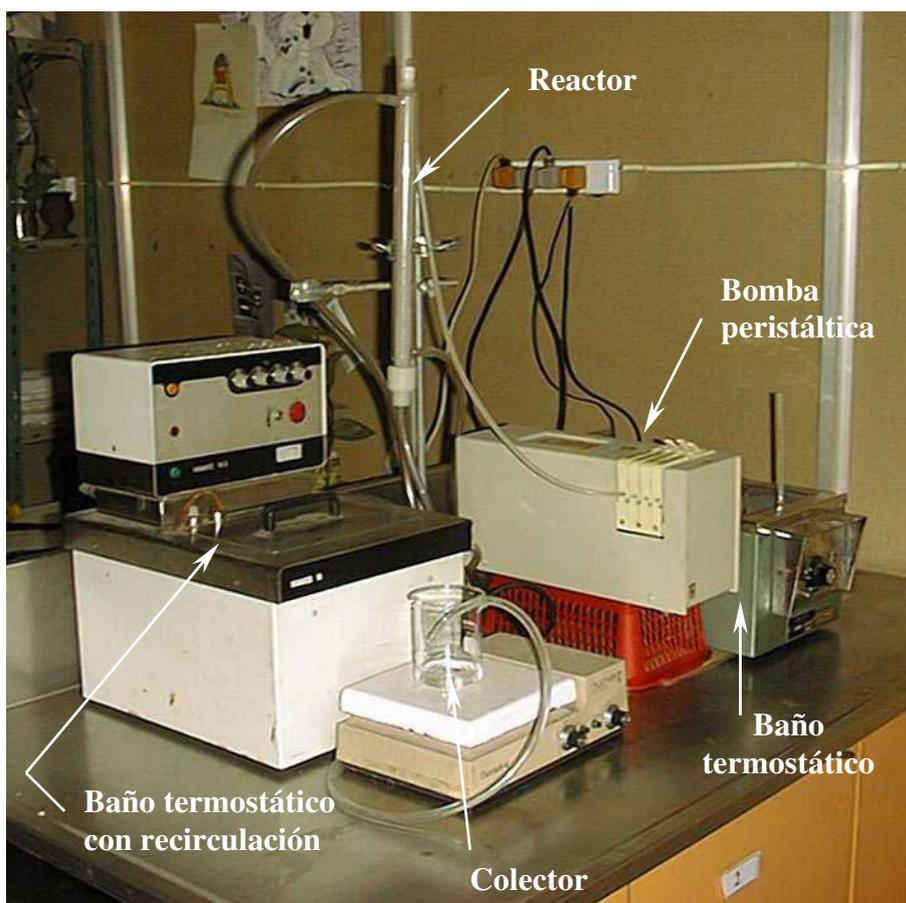


Figura 5.5: Sistema utilizado para la reacción con los biocatalizadores

Las experiencias para comparar los valores experimentales con los teóricos, se llevaron a cabo con cuatro concentraciones de lactosa: 2,5 – 5,0 – 7,5 y 10,0% (p/v) en una solución reguladora de pH 7,0. Estas se hicieron circular a través del reactor por medio de una bomba peristáltica de caudal variable, en el rango de 100 a 500 ml/h, medidos a la salida del reactor para tener en cuenta la resistencia del relleno.

Los valores de concentración de glucosa fueron medidos en la salida del reactor, considerando que antes de tomar la primera muestra se alcanza el estado estacionario, para lo cual se deja circular un volumen de sustrato de aproximadamente 10 veces el valor del volumen libre del reactor (Polakovic y otros, 1993<sup>a</sup>; 1993<sup>b</sup>).

## 6.1. Caracterización de las enzimas en estado libre

### 6.1.1. Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas utilizadas

La influencia del pH sobre la enzima libre se presenta en las Tablas 6.1 y 6.2 para las enzimas Maxilact LX 5000 y Lactozym 3000 L respectivamente. La actividad es determinada midiendo la concentración de glucosa liberada al producirse la hidrólisis de una solución 0,117 M de lactosa. La actividad relativa indica la relación entre la actividad específica calculada y la correspondiente al 100% de conversión.

Tabla 6.1: Influencia del pH sobre la actividad de la enzima Maxilact LX 5000 en estado libre

pH	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
5,5	0,035 ± 0,001	0,30 ± 0,01
6,0	0,076 ± 0,001	0,65 ± 0,01
6,5	0,104 ± 0,001	0,89 ± 0,01
7,0	0,112 ± 0,001	0,96 ± 0,01
7,5	0,108 ± 0,001	0,92 ± 0,01
8,0	0,070 ± 0,001	0,60 ± 0,01

Tabla 6.2: Influencia del pH sobre la actividad de la enzima Lactozym 3000 L en estado libre

pH	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
5,5	0,006 ± 0,001	0,05 ± 0,01
6,0	0,064 ± 0,001	0,55 ± 0,01
6,5	0,108 ± 0,001	0,92 ± 0,01
7,0	0,115 ± 0,001	0,98 ± 0,01
7,5	0,094 ± 0,001	0,80 ± 0,01
8,0	0,043 ± 0,001	0,37 ± 0,01

En la Figura 6.1 se muestra el comportamiento de las enzimas libres con el pH. Como puede observarse, en el rango de pH comprendido entre 6,5 y 7,2 se obtienen valores de actividad relativa superiores al 90% para la enzima Lactozym, mientras para la enzima Maxilact el rango es un poco más amplio, entre 6,5 y 7,5. El pH óptimo para la enzima Lactozym 3000 L se encuentra alrededor de 6,8, mientras que para la enzima

Maxilact LX 5000 se encuentra alrededor de 7,1. Para poder uniformar los ensayos con ambas enzimas, se elige como pH óptimo para la enzima libre el valor de 6,9.

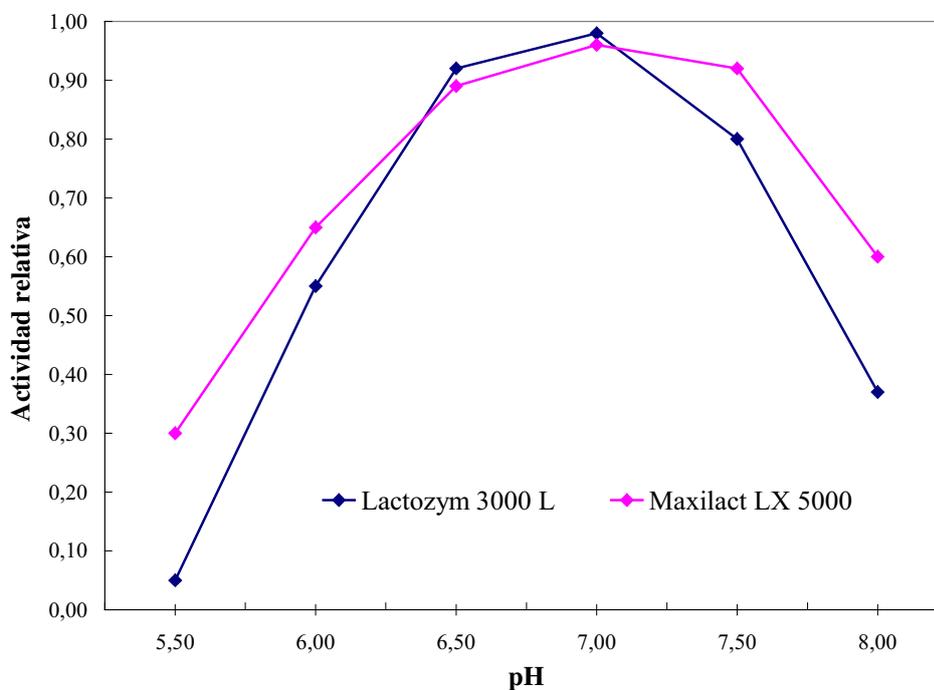


Figura 6.1: Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas libres

### 6.1.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas utilizadas

La influencia de la temperatura sobre la enzima libre se presenta en las Tablas 6.3 y 6.4 para las enzimas Maxilact LX 5000 y Lactozym 3000 L respectivamente. La actividad relativa indica la relación entre la actividad específica calculada y la correspondiente al 100% de conversión.

Tabla 6.3: Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima Maxilact LX 5000 en estado libre

Temperatura (°C)	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
27,0	0,109 ± 0,001	0,93 ± 0,01
32,0	0,112 ± 0,001	0,96 ± 0,01
37,0	0,112 ± 0,001	0,96 ± 0,01
42,0	0,110 ± 0,001	0,94 ± 0,01
47,0	0,106 ± 0,001	0,91 ± 0,01

Tabla 6.4: Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima Lactozym 3000L en estado libre

Temperatura (°C)	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
27,0	0,111 ± 0,001	0,95 ± 0,01
32,0	0,113 ± 0,001	0,97 ± 0,01
37,0	0,115 ± 0,001	0,98 ± 0,01
42,0	0,111 ± 0,001	0,95 ± 0,01
47,0	0,099 ± 0,001	0,85 ± 0,01

En la Figura 6.2 se muestra el comportamiento de las enzimas libres con la temperatura. Como puede observarse, en el rango de temperaturas comprendido entre 32,0 °C y 40,0 °C se obtienen los valores más altos de actividad para las dos enzimas. La temperatura óptima para la enzima Lactozym 3000 L se encuentra alrededor de los 37,0 °C, mientras que para Maxilact LX 5000 se encuentra entre 32,0 y 37,0 °C.

Para poder uniformar los ensayos con ambas enzimas, se elige como temperatura óptima para la enzima libre el valor de 37,0 °C.

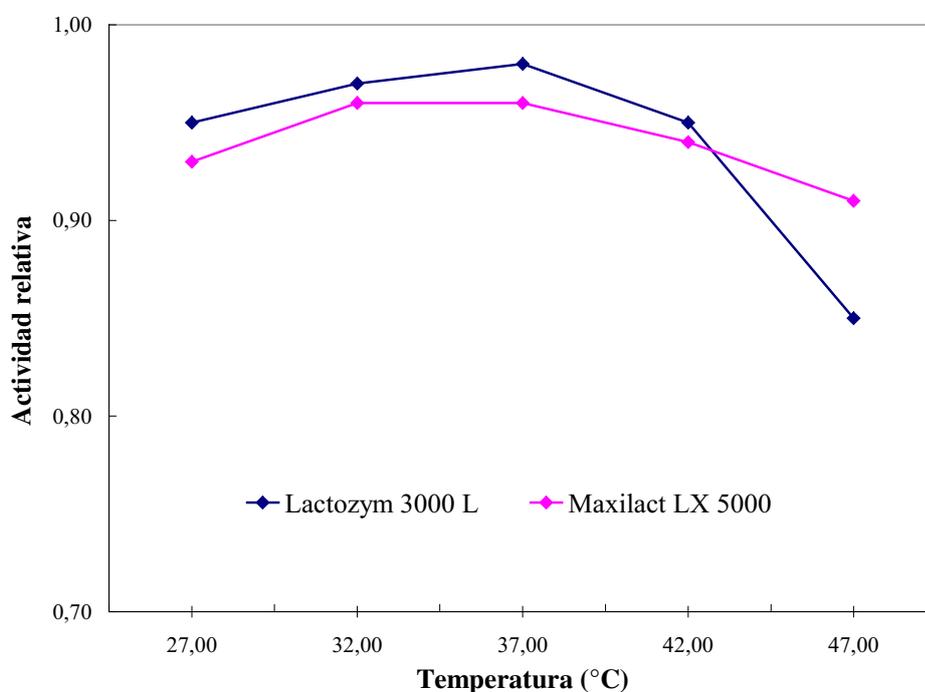


Figura 6.2: Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas libres

### 6.1.3. Influencia del medio salino sobre la actividad de las enzimas utilizadas

Para analizar la influencia del medio salino sobre la actividad de la enzima, se tomó como base al Buffer D ( $\text{H}_2\text{NaPO}_4\text{-NaOH}$  0,05 M) libre de cationes. Los valores relativos a éste se expresan en las Tablas 6.5 y 6.6 para las enzimas Maxilact LX 5000 y Lactozym 3000 L respectivamente.

Tabla 6.5: Influencia del medio salino sobre la actividad de la enzima Maxilact LX 5000 en estado libre

N°	Cation presente	Concentración molar	Tiempo en buffer (días)	Solución reguladora			
				Buffer A	Buffer B	Buffer C	Buffer D
1	---	---	---	0,56 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,00 ± 0,01
2		---	1	-----	-----	-----	0,80 ± 0,01
3		---	3	-----	-----	-----	0,70 ± 0,01
4		---	6	-----	-----	-----	0,70 ± 0,01
5		---	8	-----	-----	-----	0,70 ± 0,01
6	K <sup>+</sup>	0,0450	---	3,64 ± 0,01	3,44 ± 0,01	5,02 ± 0,01	5,09 ± 0,01
7		0,0833	---	-----	-----	-----	5,40 ± 0,01
8		0,1000	---	-----	-----	-----	5,62 ± 0,01
9		0,1153	---	-----	-----	-----	6,87 ± 0,01
10		0,1433	---	-----	-----	-----	7,26 ± 0,01
11		0,1433	1	-----	-----	-----	5,70 ± 0,01
12		0,1433	3	-----	-----	-----	5,50 ± 0,01
13		0,1433	6	-----	-----	-----	5,30 ± 0,01
14		0,1433	8	-----	-----	-----	5,10 ± 0,01
15		0,1666	---	4,31 ± 0,01	4,97 ± 0,01	6,00 ± 0,01	6,75 ± 0,01
16		0,2500	---	5,00 ± 0,01	4,31 ± 0,01	3,37 ± 0,01	5,50 ± 0,01
17		0,3333	---	3,37 ± 0,01	3,62 ± 0,01	3,25 ± 0,01	4,87 ± 0,01
18	Na <sup>+</sup>	0,0450	---	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,21 ± 0,01
19		0,2500	---	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01
20	Mn <sup>2+</sup>	0,0450	---	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
21		0,2500	---	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
22		0,3750	---	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
23	Mg <sup>2+</sup>	0,0450	---	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
24		0,0005	---	-----	-----	-----	1,00 ± 0,01
25		0,0005	1	-----	-----	-----	0,80 ± 0,01
26		0,0005	3	-----	-----	-----	0,60 ± 0,01
27		0,0005	6	-----	-----	-----	0,60 ± 0,01
28		0,0005	8	-----	-----	-----	0,60 ± 0,01
29	Ca <sup>2+</sup>	0,0450	---	4,11 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
30	K <sup>+</sup> - Mn <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	0,30 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01
31		0,1666 - 0,1666	---	0,00 ± 0,01	-----	-----	0,00 ± 0,01

32	0,2380 - 0,0238	---	0,52 ± 0,01	----	----	1,84 ± 0,01
33 K <sup>+</sup> - Ca <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	0,15 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,15 ± 0,01
34 K <sup>+</sup> - Mg <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	1,50 ± 0,01	1,50 ± 0,01	1,50 ± 0,01	1,50 ± 0,01
35	0,1666 - 0,1666	---	0,75 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,37 ± 0,01
36	0,0238 - 0,2380	---	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
37	0,0450 - 0,0045	---	----	----	----	4,04 ± 0,01
38	0,0820 - 0,0082	---	----	----	----	4,44 ± 0,01
39	0,1128 - 0,0113	---	----	----	----	5,02 ± 0,01
40	0,1389 - 0,0139	---	----	----	----	5,49 ± 0,01
41	0,1807 - 0,0181	---	----	----	----	5,75 ± 0,01
42	0,1807 - 0,0181	1	----	----	----	5,70 ± 0,01
43	0,1807 - 0,0181	3	----	----	----	5,70 ± 0,01
44	0,1807 - 0,0181	6	----	----	----	5,70 ± 0,01
45	0,1807 - 0,0181	8	----	----	----	5,70 ± 0,01
46	0,1977 - 0,0198	---	----	----	----	5,29 ± 0,01
47	0,2380 - 0,0238	---	3,15 ± 0,01	2,89 ± 0,01	2,89 ± 0,01	4,99 ± 0,01

Tabla 6.6: Influencia del medio salino sobre la actividad de la enzima Lactozym 3000 L en estado libre

N°	Cation presente	Concentración molar	Tiempo en buffer (días)	Solución reguladora			
				Buffer A	Buffer B	Buffer C	Buffer D
1	---	---	---	0,63 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,70 ± 0,01	1,00 ± 0,01
2		---	1	----	----	----	0,95 ± 0,01
3		---	3	----	----	----	0,90 ± 0,01
4		---	6	----	----	----	0,90 ± 0,01
5		---	8	----	----	----	0,90 ± 0,01
6	K <sup>+</sup>	0,0450	---	5,31 ± 0,01	4,91 ± 0,01	5,61 ± 0,01	5,82 ± 0,01
7		0,0833	---	----	----	----	6,20 ± 0,01
8		0,1000	---	----	----	----	7,05 ± 0,01
9		0,1153	---	----	----	----	7,88 ± 0,01
10		0,1433	---	----	----	----	8,35 ± 0,01
11		0,1433	1	----	----	----	7,70 ± 0,01
12		0,1433	3	----	----	----	7,62 ± 0,01
13		0,1433	6	----	----	----	7,54 ± 0,01
14		0,1433	8	----	----	----	7,48 ± 0,01
15		0,1666	---	6,14 ± 0,01	5,55 ± 0,01	6,20 ± 0,01	7,73 ± 0,01
16		0,2500	---	5,08 ± 0,01	4,85 ± 0,01	5,00 ± 0,01	5,92 ± 0,01
17		0,3333	---	2,87 ± 0,01	3,26 ± 0,01	3,02 ± 0,01	3,46 ± 0,01
18	Na <sup>+</sup>	0,0450	---	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,31 ± 0,01
19		0,2500	---	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,30 ± 0,01
20	Mn <sup>2+</sup>	0,0450	---	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,01
21		0,2500	---	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,22 ± 0,01
22		0,3750	---	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01

23	Mg <sup>2+</sup>	0,0450	---	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,52 ± 0,01
24		0,0005	---	----	----	----	1,00 ± 0,01
25		0,0005	1	----	----	----	0,90 ± 0,01
26		0,0005	3	----	----	----	0,85 ± 0,01
27		0,0005	6	----	----	----	0,80 ± 0,01
28		0,0005	8	----	----	----	0,80 ± 0,01
29	Ca <sup>2+</sup>	0,0450	---	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,01
30	K <sup>+</sup> - Mn <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	0,50 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,45 ± 0,01
31		0,1666 - 0,1666	---	0,10 ± 0,01	----	----	0,20 ± 0,01
32		0,2380 - 0,0238	---	0,83 ± 0,01	----	----	2,05 ± 0,01
33	K <sup>+</sup> - Ca <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	0,45 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,85 ± 0,01
34	K <sup>+</sup> - Mg <sup>2+</sup>	0,0416 - 0,0416	---	1,75 ± 0,01	1,65 ± 0,01	1,81 ± 0,01	2,00 ± 0,01
35		0,1666 - 0,1666	---	1,03 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,97 ± 0,01
36		0,0238 - 0,2380	---	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,01
37		0,0450 - 0,0045	---	----	----	----	5,33 ± 0,01
38		0,0820 - 0,0082	---	----	----	----	5,71 ± 0,01
39		0,1128 - 0,0113	---	----	----	----	6,05 ± 0,01
40		0,1389 - 0,0139	---	----	----	----	6,45 ± 0,01
41		0,1807 - 0,0181	---	----	----	----	7,67 ± 0,01
42		0,1807 - 0,0181	1	----	----	----	7,67 ± 0,01
43		0,1807 - 0,0181	3	----	----	----	7,67 ± 0,01
44		0,1807 - 0,0181	6	----	----	----	7,67 ± 0,01
45		0,1807 - 0,0181	8	----	----	----	7,67 ± 0,01
46		0,1977 - 0,0198	---	----	----	----	5,68 ± 0,01
47		0,2380 - 0,0238	---	4,31 ± 0,01	4,01 ± 0,01	3,90 ± 0,01	5,04 ± 0,01

De los resultados obtenidos y resumidos en las Tablas 6.5 y 6.6 se observa que para ambas enzimas se obtiene mayor actividad en el medio número 10 que posee la mayor concentración de cationes K<sup>+</sup> siendo de aproximadamente 0,14 M, la concentración óptima a utilizar.

Los cationes divalentes mostraron un efecto inhibitor sobre las enzimas cuando son los únicos adicionados, pero este efecto disminuye si se adiciona el K<sup>+</sup> en diversas concentraciones y relaciones (medios 30 a 47), siendo la relación K<sup>+</sup>:catión<sup>2+</sup> de 10:1 la que mostró menor inhibición.

Si bien con la suspensión del catalizador enzimático en el buffer D, la combinación del Mg<sup>2+</sup> con el K<sup>+</sup> no se logra conseguir la máxima actividad enzimática inmediatamente, permite obtener un buen efecto estabilizador y la actividad enzimática disminuye menos (medios 41 a 45), logrando el mejor valor en el período analizado. Usando solamente K<sup>+</sup> (medios 10 a 14), la actividad disminuye mucho en el primer día

de almacenamiento, y a los tres días ya muestra una actividad menor que la que se mantiene en la mezcla  $K^+ : Mg^{2+}$ .

Como se observa en la Figura 6.3, ambas enzimas presentan comportamientos similares por la presencia de cationes en el medio, encontrándose que el buffer hidróxido de sodio - fosfato monosódico 0,05 M de pH 6,9 con el agregado de cationes  $K^+$  fue el medio más favorable para mantener la actividad enzimática, debiendo adicionarse cationes  $Mg^{2+}$  cuando se deba almacenar la enzima para una posterior utilización.

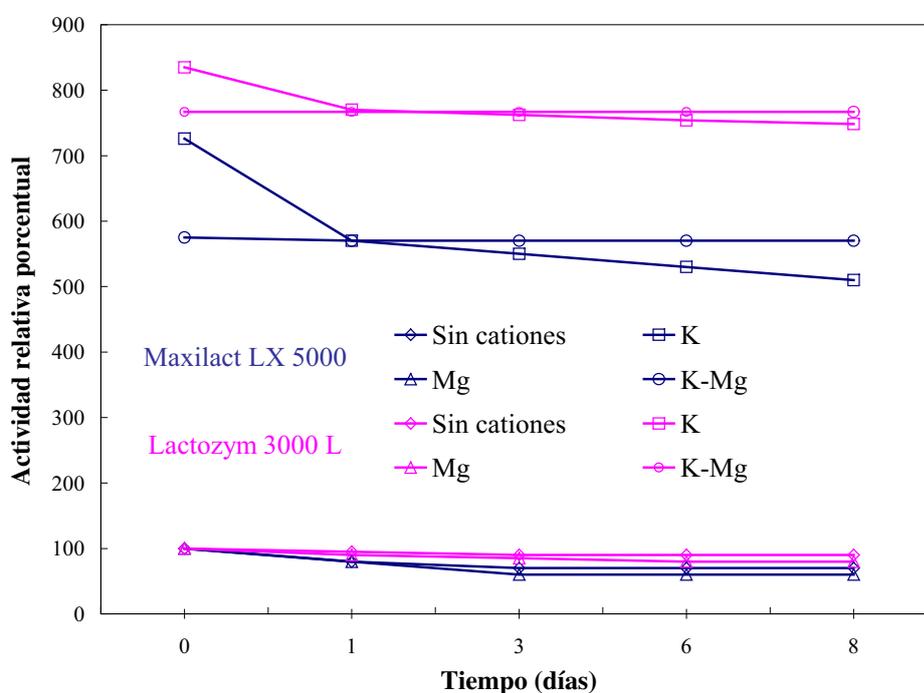


Figura 6.3: Influencia del medio salino sobre la actividad de las enzimas libres

Si bien ambas enzimas mostraron un buen comportamiento en las condiciones ensayadas, la enzima Lactozym 3000 L mostró mayores valores de actividad y estabilidad. Este mejor comportamiento, sumado a su mayor peso y tamaño molecular que otorga ventajas para el método de inmovilización fueron los elementos utilizados para elegir esta enzima para la confección de los biocatalizadores.

#### 6.1.4. Determinación de las constantes cinéticas de la enzima libre

En las Tablas 6.7 y 6.8 se muestran los valores de conversión obtenidos utilizando 20 y 40  $\mu\text{l}$  respectivamente de enzima Lactozym 3000 L, para concentraciones iniciales de sustrato  $[S^0]$  de 2,5 - 5,0 - 7,5 y 10%.

Tabla 6.7: Conversiones obtenidas con 20  $\mu\text{l}$  de enzima considerando diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Tiempo (min)	Concentración inicial de lactosa			
	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0721	0,0482	0,0345	0,0263
4	0,1401	0,0901	0,0669	0,0450
6	0,2112	0,1315	0,1005	0,0777
8	0,2806	0,1724	0,1369	0,1054
10	0,3387	0,2205	0,1695	0,1279
15	0,4812	0,3241	0,2432	0,1914
20	0,5709	0,4017	0,3012	0,2512
25	0,6517	0,4682	0,3611	0,3075
30	0,7145	0,5334	0,4095	0,3524

Tabla 6.8: Conversiones obtenidas con 40  $\mu\text{l}$  de enzima considerando diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Tiempo (min)	Concentración inicial de lactosa			
	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,1995	0,1422	0,1050	0,0800
4	0,3560	0,2639	0,2043	0,1633
6	0,4735	0,3778	0,2965	0,2347
8	0,5887	0,4822	0,3811	0,2909
10	0,6712	0,5699	0,4506	0,3502
15	0,8024	0,7112	0,5893	0,4810
20	0,8931	0,8124	0,6811	0,5817
25	0,9462	0,8796	0,7705	0,6600
30	0,9839	0,9145	0,8260	0,7295

Debido a las características de la reacción, no resulta posible determinar las velocidades iniciales; luego, para extender el rango de tiempos y conversiones a utilizar,

se utiliza la ecuación integrada (4.11).

Con los valores de las Tablas 6.7 y 6.8 se obtienen las Figuras 6.4 y 6.5 considerando los distintos valores de  $[E^0]$  y  $[S^0]$  para la obtención de los parámetros A y B, definidos en las ecuaciones (4.12) y (4.13), respectivamente.

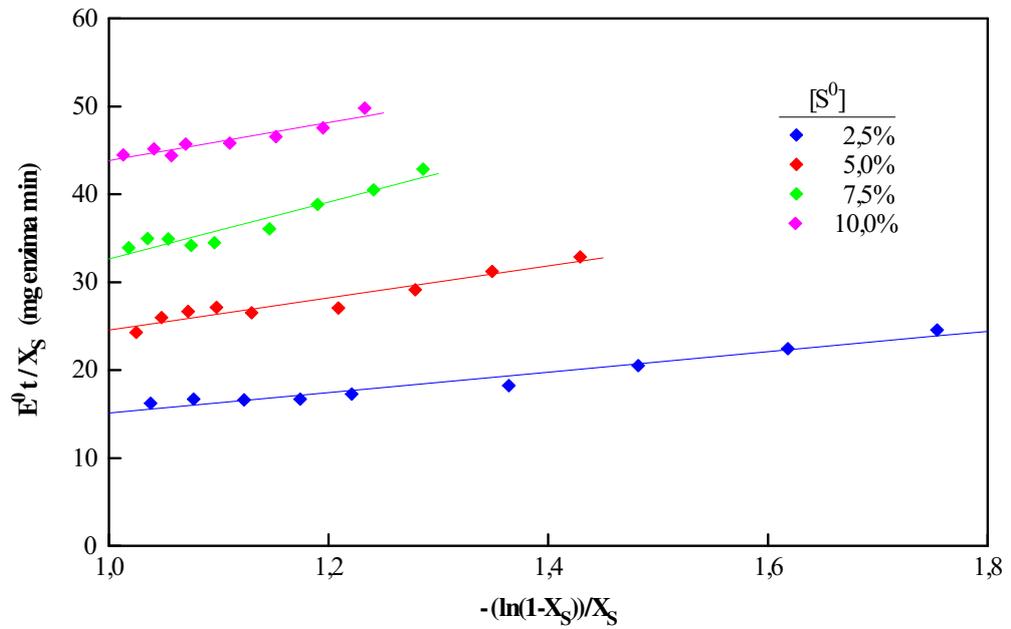


Figura 6.4: Linealización de los datos cinéticos obtenidos con 20 µl de enzima según la ecuación (4.11)

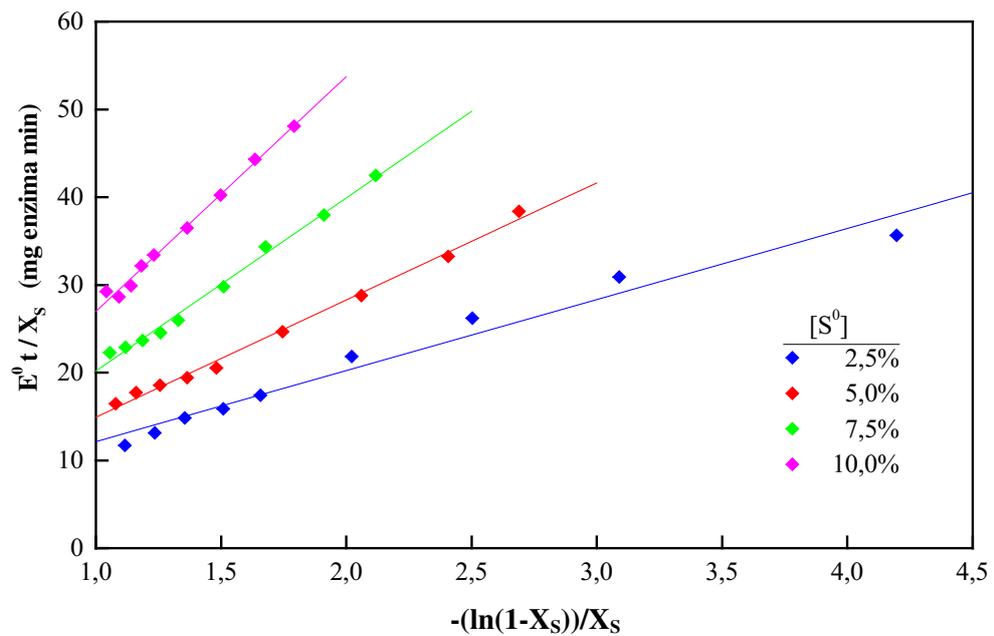


Figura 6.5: Linealización de los datos cinéticos obtenidos con 40 µl de enzima según la ecuación (4.11)

En la Tablas 6.9 y 6.10 se presentan los valores de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de cada una de las linealizaciones indicadas en las Figuras 6.4 y 6.5.

Tabla 6.9: Parámetros A y B de la ecuación cinética de la enzima libre, obtenidos utilizando 20  $\mu$ l de enzima

<b>Concentración inicial de lactosa (%)</b>	<b>B (mg enzima min)</b>	<b>A (mg enzima min)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
2,5	3,52	11,60	0,9991
5,0	6,30	18,25	0,9993
7,5	0,34	32,30	0,9994
10,0	36,02	9,83	0,9976

Tabla 6.10: Parámetros A y B de la ecuación cinética de la enzima libre, obtenidos utilizando 40  $\mu$ l de enzima

<b>Concentración inicial de lactosa (%)</b>	<b>B (mg enzima min)</b>	<b>A (mg enzima min)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
2,5	4,04	8,10	0,9961
5,0	1,58	13,35	0,9995
7,5	0,46	19,73	0,9996
10,0	0,25	26,74	0,9998

Realizando para cada  $[E^0]$ , una regresión lineal de los valores de ordenada al origen y pendiente en función de las distintas  $[S^0]$  (Figuras 6.6 y 6.7), se obtienen los valores de  $a_1$ ,  $b_1$  y  $a_2$  de las ecuaciones (4.12) y (4.13). Como se observa en dichas figuras, existe una importante dispersión de los valores obtenidos en las regresiones debida a errores experimentales asociados a la escasa extensión de los períodos de tiempo utilizados en las mediciones (Horton y otros, 1995; Shang-Tian y Okos, 1989).

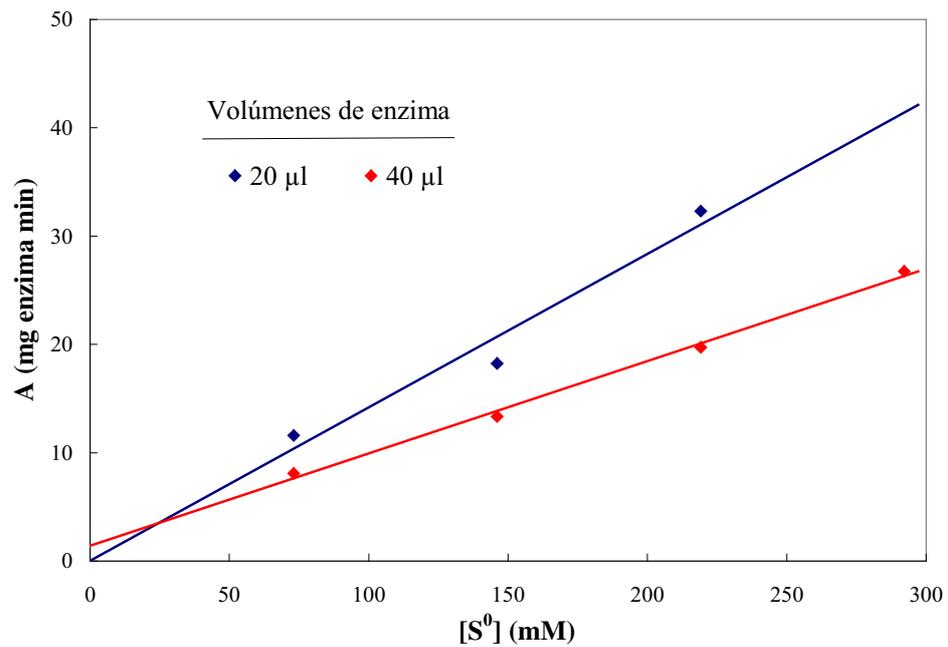


Figura 6.6: Linealización de los datos de pendiente obtenidos para los diferentes volúmenes de enzima utilizados según la ecuación (4.12)

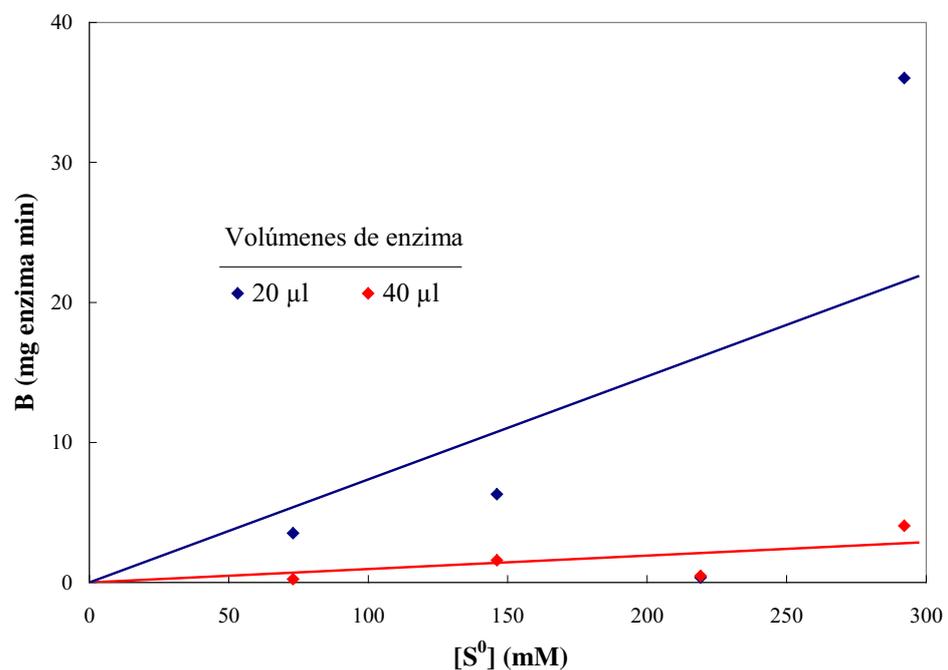


Figura 6.7: Linealización de los datos de ordenada al origen obtenidos para los diferentes volúmenes de enzima utilizados según la ecuación (4.13)

En la Tablas 6.11 y 6.12 se presentan los valores de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de cada una de las linealizaciones realizadas en las Figuras 6.6 y 6.7 para la obtención de los valores de  $a_1$ ,  $b_1$  y  $a_2$  de las ecuaciones cinéticas.

Tabla 6.11: Parámetros  $a_1$  y  $b_1$  de la ecuación cinética de la enzima libre, obtenidos para los volúmenes de enzima utilizados

Volumen de enzima ( $\mu\text{l}$ )	$b_1$	$a_1$ (mg enzima min lt $\text{mmoles}^{-1}$ )	$R^2$
20	0,018	0,142	0,9591
40	1,405	0,085	0,9994

Tabla 6.12: Parámetro  $a_2$  de la ecuación cinética de la enzima libre, obtenido para los volúmenes de enzima utilizados

Volumen de enzima ( $\mu\text{l}$ )	$a_2$ (mg enzima min lt $\text{mmoles}^{-1}$ )	$R^2$
20	0,074	0,6419
40	0,010	0,5083

Reemplazando los valores promedios de los parámetros obtenidos a través de las regresiones lineales presentadas en las Figuras 6.6 y 6.7, en las ecuaciones (4.14) a (4.16) se obtuvieron los siguientes valores de las constantes cinéticas de la enzima libre:  $K_m = 98 \pm 1 \text{ mmoles lt}^{-1}$ ;  $k_2 = 11,4 \pm 0,2 \text{ mmoles lt}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ;  $k_i = 177 \pm 2 \text{ mmoles lt}^{-1}$ .

## 6.2. Preparación y caracterización del soporte

### 6.2.1. Estudio del mecanismo de formación de geles

De la cantidad de calcio incorporado en los ensayos, cuando el frente de gelificación alcanzó el centro de las muestras, se obtuvo para el coeficiente estequiométrico  $b$  de la ecuación que representa el proceso de producción del gel un valor de 24,26 g alginato / g calcio.

Para utilizar el modelo obtenido con las ecuaciones (4.37), (4.42) y (4.43), se tomaron los valores de  $D_A$  ( $1,799 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) y  $k_1$  (0,1 cm/s) extraídos de la bibliografía para condiciones de ensayo similares a las utilizadas (Chavez y otros, 1994). En las observaciones experimentales de alginato y de mezcla alginato-carragenina no se encontraron diferencias en el avance de la gelificación.

En la Tabla 6.13 se presentan los valores de penetración del frente de gelificación determinados experimentalmente y calculados con la ecuación (4.42), tanto para la solución de alginato de sodio de baja viscosidad al 2,4% (p/v), como para la solución de alginato de sodio de baja viscosidad y de  $\kappa$ -carragenina al 2,4% (p/v) y 1,0% (p/v) respectivamente, para distintas composiciones del baño gelificante.

Tabla 6.13: Valores de penetración del frente de gelificación en función del tiempo

Tiempo gelific. (s)	Concentración de CaCl <sub>2</sub> en la solución gelificante (% p/v)					
	1,0		2,0		3,0	
	Experim.	Calculado	Experim.	Calculado	Experim.	Calculado
0	0,552 ± 0,002	0,552	0,552 ± 0,002	0,552	0,552 ± 0,002	0,552
300	0,496 ± 0,002	0,490	0,468 ± 0,002	0,462	0,448 ± 0,002	0,440
600	0,466 ± 0,002	0,462	0,428 ± 0,002	0,422	0,388 ± 0,002	0,390
900	0,440 ± 0,002	0,440	0,376 ± 0,002	0,389	0,350 ± 0,002	0,350
1800	0,386 ± 0,002	0,390	0,318 ± 0,002	0,315	0,250 ± 0,002	0,252
2700	0,350 ± 0,002	0,350	0,248 ± 0,002	0,251	0,162 ± 0,002	0,164
3600	0,312 ± 0,002	0,314	0,180 ± 0,002	0,193	0,064 ± 0,002	0,063
3900	-----	---	---	---	0,000 ± 0,002	0,000*
4500	0,284 ± 0,002	0,282	0,124 ± 0,002	0,133		
5400	0,250 ± 0,002	0,251	0,072 ± 0,002	0,063		
5880	-----	---	0,000 ± 0,002	0,000*		
6300	0,226 ± 0,002	0,222				
7200	0,190 ± 0,002	0,193				
8100	0,166 ± 0,002	0,164				
9000	0,134 ± 0,002	0,134				
9900	0,104 ± 0,002	0,101				
10800	0,066 ± 0,002	0,063				
11700	0,000 ± 0,002	0,000*				

\* Los valores exactos de los tiempos calculados son 11605 s para 1,0% de CaCl<sub>2</sub>; 5802 s para 2,0% de CaCl<sub>2</sub> y 3868 s para 3,0% de CaCl<sub>2</sub>.

La Figura 6.8 muestra que los valores calculados para cada condición ajustan los datos experimentales, por lo que el comportamiento puede estudiarse considerando que la etapa controlante en la gelificación es el fenómeno difusivo.

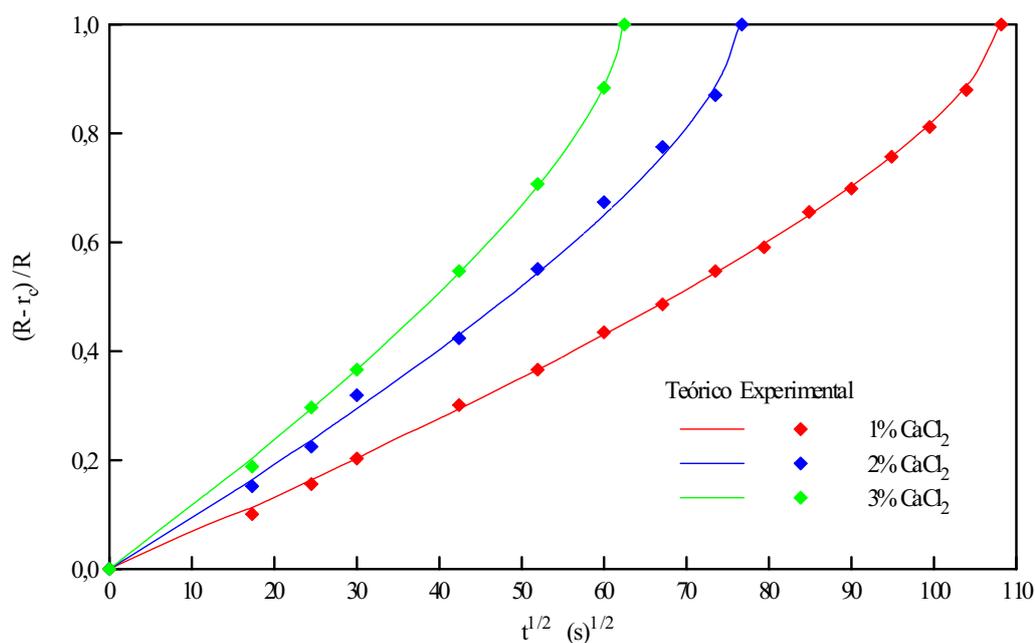


Figura 6.8: Valores experimentales y teóricos del frente de gelificación en función del tiempo

Debido a la conveniencia de añadir cationes  $\text{K}^+$  para aumentar la actividad de la enzima, se analizó cómo influye su presencia en la incorporación del  $\text{Ca}^{2+}$  a la estructura del gel. En la Tabla 6.14 se presentan los valores experimentales de la concentración promedio de Ca y K incorporados por reacción química a la estructura de los gels obtenidos de una solución de alginato de sodio de baja viscosidad al 2,4% (p/v) y de  $\kappa$ -carragenina al 1,0% (p/v) con distintas composiciones del baño gelificante.

Como se observa en la Tabla 6.14, la incorporación de cationes a la estructura del gel aumenta con el tiempo de inmersión, alcanzándose un valor límite máximo para una concentración de cationes ligeramente superior a la que le corresponde teóricamente por reacción química total, relacionada con el valor de  $1/b$ .

La ecuación (4.37) permite calcular la disponibilidad teórica de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior del gel como se muestra en la Figura 6.9 donde se observa el avance de la gelificación de una solución de alginato de sodio de baja viscosidad al 2,4% (p/v) colocada en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1,0% (p/v). Esta información permite calcular el tiempo de gelificación necesario para obtener un catalizador que reúna las características estructurales deseadas sin necesidad de sobreexponer a la enzima al efecto inhibitor del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tabla 6.14: Incorporación de cationes durante la gelificación de una solución de alginato de sodio de baja viscosidad al 2,4% (p/v) y de  $\kappa$ -carragenina al 1,0% (p/v) con distintas composiciones del baño gelificante

Tiempo de gelificación (s)	Solución gelificante 1,0% $\text{CaCl}_2$ – 2,0% $\text{KCl}$		Solución gelificante 2,0% $\text{CaCl}_2$ – 4,0% $\text{KCl}$	
	Ca ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	K ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	Ca ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	K ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )
1800	0,143 $\pm$ 0,001	0,249 $\pm$ 0,001	0,188 $\pm$ 0,001	0,321 $\pm$ 0,001
3600	0,190 $\pm$ 0,001	0,269 $\pm$ 0,001	0,245 $\pm$ 0,001	0,347 $\pm$ 0,001
5400	0,205 $\pm$ 0,001	0,321 $\pm$ 0,001	0,265 $\pm$ 0,001	0,366 $\pm$ 0,001
7200	0,245 $\pm$ 0,001	0,344 $\pm$ 0,001	0,280 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001
9000	0,263 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001	0,282 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001
10800	0,280 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001	0,284 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001
12600	0,282 $\pm$ 0,001	0,367 $\pm$ 0,001	0,284 $\pm$ 0,001	0,369 $\pm$ 0,001

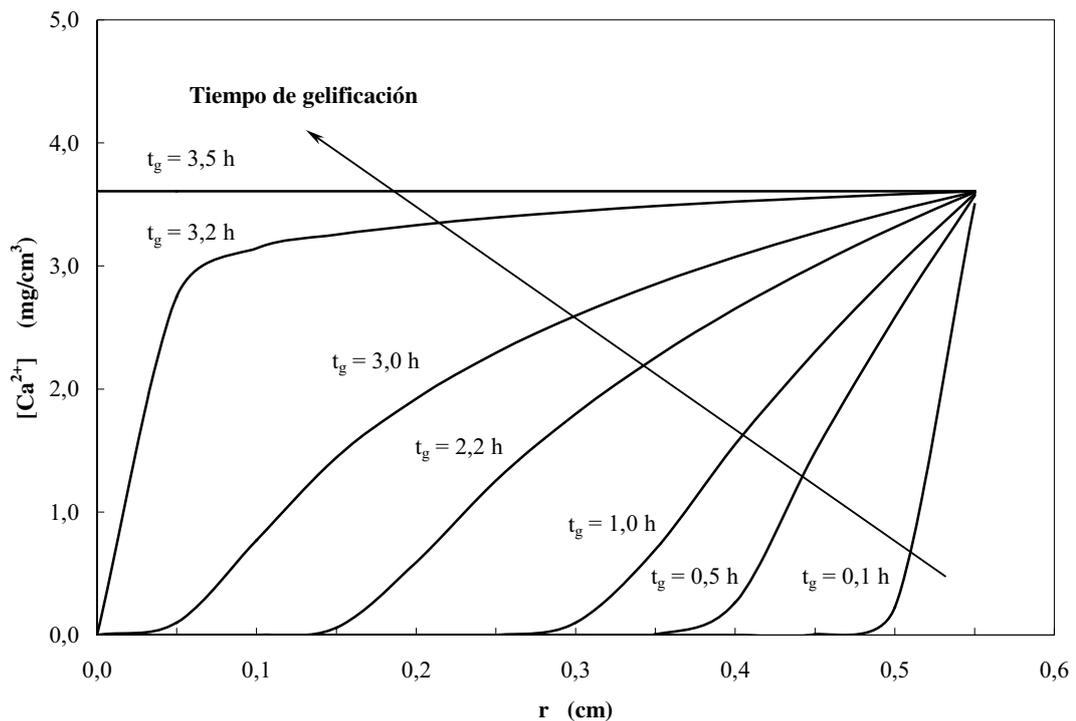


Figura 6.9: Perfil de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de un gel de alginato al 2,4% (p/v) obtenido en un baño gelificante de  $\text{CaCl}_2$  al 1,0% (p/v)

### **6.2.2. Comportamiento de los geles a la compresión**

Para identificar las muestras se utilizó un sistema de codificación que utiliza letras y números, separados por guiones. Como primera clave se utilizó la letra G para identificar la composición del gel, seguido en este caso por un número de 3 cifras en el que cada dígito expresa el nivel de concentraciones de cada hidrocoloide de acuerdo al siguiente esquema:

\* Primer dígito: Representa el nivel de concentración del alginato de sodio de alta viscosidad en el gel. Se utilizan los siguientes niveles de asociación:

- 1.- Corresponde a una concentración de 1,0%.
- 2.- Corresponde a una concentración de 2,0%.
- 3.- Corresponde a una concentración de 3,0%.

\* Segundo dígito: Representa el nivel de concentración del alginato de sodio de baja viscosidad en el gel. Se utilizan los siguientes niveles de asociación:

- 0.- Expresa la ausencia de este componente en el gel.
- 1.- Corresponde a una concentración de 1,0%.

\* Tercer dígito: Representa el nivel de concentración de la  $\kappa$ -carragenina en el gel. Se utilizan los siguientes niveles de asociación:

- 0.- Expresa la ausencia de este componente en el gel.
- 1.- Corresponde a una concentración de 0,1%.
- 2.- Corresponde a una concentración de 0,5%.
- 3.- Corresponde a una concentración de 1,0%.
- 4.- Corresponde a una concentración de 2,0%.

Como segunda clave se utilizó la letra K para identificar la composición del baño gelificante, seguido en este caso por un número de 2 cifras en el que cada dígito expresa el nivel de concentraciones de cada compuesto de acuerdo al siguiente esquema:

\* Primer dígito: Representa el nivel de concentración del  $\text{CaCl}_2$  en el baño gelificante. Se utilizan los siguientes niveles de asociación:

1.- Corresponde a una concentración de 1,0%.

2.- Corresponde a una concentración de 2,0%.

3.- Corresponde a una concentración de 3,0%.

\* Segundo dígito: Representa el nivel de concentración del KCl en el baño gelificante. Se utilizan los siguientes niveles de asociación:

0.- Expresa la ausencia de este componente en el baño gelificante.

1.- Corresponde a una concentración igual al doble del  $\text{CaCl}_2$ .

Por último, para expresar el tiempo que los geles permanecieron en el baño gelificante, se utilizó la letra T seguida de un número de una cifra que representa el nivel de tiempo, de acuerdo con los siguientes niveles de asociación:

1.- Corresponde a un tiempo de 0,5 h.

2.- Corresponde a un tiempo de 1,0 h.

3.- Corresponde a un tiempo de 1,5 h.

4.- Corresponde a un tiempo de 2,0 h.

5.- Corresponde a un tiempo de 2,5 h.

6.- Corresponde a un tiempo de 3,0 h.

Por ejemplo, la muestra identificada como G100–K11–T6 corresponde a un gel de 1,0% de alginato de sodio de alta viscosidad sin el agregado de alginato de sodio de baja viscosidad ni  $\kappa$ -carragenina, colocado en un baño gelificante de 1,0% de  $\text{CaCl}_2$  y 2,0% de KCl y mantenido sumergido en el mismo por un período de 3,0 h.

En los ensayos reológicos de compresión y relajación realizados a los geles obtenidos en las distintas condiciones, se obtuvieron las curvas características que se observan en la Figura 6.10 y que representan la evolución de distintos geles para un porcentaje de deformación del 50%. La tensión aparente se obtiene dividiendo la fuerza por el valor inicial de la sección transversal de la muestra, mientras que la tensión verdadera se obtiene considerando el incremento del área por la deformación (Peleg y Calzada, 1976; Calzada y Peleg, 1978; Rosenau y otros, 1978).

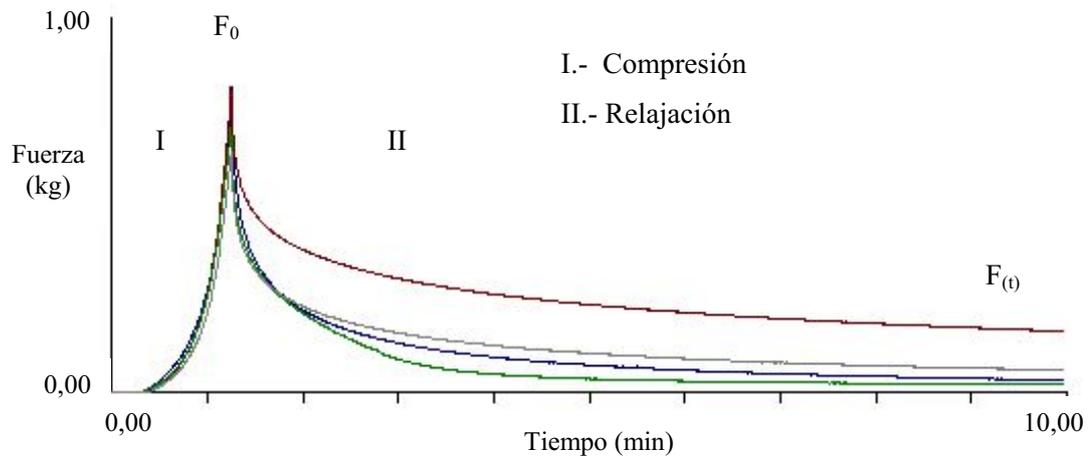


Figura 6.10: Curvas características de compresión-relajación para los geles estudiados

Los geles de alginato-carragenina mostraron una mayor resistencia a la compresión, presentando un efecto sinérgico para las distintas condiciones de gelificación.

Los valores de tensión obtenidos se procesaron de acuerdo al método de Peleg y Calzada (1976), normalizando las curvas de relajación para  $Y(t)$  (módulo aparente), expresado en función de la fuerza registrada al iniciar la relajación,  $F_0$ , y de la fuerza registrada después de un tiempo  $t$  de relajación,  $F(t)$ , de acuerdo a la ecuación (6.1).

$$\frac{t}{Y(t)} = \frac{F_0 t}{F_0 - F(t)} = \frac{1}{a b} + \frac{t}{a} \quad (6.1)$$

El valor de “ $a$ ” representa cómo decae la fuerza durante la relajación. Si  $a = 0$ , la tensión se mantiene y no se produce la relajación (sólido elástico ideal), y si  $a = 1$ , la tensión se pierde, relajando a cero (líquido). El valor de “ $b$ ” representa la velocidad de relajación de la tensión (Mickley y otros, 1957).

Graficando los valores obtenidos en los ensayos de relajación y realizando un ajuste por mínimos cuadrados, se obtienen los valores de  $1/a$  (pendiente de la recta) y de  $1/ab$  (ordenada al origen).

La Figura 6.11 muestra la linealización de las curvas de relajación de distintos geles para un porcentaje de deformación del 50 %.

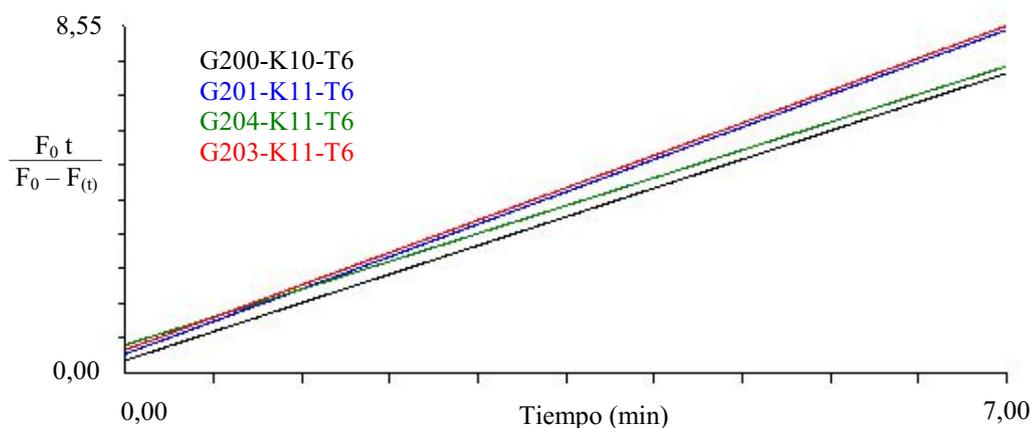


Figura 6.11: Representación normalizada de las curvas de relajación obtenidas para los geles G200-K10-T6, G201-K11-T6, G204-K11-T6 y G203-K11-T6

Analizando los resultados obtenidos en la fase de compresión de los ensayos reológicos puede observarse que los mayores valores de fuerza máxima al inicio de la relajación ( $F_0$ ) se producen a mayores valores de incorporación de calcio a la matriz, presentando las otras variables, escaso efecto sobre la tensión de compresión y la fuerza al final de la relajación. En esta fase, el gel de alginato con la incorporación de  $\kappa$ -carragenina muestra un comportamiento similar al de un fluido, disminuyendo el valor de la fuerza remanente al final del ensayo de relajación porque el material se desliza más fácilmente (Nussinovitch y otros, 1989; Tang y otros 1994).

A través de la Figura 6.11 puede observarse que los resultados obtenidos en la fase de relajación de los ensayos reológicos de los geles presentan comportamientos similares, variando particularmente los valores de “ $a$ ” con la cantidad de  $\kappa$ -carragenina agregada.

La Tabla 6.15 muestra los parámetros obtenidos en cada ensayo reológico conforme a las curvas características obtenidas para cada gel. En la misma puede observarse que los valores obtenidos para distintas condiciones del baño gelificante, cambian muy poco con el agregado de  $\kappa$ -carragenina hasta alcanzar un 1,0%; así los geles G201-K11-T6, G202-K11-T6 y G203-K11-T6 presentan características reológicas muy similares entre sí, al igual que los geles G201-K21-T6, G202-K21-T6 y G203-K21-T6, y G201-K31-T6, G202-K31-T6 y G203-K31-T6.

Tabla 6.15: Parámetros reológicos obtenidos para los geles estudiados

Muestra	F <sub>0</sub> (kg)	Tensión aparente (kg/cm <sup>2</sup> )	Tensión verdadera (kg/cm <sup>2</sup> )	Parámetros de relajación		
				<i>a</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
G100-K10-T6	0,065	0,128	0,064	0,02	1,00	1,000
G100-K20-T6	0,077	0,154	0,077	0,18	1,01	0,999
G100-K30-T6	0,056	0,112	0,056	0,15	1,01	0,999
G300-K30-T6	0,384	0,554	0,277	0,14	1,01	1,000
G300-K20-T6	0,730	1,052	0,526	0,19	1,01	0,999
G300-K10-T6	0,469	0,675	0,338	0,40	1,07	0,999
G110-K10-T6	0,331	0,457	0,228	0,22	1,01	1,000
G110-K20-T6	0,302	0,418	0,209	0,15	1,00	1,000
G110-K30-T6	0,205	0,284	0,142	0,17	1,01	1,000
G200-K10-T6	0,338	0,531	0,265	0,31	1,03	0,999
G200-K20-T6	0,338	0,509	0,254	0,18	1,01	1,000
G200-K30-T6	0,146	0,291	0,145	0,15	1,00	1,000
G200-K20-T5	0,360	0,717	0,358	0,26	1,01	1,000
G200-K20-T4	0,288	0,463	0,231	0,16	1,00	1,000
G200-K20-T3	0,274	0,412	0,206	0,14	1,00	1,000
G200-K20-T2	0,274	0,431	0,215	0,17	1,01	1,000
G200-K20-T1	0,389	0,612	0,306	0,39	1,07	0,999
G201-K11-T6	0,435	0,684	0,342	0,47	1,14	0,999
G201-K21-T6	0,501	0,722	0,361	0,51	1,07	0,990
G201-K31-T6	0,561	0,844	0,422	0,49	1,08	0,999
G204-K11-T6	0,721	0,818	0,409	0,69	1,09	0,998
G204-K21-T6	0,635	0,719	0,359	0,43	1,06	0,999
G204-K31-T6	0,635	0,719	0,360	0,47	1,06	0,999
G202-K11-T6	0,479	0,586	0,293	0,50	1,05	0,999
G202-K21-T6	0,436	0,664	0,328	0,48	1,07	0,999
G202-K31-T6	0,434	0,653	0,326	0,35	1,02	0,999
G203-K11-T6	0,447	0,548	0,274	0,58	1,12	0,999
G203-K21-T6	0,411	0,545	0,273	0,48	1,06	0,999
G203-K31-T6	0,426	0,641	0,321	0,43	1,05	0,999

En los ensayos de compresión donde la deformación alcanza el 85%, se observa que a igual relación de concentraciones de cationes por gramo de hidrocoloide, los geles de alginato de sodio resultaron más elásticos que aquellos que contenían además  $\kappa$ -carragenina, permitiendo mayores deformaciones sin que se produzca la fractura (Figura 6.12). Esto podría deberse a que la  $\kappa$ -carragenina, que interfiere en la estructura del alginato, no permitiría que se produzcan algunos enlaces cruzados entre los bloques

poliméricos y no se completarían las redes tridimensionales que le dan mayor deformabilidad al gel.

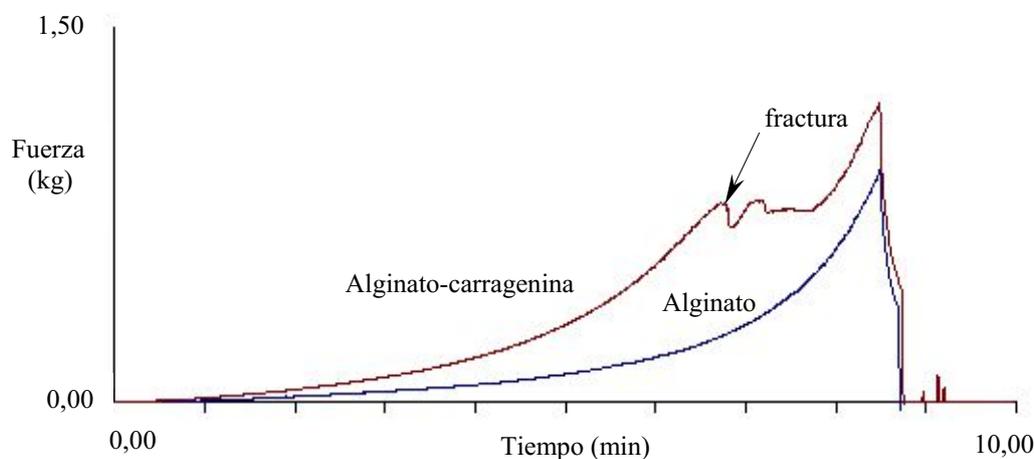


Figura 6.12: Curvas de compresión para deformaciones del 85% de las muestras de geles

Por otra parte, el esfuerzo necesario para lograr la fractura del gel aumenta a medida que se incrementa la cantidad de cationes que ingresa, alcanzándose un valor límite para una concentración de cationes superior entre un 3,0 y un 5,0% a la correspondiente por los coeficientes estequiométricos de la reacción química. Esto podría deberse a que a partir de este punto no existe más formación de enlaces estables, y existe un equilibrio entre los enlaces que se forman y los que se rompen y por lo tanto no se modifica la rigidez del gel (Tang y otros, 1997; Mancini y otros, 1999).

Para los geles G200-K20-T6 y G203-K21-T6, en los que el tiempo de permanencia en el baño gelificante fue el doble del necesario para garantizar la total gelificación, se obtuvieron tensiones de fractura de  $1,86 \text{ kg / cm}^2$  y  $1,19 \text{ kg / cm}^2$ , respectivamente.

Con la información obtenida en el estudio del mecanismo de formación de los geles y de su comportamiento a la compresión, para el sistema de preparación de los biocatalizadores se eligió la composición del baño gelificante de  $\text{CaCl}_2$  al 2,0% (p/v) y de KCl al 4,0% (p/v) y el tiempo de gelificación de 1h que permiten obtener una partícula de características estructurales deseadas sin necesidad de sobreexponer a la enzima al efecto inhibitor del  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 6.2.3. Estabilidad del soporte formado con geles

Las muestras, preparadas con las distintas cantidades de los componentes, que presentaron los valores de variación promedio del volumen (V.P.V.) y duración del biocatalizador que satisfacen las restricciones impuestas, se presentan en la Tabla 6.16.

Tabla 6.16: Valores experimentales para el análisis del comportamiento de los geles en las condiciones de reacción consideradas en el diseño experimental de 3 factores en 5 niveles según la codificación de la Tabla 5.3

Experiencia n°	Nivel empleado en el soporte			Respuesta	
	Alginato baja visc.	Alginato alta visc.	Carrag.	Duración	V.P.V. (mm <sup>3</sup> )
1	-1	-1	-1	8	0,7749
2	-1	-1	1	10	0,8378
3	-1	1	-1	29	0,1634
4	-1	1	1	28	0,1843
5	1	-1	-1	23	0,2262
6	1	-1	1	17	0,3812
7	1	1	-1	45	0,0963
8	1	1	1	45	0,1047
9	-1,682	0	0	14	0,3183
10	1,682	0	0	29	0,1550
11	0	-1,682	0	6	0,8587
12	0	1,682	0	35	0,1340
13	0	0	-1,682	23	0,1801
14	0	0	1,682	7	0,7707
15	0	0	0	22	0,2094
16	0	0	0	21	0,2304
17	0	0	0	22	0,2136
18	0	0	0	24	0,1927
19	0	0	0	21	0,2262
20	0	0	0	25	0,1885

Los datos experimentales mostrados en la Tabla 6.16 se ajustaron con un polinomio de segundo orden utilizando, para el diseño experimental adoptado, la ecuación (6.2) para calcular mediante el análisis de regresión múltiple para cada variable dependiente, el correspondiente coeficiente de correlación para el mínimo valor de  $R^2$ .

$$\eta_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{kij} x_i x_j \quad (6.2)$$

Los valores de los coeficientes obtenidos para cada respuesta se presentan en la Tabla 6.17.

Tabla 6.17: Coeficientes de la ecuación (6.2) cuando las variables respuestas son duración y V.P.V.

Coeficiente	Variable dependiente	
	Duración k = 1	V.P.V. k = 2
$\beta_k$		
$\beta_{k0}$	21,92	0,216
$\beta_{k1}$	5,87	-0,104
$\beta_{k2}$	10,09	-0,212
$\beta_{k3}$	-2,34	0,091
$\beta_{k11}$	1,58	-0,010
$\beta_{k22}$	1,23	0,082
$\beta_{k33}$	-0,72	0,074
$\beta_{k12}$	1,38	0,107
$\beta_{k13}$	-0,88	0,010
$\beta_{k23}$	0,38	-0,024
$R^2$	0,884	0,908

Se desarrollaron superficies tridimensionales correspondientes a cada variable de respuesta basadas en la predicción del modelo y empleando los coeficientes presentados en la Tabla 6.17 (Figuras 6.13 y 6.14). Se consideró para ambas, un valor de 1,0% para la variable independiente concentración de alginato de sodio de baja viscosidad.

En la Figura 6.13 puede observarse que los valores de duración del soporte aumentan conforme aumenta la concentración de alginato de alta viscosidad, teniendo muy poca influencia sobre esta variable el cambio de concentración de  $\kappa$ -carragenina. Por su parte, en la Figura 6.14 se observa que un aumento en la concentración de alginato de alta viscosidad produce menores V.P.V. en el soporte y, a medida que su concentración se incrementa, el efecto de hinchamiento producido por la inclusión de la  $\kappa$ -carragenina en el gel se hace menos importante.

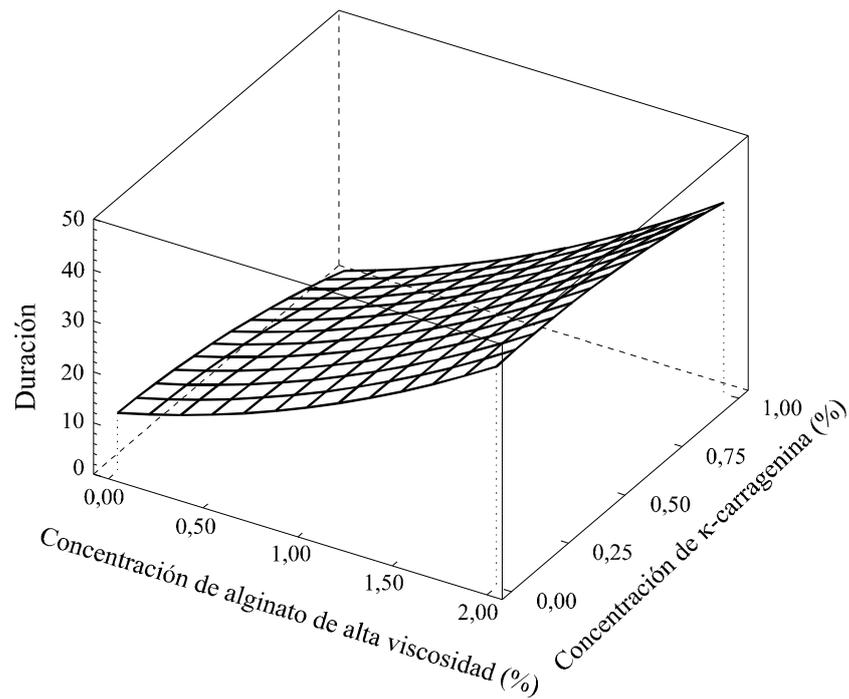


Figura 6.13: Superficie de respuesta para la duración del soporte considerando un valor constante de alginato de sodio de baja viscosidad (1,0%)

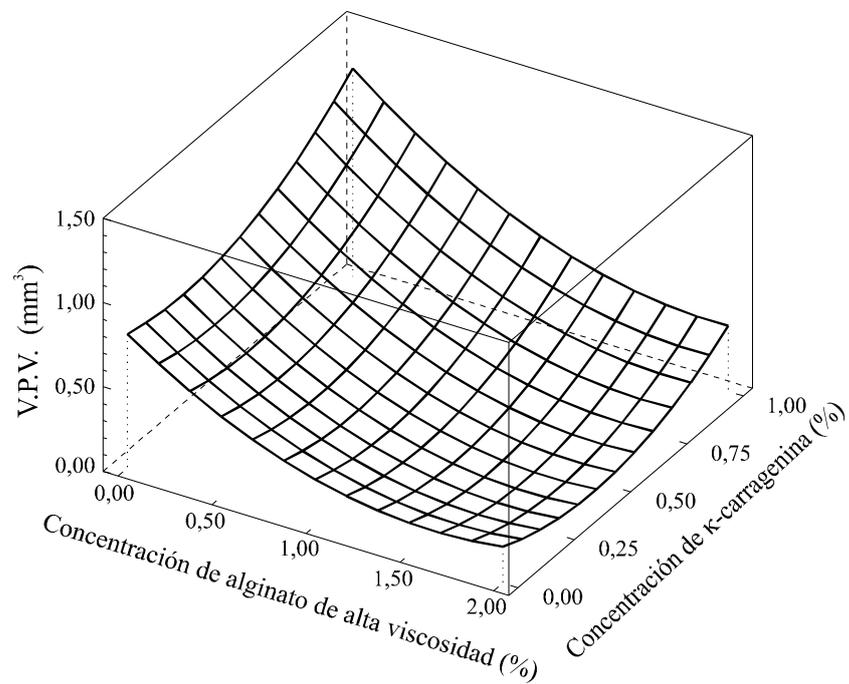


Figura 6.14: Superficie de respuesta para la variación promedio del volumen considerando un valor constante de alginato de sodio de baja viscosidad (1,0%)

En general, el alginato de sodio tiene un efecto estabilizante, de mayor magnitud para el que tiene características de alta viscosidad. Este comportamiento, que muestra una zona óptima para altas concentraciones de alginato en el gel, se limitaría posiblemente por una deficiencia de calcio en la estructura al no saturarse la matriz de hidrocoloides. La  $\kappa$ -carragenina produce un aumento del hinchamiento, a la vez que disminuye la resistencia del gel.

Para localizar las condiciones óptimas del proceso, se utilizaron las técnicas gráficas de optimización de multi-respuestas (Floros y Chinnan, 1988) y las gráficas de contornos generadas por computadora. Los criterios aplicados para la optimización gráfica son en orden de importancia:

(a) la duración del biocatalizador debe ser tan alta como sea posible, el valor de 30 corridas fue considerado como valor mínimo de referencia. Esta restricción resulta en una "región factible" de soluciones óptimas.

(b) la variación promedio del volumen debe ser la menor posible, el valor de V.P.V. de  $0,200 \text{ mm}^3$  fue considerado como valor máximo de referencia. Como en el caso anterior, esta restricción resulta en una "región factible" de soluciones óptimas.

Al superponer los gráficos tridimensionales generados por la computadora para la respuesta duración y para la respuesta variación promedio del volumen con los criterios mencionados anteriormente, se obtiene una región óptima cuya intersección con la superficie correspondiente a cada nivel de un factor, genera un gráfico de contornos como se muestra en la Figura 6.15.

Para el rango de condiciones óptimas de procesamiento predichas por el modelo, en la zona de concentraciones comprendida entre 1,0 y 1,5% para el alginato de baja viscosidad, entre 1,0 y 2,0% para el alginato de alta viscosidad y entre 0,0 y 0,5% para la carragenina, se puede producir una matriz-soporte de aceptable resistencia mecánica en las condiciones de reacción. Dentro de esta región se realizó el estudio de las condiciones de inmovilización para obtener un biocatalizador con aceptable actividad y estabilidad, involucrando en esta oportunidad a la enzima como factor de análisis; por lo cual, para seguir utilizando el mismo modelo por los motivos explicados en el punto

5.3., se mantiene invariable la composición del alginato de baja viscosidad que es un factor muy poco significativo.

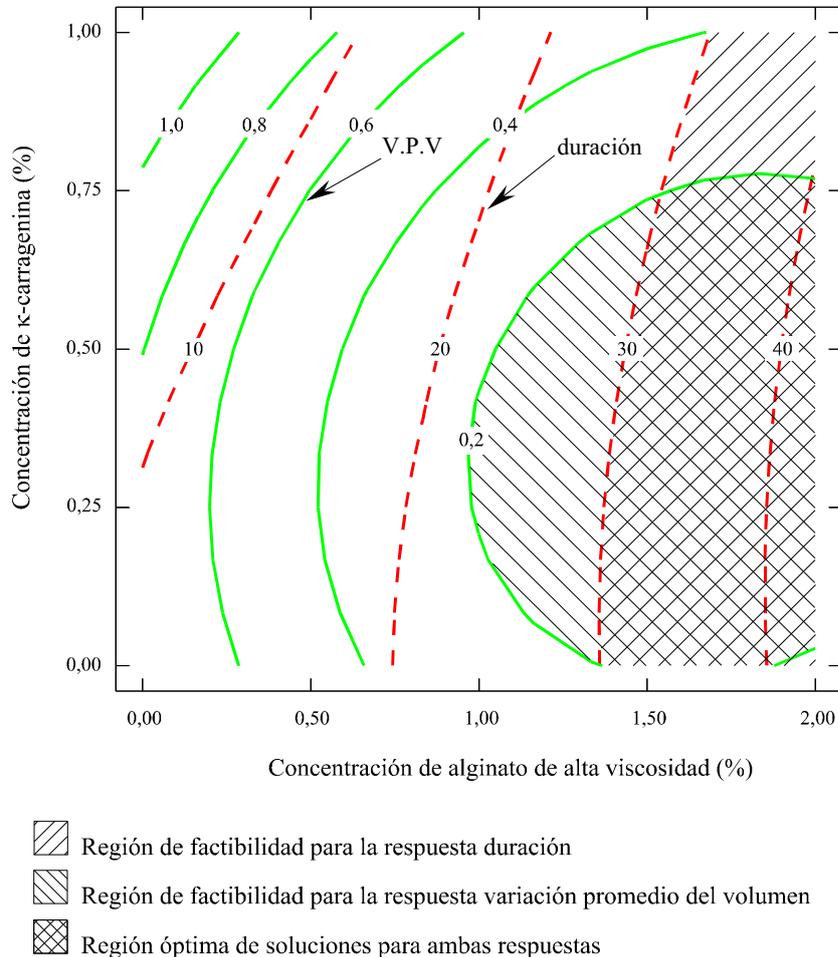


Figura 6.15: Localización de la zona de condiciones óptimas para las características requeridas del soporte considerando las respuestas duración y V.P.V.

### 6.3. Preparación y caracterización de los biocatalizadores

Los valores experimentales obtenidos para las variables: actividad inicial, actividad relativa media porcentual y períodos de utilización, que cumplen con las restricciones impuestas, se presentan en la Tabla 6.18. Estos datos experimentales se ajustaron utilizando la ecuación (6.2), realizando el análisis de regresión múltiple para cada variable dependiente y calculando su correspondiente coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Los valores de los coeficientes de regresión obtenidos para cada respuesta se presentan en la Tabla 6.19.

Tabla 6.18: Valores experimentales para el análisis del biocatalizador en las condiciones de reacción consideradas en el diseño experimental de 3 factores en 5 niveles según la codificación de la Tabla 5.4

Experiencia n°	Nivel empleado en el catalizador			Respuesta		
	Alginato alta visc.	Carrag. Carrag.	Enzima	Períodos utilizados	Actividad inicial ( $\mu\text{moles}$ $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-3}$ )	Actividad media relativa (%)
1	-1	-1	-1	16	208,75	82,13
2	-1	-1	1	11	225,50	90,00
3	-1	1	-1	16	31,36	70,64
4	-1	1	1	13	252,13	99,96
5	1	-1	-1	20	131,25	60,21
6	1	-1	1	16	163,33	78,72
7	1	1	-1	15	36,38	60,17
8	1	1	1	15	265,20	90,71
9	-1,682	0	0	15	21,40	99,88
10	1,682	0	0	16	102,08	89,97
11	0	-1,682	0	15	252,38	69,41
12	0	1,682	0	13	300,77	69,87
13	0	0	-1,682	21	428,60	56,36
14	0	0	1,682	13	618,75	70,25
15	0	0	0	17	298,82	90,02
16	0	0	0	15	294,93	91,19
17	0	0	0	16	296,60	91,36
18	0	0	0	15	297,80	90,16
19	0	0	0	15	295,00	91,25
20	0	0	0	16	294,99	90,19

Como se observa en la Tabla 6.19, el alginato de alta viscosidad tiene un efecto negativo sobre la actividad media relativa. Esto puede deberse al hecho de que el  $\text{Ca}^{2+}$  pueden afectar la actividad de la enzima. Sin embargo, este efecto negativo no se produjo cuando se determinó actividad inicial. El mismo fenómeno fue observado en la estabilidad del biocatalizador. La adición de  $\kappa$ -carragenina produce un efecto negativo sobre la actividad inicial y positivo sobre la actividad media relativa y la estabilidad del biocatalizador, aunque muy leve en estos últimos dos casos. Por otra parte, la concentración de enzima tiene un fuerte efecto positivo sobre la actividad inicial y la actividad media relativa pero no resulta favorable para la estabilidad del biocatalizador.

Tabla 6.19: Coeficientes de la ecuación (6.2) cuando las variables respuestas son actividad inicial, actividad media relativa y períodos utilizados

Coeficiente	Variable dependiente		
	Actividad inicial k = 1	Actividad media relativa k = 2	Períodos utilizados k = 3
$\beta_k$			
$\beta_{k0}$	302,40	90,48	15,76
$\beta_{k2}$	1,03	-5,10	0,86
$\beta_{k3}$	-4,57	0,82	-0,54
$\beta_{k4}$	59,91	8,03	-1,86
$\beta_{k22}$	-111,67	2,46	-0,23
$\beta_{k33}$	-35,72	-6,48	-0,76
$\beta_{k44}$	51,65	-8,72	0,30
$\beta_{k23}$	19,72	1,69	-1,00
$\beta_{k24}$	2,92	1,48	0,50
$\beta_{k34}$	50,10	4,19	0,75
$R^2$	0,849	0,926	0,903

Con los coeficientes presentados en la Tabla 6.19, se desarrollaron las superficies tridimensionales correspondientes a cada variable de respuesta, y que son mostradas en las Figuras 6.16, 6.17 y 6.18. Todas fueron obtenidas para valores constantes de las variables independientes: concentración de alginato de sodio de baja viscosidad de 1,0% y concentración de  $\kappa$ -carragenina de 0,3%.

Como se observa en las Figuras 6.16–6.18, la concentración de alginato de alta viscosidad muestra un efecto importante hasta una concentración alrededor de 1,75% sobre la actividad inicial, el cual indica protección de la enzima, pero como se observa en la actividad media relativa, su participación en el aumento de la resistencia estructural del gel puede resultar en una disminución de la velocidad de reacción. Por otra parte, los efectos negativos iniciales de la  $\kappa$ -carragenina se tornan poco importantes cuando se los compara con la estabilidad que le confiere a la enzima en el biocatalizador. Por último, el efecto de la concentración de enzima no resulta muy claro, pero, puede inferirse que a altas concentraciones de enzima se incrementan las posibilidades de que ésta se desprenda del gel y así disminuya la actividad del biocatalizador a lo largo del tiempo de utilización.

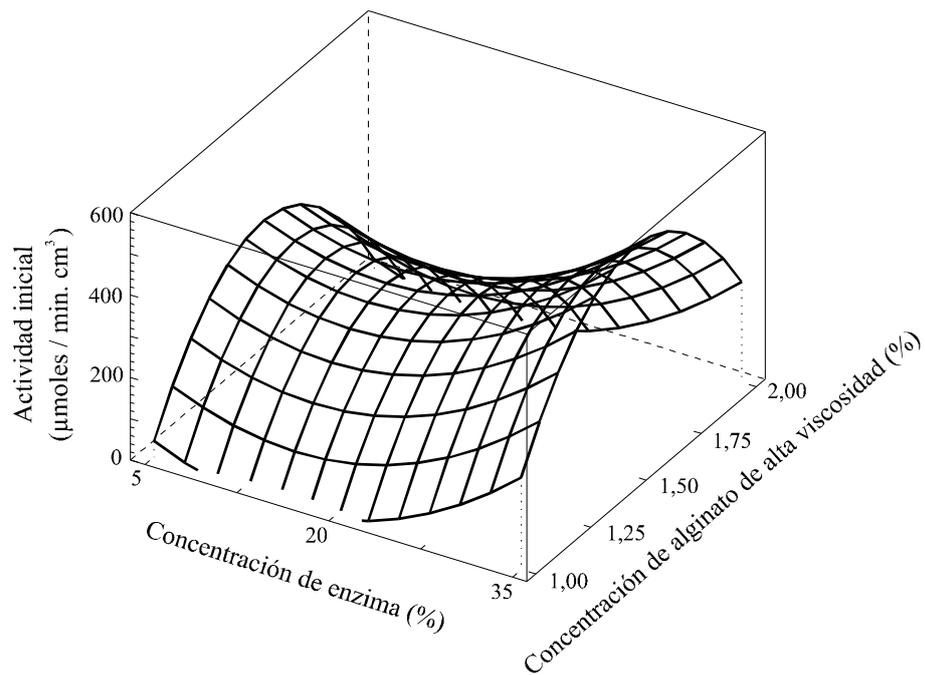


Figura 6.16: Superficie de respuesta para la actividad inicial del biocatalizador considerando valores constantes de alginato de sodio de baja viscosidad (1,0%) y  $\kappa$ -carragenina (0,3%)

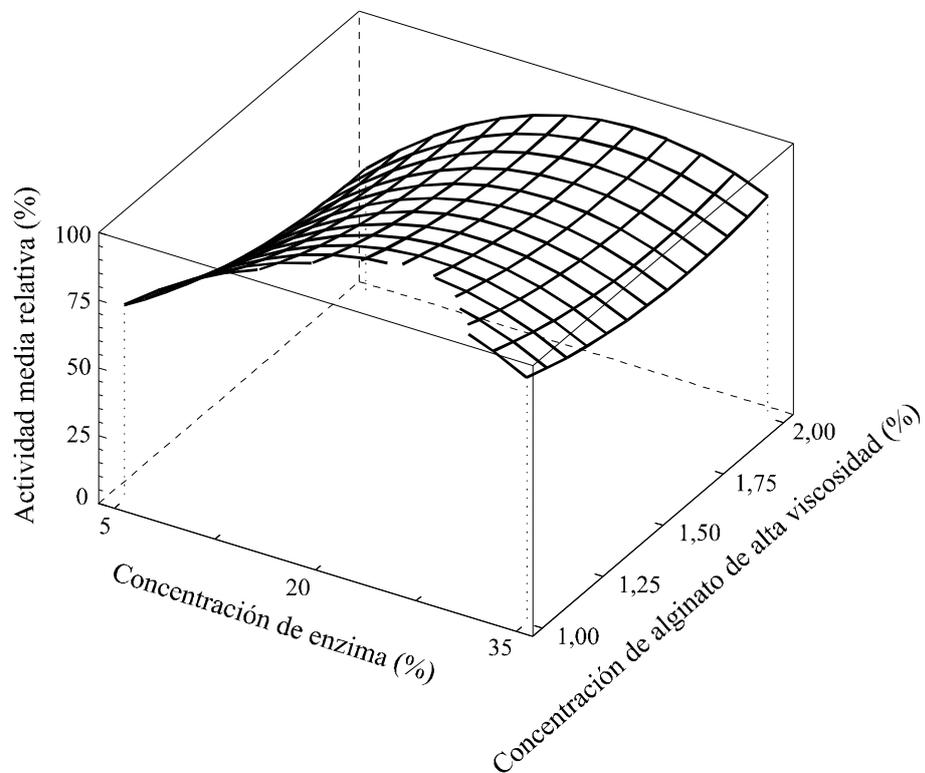
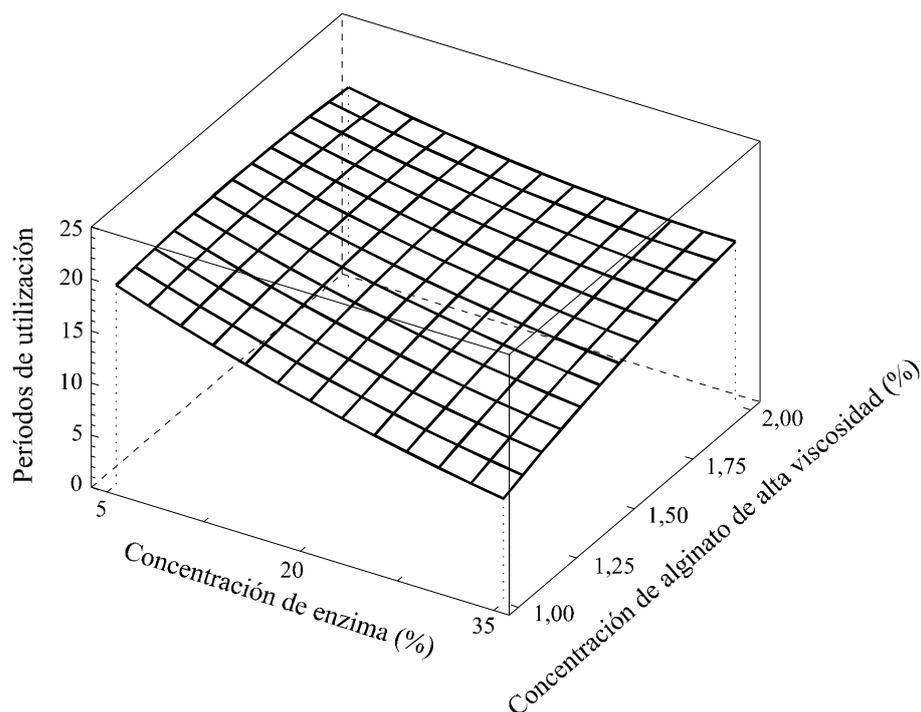


Figura 6.17: Superficie de respuesta para la actividad media relativa del biocatalizador considerando valores constantes de alginato de sodio de baja viscosidad (1,0%) y  $\kappa$ -carragenina (0,3%)



*Figura 6.18: Superficie de respuesta para los períodos de utilización del biocatalizador considerando valores constantes de alginato de sodio de baja viscosidad (1,0%) y  $\kappa$ -carragenina (0,3%)*

Aplicando técnicas gráficas de optimización de multi-respuestas e imponiendo los criterios de que la actividad inicial sea mayor a  $200 \mu\text{moles glucosa} / \text{min cm}^3$  de biocatalizador, que la actividad media relativa porcentual sea mayor al 80% y que el biocatalizador mantenga su estabilidad por más de 17 períodos de utilización; a través de las gráficas de contornos generadas para cada nivel determinado se obtiene una región de condiciones óptimas de procesamiento, en la zona de concentraciones comprendida entre 1,4 y 1,6% para el alginato de alta viscosidad, entre 0,1 y 0,3% para la  $\kappa$ -carragenina, entre 10,0 y 12,0% para la enzima y el valor de 1,0% para el alginato de baja viscosidad, donde es posible producir un biocatalizador con adecuadas propiedades estructurales, con alta actividad y aceptable estabilidad operacional, como se muestra en la Figura 6.19.

De la zona de condiciones óptimas, para la preparación del biocatalizador a utilizar se eligieron las concentraciones de 1,0% (p/v) de alginato de sodio de baja viscosidad, 1,4% (p/v) de alginato de sodio de alta viscosidad, 0,3% (p/v) de  $\kappa$ -carragenina y 12,0%

(v/v) de enzima que permiten la mayor carga de proteína, la mayor incorporación de cationes  $K^+$  y la menor viscosidad de la solución.

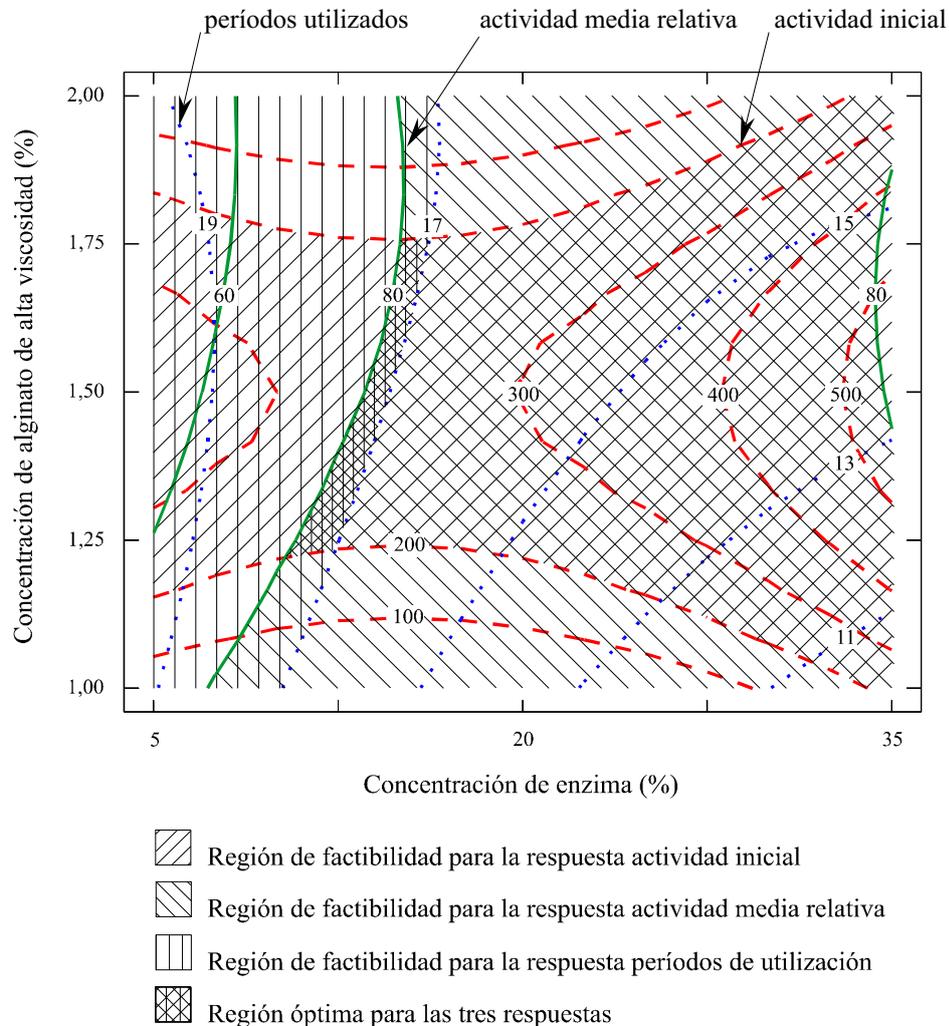


Figura 6.19: Localización de la zona de condiciones óptimas para las características requeridas del biocatalizador considerando las respuestas de actividad inicial, actividad media relativa y períodos de utilización

### 6.3.1. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada

Del estudio de la cantidad de enzima ligada durante el proceso de inmovilización, se determinó que por cada gramo de biocatalizador preparado haciendo gotear una solución de 1,0% (p/v) de alginato de sodio de baja viscosidad, 1,4% (p/v) de alginato

de sodio de alta viscosidad, 0,3% (p/v) de  $\kappa$ -carragenina y 12,0% (v/v) de enzima en un baño gelificante de  $\text{CaCl}_2$  al 2,0% (p/v) y de KCl al 4,0% (p/v) y permaneciendo en el mismo por 1 hora, se retienen 4,55 mg de proteínas.

### 6.3.2. Determinación de la actividad de los biocatalizadores

#### 6.3.2.1. Influencia del pH sobre la actividad de los biocatalizadores

La influencia del pH sobre el biocatalizador elegido se presenta en la Tabla 6.20. La actividad relativa indica la relación entre la actividad específica calculada y la correspondiente al 100% de conversión.

Tabla 6.20: Influencia del pH sobre el biocatalizador elegido

pH	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
5,5	$0,041 \pm 0,001$	$0,35 \pm 0,01$
6,0	$0,088 \pm 0,001$	$0,75 \pm 0,01$
6,5	$0,116 \pm 0,001$	$0,99 \pm 0,01$
7,0	$0,116 \pm 0,001$	$0,99 \pm 0,01$
7,5	$0,105 \pm 0,001$	$0,90 \pm 0,01$
8,0	$0,070 \pm 0,001$	$0,60 \pm 0,01$

En la Figura 6.20 se muestra el comportamiento del biocatalizador elegido con el pH. Como puede observarse, en el rango de pH comprendido entre 6,5 y 7,5 se obtienen los valores más altos de actividad, observándose respecto a la enzima libre un pequeño desplazamiento del pH óptimo hacia valores superiores y un mayor grado de estabilización para el rango estudiado.

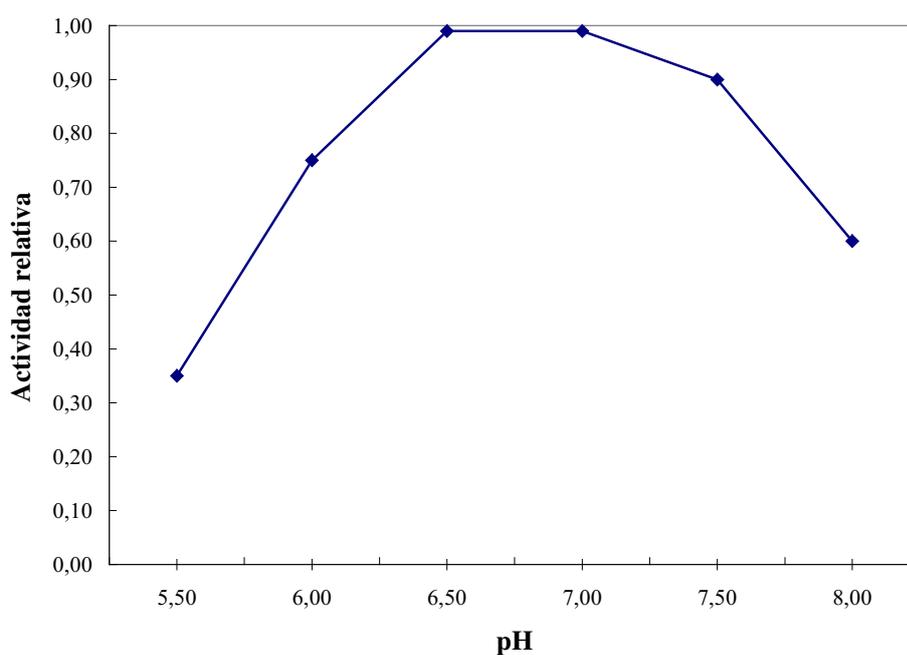


Figura 6.20: Influencia del pH sobre la actividad del biocatalizador elegido

Para mantener uniformidad en los ensayos, se eligió como pH óptimo para el biocatalizador el valor de 7,0.

### 6.3.2.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de los biocatalizadores

La influencia de la temperatura sobre el biocatalizador elegido se presenta en la Tabla 6.21. La actividad relativa indica la relación entre la actividad específica calculada y la correspondiente al 100% de conversión.

Tabla 6.21: Influencia de la temperatura sobre el biocatalizador elegido

Temperatura (°C)	Concentración de glucosa (M)	Actividad relativa
27,0	0,105 ± 0,001	0,90 ± 0,01
32,0	0,115 ± 0,001	0,98 ± 0,01
37,0	0,117 ± 0,001	1,00 ± 0,01
42,0	0,116 ± 0,001	0,99 ± 0,01
47,0	0,103 ± 0,001	0,88 ± 0,01

En la Figura 6.21 se muestra el comportamiento del biocatalizador elegido con la temperatura.

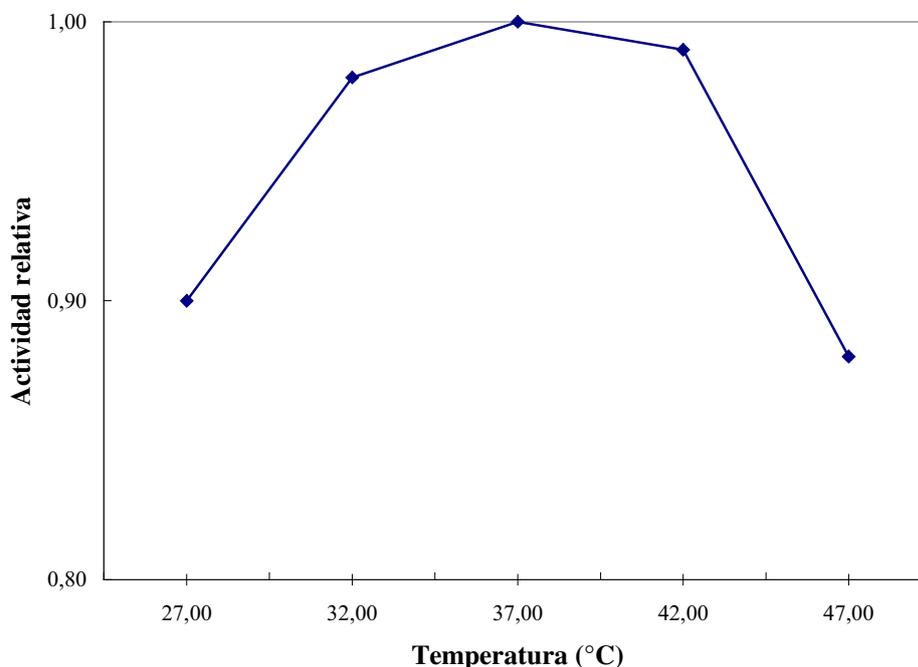


Figura 6.21: Influencia de la temperatura sobre la actividad del biocatalizador elegido

Como puede observarse en la Figura 6.21, en el rango de temperaturas comprendido entre 35,0 y 42,0 °C se obtienen los valores más altos de actividad, observándose respecto a la enzima libre un pequeño desplazamiento de la temperatura óptima hacia valores superiores y un mayor grado de estabilización para el rango de temperaturas más altas.

Para mantener uniformidad en los ensayos, se elige como temperatura óptima para el biocatalizador el valor de 37,0 °C.

### 6.3.3. Determinación de las constantes cinéticas de los biocatalizadores

En las Tablas 6.22 y 6.23 se muestran los valores de conversión obtenidos utilizando 0,40 y 0,60 g del biocatalizador elegido, para concentraciones iniciales de sustrato  $[S^0]$  de 2,5 - 5,0 - 7,5 y 10%.

Como en el caso de la enzima libre, debido a las características de la reacción se aplica el método integral para la obtención de las constantes cinéticas.

Tabla 6.22: Conversiones obtenidas con 0,40 g del biocatalizador elegido considerando diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Tiempo (min)	Concentración inicial de lactosa			
	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0366	0,0312	0,0288	0,0182
4	0,0702	0,0594	0,0486	0,0328
6	0,1038	0,0882	0,0706	0,0458
8	0,1370	0,1174	0,0950	0,0576
10	0,1704	0,1466	0,1196	0,0692
15	0,2366	0,2010	0,1632	0,0950
20	0,3060	0,2522	0,1924	0,1106
25	0,3530	0,2816	0,2250	0,1218
30	0,3864	0,3192	0,2420	0,1322

Tabla 6.23: Conversiones obtenidas con 0,60 g de biocatalizador elegido considerando diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Tiempo (min)	Concentración inicial de lactosa			
	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0495	0,0432	0,0334	0,0236
4	0,0996	0,0861	0,0663	0,0441
6	0,1472	0,1276	0,0971	0,0637
8	0,1924	0,1677	0,1258	0,0824
10	0,2377	0,2077	0,1547	0,1012
15	0,3302	0,2753	0,2076	0,1391
20	0,4179	0,3395	0,2627	0,1615
25	0,4907	0,4001	0,3061	0,1780
30	0,5558	0,4568	0,3385	0,1911

Con los valores de las Tablas 6.22 y 6.23 se obtienen las Figuras 6.22 y 6.23 considerando los distintos valores de  $[E^0]$  y  $[S^0]$  para la obtención de los parámetros A y B de las ecuaciones (4.12 y 4.13).

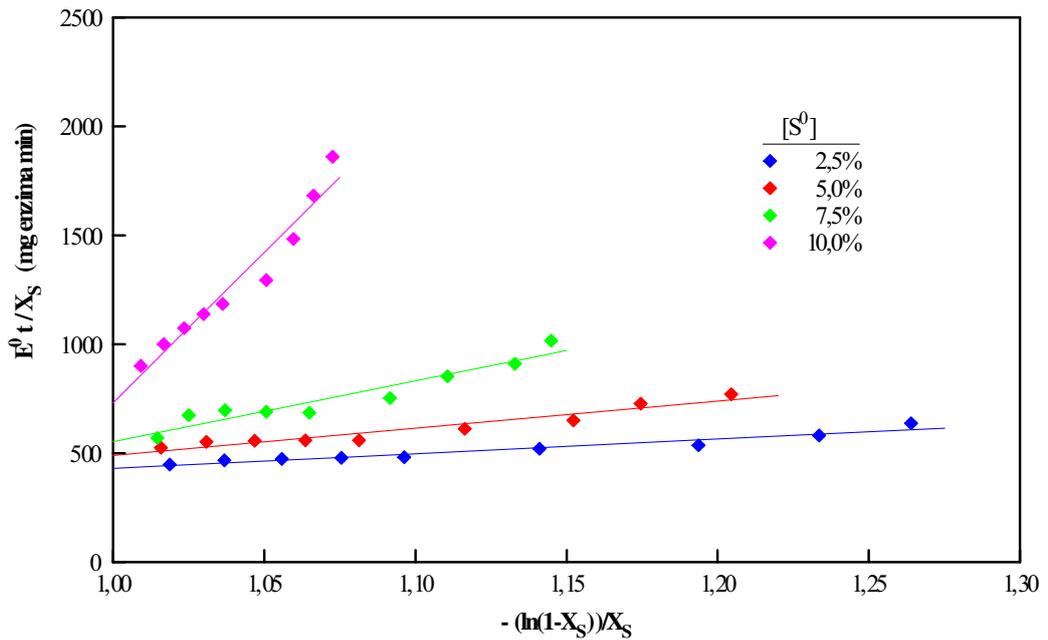


Figura 6.22: Linealización de datos cinéticos obtenidos con 0,40 g de biocatalizador según la ecuación (4.11)

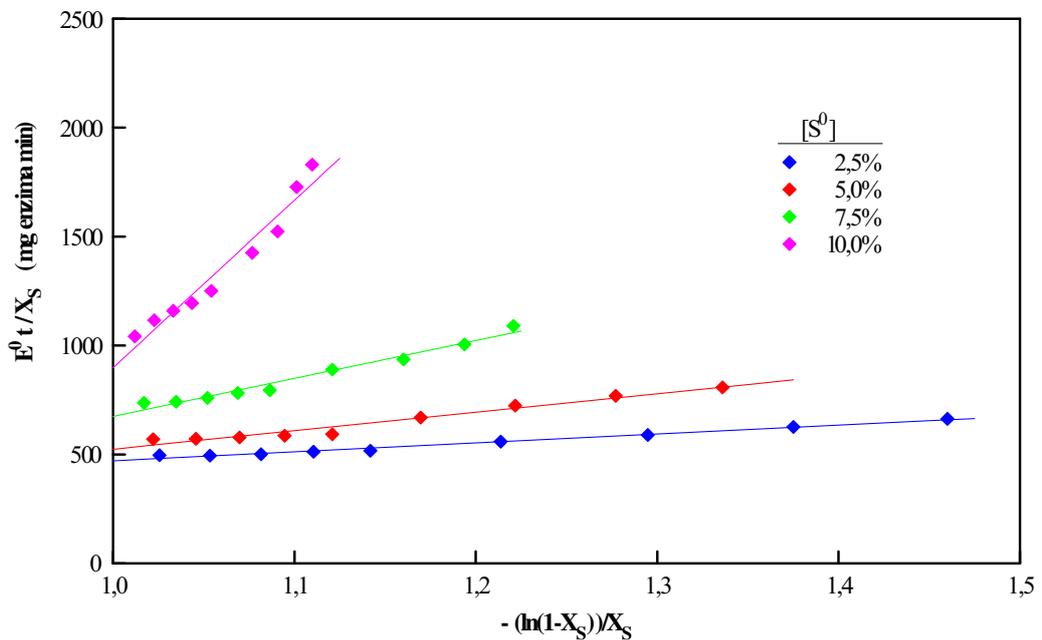


Figura 6.23: Linealización de datos cinéticos obtenidos con 0,60 g de biocatalizador según la ecuación (4.11)

En la Tablas 6.24 y 6.25 se presentan los valores de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de cada una de las linealizaciones realizadas en las Figuras 6.22 y 6.23.

Tabla 6.24: Parámetros A y B de la ecuación cinética de la enzima inmovilizada, obtenidos utilizando 0,40 g de biocatalizador

<b>Concentración inicial de lactosa (%)</b>	<b>B (mg enzima min)</b>	<b>A (mg enzima min)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
2,5	-241,73	672,06	0,9992
5,0	-750,85	1241,31	0,9987
7,5	-2243,12	2795,39	0,9974
10,0	-13066,22	13797,46	0,9970

Tabla 6.25: Parámetros A y B de la ecuación cinética de la enzima inmovilizada, obtenidos utilizando 0,60 g de biocatalizador

<b>Concentración inicial de lactosa (%)</b>	<b>B (mg enzima min)</b>	<b>A (mg enzima min)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
2,5	62,15	409,17	0,9998
5,0	-323,80	848,02	0,9993
7,5	-1066,24	1741,10	0,9995
10,0	-7172,07	8044,90	0,9951

Realizando para cada  $[E^0]$ , una regresión lineal de los valores de ordenada al origen y pendiente en función de las distintas  $[S^0]$  (Figuras 6.24 y 6.25), se obtienen los valores de  $a_1$ ,  $b_1$  y  $a_2$  de las ecuaciones (4.12) y (4.13). Como se observa en dichas figuras, al igual que en el caso de la enzima libre, existe una importante dispersión de los valores obtenidos en las regresiones debida a errores experimentales asociados a la escasa extensión de los períodos de tiempo utilizados en las mediciones (Horton y otros, 1995; Shang-Tian y Okos, 1989).

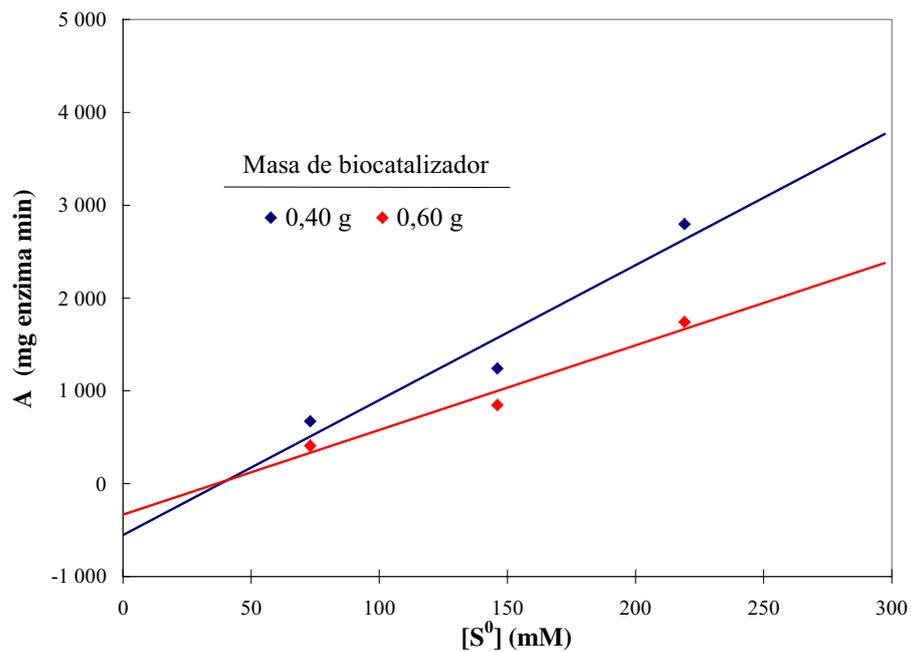


Figura 6.24: Linealización de los datos de pendiente obtenidos para las diferentes cantidades de biocatalizador utilizado según la ecuación (4.12)

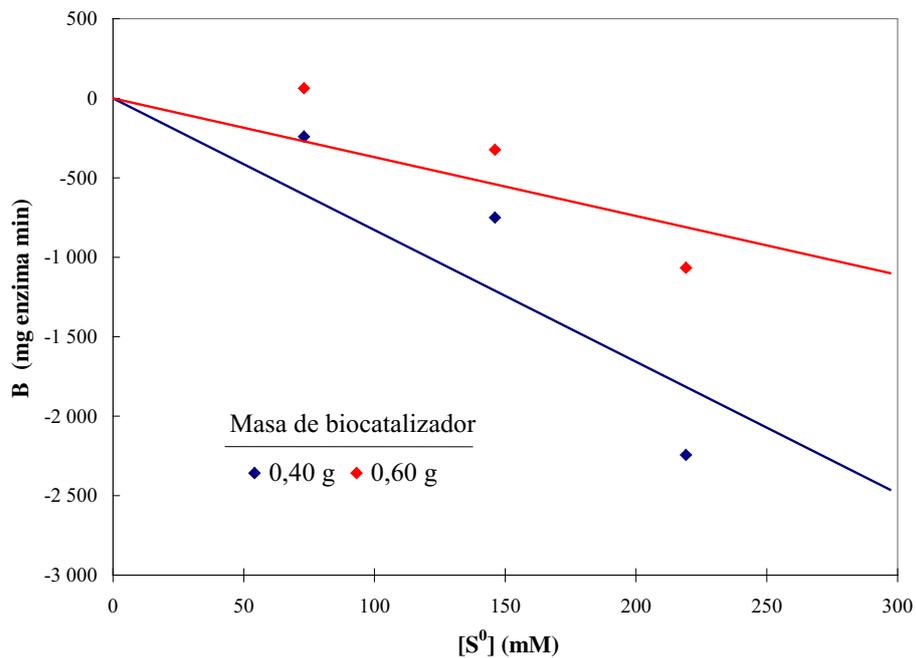


Figura 6.25: Linealización de los datos de ordenada al origen obtenidos para las diferentes cantidades de biocatalizador utilizado según la ecuación (4.13)

En la Tablas 6.26 y 6.27 se presentan los valores de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de cada una de las linealizaciones realizadas en las Figuras 6.24 y 6.25 para la obtención de los valores de  $a_1$ ,  $b_1$  y  $a_2$  de las ecuaciones cinéticas.

Tabla 6.26: Parámetros  $a_1$  y  $b_1$  de la ecuación cinética de la enzima inmovilizada, obtenidos para las cantidades de biocatalizador utilizado

Masa de biocatalizador (g)	$b_1$	$a_1$ (mg enzima min Lt mmoles <sup>-1</sup> )	$R^2$
0,40	-553,6	14,53	0,9331
0,60	-332,4	9,12	0,9626

Tabla 6.27: Parámetro  $a_2$  de la ecuación cinética de la enzima inmovilizada, obtenido para las cantidades de biocatalizador utilizado

Masa de biocatalizador (g)	$a_2$ (mg enzima min Lt mmoles <sup>-1</sup> )	$R^2$
0,40	-8,29	0,7569
0,60	-3,70	0,6674

Reemplazando los valores promedios de los parámetros obtenidos a través de las regresiones lineales presentadas en las Figuras 6.24 y 6.25, en las ecuaciones (4.14) a (4.16) se obtuvieron los siguientes valores de las constantes cinéticas:  $K'm = 75 \pm 1$  mmoles Lt<sup>-1</sup>;  $k'_2 = 0,17 \pm 0,01$  mmoles Lt<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>;  $k'_i = 37 \pm 1$  mmoles Lt<sup>-1</sup>. Al mismo tiempo, con los valores obtenidos se verificó en forma gráfica la ausencia de los efectos difusivos en la determinación de los parámetros cinéticos, pudiéndose asegurar su no incidencia.

#### 6.3.4. Determinación de la pérdida de enzima de los biocatalizadores

La pérdida de proteína en el biocatalizador en condiciones de reacción, se presenta en la Tabla 6.28. La actividad relativa indica la relación entre la actividad específica calculada y la correspondiente al 100% de conversión.

Como se observa en la Tabla 6.28, la pérdida de enzima durante la utilización del biocatalizador no es un factor muy importante, determinándose que luego de 18 corridas se pierde el 6,34 % de la proteína inmovilizada inicialmente.

Calculando la actividad remanente que debería mantener el biocatalizador luego de computarle la pérdida de proteína y comparándola con el valor experimental, puede analizarse la influencia de este factor en la desactivación (Figura 6.26).

Tabla 6.28: Pérdidas de proteínas en el biocatalizador en condiciones de reacción

Corrida n°	Proteína perdida (mg/ g biocatalizador)	Actividad relativa
1	0,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
2	0,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
3	0,00 ± 0,01	0,99 ± 0,01
4	0,00 ± 0,01	0,98 ± 0,01
5	0,00 ± 0,01	0,97 ± 0,01
6	0,00 ± 0,01	0,96 ± 0,01
7	0,05 ± 0,01	0,96 ± 0,01
8	0,05 ± 0,01	0,95 ± 0,01
9	0,10 ± 0,01	0,94 ± 0,01
10	0,10 ± 0,01	0,93 ± 0,01
11	0,10 ± 0,01	0,92 ± 0,01
12	0,10 ± 0,01	0,91 ± 0,01
13	0,10 ± 0,01	0,90 ± 0,01
14	0,10 ± 0,01	0,89 ± 0,01
15	0,10 ± 0,01	0,88 ± 0,01
16	0,15 ± 0,01	0,87 ± 0,01
17	0,15 ± 0,01	0,85 ± 0,01
18	0,20 ± 0,01	0,83 ± 0,01

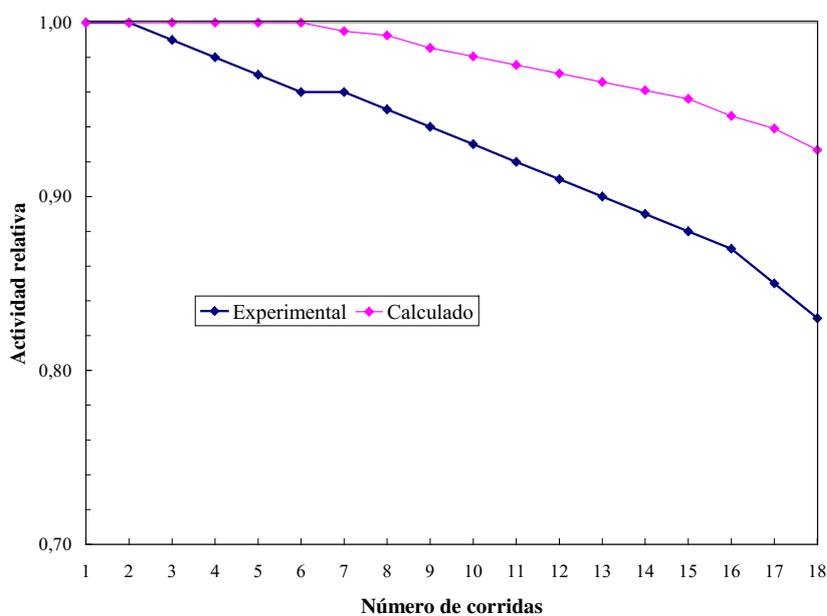


Figura 6.26: Influencia de la pérdida de enzima en la desactivación del biocatalizador

Como se observa en la Figura 6.26, la pérdida de proteínas no es el principal factor de la pérdida de actividad del biocatalizador. A lo largo de 18 ensayos, este factor

contribuye a la pérdida de actividad con un 37,3% debiéndose por tanto el resto a factores inherentes a las condiciones de reacción (tiempo-temperatura-medio de reacción). Por tal motivo, resulta conveniente el planteo de una constante de desactivación global que luego pueda ser equiparada a una disminución de la concentración de enzima inmovilizada inicialmente.

### 6.3.5. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores

Con los valores de los coeficientes obtenidos de los ensayos de comportamiento de los biocatalizadores al inicio del funcionamiento del reactor batch, donde el efecto de inhibición por producto puede despreciarse, se puede estimar mediante la ecuación (4.22) la constante de pérdida de actividad de los mismos de acuerdo a su composición. Para el biocatalizador elegido, se obtiene para  $k_t$  un valor de  $0,0659 \text{ h}^{-1}$  que se adopta, tal como se indicara en la obtención de la ecuación (4.22), como la constante de desactivación del biocatalizador.

Asimismo, en la Tabla 6.29 se presentan la variación temporal de los valores promedios de conversión, obtenidos en los ensayos realizados en el reactor tubular para la verificación de las estimaciones realizadas a través de los análisis anteriores.

Tabla 6.29: Valores promedios de conversión en función del tiempo de operación

Tiempo (h)	$X_s$	Tiempo (h)	$X_s$
1	$0,98 \pm 0,01$	13	$0,84 \pm 0,01$
2	$0,98 \pm 0,01$	14	$0,83 \pm 0,01$
3	$0,97 \pm 0,01$	15	$0,81 \pm 0,01$
4	$0,95 \pm 0,02$	16	$0,80 \pm 0,02$
5	$0,94 \pm 0,00$	17	$0,79 \pm 0,01$
6	$0,92 \pm 0,01$	18	$0,78 \pm 0,01$
7	$0,91 \pm 0,00$	19	$0,78 \pm 0,00$
8	$0,89 \pm 0,00$	20	$0,76 \pm 0,00$
9	$0,88 \pm 0,01$	21	$0,75 \pm 0,00$
10	$0,87 \pm 0,02$	22	$0,75 \pm 0,00$
11	$0,86 \pm 0,01$	23	$0,74 \pm 0,01$
12	$0,85 \pm 0,01$	24	$0,74 \pm 0,00$

Introduciendo la expresión de la cinética de reacción en la ecuación de diseño de un reactor flujo pistón e integrando, se puede obtener una ecuación sencilla que permite relacionar la conversión obtenida en el reactor con la cantidad de enzima inmovilizada que permanece activa en el tiempo de trabajo, de acuerdo a la ecuación (6.3).

$$[S^0] X_S \left( 1 - \frac{K'_m}{k'_i} \right) - K'_m \ln(1 - X_S) \left( 1 + \frac{[S^0]}{k'_i} \right) = k_2 [E_{in}^t] \tau \quad (6.3)$$

donde  $\tau$  es el tiempo de residencia en el reactor y  $X_S$  es la conversión de sustrato obtenida en el reactor. En este caso, no puede relacionarse directamente con la actividad de la enzima debido a que  $\tau$ , que es representativo de la inhibición por producto, no es insignificante.

Aplicando la ecuación (6.3) para los distintos tiempos de trabajo del reactor y realizando una regresión lineal de los valores experimentales de  $[\ln E_{in}^t/E_{in}^0]$  vs.  $[t]$  según la ecuación (4.20), se obtiene un valor de  $0,0536 \text{ h}^{-1}$  para  $k_d$ , con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9428$ .

Comparando los valores obtenidos para la constante de desactivación, se observa una diferencia de alrededor del 20 % en la obtenida en el reactor batch a través del análisis por superficie de respuesta, que puede asignarse a la mayor pérdida de actividad del biocatalizador en este reactor debido no solo a la disminución de efectividad de la enzima, sino también a la pérdida de proteína ocasionada por la mayor agitación. Esta verificación experimental no es sencilla de realizar, pero resulta importante para analizar que en condiciones menos rigurosas, la desactivación disminuye.

### 6.3.6. Determinación del coeficiente de dispersión axial del reactor

Del análisis de la cantidad de glucosa utilizada como trazador, registrada en la salida del reactor operando a un caudal de 250 ml/h, con una carga de catalizador de 38,94 g y empacado con una porosidad de lecho ( $\epsilon$ ) de 0,375; mediante el método de los momentos se determinó que para esas condiciones el coeficiente efectivo de dispersión axial  $E_{z_{ef}}$  presenta un valor de  $0,0426 \text{ cm}^2/\text{s}$ .

Este valor de coeficiente fue obtenido para las condiciones iniciales de funcionamiento del reactor, pudiéndose luego realizar una corrección por el efecto de hinchamiento de las partículas de biocatalizador utilizando para ello la ecuación (4.69).

#### 6.4. Determinación de los coeficientes de difusión

Los coeficientes de difusión de lactosa, glucosa y galactosa en geles de distintas composiciones, teniendo en cuenta la presencia simultánea de todas las especies reactivas, se presentan en la Tabla 6.30.

Tabla 6.30: Coeficientes de difusión de lactosa, glucosa y galactosa en geles de diferentes composiciones, determinados por el método de la celda de difusión

Composición del gel			Coeficiente de Difusión (cm <sup>2</sup> /s)		
[Alg. H.V.] (% p/v)	[Alg. L.V.] (% p/v)	[Carrag.] (% p/v)	Lactosa	Glucosa	Galactosa
1,40	1,00	0,30	—	4,09×10 <sup>-6</sup>	—
1,40	1,00	—	—	4,76×10 <sup>-6</sup>	—
—	2,40	—	—	4,11×10 <sup>-6</sup>	—
—	2,40	—	—	4,79×10 <sup>-6</sup>	—
2,40	—	—	—	4,09×10 <sup>-6</sup>	—
2,40	—	—	—	4,72×10 <sup>-6</sup>	—
1,40	1,00	0,30	4,12×10 <sup>-6</sup>	—	—
1,40	1,00	—	4,58×10 <sup>-6</sup>	—	—
—	2,40	—	4,13×10 <sup>-6</sup>	—	—
—	2,40	—	4,60×10 <sup>-6</sup>	—	—
2,40	—	—	4,12×10 <sup>-6</sup>	—	—
2,40	—	—	4,60×10 <sup>-6</sup>	—	—
1,40	1,00	0,30	—	—	4,08×10 <sup>-6</sup>
1,40	1,00	—	—	—	4,78×10 <sup>-6</sup>
—	2,40	—	—	—	4,12×10 <sup>-6</sup>
—	2,40	—	—	—	4,79×10 <sup>-6</sup>
2,40	—	—	—	—	4,09×10 <sup>-6</sup>
2,40	—	—	—	—	4,74×10 <sup>-6</sup>

Si bien la presencia de las otras especies reactivas afecta a la difusión en forma proporcional a la concentración en que se encuentran, en lugar de proponer una ecuación que represente esta variación en el rango de concentraciones empleadas, para el cálculo de las condiciones en el reactor se adopta directamente el promedio de los coeficientes de difusión obtenidos en las condiciones extremas. Así, para la glucosa y la galactosa se determinó un coeficiente de difusión promedio de  $4,43 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  y de  $4,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  para la lactosa.

Debido a que en la determinación de los coeficientes de difusión el método no pudo tener en cuenta el efecto de hinchamiento (swelling) de los geles (Nguyen y Luong, 1986; Hendrickx y otros, 1987), se realizó una corrección por este efecto mediante el empleo de la metodología propuesta por Axelsson y otros (1994).

### 6.5. Estudio del comportamiento de los biocatalizadores en el reactor

En la Tabla 6.31 se presentan los valores de conversión obtenidos operando el reactor en estado estacionario, con una carga de catalizador de 38,94 g y empacado con una porosidad de lecho ( $\epsilon$ ) de 0,375, bajo diferentes condiciones de flujo y concentraciones iniciales de sustrato durante la primer hora de funcionamiento.

Tabla 6.31: Valores de conversión obtenidos en el reactor experimental a la primer hora de funcionamiento para distintos caudales y concentraciones iniciales de sustrato

Caudal (ml/h)	Concentración inicial de lactosa			
	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
100	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
150	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01
200	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,01
250	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,96 ± 0,02
300	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,94 ± 0,01
350	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,92 ± 0,02
400	0,95 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,92 ± 0,02	0,90 ± 0,01
450	0,94 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,88 ± 0,01
500	0,92 ± 0,02	0,90 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,86 ± 0,01

[L = 34 cm, a = 1,70 cm<sup>2</sup>, p<sup>cat</sup> = 38,94 g,  $\epsilon$  = 0,375]

Con los valores obtenidos para los parámetros cinéticos, la composición de los biocatalizadores y las características del reactor y del relleno se utilizó un programa de computación desarrollado en lenguaje Matlab® que resuelve el modelo planteado. Este programa, que se presenta en el Anexo 1, permite calcular los valores de conversión que se obtendrían en el reactor en función al caudal de alimentación y el tiempo de funcionamiento, para distintos valores de concentración inicial de sustrato. A su vez, se han incorporado en el mismo, los efectos del hinchamiento y de la desactivación de los biocatalizadores en el funcionamiento del reactor.

Los valores de conversión obtenidos experimentalmente y los teóricos para el reactor especificado previamente se muestran en la Figura 6.27.

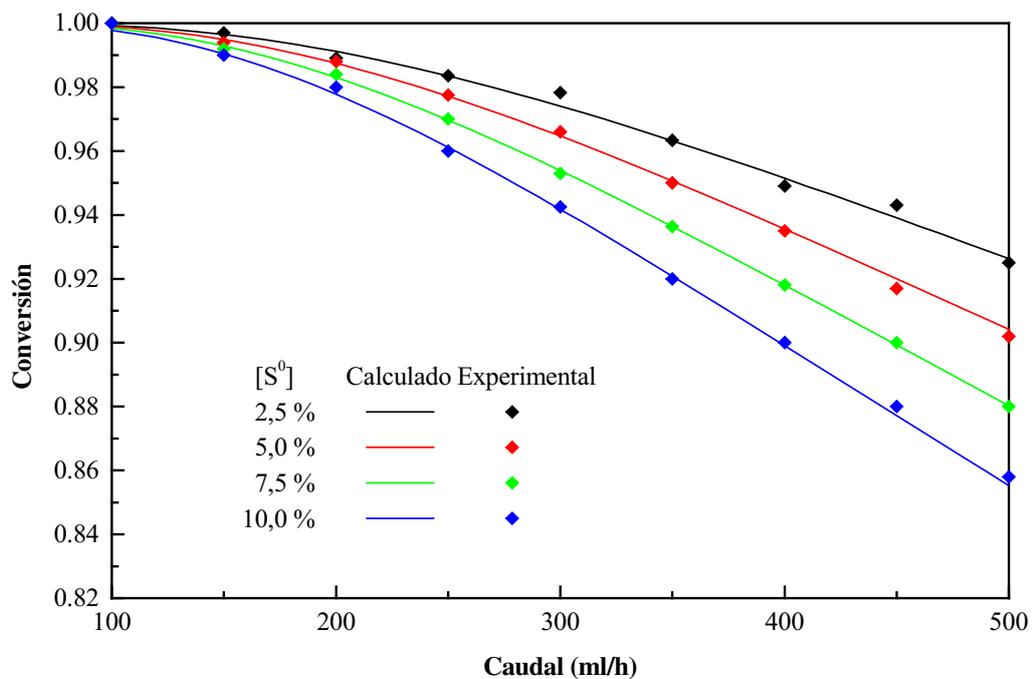


Figura 6.27: Valores de conversión experimentales y calculados por el modelo para el reactor cargado con biocatalizador fresco

Como puede observarse en la Figura 6.27, en el rango de caudales analizado, el modelo propuesto predice ajustadamente el comportamiento experimental en las primeras horas de funcionamiento con un error menor al 5%.

A medida que aumenta el tiempo de funcionamiento del reactor, comienzan a cobrar importancia dos efectos: el hinchamiento de las partículas y la desactivación del biocatalizador.

El efecto del hinchamiento (swelling) de las partículas sobre la performance del reactor, interviene en forma diferente según el factor analizado. A medida que se incrementa el tamaño de las partículas, por un lado aumenta el coeficiente de difusión, pero por otro lado, se pierde mayor cantidad de enzima y disminuye el volumen libre del reactor.

En la Figura 6.28, se muestra la predicción del funcionamiento temporal del reactor realizada con el programa. Como puede observarse en dicha figura, la influencia positiva del efecto de hinchamiento sobre la difusión no alcanza a equilibrar la influencia negativa que ocasiona sobre los parámetros de flujo, sumada al efecto propio de la desactivación, y la conversión que se obtiene para distintos caudales de alimentación decae con el tiempo de funcionamiento del reactor.

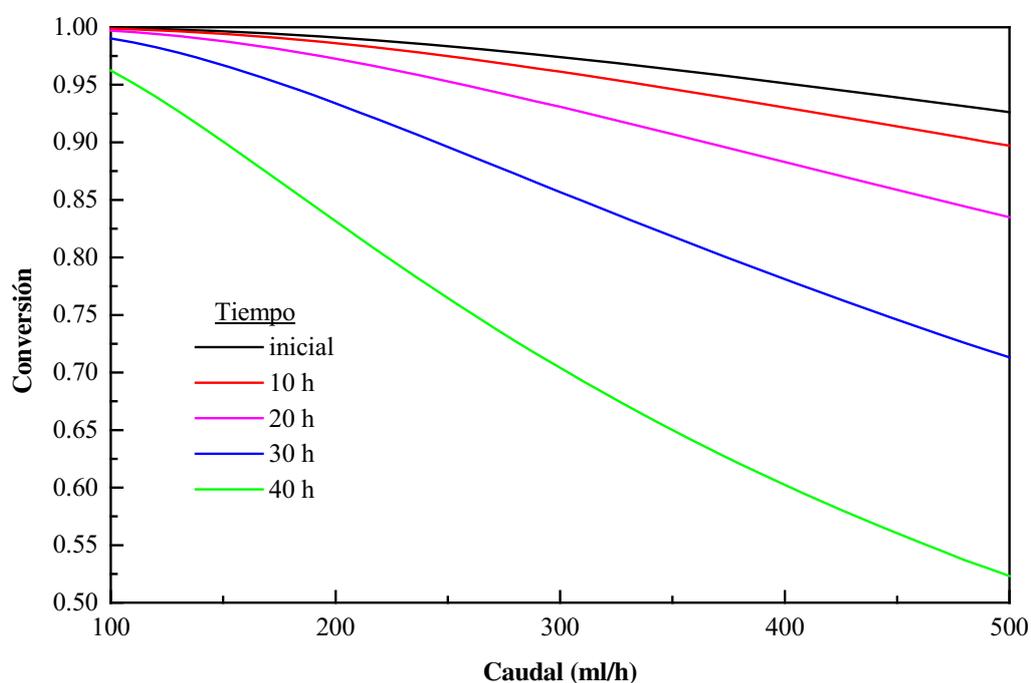


Figura 6.28: Valores de conversión calculados por el modelo para distintos tiempos de funcionamiento cuando se lo alimenta con una concentración de sustrato de 2,5%.

La influencia propia del efecto de desactivación puede observarse en la Figura 6.29 en la que se muestra el funcionamiento del reactor predicho por el programa cuando se utiliza la metodología empleada para la estimación de la constante de desactivación o se reemplaza a ésta directamente por el valor hallado experimentalmente directamente en el mismo reactor a una condición de flujo establecida.

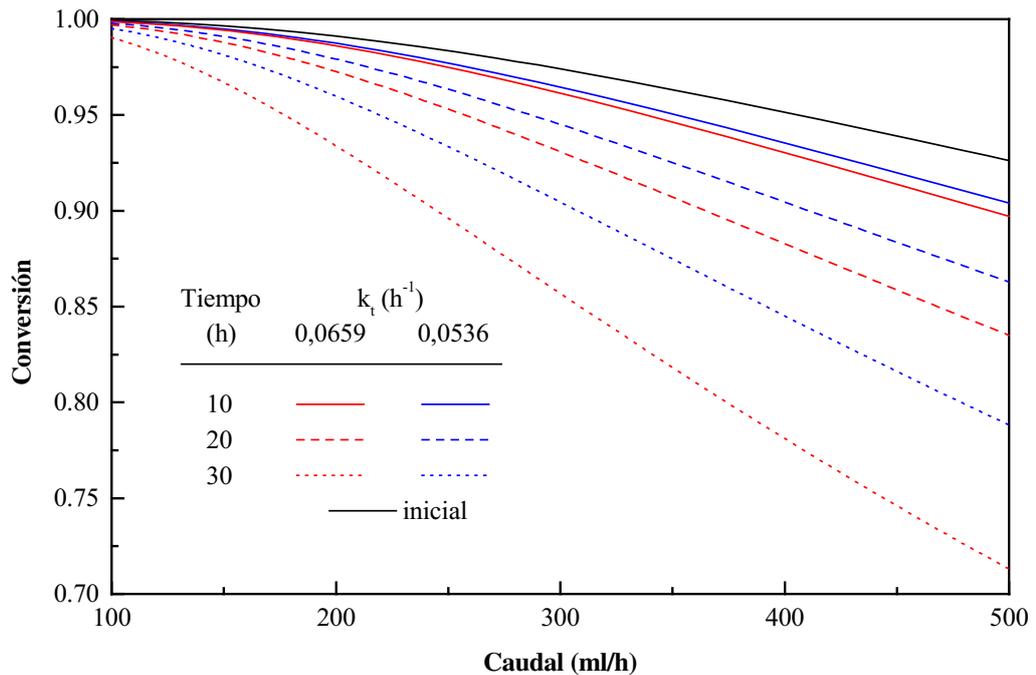


Figura 6.29: Valores de conversión calculados por el modelo para distintos efectos de desactivación cuando se lo alimenta con una concentración de sustrato de 2,5%.

Comparando el funcionamiento del reactor en cada caso, puede observarse que el efecto por la desactivación del biocatalizador es más importante que el efecto por la pérdida de enzima debida al hinchamiento, aunque este último sea también responsable de la pérdida de actividad y no pueda desacoplarse a priori para realizar un análisis individual.

Al mismo tiempo, analizando a través del programa el comportamiento del biorreactor para distintos caudales y tiempos de operación, pueden predecirse las condiciones de operación que deberían utilizarse para conseguir que la conversión deseada se mantenga constante. En la Figura 6.30 se muestran los caudales a los que debería operarse el biorreactor a través del tiempo de trabajo, para lograr mantener

constante los valores de conversión de 0,99; 0,97; 0,95 y/o 0,93 cuando se alimenta con una solución de lactosa al 2,5 % (p/v).

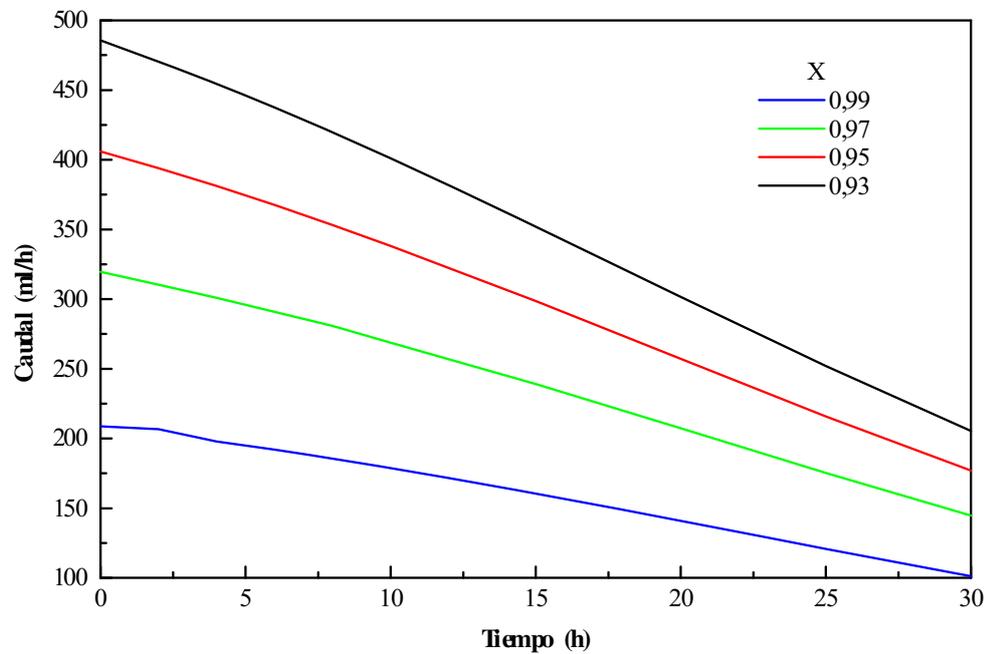


Figura 6.30: Variación del caudal con el tiempo de operación del biorreactor para mantener valores de conversión constantes cuando se lo alimenta con una concentración de sustrato de 2,5%.

El estudio del comportamiento de un sistema de reacción apropiado para la inmovilización de  $\beta$ -Galactosidasa para hidrólisis de lactosa, utilizando preparaciones comerciales de la enzima y considerando la inmovilización por entrapamiento en geles de hidrocoloides, permite indicar las siguientes conclusiones correspondientes a las distintas etapas que se desarrollaron.

### **7.1. Respecto a la enzima libre**

Las preparaciones comerciales más utilizadas por las industrias lácteas de la zona: Maxilact LX 5000 (Gist-Brocades, DSM Group, Holanda) de extracto de *Kluyveromyces lactis* y Lactozym 3000 L (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) de extracto de *Kluyveromyces fragilis*, en base a su comportamiento mostraron que el buffer hidróxido de sodio – fosfato monosódico 0,05 M de pH 6,9 con el agregado de cationes  $K^+$  mostró ser el medio más favorable para realizar ensayos de actividad enzimática, debiéndose adicionar cationes  $Mg^{2+}$  cuando se desea almacenar la enzima para una posterior utilización. Asimismo, la temperatura de 37,0 °C resultó un valor óptimo para trabajar con ambas enzimas.

Si bien ambas enzimas mostraron un buen comportamiento en las condiciones ensayadas, la enzima Lactozym 3000 L mostró mayores valores de actividad y una mejor estabilidad. Por este mejor comportamiento, sumado a su mayor peso y tamaño molecular, se seleccionó esta enzima para la obtención de los biocatalizadores.

### **7.2. Respecto a la producción del soporte para la inmovilización**

El mecanismo de gelificación de distintas mezclas de alginato de sodio y  $\kappa$ -carragenina por difusión del catión permite determinar el tiempo de formación según la composición de la mezcla que gelifica, la concentración de calcio incorporado y la posición del frente de reacción, como los puntos óptimos para conseguir la estructura más resistente con mayor rendimiento en el proceso de hidrólisis.

El alginato de calcio y la  $\kappa$ -carragenina poseen una etapa rápida de gelificación que resulta favorable para su utilización en el entrapamiento de moléculas no pequeñas como las enzimas.

El comportamiento de los distintos geles a la compresión mostró que el gel alcanza un contenido máximo de cationes y luego éstos se incorporan en forma inestable, sin aumento de rigidez del gel.

El  $\text{Ca}^{2+}$  incorporado en el reordenamiento estructural de la matriz de alginato, otorga rigidez. El agregado de otros polisacáridos a los geles de alginato produce la fractura por compresión a tensiones más bajas. A igualdad de concentración de cationes en el hidrocóide, los geles formados solamente con alginato de sodio resultaron más elásticos que los adicionados de  $\kappa$ -carragenina.

La  $\kappa$ -carragenina, de efecto activador para las enzimas por los iones  $\text{K}^+$  que incorpora, afecta el reordenamiento y disminuye la estabilidad, por lo que solo puede ser utilizada a muy bajas concentraciones (menores al 0,4%).

### **7.3. Respecto a los biocatalizadores**

El mejor comportamiento en función a las propiedades estructurales, actividad y estabilidad operacional de los distintos biocatalizadores obtenidos determinó, utilizando un método de superficie de respuesta, la variación de las concentraciones de los distintos hidrocóides y de la enzima. Se seleccionaron dentro del rango obtenido, los valores óptimos para la preparación de los biocatalizadores (1,0% de alginato de sodio de baja viscosidad; 1,4% de alginato de sodio de alta viscosidad; 0,3% de  $\kappa$ -carragenina y 12,0% de enzima).

El biocatalizador obtenido en estas condiciones retiene 4,55 mg de proteínas por cada gramo preparado y presenta una actividad inicial de  $230 \mu\text{moles} / \text{min cm}^3$ . Este biocatalizador presenta un pequeño desplazamiento hacia valores superiores de los valores óptimos de la enzima libre, tanto de pH como de la temperatura, y un mayor grado de estabilización para todo el rango ensayado.

Si bien, las mayores pérdidas de actividad se producen inicialmente por el lavado, la actividad específica del biocatalizador decrece con el tiempo de utilización siendo una fracción menor al 30% debida a la difusión al producirse el hinchamiento (swelling) de la carragenina en las condiciones de reacción.

Los valores de las constantes cinéticas obtenidos para el biocatalizador difieren de los de la enzima libre debido a la influencia del proceso de inmovilización sobre la estructura, conformación y actividad de la enzima y a la heterogeneidad del sistema.

Los valores obtenidos para los distintos parámetros se correspondieron convenientemente con los datos experimentales a las distintas concentraciones de sustrato y diferentes períodos de tiempo empleados.

#### **7.4. Respecto al sistema de reacción**

El modelo matemático del comportamiento del biocatalizador seleccionado en un reactor tubular de lecho fijo isotérmico con dispersión axial permitió calcular la variación temporal de la conversión de lactosa en función de la velocidad superficial a partir de una concentración inicial, a caudal constante y considerando la disminución de actividad de la enzima inmovilizada.

El modelo del sistema de reacción desarrollado consideró todas las variables que se determinaron experimentalmente y permitió predecir el comportamiento real del biorreactor con un error menor al 5%, cuando con otros modelos y otras cinéticas se obtuvieron errores del 50%.

La metodología empleada en este estudio puede ser extendida al estudio de la hidrólisis de la lactosa en suero de quesería y/o leche, debiéndose analizar en tales casos, la influencia de todos los componentes presentes en estos sistemas biológicos.

**AI.1. Programa fuente para el cálculo de conversiones en el reactor**

```
clear
echo on
```

## % DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA

```
% Programa para el cálculo de los valores de conversión para un reactor tubular de
% lecho fijo con difusión axial y cinética de Michaelis-Menten con inhibición
% competitiva por producto, aplicando el método de colocación ortogonal con 6 puntos
% interiores y considerando el efecto swelling y la desactivación del biocatalizador.
% Autor: Enrique Mammarella
% Versión: Marzo 2001
```

## % MÓDULO DE INTRODUCCIÓN DE LOS DATOS

```
% Concentración inicial de sustrato;
```

```
lac = 10; % (%m/v);
So = lac*10/342.3; % (Moles/litro);
```

```
% Parámetros del reactor
```

```
L = 34; % Longitud del reactor; % (cm);
Volr = 57.70; % Volumen total del reactor; % (cm^3);
volc = 36.06; % Volumen inicial de catalizador en el reactor; % (cm^3);
ar = 1.70; % Sección del reactor; % (cm^2);
dc = 0.24; % Diámetro inicial del catalizador; % (cm);
peso = 38.94; % Carga de catalizador; % (gramos);
prot = 4.55; % Retención del catalizador; % (mg proteína/gramo catalizador);
tita = 0; % Tiempo de funcionamiento del reactor; % (h);
```

```
% Composición del biocatalizador;
```

```
LV = 1.00; % Concentración de alginato de sodio de baja viscosidad; % (% p/v);
HV = 1.40; % Concentración de alginato de sodio de alta viscosidad; % (% p/v);
Car = 0.30; % Concentración de alginato de sodio de kappa-carragenina; % (% p/v);
Enz = 12.00; % Concentración de enzima; % (% v/v);
```

```
% Constantes cinéticas;
```

```
k2 = 1.7e-4; % (Moles/litro mg proteína minuto);
Km = 0.075; % (Moles/litro);
Ki = 0.037; % (Moles/litro);
kd = 0.0659; % (h-1);
```

```
% Coeficiente efectivo de difusión de sustrato en las condiciones iniciales;
```

```
Ds = 4.35e-6; % (cm^2/s);
```

```
% Caudales (ml/h);
```

```
QA = [100; 110; 120; 130; 140; 150; 160; 170; 180; 190;
200; 210; 220; 230; 240; 250; 260; 270; 280; 290;
300; 310; 320; 330; 340; 350; 360; 370; 380; 390;
400; 410; 420; 430; 440; 450; 460; 470; 480; 490;
500];
```

```
% Número de ciclos de cálculos por velocidades;
```

```
uv = 41;
```

---

```

% Coeficientes del polinomio del efecto swelling;
SW = [0.0017; -0.0026; -0.0050; -0.0027; -0.0035; 0.0004; -0.0016; 0.0003; -0.0024;
      -0.0022];

% Vector posición;
X = [0; 0.03376; 0.16939; 0.38069; 0.61930; 0.83060; 0.96623; 1];

% INICIALIZACIÓN DEL MÉTODO DE COLOCACIÓN ORTOGONAL
% Orden de la matriz;
n = 8;
for v = 1:n;
    for w = 1:n;
        Q(w,v) = X(w)^(v-1);
    end
end
for v = 1:n;
    for w = 1:n;
        C(w,v) = (v-1)*X(w)^(v-2);
    end
end
C(1,1) = 0;
for v = 1:n;
    for w = 1:n;
        D(w,v) = (v-1)*(v-2)*X(w)^(v-3);
    end
end
D(1,1) = 0; D(1,2) = 0;

% Cálculo de las matrices A y B
A = C*inv(Q);
A1 = C*inv(Q);
B = D*inv(Q);
B1 = D*inv(Q);

control = 1
while control > 1e-5

% MÓDULO DE CÁLCULO DE VARIABLES
for ui = 1:uv;

% Estimación de la cantidad partículas;
np = volc*3/4/pi*(2/dc)^3;

% Codificación de los componentes del catalizador para el efecto swelling;
LV1 = 3.364*(LV-1.00)/2.00; % Factor codificado de alginato de sodio de baja
viscosidad;

```

HV1 = 3.364\*(HV-1.00)/2.00; % Factor codificado de alginato de sodio de alta viscosidad;

Car1 = 3.364\*(Car-0.50)/1.00; % Factor codificado de kappa-carragenina;

% Cálculo del diámetro del catalizador para el tiempo de utilización;

per = tita/2; % Equivalente al número de períodos del estudio de swelling por superficie de respuesta ;

f = SW(1) + SW(2)\*LV1 + SW(3)\*HV1 + SW(4)\*Car1 + SW(5)\*LV1^2 + SW(6)\*HV1^2 + SW(7)\*Car1^2 + SW(8)\*LV1\*HV1 + SW(9)\*LV1\*Car1 + SW(10)\*HV1\*Car1; % Factor de hinchamiento;

dct = dc \* (1 + f\*per); % Diámetro del catalizador; % (cm);

% Cálculo de la velocidad máxima;

Vm = k2\*peso\*prot\*exp(-kd\*tita); % (Moles/litro minuto);

% Cálculo de la porosidad de lecho para el tiempo de funcionamiento;

vt = 4/3\*pi\*(dct/2)^3; % Volumen de la partícula de biocatalizador para el tiempo de funcionamiento;

volct = np\*vt; % Volumen de catalizador para el tiempo de funcionamiento;

eps = 1 - volct / volr; % Porosidad de lecho;

% Estimación de la velocidad superficial para el tiempo de funcionamiento;

U(ui) = QA(ui)/(eps\*ar\*3600); % Velocidad superficial; % (cm/s);

% Cálculo del coeficiente de difusión efectivo del sustrato para el tiempo de funcionamiento;

xi = 6.14E-4; % Factor experimental de ocupación para la aplicación de la ecuación de Mackie y Meares;

Dsaq = 5.21E-6; % Coeficiente de difusión de lactosa en agua a 25°C; % (cm^2/s);

Fi = xi/vt; % Factor volumétrico de ocupación para la aplicación de la ecuación de Mackie y Meares;

Dset = Dsaq\*(1-Fi)^3/(1+Fi)^2; % coeficiente de difusión efectivo del sustrato para el tiempo de funcionamiento; % (cm^2/s);

% Cálculo del kla;

kl = 0.002265\*((U(ui))^(1/3));

a = 6\*(1-eps)/dct;

% Estimación del coeficiente efectivo de dispersión axial;

fd = 0.031; % Factor experimental de dispersión ;

Ez = fd\*L\*U(ui); % Coeficiente efectivo de dispersión axial; % (cm^2/s);

% Cálculo de números adimensionales;

St = kl\*a\*L/U(ui); % Número de Stanton;

Pe = L\*U(ui)/Ez; % Número de Peclet;

Sh = kl\*(dct/2)/Dset; % Número de Sherwood;

---

```

% Agrupación de constantes
MR = St*Pe*0.5;
fi2 = Vm*(dc/2)^2/Ds;
sg = Km*((1/So)+(1/ki));
sg2 = -Km/ki;
d3 = MR * (Km + Km*So/ki + Vm/(kl*a));
d2 = MR * (2-(Km+1));

% MÓDULO DE RESOLUCIÓN DEL SISTEMA DE ECUACIONES

% RESOLUCIÓN DEL BALANCE DE MATERIA EN EL BIOCATALIZADOR
% Cálculo de la matriz E;
% primera fila;
for j = 2:n;
    E(1,j) = A(1,j);
end

% filas interiores;
for i = 2:n-1;
    for j = 1:n;
        E(i,j) = B(i,j)-(A(i,j)*Pe);
    end
end

% Considerando la ecuación
for i = 2:n-1;
    E(i,i) = E(i,i)-MR;
end

% Ultima fila
for j = 1:n;
    E(n,j) = A(n,j)-Sh;
end,

e = [1 -d3 -d3 -d3 -d3 -d3 0];

% Se graban los datos
save polmm E fi2 sg sg2 e MR Km ki Vm So Sh xx dc kl

y = fsolve('catalizador',[1 1 1 1 1 1 1]); % A subrutina de optimización (AI.2)

% Se guarda el valor a Z=1
yy(ui) = y(8);

```

---

```

% RESOLUCIÓN DEL BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR
% Cálculo de la matriz E;
% primera fila;
for j = 2:n;
    E(1,j) = A1(1,j)/Pe;
end
    E(1,1) = (A1(1,1)/Pe)-1;
% filas interiores;
for i = 2:n-1;
    for j = 1:n;
        E(i,j) = B1(i,j)-(A1(i,j)*Pe);
    end
end

% Considerando la ecuación
for i = 2:n-1;
    E(i,i) = E(i,i)-d2;
end

% Ultima fila
for j = 1:n;
    E(n,j) = A1(n,j);
end,

e = [1 -MR -MR -MR -MR -MR -MR 0];

% Se graban los datos
save polmmm E fi2 sg sg2 e MR Km ki Vm So Sh dc kl

yy = fsolve('reactor',[1 1 1 1 1 1 1 1]); % A subrutina de optimización (AI.3)

% Se guardan los valores a los distintos Z
AA(ui) = yy(1);
BB(ui) = yy(2);
CC(ui) = yy(3);
DD(ui) = yy(4);
EE(ui) = yy(5);
FF(ui) = yy(6);
GG(ui) = yy(7);
XX(ui) = yy(8);

% Cálculo de la conversión
con(ui) = 1-XX(ui);
end

```

```

for i=1:ui
    control = abs((YY(ui)-XX(ui))/XX(ui))
    YY(ui) = XX(ui)
end

```

```
end
```

```
% MÓDULO DE PRESENTACIÓN DE RESULTADOS
```

```
% Se graban los resultados
```

```
save conver U YY con QA
```

```
plot(QA,con)
```

## AI.2. Subrutina para la resolución del balance de masa en la partícula de biocatalizador

```
% POLINOMIOS DE COLOCACIÓN PARA LA RESOLUCIÓN DEL BALANCE DE MATERIA EN EL BIOCATALIZADOR
```

```
function q = catalizador(p);
```

```
y1 = p(1); y2 = p(2); y3 = p(3); y4 = p(4); y5 = p(5); y6 = p(6);
```

```
y7 = p(7); y8 = p(8);
```

```
q = ones(5,1); load polmm; load conc;
```

```
q(1) = E(1,1) * y1 + E(1,2) * y2 + E(1,3) * y3 + E(1,4) * y4 + E(1,5) * y5 + E(1,6) * y6 + E(1,7) * y7 + E(1,8) * y8 + e(1);
```

```
q(2) = E(2,1) * y1 + E(2,2) * y2 + y2 * fi2 / (1 + sg2 * xx(2) + sg * y2) + E(2,3) * y3 + E(2,4) * y4 + E(2,5) * y5 + E(2,6) * y6 + E(2,7) * y7 + E(2,8) * y8 + e(2);
```

```
q(3) = E(3,1) * y1 + E(3,2) * y2 + E(3,3) * y3 + y3 * fi2 / (1 + sg2 * xx(3) + sg * y3) + E(3,4) * y4 + E(3,5) * y5 + E(3,6) * y6 + E(3,7) * y7 + E(3,8) * y8 + e(3);
```

```
q(4) = E(4,1) * y1 + E(4,2) * y2 + E(4,3) * y3 + E(4,4) * y4 + y4 * fi2 / (1 + sg2 * xx(4) + sg * y4) + E(4,5) * y5 + E(4,6) * y6 + E(4,7) * y7 + E(4,8) * y8 + e(4);
```

```
q(5) = E(5,1) * y1 + E(5,2) * y2 + E(5,3) * y3 + E(5,4) * y4 + E(5,5) * y5 + y5 * fi2 / (1 + sg2 * xx(5) + sg * y5) + E(5,6) * y6 + E(5,7) * y7 + E(5,8) * y8 + e(5);
```

```
q(6) = E(6,1) * y1 + E(6,2) * y2 + E(6,3) * y3 + E(6,4) * y4 + E(6,5) * y5 + E(6,6) * y6 + y6 * fi2 / (1 + sg2 * xx(6) + sg * y6) + E(6,7) * y7 + E(6,8) * y8 + e(6);
```

```
q(7) = E(7,1) * y1 + E(7,2) * y2 + E(7,3) * y3 + E(7,4) * y4 + E(7,5) * y5 + E(7,6) * y6 + E(7,7) * y7 + y7 * fi2 / (1 + sg2 * xx(7) + sg * y7) + E(7,8) * y8 + e(7);
```

```
q(8) = E(8,1) * y1 + E(8,2) * y2 + E(8,3) * y3 + E(8,4) * y4 + E(8,5) * y5 + E(8,6) * y6 + E(8,7) * y7 + E(8,8) * y8 + y8 * Sh * xx(8) * Vm * dc/2 / (xx(8) * 3 * kl * (Km*(1+(So-xx(8))/ki)+y8)) + e(8);
```

```
save conc2 y1 y2 y3 y4 y5 y6 y7 y8;
```

**AI.3. Subrutina para la resolución del balance de masa en el reactor****% POLINOMIOS DE COLOCACIÓN PARA LA RESOLUCIÓN DEL BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR**

```

function q = reactor(p);
yy1 = p(1); yy2 = p(2); yy3 = p(3); yy4 = p(4); yy5 = p(5); yy6 = p(6); yy7 = p(7);
yy8 = p(8);
q = ones(5,1); load polmmm; load conc2;

q(1) = E(1,1) * yy1 + E(1,2) * yy2 + E(1,3) * yy3 + E(1,4) * yy4 + E(1,5) * yy5 +
      + E(1,6) * yy6 + E(1,7) * yy7 + E(1,8) * yy8 + e(1);
q(2) = E(2,1) * yy1 + E(2,2) * yy2 + MR * yy2 * (Vm * y2 * dc/2 / (yy2*3*kl*(Km*
      * (1+(So-yy2)/ki)+y2))) + E(2,3) * yy3 + E(2,4) * yy4 + E(2,5) * yy5 + E(2,6) *
      * yy6 + E(2,7) * yy7 + E(2,8) * yy8 + e(2);
q(3) = E(3,1) * yy1 + E(3,2) * yy2 + E(3,3) * yy3 + MR * yy3 * (Vm * y3 * dc/2 /
      / (yy3*3* kl*(Km*(1+(So-yy3)/ki)+y3))) + E(3,4) * yy4 + E(3,5) * yy5 +
      + E(3,6) * yy6 + E(3,7) * yy7 + E(3,8) * yy8 + e(3);
q(4) = E(4,1) * yy1 + E(4,2) * yy2 + E(4,3) * yy3 + E(4,4) * yy4 + MR * yy4 * (Vm *
      * y4 * dc/2 / (yy4*3*kl*(Km*(1+(So-yy4)/ki)+y4))) + E(4,5) * yy5 + E(4,6) *
      * yy6 + E(4,7) * yy7 + E(4,8) * yy8 + e(4);
q(5) = E(5,1) * yy1 + E(5,2) * yy2 + E(5,3) * yy3 + E(5,4) * yy4 + E(5,5) * yy5 +
      + MR * yy5 * (Vm * y5 * dc/2 / (yy5*3*kl*(Km*(1+(So-yy5)/ki)+y5))) +
      + E(5,6) * yy6 + E(5,7) * yy7 + E(5,8) * yy8 + e(5);
q(6) = E(6,1) * yy1 + E(6,2) * yy2 + E(6,3) * yy3 + E(6,4) * yy4 + E(6,5) * yy5 +
      + E(6,6) * yy6 + MR * yy6 * (Vm * y6 * dc/2 / (yy6*3*kl*(Km*(1+(So-yy6)/
      / ki)+y6))) + E(6,7) * yy7 + E(6,8) * yy8 + e(6);
q(7) = E(7,1) * yy1 + E(7,2) * yy2 + E(7,3) * yy3 + E(7,4) * yy4 + E(7,5) * yy5 +
      + E(7,6) * yy6 + E(7,7) * yy7 + MR * yy7 * (Vm * y7 * dc/2 / (yy7*3*kl*(Km*
      * (1+(So-yy7)/ki)+y7))) + E(7,8) * yy8 + e(7);
q(8) = E(8,1) * yy1 + E(8,2) * yy2 + E(8,3) * yy3 + E(8,4) * yy4 + E(8,5) * yy5 +
      + E(8,6) * yy6 + E(8,7) * yy7 + E(8,8) * yy8 + e(8);

```

### Especies

A:	Catión entrecruzante
B:	Hidrocoloide
C:	Gel
E:	Enzima $\beta$ -Galactosidasa
EGa:	Complejo enzima-producto ( $\beta$ -Galactosidasa–galactosa)
ES:	Complejo enzima-sustrato ( $\beta$ -Galactosidasa–lactosa)
Ga:	Galactosa
Gl:	Glucosa
I:	Especie genérica
S:	Lactosa

### Variables

$\alpha$ :	Concentración interfásica adimensional ( $[S^i]/[S^b]$ )
$\beta$ :	Coefficiente de la ecuación de Chilton y Colburn
$\beta_k$ :	Coefficiente del polinomio de superficie de respuesta para respuesta k
$\lambda$ :	Coefficiente de la ecuación de Chilton y Colburn
$\sigma$ :	Factor de agrupación de constantes del biocatalizador
$\varepsilon$ :	Fración volumétrica libre del reactor
$\delta$ :	Valor experimental
v:	Velocidad de reacción ( $\text{mmoles l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
$\theta_{1/2}$ :	Tiempo de vida media (h)
$\kappa_1$ :	Constante de integración ( $\text{mmoles l}^{-1}$ )
$\kappa_2$ :	Constante de integración ( $\text{mmoles l}^{-1}$ )
$\Phi^2$ :	Factor de agrupación de constantes del biocatalizador
$\sigma_2$ :	Factor de agrupación de constantes del biocatalizador
$\kappa_3$ :	Constante de integración ( $\text{cm}^2$ )
$\kappa_A$ :	Constante de Arrhenius o factor preexponencial
$\eta_k$ :	Valor de la respuesta k obtenida a través polinomio de superficie de respuesta
$\tau$ :	Tiempo de residencia en el reactor (min)
$\nabla$ :	Operador gradiente
$\hat{n}$ :	Normal al área de la interfase biocatalizador-líquido.
$\mathbf{E}$ :	Tensor de dispersión
$\bar{x}$ :	Valor medio ( $\sum x_i/n$ )
$\vec{v}$ :	Vector de velocidades
[I]:	Concentración de la especie I ( $\text{g cm}^{-3}$ )
a:	Área ( $\text{cm}^2$ )
a:	Parámetro de la normalización de la relajación de los geles
A:	Pendiente de la linealización de los datos cinéticos ( $\text{mg enzima min}$ )
$a_1$ :	Pendiente de la linealización de las pendientes de los datos cinéticos ( $\text{mg enzima min l}^{-1} \text{ mmoles}^{-1}$ )
$a_2$ :	Pendiente de la linealización de las ordenadas al origen de los datos cinéticos ( $\text{mg enzima min l}^{-1} \text{ mmoles}^{-1}$ )
Act:	Actividad enzimática ( $\mu\text{moles glucosa liberada min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ material}$ )
$A_{kj}$ :	Matriz de colocación

b:	Coefficiente estequiométrico del hidrocoloide (g hidrocoloide g <sup>-1</sup> agente entrecruzante)
B:	Ordenada al origen de la linealización de los datos cinéticos (mg enzima min)
b:	Parámetro de la normalización de la relajación de los geles (min <sup>-1</sup> )
b <sub>1</sub> :	Ordenada al origen de la linealización de las pendientes de los datos cinéticos
B <sub>kj</sub> :	Matriz de colocación
C*:	Concentración externa adimensional ([S <sup>b</sup> ]/[S <sup>0</sup> ])
C:	Concentración interna adimensional ([S]/[S <sup>0</sup> ])
D:	Diámetro de la partícula de catalizador (cm)
D <sub>I</sub> :	Coefficiente efectivo de difusión de la especie I en el gel (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
D <sub>I1</sub> :	Coefficiente efectivo de difusión de la especie I en la fase líquida (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
E:	Coefficiente de dispersión (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Ea:	Energía de activación (kcal g mol <sup>-1</sup> )
E <sub>icat</sub> <sup>0</sup> :	Masa de enzima inmovilizada inicialmente (mg proteína g <sup>-1</sup> catalizador)
F:	Fuerza (kg)
K:	Constante de la ecuación de Chilton y Colburn
k <sub>1</sub> :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
k <sub>-1</sub> :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
k <sub>2</sub> :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
k <sub>3</sub> :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
k <sub>-3</sub> :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
k <sub>d</sub> :	Constante de desactivación (h <sup>-1</sup> )
k <sub>i</sub> :	Constante de inhibición (mmoles lt <sup>-1</sup> )
k <sub>l</sub> :	Coefficiente de transferencia de materia en la película líquida (cm s <sup>-1</sup> )
K <sub>m</sub> :	Constante de Michaelis-Menten (mmoles lt <sup>-1</sup> )
k <sub>f</sub> :	Constante de velocidad de pérdida de actividad (h <sup>-1</sup> )
L:	Espesor de la capa de gel (cm)
M:	Peso molecular de la glucosa (180 g g mol <sup>-1</sup> )
n:	Número de determinaciones realizadas
n:	Número de ensayos
p:	Masa (g)
Pe:	Número de Peclet (u <sub>s</sub> Z/E <sub>z,ef</sub> )
Q:	Cantidad de soluto que atraviesa la unidad de superficie de placa de gel (g/cm <sup>2</sup> )
R:	Constante universal de los gases (kcal g mol <sup>-1</sup> °K <sup>-1</sup> )
r:	Coordenada radial (cm)
r <sub>1</sub> :	Velocidad de producción o desaparición de la especie I por reacción química (mmoles lt <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
R:	Radio (cm)
R <sup>2</sup> :	Coefficiente de correlación
r <sub>c</sub> :	Posición radial de la interfase de reacción (variable con el tiempo) (cm)
Re <sub>p</sub> :	Número de Reynolds de partícula (D u <sub>s</sub> ρ <sub>l</sub> /μ <sub>l</sub> )
s:	Desviación estándar
Sc:	Número de Schmidt (μ <sub>l</sub> /ρ <sub>l</sub> D <sub>Sl</sub> )
Sh:	Número de Sherwood (k <sub>l</sub> R/D <sub>Sl</sub> )
St:	Número de Stanton (k <sub>l</sub> a <sub>sl</sub> Z/u <sub>s</sub> )
t <sub>(n-1)</sub> :	Valor del test-t de dos lados con (n-1) grados de libertad (95% de confianza)
T:	Temperatura absoluta (°K)

---



---

t:	Tiempo (s)
$u_s$ :	Velocidad superficial ( $\text{cm s}^{-1}$ )
V.P.V.:	Variación promedio del volumen de la partícula de biocatalizador
v:	Velocidad del líquido ( $\text{cm s}^{-1}$ )
V:	Volumen de reacción (lt)
$V_{\text{max}}$ :	Velocidad máxima de reacción ( $\text{mmoles lt}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
x:	Posición axial adimensional ( $z/Z$ )
$X_I$ :	Conversión de la especie I por reacción química
$x_I$ :	Factor codificado de la especie I para el diseño experimental
$x_j$ :	Valores experimental de una determinación
Y:	Módulo aparente de relajación $((F_0 - F_{(t)})/F_0)$
y:	Posición radial adimensional ( $r/R$ )
z:	Coordenada axial (cm)
Z:	Longitud del reactor (cm)

### Subíndices

0:	En el seno del baño gelificante
c:	Completa
e:	Específico en las condiciones ensayadas
ef:	Efectivo
f:	Al finalizar la experiencia
g:	Gelificación
i:	En la interfase de reacción
in:	Inmovilizada
k:	Variable respuesta para el análisis de los resultados del diseño experimental
r%:	Relativa porcentual
r:	Radial
s:	En condiciones estándares
sl:	En la interfase sólido-líquido
z:	Axial

### Supraíndices

':	Parámetros cinéticos intrínsecos de la enzima inmovilizada
0:	En la entrada del reactor
b:	En el seno de la fase líquida
cat:	Catalizador
enz:	Enzima
Hom	En fase homogénea
i:	En la superficie del biocatalizador
t:	A un tiempo t

Ak M., A. Nussinovitch, O. Campanella y M. Peleg. 1989. Crosslinking rates of thermally preset alginate gels. *Biotechnol. Progress.* 5: 75-77.

Alais Ch. 1971. *Ciencia de la leche*. Compañía Editora Continental S.A. Barcelona, España.

Annunziato M. y R. Mahoney. 1987. Partial purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Food Biochem.* 11: 263-277.

Aspinall G. 1985. *The polysaccharides*. Academic Press Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.

Axelsson A., C. Sisak, B. Westrin y B. Szajáni. 1994. Diffusional characteristics of a swelling gel and its consequences for bioreactor performance. *Chem. Eng. J.* 55: B35-B39.

Bailey J. y D. Ollis. 1977. *Biochemical engineering fundamentals*. Mc. Graw-Hill Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.

Banerjee M., A. Chakravarty y S. Majumdar. 1984. Characteristics of yeast  $\beta$ -galactosidase immobilized on calcium alginate gels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 271-274.

Barnes L. 1994. *Manual de nutrición en pediatría*. 3<sup>ra</sup> edición. Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Becker V. y H. Evans. 1969. The influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on  $\beta$ -galactosidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 191: 95-104.

Bernal V. y J. Pavel. 1985. Lactose hydrolysis by *Kluyveromices lactis*  $\beta$ -D-galactosidase in skim milk, whey, permeate and model system. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18: 97-99.

Birch G., N. Blakebrough y K. Parker. 1981. *Enzymes and food processing*. Applied Science. Londres, Reino Unido.

Calzada J. y M. Peleg. 1978. Mechanical interpretation of stress-strain relationships in solid foods. *J. Food Sci.* 43: 1087-1092.

- Carrara C. y A. Rubiolo. 1994. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* 10: 220-224.
- Caulcutt C. y R. Boddy. 1983. *Statistics for analytical chemists*. Chapman and Hall. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Chavez M., J. Luna y R. Garrote. 1994. Crosslinking kinetics of thermally preset alginate gels. *J. Food Sci.* 59: 1108-1110 y 1114.
- Cussler E. 1976. *Multicomponent diffusion*. Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam, Holanda.
- Danty A y K. Goulding. 1986. Stability of alginate-immobilized algae cells. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 210-216.
- Davidson R. 1980. *Handbook of water-soluble gums and resins*. Mc. Graw-Hill Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Dea I. 1982. Polysaccharide conformation in solutions and gels. En *food carbohydrate*. Lineback D. y G. Inglett editores. AVI Pub. Co. Westport, Estados Unidos de América.
- Djelveh G., J. Gros y B. Bories. 1989. An improvement of the cell diffusion method for the rapid determination of diffusion constants in gels or foods. *J. Food Sci.* 54: 166-169.
- Doraiswamy L. 1984. *Recent advances in the engineering analysis of chemically reacting systems*. J. Wiley. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Doran P. 1998. *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Engasser J. y C. Hovarth. 1976. Difussional kinetics with immobilized enzymes. En *applied biochemistry and bioengineering. Immobilized enzymes principles*. Academic Press Inc. Nueva York, Estados Unidos. Vol. 1: 128-221.
- Enzyme data bank. 1995. Release 18.0. Medical Biochemistry Department. Centre Medical Universitaire. Genève 4, Suiza.
- ExPASy. 1999. ProtParam tool. Swiss Institute of Bioinformatics. Genève 4, Suiza.

Finlayson B. 1980. Nonlinear analysis in chemical engineering. Mc. Graw-Hill International Book Co. Nueva York, Estados Unidos de América.

Floros J. y M. Chinnan. 1988. Computer graphics-assisted optimization for product and process development. Food Technol. 2: 72-78.

Froment G. y Bischoff K. 1990. Chemical reactor analysis and design. 2<sup>nd</sup> edition. J. Wiley. Nueva York, Estados Unidos de América. Series.

Geankoplis C. 1999. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. México, México.

Gekas V. y M. Lopez-Leiva. 1985. Hydrolysis of lactose: A literature review. Process Biochem. 22: 2-12.

Glicksman M. 1983. Food hydrocolloids. C.R.C. Press Inc. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América.

Greene H. y F. Ghishan. 1982. Excessive fluid intake as a cause of chronic diarrhea in young children. J. Pediatr. 102: 836-840.

Handriková G., V. Stefuca, M. Polakovic y V. Bales. 1996. Determination of effective diffusion coefficient of substrate in gel particles with immobilized biocatalyst. Enzyme and Microbial Technol. 18: 581-584.

Hannibal-Friedrich O., M. Chun y M. Sernetz. 1980. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase, albumin, and  $\gamma$ -globulin on epoxy-activated acrylic beads. Biotechnol. Bioeng. 22: 157-175.

Hendrickx M., C. Ooms, C. Engels, E. Van Pottelbergh y P. Tobback. 1987. Obstruction effect of carrageenan and gelatin on the diffusion of glucose. J. Food Sci. 52: 1113-1114.

Henley S. y T. Sadana. 1986. Deactivation theory. Biotechnol. Bioeng. 28: 1277-1285.

Henley S. y T. Sadana. 1989. Graphical determination of mean activation theory energy and standard deviation in a microheterogeneity model of enzyme deactivation. Biotechnol. Bioeng. 34: 916-923.

Hobman P. 1984. Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. *J. Dairy Sci.* 67: 2631-2653.

Horton R., L. Moran, R. Ochs, J. Rawn y K. Scrimgeour. 1995. *Bioquímica*. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México, México.

Hossain M. y D. Do. 1989. General theory of determining intraparticle active immobilized enzyme distribution and rate parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 963-975.

Hossain M. y D. Do. 1992. Determination of intraparticle immobilized enzyme distribution under moderate diffusion conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 743-747.

Hulst A. y J. Tramper. 1989. Immobilized plant cells: A literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 546-558.

Ismail S., S. Mabrouk y R. Mahoney. 1997. Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Mucor pusillus*. *J. Food Biochemistry.* 21: 145-162.

Jakubowski J., J. Giacini, D. Kleyn, S. Gilbert y J. Leeder. 1975. Effect of calcium, magnesium and whey proteins on the activity of  $\beta$ -galactosidase (*A. niger*) immobilized on collagen. *J. Food Sci.* 40: 467-469.

Knorr D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47: 593-595.

Kuo-Cheng C., H. Jer-Ying y C. Alvin. 1985. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 510-514.

Laidler K. y P. Bunting. 1973. *The chemical kinetics of enzyme action*. Clarendon Press. Oxford, Reino Unido.

Levenspiel O. 1979. *The chemical reactor omnibook*. OSU Book Stores. Corvallis, Estados Unidos de América.

Lilly M. y P. Dunnill. 1976. Immobilized-enzymes reactors. En *methods in enzymology*. Academic Press Inc. Nueva York, Estados Unidos de América. 44: 717-738.

Lloyd-Still J. 1979. Chronic diarrhea and the misuse of elimination diets. *J. Pediatr.* 95: 10-13.

Luh N., J. Flink y M. Karel. 1977. Fabrication, characterization, and modification of the texture of calcium alginate gels. *J. Food Sci.* 42: 976-981.

Luong J. 1985. Cell immobilization in k-carrageenan for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1652-1661.

Mahoney R. 1998. Oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry.* 63: 147-154.

Mahoney R. y C. Adamchuk. 1980. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromices fragilis*. *J. Food Sci.* 45: 962-964 y 968.

Mahoney R. y J. Whitaker. 1977. Stability and enzymatic properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromices fragilis*. *J. Food Biochem.* 1: 327-350.

Mahoney R. y J. Whitaker. 1978. Purification and physiochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromices fragilis*. *J. Food Science.* 43: 584-591.

Mahoney R. y T. Wilder. 1989. Effect of milk constituents and related compounds on thermal stability of lactase (*Escherichia coli*). *J. Food Science.* 54: 899-901.

Mammarella E., C. Carrara y A. Rubiolo. 1991. Transferencia al medio de la enzima  $\beta$ -galactosidasa entrampada en geles con distintos compuestos. Proceedings IV Congreso Latino-americano de Transferencia de Calor y Materia. La Serena, Chile. 360-363.

Mammarella E., D. De Piante Vicín y A. Rubiolo. 1999. Estudio del comportamiento a la compresión de geles de polisacáridos. Proceedings VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Rafaela, Argentina. Publicado en C.D.

Mancini M., M. Moresi y R. Rancini. 1999. Mechanical properties of alginate gels: Empirical characterisation. *J. Food Eng.* 39: 369-378.

Merchant F., A. Margaritis y J. Wallace. 1987. A novel technique for measuring solute diffusivities in entrapment matrices used in immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 936-945.

Mickley H., T. Sherwood y C. Reed. 1957. Applied Mathematics in Chemical Engineering. McGraw-Hill Book Co. Nueva York, Estados Unidos de América.

Narsimhan G. 1981. Prediction of intrinsic kinetics in diffusion disguised immobilized enzyme systems. Chem. Eng. J. 22: 101-105.

Nguyen A. y J. Luong. 1986. Diffusion in  $\kappa$ -carrageenan gel beads. Biotechnol. Bioeng. 28: 1261-1267.

Nussinovitch A., M. Peleg y M. Normand. 1989. A modified Maxwell and nonexponential model for characterization of the stress relaxation of agar and alginate gels. J. Food Sci. 54: 1013-1016.

Office of Premarket Approval. 1998. Partial list of enzyme preparations that are used in foods. Center for Food Safety & Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. Rockville, Estados Unidos de América.

Okos M., E. Grulke y A. Syverson. 1978. Hydrolysis of lactose in acid whey using  $\beta$ -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin. J. Food Sci. 43: 566-571.

Patocka J. y P. Jelen. 1988. Enzymatic lactose hydrolysis for prevention of lactose crystallization in a whey spread. J. Food Sci. 53: 1370-1372.

Patwardhan V. y N. Karanth. 1982. Film diffusional influences on the kinetic parameters in packed-bed immobilized enzyme reactors. Biotechnol. Bioeng. 24: 763-780.

Peleg M. y J. Calzada. 1976. Stress relaxation of deformed fruits and vegetables. J. Food Sci. 41: 1325-1332.

Pizarro C., M. Fernández-Torroba, C. Benito y J. González-Sáiz. 1997. Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment. Biotechnol. Bioeng. 53: 497-506.

Poch O., H. L'Hote, V. Dallery, F. Debeaux, R. Fleer y R. Sodoyer. 1992. Sequence of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase: Comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. Gene. 118: 55-63.

Polakovic M., V. Bales, M. Dluhy y V. Stefuca. 1993<sup>a</sup>. Optimization of a packed bed bioreactor with immobilized cells using experimental design. Bioprocess Eng. 9: 225-230.

Polakovic M., V. Stefuca, V. Bales, L'. Kurillová y P. Gemeiner. 1993<sup>b</sup>. Heterogeneous enzymic hydrolysis in a biocatalytic packed bed formed by Ca-pectate gel beads. *Process Biochemistry*. 28: 549-552.

Reed G. 1975. *Enzymes in food processing*. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.

Richmond M. y J. Gray. 1981. Beta-galactosidasa: Review of recent research related to technological application, nutritional concern and immobilization. *J. Dairy Sci.* 64: 1759-1771.

Rickenberg H. 1959. The effect of metal ions and proteins on the stability of the  $\beta$ -galactosidasa of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 35: 122-129.

Roberts D. 1977. *Enzyme kinetics*. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.

Rojkin M. y G. Drappo. 1974. Fraccionamiento proteico por determinación directa de albúmina. *Bioq. Atlántico VI.* 63: 1931-1937.

Rose, L. 1983. *Chemical reactor design in practice*. 2<sup>nd</sup> edition. Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam, Holanda.

Rosenau J., J. Calzada y M. Peleg. 1978. Some rheological properties of cheese-like products prepared by direct acidification. *J. Food Sci.* 43: 948-952.

Santos A., M. Ladero y F. García-Ochoa. 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromices fragilis*. *Enzyme and Microbial Technol.* 22: 558-567.

Shang-Tian Y. y M. Okos. 1989. A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 763-773.

Siso M. 1993. Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistances. *Process Biochem.* 29: 7-12.

Tang J., J. Lelievre, M. Tung e Y. Zeng. 1994. Polymer and ion concentration effects on gellan gel strength and strain. *J. Food Sci.* 59: 216-220.

- Tang J., M. Tung e Y. Zeng. 1997. Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations. *J. Food Sci.* 62: 688-692 y 712.
- Tarhan M. 1983. *Catalytic Reactor Design*. Mc. Graw-Hill Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Toda K. 1975. Interparticle mass transfer study with a packed column of immobilized microbes. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1729-1747.
- Villadsen J. y W. Stewart. 1967. Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation. *J. Eng. Sci.* 22: 1483-1501.
- Víllora G. y A. López Cabanes. 1994. A generalized analysis of internal diffusion of immobilized enzyme in multi-enzyme reactions. *Chem. Eng. J.* 56: B61-B67.
- Walker-Smith J. 1988. *Diseases of the small intestine in childhood*. Butterworths. Londres, Reino Unido.
- Wang X. y E. Ruckenstein. 1993. Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization. *Biotechnol. Prog.* 9: 661-665.
- Weetall H. y B. Noshir. 1974. The preparation of immobilized lactase and its use in enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol. Bioeng.* 16: 295-313.
- Wen C. y L. Fan. 1975. *Models for flow systems and chemical reactors*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Whistler R. 1973. *Industrial gums, polysaccharides and their derivatives*. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Wilson I. y J Hynn-Jael. 1971. Enzymatic parameters: Measurement of  $V_m$  and  $K_m$ . *Biochimica et Biophysical Acta.* 242: 519-522.
- Wingard L., LL. Brezin y A. Klyosov. 1980. *Enzyme engineering*. Plenum Press. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Wiseman A. 1991. *Manual de biotecnología de los enzimas*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Woodward J., S. Krasniak, R. Smith, F. Spielberg y G. Zachry. 1982. Preparation and characterization of  $\beta$ -D-glucosidase immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12: 485-489.

Yamane T., P. Sirote y S. Shimizu. 1987. Evaluation of half-life of immobilized enzyme during continuous reaction in bioreactors: A theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 963-969.

Yang S. e I. Tang. 1988. Lactose hydrolysis and oligosaccharides formation catalyzed by  $\beta$ -galactosidase. Kinetics and mathematical modeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Nueva York, Estados Unidos de América. 542: 417-422.

Zadow J. 1984. Lactose: Properties and uses. *J. Dairy Sci.* 67: 2655-2679.

Zorrilla S. y A. Rubiolo. 1994. A model for using the diffusion cell in the determination of multicomponent diffusion coefficients in gels or foods. *Chem. Eng. Sci.* 49: 2123-2128.

Zorrilla S. y A. Rubiolo. 1998. Estimación de coeficientes de difusión de solutos en alimentos semirrígidos usando el método de la celda de difusión. *Proceedings II Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos.* Bahía Blanca, Argentina. Publicado en C.D.