

U N I V E R S I D A D D E M U R C I A

Facultad de Ciencias (Químicas y Matemáticas)

ANALISIS Y SIMULACION DE UN REACTOR DE  
LECHO FIJO DE NARINGINASA INMOVILIZADA  
EN VIDRIO POROSO.

Memoria presentada  
para optar al Gra-  
do de Doctor en /  
Ciencias, Sección  
de Químicas.

JOSEFA BASTIDA RODRIGUEZ

MCMLXXXV

AGUSTIN MIÑANA AZNAR, Profesor Titular, Director del Departamento de Química y JOSE LUIS IBORRA PASTOR, Catedrático Numerario, Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias (Químicas y Matemáticas) de la Universidad de Murcia.

CERTIFICAMOS : Que el trabajo contenido en esta Memoria bajo el título:

ANALISIS Y SIMULACION DE UN REACTOR DE LECHO FIJO DE NARINGINA SA INMOVILIZADA EN VIDRIO POROSO

que para optar al grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas, presenta D<sup>a</sup> Josefa Bastida Rodriguez ha sido realizado en estos Departamentos bajo la dirección de los Doctores Antonio Bódalo Santoyo y Arturo Manjón Rubio.

Y para que conste a los efectos oportunos expedimos el presente certificado en

Murcia, Septiembre de 1.985

Agustin Miñana Aznar	J.Luis Iborra Pastor
Director del Departamento de Química Técnica	Director del Departamento de Bioquímica

Trabajo presentado para optar al  
Grado de Doctor en Ciencias, Secci  
ción de Químicas.

Murcia, 10 de Septiembre de 1.985

Josefa Bastida Rodriguez  
Licenciada en Ciencias Químicas

Visado en Murcia a 10 de Septiembre de 1.985

LOS DIRECTORES

Antonio Bódalo Santoyo	Arturo Manjón Rubio
Prof. Titular de Ingeniería Química de la Universidad / de Murcia.	Prof. Titular de Bioquímica de la Universidad de Murcia.

El presente trabajo ha sido subvencionado, en parte, por el proyecto nº 1510/82 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Asimismo, la firmante de la Memoria es becaria del citado proyecto.

También se ha recibido una ayuda del Convenio Caja de Ahorros Provincial - Universidad de Murcia. A ambas instituciones se le agradece las ayudas prestadas.

Parte de los resultados que se expresan en esta Memoria han sido publicados en las siguientes revistas:

Analytical Biochemistry (1985)  
vol. 149, nº 1

Biotechnology Letters (1985)  
vol. 7, nº 7, 477-483

y están pendientes de publicación en:

Biotechnology and Bioengineering  
Enzyme and Microbial Technology

Además, han dado lugar a las siguientes comunicaciones a Congresos y Reuniones:

XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica

3º Congreso Mediterráneo de Ingeniería Química.

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a los Profs. Drs. Antonio Bódalo Santoyo y Arturo Manjón Rubio, directores de este trabajo, por las enseñanzas, estímulos y ayudas con las que me alentaron en todo momento.

Al Prof. Dr. José Luis Gómez Carrasco, mi reconocimiento por el esfuerzo que desinteresadamente ha desplegado para la elaboración del trabajo.

Al Prof. Dr. José Luis Iborra Pastor, por su oportuna colaboración en los momentos más necesarios.

A la Profa. Dra. Elisa Gómez Gómez, por la amistad e inestimable apoyo que siempre me ha facilitado.

A los Licenciados Carmen Romero y Alfonso Gimeno por su ayuda en la realización de la parte experimental.

A Mariano Tarí y demás compañeros de los Departamentos de Química Técnica y Bioquímica por tantas horas de trabajo compartido.

Por último, mi agradecimiento a la empresa Zoster S.A. y al Centro de Proceso de Datos de esta Universidad por su colaboración.

El rubor que aflorando,  
queda siempre inerme al  
brote del esfuerzo ya doblado,  
nos pone en situación de espera  
no resuelta.

Y, por tanto, con la esperanza  
de que el después ha de  
alcanzarse.

ALANO

A mi madre.

A mamá-Carmen.

INDICE

## INDICE

1.	INTRODUCCION Y OBJETIVOS .....	1
2.	ANTECEDENTES .....	7
2.1.	La naringina, flavonoide responsable del amargor en cítricos .....	8
2.2.	Actuación de la enzima naringinasa .....	13
2.3.	Extracción y purificación .....	16
2.4.	Propiedades .....	19
2.5.	Métodos de medida de la actividad catalítica .....	25
2.6.	Naringinasa inmovilizada .....	29
2.7.	Difusión y reacción en sistemas de enzimas inmovilizadas .....	32

2.8.	Diseño y simulación de reactores en procesos con enzimas inmovili- zadas .....	46
3.	MATERIALES Y METODOS .....	56
3.1.	Materiales .....	57
3.2.	Métodos .....	59
3.2.1.	Determinación de proteína .....	59
3.2.2.	Determinación de la masa mole- cular de la naringinasa por HPLC.....	60
3.2.3.	Espectros de absorción de p-nitrofenol y p-nitrofenil- - $\alpha$ -L-ramnósido .....	62
3.2.4.	Absortividades molares de na- ringina y prunina .....	62
3.2.5.	Inmovilización de naringinasa ..	63
3.2.5.1.	En derivados aminoa- rúlicos .....	63
3.2.5.2.	En derivados aldehí- dicos .....	65
3.2.5.3.	En derivados tiólicos.	65
3.2.5.4.	En derivados aminados.	66

3.2.6.	Medida de actividad enzimática .	67
3.2.6.1.	Con p-nitrofenil- $\alpha$ - -L-ramnósido como sustrato .....	67
3.2.6.2.	Con naringina como sustrato .....	68
3.2.7.	Obtención de los valores de con- versión en un reactor tubular ..	70
3.2.8.	Obtención y purificación de prunina .....	71
4.	RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION .....	74
4.1.	Cromatografía líquido-líquido de alta resolución de naringinasa. Determina- ción de la masa molecular. Criterio de pureza .....	76
4.2.	Métodos de medida de la actividad $\alpha$ - -ramnosidasa de naringinasa .....	79
4.3.	Inmovilización y propiedades generales de naringinasa inmovilizada .....	89
4.3.1.	Inmovilización en vidrio poroso.	90
4.3.2.	Estabilidad al almacenamiento y operacional del derivado in- movilizado .....	97

4.3.3.	Variación de la actividad con la concentración de enzima .....	104
4.3.4.	Determinación de las condiciones óptimas de actuación de la enzima .....	110
4.4.	Determinación de los parámetros cinéticos de naringinasa .....	118
4.5.	Estudios de inhibición .....	135
4.5.1.	Inhibición por p-nitrofenol ....	137
4.5.2.	Inhibición por ramnosa .....	139
4.5.3.	Inhibición por glucosa .....	145
4.5.3.	Inhibición por prunina y naringenina .....	155
4.6.	Determinación de la conversión de equilibrio .....	159
4.7.	Resultados del reactor de lecho fijo con naringinasa inmovilizada .....	161
4.7.1.	Sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido .....	161
4.7.2.	Sustrato natural naringina .....	162

5.	DESARROLLO TEORICO .....	166
5.1.	Difusión y reacción en partículas esféricas porosas .....	167
5.1.1.	Ecuaciones diferenciales del proceso .....	168
5.1.2.	Factor de eficacia .....	174
5.1.3.	Aplicación del modelo a procesos enzimáticos reversibles, tipo Michaelis-Menten y con inhibición competitiva por producto .....	175
5.1.4.	Resolución de la ecuación diferencial .....	181
5.1.5.	Resultados producidos por el modelo y discusión de los mismos .	186
5.2.	Diseño y simulación de reactores de lecho fijo para sistemas con enzimas inmovilizadas en partículas esféricas .....	197
5.2.1.	Ecuación de diseño .....	197
5.2.2.	Integración de la ecuación de diseño del reactor .....	203
5.2.3.	Resultados y discusión .....	205

6.	CONTRASTE DEL MODELO .....	215
6.1.	Estimación de difusividades de los sus- tratos y productos .....	218
6.2.	Cinética de Michaelis-Menten reversible: sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido ...	220
6.2.1.	Factor de eficacia .....	221
6.2.2.	Conversión de salida del reactor tubular de lecho fijo .....	225
6.3.	Cinética de Michaelis-Menten con inhibi- ción competitiva por producto: sustrato naringina .....	228
6.3.1.	Factor de eficacia .....	229
6.3.2.	Conversión de salida del reactor tubular de lecho fijo .....	232
7.	CONCLUSIONES .....	241
8.	BIBLIOGRAFIA .....	249
9.	NOMENCLATURA .....	273

10. APENDICES .....	280
I. Algoritmo para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales por el método de Runge-Kutta .....	281
II. Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención del perfil de concentraciones adimensionales y el factor de eficacia .....	288
III. Algoritmo para la resolución de la ecuación de diseño del reactor por el método de Runge-Kutta .....	296
IV. Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención de los perfiles axiales de conversión en el reactor tubular de lecho fijo .....	301

1.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS

## 1.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La aplicación de enzimas en industrias de procesado de cítricos es una práctica de uso corriente en el desarrollo de tecnologías avanzadas. Va dirigida fundamentalmente a incrementar la calidad del producto por reducción de su amargor o viscosidad, o bien a aumentar el rendimiento en componentes extraíbles de los mismos para su aplicación posterior.

Los cítricos contienen dos tipos de compuestos amargos químicamente diferentes, flavonoides y limonoides, que afectan de forma distinta a la calidad de los cítricos y sus productos derivados. Los flavonoides se encuentran distribuidos en todo el fruto, alcanzando su máxima concentración en el albedo. Los limonoides, por su parte, se presentan en los cítricos en menores proporciones que los flavonoides, no habiéndose detectado su presencia en los sacos de jugo. Además, contribuyen de forma minoritaria al sabor amargo total de un jugo cítrico.

De entre los flavonoides, el principal responsable del sabor amargo es la naringina, y su procesado para limitar su concentración a niveles moderados se ha realizado por varias técnicas: seleccionando el fruto, por control de la presión empleada en la extracción del jugo o por mezcla de diferentes zumos. En la actualidad, el uso de hidrólisis enzimática de naringina por naringinasa, constituye un medio de eliminar eficazmente el amargor. La adición de la naringinasa soluble a los zumos es un proceso de alto coste que implica, además, la adición de componentes extraños a los mismos para lograr la eliminación de la naringina, sin conseguirlo, a pesar de ello, ya que la actividad enzimática es inhibida por los componentes del zumo así como por los propios productos de la hidrólisis. Para solventar los problemas inherentes a estas desventajas, la utilización de reactores de enzimas inmovilizadas supone un gran avance en la optimización de los procesos industriales que conducen a la obtención de jugos cítricos no amargos. Además, la utilización de tal tipo de derivados permitiría la reutilización del biocatalizador, así como un mejor control del proceso de desamargado, posibilidades ambas que redundarían en una disminución del coste global del proceso.

Sin embargo, y a pesar de la abundante bibliografía existente sobre posibles aplicaciones de las enzimas inmovilizadas en procesos industriales, algunas de cuyas referen-

cias se basan en la utilización de naringinasa inmovilizada, la utilización de estos sistemas en la industria es muy escasa, debido esencialmente a la parquedad de modelos matemáticos generalizados que representen la hipotética descripción física de tales sistemas y a la inexistencia de modelos digitales que sean operativos y tengan posibilidades de uso habitual para el cálculo, diseño y control de unidades en las que se desarrollen estos tipos de procesos.

Así pues, el objetivo general del presente trabajo ha consistido en el análisis y simulación de un reactor de lecho fijo de naringinasa inmovilizada en vidrio poroso, para conseguirlo, ha sido necesario cubrir los siguientes objetivos particulares:

1º) Proponer un método alternativo para la caracterización de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa haciendo uso del sustrato sintético p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido, ya que en la bibliografía no existe un método rápido, sensible y económico para determinar dicha actividad de forma específica y diferenciada de la actividad global de la enzima naringinasa. Dicho sustrato es absolutamente específico de la citada actividad, y uno de los productos de la reacción hidrolítica, el p-nitrofenol, es fácilmente cuantificable colorimétricamente, mostrando, además, una absorptividad molar elevada, lo que implica una gran sensibilidad del método que se propone.

2º) Proceder a la inmovilización de la enzima naringinasa, usándose para ello un soporte de vidrio poroso de naturaleza hidrofílica bien definida, ya que va recubierto por una capa de residuos de glicerilo y cuyo tamaño de partícula es uniforme. La inmovilización se ha llevado a cabo por cuatro procesos distintos tendentes a implicar en la unión soporte-proteína a cuatro residuos de aminoácidos diferentes de la enzima con el fin de estudiar el efecto de la modificación química sobre la actividad del derivado.

3º) Estudiar la influencia del tamaño de poro del soporte, manteniendo constante el nivel de modificación química de la enzima, sobre la actividad del derivado, siendo éste un parámetro extraordinariamente importante en el estudio del comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas por los problemas de difusión interna que se plantean.

4º) Proceder a la caracterización del mejor de los derivados obtenidos frente al sustrato sintético propuesto y al sustrato natural naringina, obteniéndose los parámetros cinéticos intrínsecos en ambos casos, así como al estudio de la estabilidad al almacenamiento y operacional de dicho derivado, siendo este último parámetro fundamental cuando se prevé la aplicación del sistema a un proceso continuo.

5º) A fin de describir cuantitativamente la interacción de la reacción enzimática con las limitaciones difusionales internas, se pretende desarrollar un modelo matemático para reacciones enzimáticas heterogéneas monosustrato, en las que la enzima se encuentra inmovilizada en partículas esféricas porosas, obteniéndose los perfiles radiales de concentración adimensional de sustrato en la partícula, así como el correspondiente factor de eficacia.

6º) Formular la ecuación de diseño de un reactor de lecho fijo para este tipo de sistemas, y resolverla teniendo en cuenta la variación continua que experimenta el factor de eficacia a lo largo del reactor, examinando la influencia que puedan tener cambios en los parámetros cinéticos y de operación sobre los perfiles axiales de conversión.

7º) Por último, proceder a la verificación sistemática de los modelos propuestos comparando los resultados experimentales obtenidos con los predichos por los citados modelos en términos de conversión y de factores de eficacia.

2.- ANTECEDENTES

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- LA NARINGINA, FLAVONOIDE RESPONSABLE DEL AMARGOR EN CITRICOS

En los cítricos se encuentra una gran variedad de flavonoides. Estos aparecen normalmente como glicósidos y se hallan ampliamente distribuidos en todos los tejidos, pero en mayor concentración (más de un 2%) en el albedo y fragmentos de membrana (1).

En función del disacárido predominante en la composición del flavonoide, éstos se dividen en dos grupos químico-taxonómicos : neohesperidosas (2-0- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosa) y rutinosa (6-0- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosa) (1).

Los flavonoides que alcanzan mayor concentración son la naringina y la hesperidina; la primera predomina en pomelos y naranjas tanto amargas como ácidas, mientras que la hesperidina

se encuentra principalmente en naranjas, limones y varias clases de mandarinas (2).

La concentración de flavonoides en los zumos cítricos debe ser reducida, por dos razones, fundamentalmente. En primer lugar, su insolubilidad da lugar a la aparición de depósitos cristalinos en la superficie de los equipos de procesado (3); y, en segundo lugar, algunos de estos compuestos muestran un acusado sabor amargo, lo que confiere a los zumos un sabor desagradable (4).

Se ha estudiado con detalle la relación existente entre la estructura del disacárido del flavonoide y el amargor que confiere al zumo que lo posee. Así, inicialmente se pensó que era el tipo de enlace entre la ramnosa y la glucosa el factor determinante del amargor, siendo el aglicón el modulador de esta propiedad, ya que la narirutina, isómero  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) ramnoglu--cosídico de la naringina, no es amarga (5) mientras que la poncirina (un  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) ramnoglu--cosídico de la neohesperidosa) es menos amarga que la naringina, llegándose por lo tanto a la conclusión de que todos los 2-ramnoglu--cosídicos eran amargos y solo ellos (6). Sin embargo, en estudios posteriores se ha confirmado que el amargor es fundamentalmente debido al enlace (1 $\rightarrow$ 2), es decir, no se requiere que el disacárido sea un ramnoglu--cosídico, ni tan siquiera que sea  $\alpha$  ó  $\beta$  el enlace entre las dos unidades de azúcar, importando poco además el tipo de enlace con el que el

segundo azúcar se une al esqueleto de la flavonona (7,8).

La naringina, el 7-(2-ramnósido- $\beta$ -glucósido) de la 4', 5, 7-trihidroxiflavanona (Figura 1), es el principal flavonoide responsable del sabor amargo en los zumos y jugos cítricos, y fué descubierta en 1857 por De Vry (9) en las flores de los árboles de pomelo que crecían en Java.

A lo largo del proceso de maduración del fruto se produce una marcada disminución de la concentración de naringina, y por tanto del amargor, dependiendo, además el contenido en dicho flavonoide, de factores tales como el tipo de fruto, la estación del año y las condiciones de extracción y filtración del zumo que se obtenga (10, 11).

Se ha determinado que la naringina se encuentra en los zumos de cítricos en una proporción media del 0,07%, siendo necesario el tratamiento del zumo a fin de disminuir estos niveles si se desea que tengan una aceptación comercial satisfactoria, ya que ese orden de concentración confiere un sabor muy desagradable. Cuando se disminuye la concentración de naringina en los zumos cítricos a niveles del orden del 0,03%, el sabor amargo desaparece (12); sin embargo, los resultados de muchas pruebas organolépticas realizadas han demostrado que no conviene reducir a tales niveles la concentración del flavonoide, ya que un cierto grado de amargor se considera

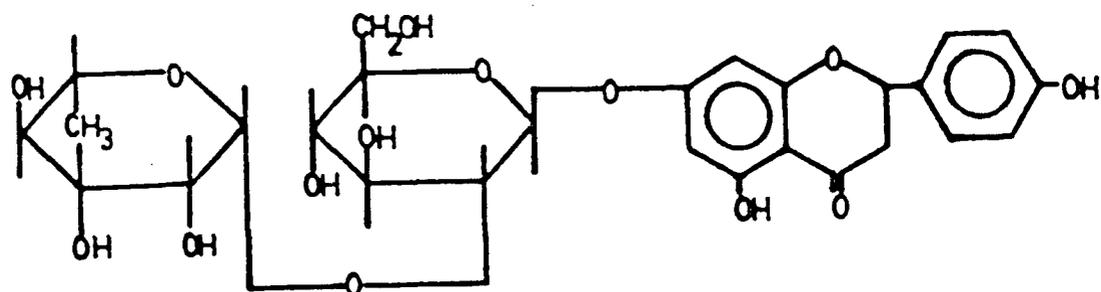


FIGURA 1.- Estructura de la naringina.  
7-(2-ramnósido- $\beta$ -glucósido) de la  
4',5,7 trihidroxiflavanona.

que resulta refrescante, por lo que el contenido en naringina de los zumos cítricos se suele reducir industrialmente al 0,05% valor que permite equilibrar las dos propiedades deseadas para el zumo : ausencia de amargor y frescor. Por otra parte es conveniente poder controlar el amargor del producto final sin afectar de forma adversa otras propiedades organolépticas del zumo (13).

Se han propuesto diversos métodos para reducir el nivel de naringina de los productos cítricos. El primero de ellos consiste en la extracción de dicho flavonoide con carbón activo, en determinadas condiciones de pH y temperatura, pero este tratamiento no es aplicable puesto que también se extraen otros compuestos que contribuyen a la calidad del zumo o derivado cítrico (14).

Por otra parte, la hidrólisis ácida de la naringina, utilizando ácido clorhídrico a 90°C (15) o una mezcla de ácido fórmico-ciclohexanol (16), son procedimientos demasiado drásticos para su aplicación práctica.

Sin duda alguna, el método más ampliamente utilizado para la eliminación de la naringina, es la hidrólisis enzimática. La utilización de enzimas como medio eficaz y selectivo de reducir los niveles de naringina se ha convertido en una práctica industrial corriente, ya que se trabaja en condiciones

suaves, lo que redundaba en el mantenimiento de las propiedades del producto final, a la vez que simplifica el número de manipulaciones necesarias para conseguir el objetivo propuesto. Este método fué propuesto en Japón en 1955 y desde entonces ha sido objeto de muchas patentes basadas en producir y utilizar una enzima capaz de hidrolizar el componente disacárido neohesperidosa de los flavonoides, pudiendo esta hidrólisis limitarse al enlace (1—→2) que liga a los azúcares constituyentes de la parte glicosídica vista la relación exclusiva existente entre este tipo de enlace y el amargor (8,9).

## 2.2.- ACTUACION DE LA ENZIMA NARINGINASA

La naringinasa es una enzima que hidroliza la naringina en dos etapas, siendo cada una de ellas catalizada por una actividad diferente de la enzima; así la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa (E C 3.2.1.40) hidroliza la naringina a ramnosa y prunina (7- $\beta$ -glucósido de la 4', 5,7-trihidroxiflavanona), producto este último que es sustrato de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (E C 3.2.1.21) que lo degrada a glucosa y naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona). Un esquema de la reacción se representa en la Figura 2.

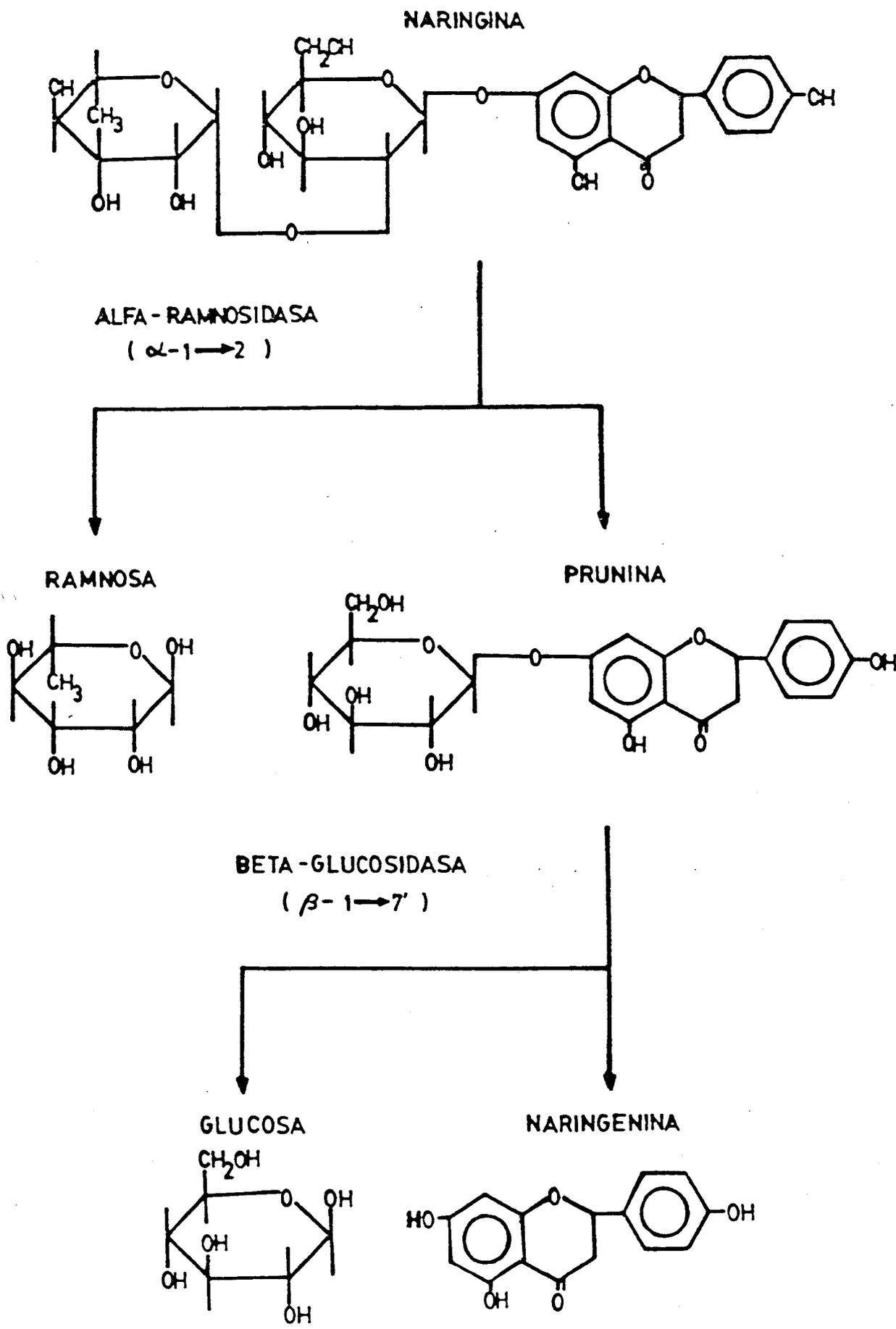


FIGURA 2.- Hidrólisis enzimática de la naringina.

Se ha demostrado que la prunina es aproximadamente tres veces menos amarga que la naringina (12); ello hace que para lograr el desamargado de un zumo, no haya necesidad de degradar la naringina por completo a naringenina, proceso que es más lento en su conjunto y que además puede dar lugar a la formación de un precipitado en el zumo de cristales de naringenina, dada su insolubilidad en medio acuoso.

Así pues, es suficiente la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa para proceder al desamargado de zumos. La enzima empleada para ello puede ser la misma que se encuentra en los zumos recién obtenidos, o la que se puede adicionar en el caso de que carezcan de ella o se desee acelerar el proceso. De cualquier forma, tanto si la enzima se encuentra ya en el zumo, como si es exógena, es necesario caracterizar adecuadamente el nivel de actividad  $\alpha$ -ramnosidasa que presenta, a fin de controlar la extensión de la hidrólisis de naringina a prunina y obtener así un zumo con las características organolépticas deseadas.

### 2.3.- EXTRACCION Y PURIFICACION

El enorme interés práctico que presenta la hidrólisis enzimática de los componentes amargos de los productos cítricos, requiere disponer de una preparación enzimática purificada y libre de enzimas contaminantes.

La naringinasa es una enzima que no se encuentra en abundancia en la naturaleza. De hecho, no se ha detectado su presencia en el reino animal, mientras que en el vegetal tan sólo se ha detectado en cítricos (en la región comprendida entre el flavedo y el albedo del pomelo), en las semillas de apio (17, 18), y en las hojas del árbol Citrus decumana (19). Sin embargo, el aislamiento y purificación de la actividad hidrolizante de naringina de las dos últimas fuentes condujo a una preparación que era capaz de hidrolizar la naringina a naringenina y el disacárido intacto, debiendo pues considerarse dicha enzima como una  $\beta$ -glucosidasa, y no realmente como naringinasa, ya que no estaba presente la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa.

Dado que las cantidades extraíbles de la enzima naringinasa de fuentes de origen vegetal son muy pequeñas, fué evidente desde un primer momento, que se necesitaba otra fuente distinta capaz de producir la enzima en cantidades suficiente

tes para su aplicación práctica. Por ello, cuando se encontró que una preparación comercial de enzimas pécticos de origen fúngico denominada Pectinol 100-D (de Rohm and Haas Co.), era capaz de hidrolizar completamente la naringina en disolución acuosa a ramnosa, glucosa y naringenina (19), los estudios sobre obtención de enzimas de origen fúngico, se dirigieron hacia el aislamiento, purificación y comercialización de nuevas preparaciones enzimáticas de naringinasa. Efectivamente, ciertos cultivos de microorganismos, principalmente del reino Fungi, han resultado ser las mejores fuentes de naringinasa. En ellos, se induce la síntesis de la enzima haciéndolos crecer en un medio de cultivo que contiene naringina, pudiéndose realizar este proceso a escala industrial. Es así como se han obtenido muchas preparaciones enzimáticas de naringinasa: "Naringinasa C" (20), "Kumitanase" de Aspergillus niger (7,11,21-25), "Sclase" de Coniothyrium diplodiella o "Sankyo Naringinase" de Aspergillus usamii mut. shirousamii (26).

La purificación de la preparación enzimática a utilizar, tanto para una caracterización completa de la enzima, como para la aplicación práctica consecuente, es una etapa decisiva en la obtención de la enzima. En este tipo de preparaciones enzimáticas suelen estar presentes enzimas pécticas, que se ponen de manifiesto porque reducen considerablemente la viscosidad del zumo; sin embargo su presencia no es deseable ya que pueden romper el sistema hidrocoloidal complejo que mantiene a los componentes del

zumo en suspensión, por lo que el procedimiento más usual para la obtención de una preparación enzimática satisfactoria incluye la separación de estas enzimas contaminantes. En primer lugar se selecciona el cultivo que presenta la mayor actividad naringinasa, que se hace crecer en un medio con nutrientes adecuados para la producción de la enzima, ya que esta no es sintetizada por el microorganismo en condiciones normales. Seguidamente, se efectúa una purificación parcial por tratamiento de los extractos del cultivo con alcohol para precipitar las proteínas, para a continuación filtrar y secar el precipitado proteico obtenido con aire (20). La eliminación de las enzimas pécticas se realiza por diferencia de solubilidad de las glicosidasas y pectinasas en disolución alcohólica (27) o por inactivación diferencial de las pectinasas a pH 8 y 37°C (28). En líneas generales éste es el tratamiento para conseguir una preparación enzimática, aunque puede diferir ligeramente según la fuente de partida. Sin embargo, en ningún caso se especifica en la bibliografía el criterio para determinar la pureza de las naringinasas así obtenidas, empleándose normalmente estas preparaciones en los ensayos analíticos.

#### 2.4.- PROPIEDADES

Una vez que ha sido obtenida una preparación enzimática de naringinasa y antes de su aplicación práctica en el desamargado de cítricos y sus derivados, se requiere un conocimiento previo de las características moleculares y cinéticas de la enzima. Sin embargo, en la bibliografía disponible no se ha encontrado una caracterización completa de la naringinasa en sentido estricto, sino mas bien estudios de las condiciones óptimas de actuación de la enzima para llegar a un grado de hidrólisis de la naringina satisfactorio para eliminar el amargor del zumo. Tan sólo en un caso, existe una referencia bibliográfica que menciona la separación, mediante técnicas electrocromatográficas (29), de las dos actividades enzimáticas de la naringinasa. Puesto que dichas actividades se determinaron en fracciones asociadas a dos bandas de proteína diferentes, es obvio deducir, que la naringinasa contiene como mínimo dos tipos de cadenas polipeptídicas diferentes. Sin embargo, en dicho trabajo no se llegó a ninguna conclusión en ese aspecto, dedicándose los autores tan sólo a ensayar la idoneidad de diferentes ramnósidos, glucósidos y ramnoglucósidos de flavanonas como sustratos para cada una de las actividades. En tales condiciones la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa se expresó preferentemente frente a los ramnoglucósidos, siendo muy baja cuando la ramnosa se halló unida directamente al aglicón (29).

Fuera de esta referencia bibliográfica, la naringinasa parece comportarse como una única especie frente a los procedimientos de purificación empleados normalmente (precipitación con sulfato amónico o etanol), no habiéndose tampoco referenciado la posibilidad existente de que se separen las dos actividades al añadir urea o incubar a temperaturas de 50°C, tratamientos ambos usualmente empleados en las preparaciones enzimáticas de naringinasa para eliminar las actividades asociadas a enzimas pécticas (20, 22, 23, 26, 30).

Asimismo, tampoco existen referencias bibliográficas en cuanto a tamaño molecular, punto isoeléctrico, existencia de subunidades, o información relacionada con la estructura de la proteína (espectros UV-Vis, o de fluorescencia, extinción de fluorescencia, etc.), o con los aminoácidos que pudieran participar en el centro catalítico.

En cuanto a las propiedades catalíticas de la enzima es necesario decir que, en la mayoría de los casos, las determinaciones cinéticas se han realizado siguiendo el método de Davis (31). Este método, tal y como se discutirá más adelante en el apartado correspondiente, no permite diferenciar entre naringina y prunina, sustrato y producto, respectivamente, de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, por lo que las medidas de actividad referenciadas son

un reflejo de la diferencia entre el contenido de naringina más prunina y el de naringenina en el medio de reacción. De igual forma, la determinación de grupos reductores como medida de la actividad enzimática (32, 33) refleja una mezcla de las dos actividades enzimáticas presentes en la naringinasa, ya que el método colorimétrico de Nelson-Somogyi no diferencia entre ramnosa y glucosa (22, 23).

Teniendo en cuenta estos condicionamientos, los datos de la bibliografía pueden servir para situar aproximadamente las condiciones óptimas para la expresión de la actividad de la enzima así como para establecer, igualmente de forma aproximada, sus parámetros cinéticos. Así, por ejemplo, la enzima extraída de la semilla de apio hidroliza la naringina "in vitro" a pH 7 y 37°C (17), condiciones que difieren bastante de las encontradas para la mayoría de las preparaciones enzimáticas referenciadas : rangos de pH óptimos de 3,5 a 5,0, y de temperatura de 50° a 60°C (10, 19, 20, 34). Tal sucede para la naringinasa obtenida a partir de Coniothyrium diplodiella que muestra unas condiciones óptimas que están dentro del rango citado : pH 4,2 y temperaturas entre 60 y 65°C, al igual que para los estudios realizados con la enzima de Aspergillus niger, en los cuales se obtuvieron valores semejantes (22-25, 35). La constancia de estos valores se mantuvo también en el único caso referenciado de separa-

ción de las dos actividades de la naringinasa por electrocromatografía (29); se determinó en tal caso un pH óptimo de 4,5 y una temperatura óptima de 60°C para la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, y un pH de 4,7 y temperatura óptima de 58°C para la actividad  $\beta$ -glucosidasa.

Por otra parte, mientras que existen multitud de referencias bibliográficas sobre el efecto del pH del medio y de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de la naringinasa, es muy escasa la información disponible sobre la variación de la actividad enzimática con la cantidad de enzima, el periodo de incubación óptimo o la estabilidad al almacenamiento, y nula respecto al efecto de la fuerza iónica sobre la expresión de la actividad de la naringinasa.

Por lo que se refiere a los parámetros cinéticos de la enzima es manifiesta la parquedad y diversidad de datos bibliográficos; además, estos hay que analizarlos con precauciones ya que han sido obtenidos empleando el método Davis en la mayoría de las ocasiones. Por ejemplo, se han publicado valores de constante de Michaelis frente a naringina como sustrato comprendidas entre 0,64 y 2,20 mM (22-24, 35), mientras que la dispersión de valores para velocidad máxima es aún mayor. Teniendo en cuenta que la fuente de enzima y el grado de pureza es diferente en cada caso, tales

resultados no son de extrañar. Así, para naringinasa extraída y purificada de un cultivo de Aspergillus niger, la actividad máxima calculada fué de 74 U/mg (22, 23), mientras que una preparación comercial de naringinasa de la misma fuente dió 78 U/g (24); la purificación por cromatografía en DEAE-Sephadex y precipitación por alcohol de dicha preparación comercial, hizo subir la actividad hasta 375 U/mg (24).

Por otra parte, cuando se ha hecho actuar la enzima naringinasa sobre la naringina presente en un jugo o zumo de cítrico, la observación general realizada es que se produce un descenso de la actividad enzimática. Teniendo en cuenta el interés comercial de la enzima naringinasa, algunos autores han tratado de estudiar el efecto de ciertos componentes particulares de los zumos sobre la actividad enzimática. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el estudio se ha restringido al aspecto puramente cualitativo, ya que no se citan valores de constantes o tipos de inhibición. Así, por ejemplo, se ha publicado que el citrato (19, 25, 26, 35), glucosa (20, 24, 25), sorbitol (26), fructosa (26, 35) y sacarosa (25) inhiben la actividad naringinasa, aunque otros autores han publicado que la fructosa, sacarosa o ácido málico no son inhibidores (25). En el caso del citrato, el efecto inhibitor parece ser claramente dependiente del pH al que se realizó la medida de actividad (19, 24, 35).

En cuanto a las especies que participan en la propia reacción enzimática, la ramnosa aparece como un inhibidor poco potente (19, 35) o muy potente (36) dependiendo de la preparación enzimática utilizada, mientras que tanto la prunina (36) como la naringenina (19) parecen tener poco efecto inhibidor sobre la actividad de la naringinasa.

Mientras que la mayoría de los investigadores se han centrado en la caracterización y estudio de las propiedades de la naringinasa "in vitro", otros se han dedicado al estudio fisiológico de los cambios del fruto con la disminución del contenido de naringina. Así, se ha estudiado (37, 38) la posibilidad de desamargar el fruto "in situ", inoculándolo con naringinasa, prestándose también atención a los cambios en el aroma y textura del mismo que acompañan dicho tratamiento. Sin embargo esta técnica ha tenido poca aceptación y raramente es utilizada en la práctica.

## 2.5.- METODOS DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CATALITICA

La medida de la actividad naringinasa implica la determinación individualizada de las actividades  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, y la cuantificación de la contribución de cada una de ellas a la actividad global de la enzima. Este es un hecho que habitualmente no se especifica en la bibliografía cuando se habla de la actividad naringinasa.

La actividad  $\alpha$ -ramnosidasa se puede determinar siguiendo la desaparición de naringina, o la aparición de prunina o ramnosa en el medio (si se emplea el sustrato natural naringina), mientras que la actividad  $\beta$ -glucosidasa se podría seguir a través de la desaparición de prunina o aparición de glucosa y naringenina, sin embargo, para esta última actividad se ha recurrido frecuentemente al uso de sustratos sintéticos, tipo salicina (fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido) u o-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido.

El seguimiento exclusivo de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa a través de la aparición de ramnosa se podría llevar a cabo mediante el uso de un sistema enzimático adicional, la ramnosa deshidrogenasa, que permite seguir fotométricamente la producción de ramnosa por la aparición acoplada de NADH (39). La mayor desventaja del método estriba

en el elevado coste del cofactor  $\text{NAD}^+$  , así como el originado por la necesidad de emplear una enzima adicional, por lo que su uso no está estudiado.

Sin embargo, el método más ampliamente utilizado en la determinación de la actividad naringinasa es el propuesto por Davis (31), o algunas de sus modificaciones (40, 41). El método Davis se basa en la formación de un producto coloreado cuando reacciona naringina con dietilenglicol en un medio fuertemente alcalino. Dicha coloración se puede medir fotométricamente a 410 nm y su intensidad es proporcional al contenido en naringina de la muestra. La naringenina, producto final de la actividad hidrolítica de naringinasa, desarrolla mucho menos color en las mismas condiciones, por lo que según Davis, es posible seguir el curso de la hidrólisis de naringina por comparación del color con las curvas estándar preparadas a partir del ramnoglucósido y del aglicón a una temperatura dada. Sin embargo, otras muchas sustancias interfieren dando el mismo color, tales como flavonas, flavonoles, citral, furfural, geraniol, etc., e incluso el producto de la primera actividad de naringinasa, prunina, por lo que el test de Davis no es un método fiable para la caracterización de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, ya que los resultados que se obtienen reflejan la desaparición de naringina y prunina de forma conjunta. Esta limitación, que es importante por cuanto lo que se mide es un reflejo de la actividad global de

naringinasa, y específicamente de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, ya que esta actividad es la limitante de velocidad en el proceso de hidrólisis total, ha sido considerada desde hace mucho tiempo (20) como una clara desventaja del método de Davis en su aplicación a la determinación de la actividad naringinasa, y curiosamente es el método que más se ha empleado y aún se sigue empleando para tal fin.

La interferencia de la prunina se ha eliminado mediante extracción selectiva de este componente en acetato de etilo (40), aplicándose posteriormente el test de Davis a la mezcla de reacción así tratada. Sin embargo, el problema sigue siendo el mismo, por cuanto solo se mide la actividad global de la naringinasa.

Para solventar estos problemas, han aparecido diversas alternativas basadas esencialmente en la separación de los componentes de la reacción por cromatografía de capa fina (29, 42, 43) y cuantificación posterior de los productos separados, bien por el método de Davis, ahora ya sin ninguna interferencia para cada uno de los flavonoides, bien por espectrofotometría a 280 nm, o por fluorodensitometría, que mide directamente las intensidades de fluorescencia en el cromatograma (36). Pero todos ellos son métodos muy laboriosos y complicados, sin dejar de estar sujetos a error. Más tediosas aún son las técnicas que implican

dos experimentos consecutivos para la obtención de un único valor de actividad enzimática, como la combinación del método clásico de Davis y la determinación del contenido en aldohexosas liberadas en la reacción con o-aminodifenilo (32, 33).

Sin duda alguna, el método más preciso de los que actualmente se emplean para cuantificar el contenido en naringina de cítricos y demás productos derivados, es la cromatografía líquido-líquido de alta resolución (HPLC), pero su gran problema es el elevado coste económico que implica su utilización. Fué en 1974 (44) cuando se publicó la primera aplicación práctica de HPLC en análisis de flavonoides. En este método es esencial el uso del eluyente adecuado; los primeros utilizados fueron mezclas metanol-ácido acético-agua (30:5:65 V/V) sobre una columna de C<sub>18</sub> adecuada para la resolución de estos flavonoides. Posteriormente, se ha realizado una modificación de este método (45), utilizando una columna  $\mu$  Boundapak C<sub>18</sub> y como eluyente una mezcla agua-acetonitrilo (80:20, V/V); de esta manera se obtienen valores para la concentración de naringina en el pomelo y sus derivados, que son aproximadamente el doble de las encontradas utilizando el método Davis. Actualmente, todas las referencias bibliográficas que se encuentran acerca de la cuantificación de naringina y otros flavonoides en zumos y derivados cítricos, hacen uso de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (46-53).

## 2.6.- NARINGINASA INMOVILIZADA

La adición de preparaciones comerciales de naringinasa a zumos y jugos cítricos para proceder a su desamargado, plantea algunos problemas. En primer lugar, el producto final se encuentra contaminado por los propios componentes de la preparación enzimática, pectinasas principalmente; ello, y la inhibición de la actividad enzimática por los propios productos de la reacción, así como por los componentes del medio de reacción, supone un costo adicional al uso de naringinasa en forma soluble para el desamargado de zumos y demás derivados cítricos.

La inmovilización de la enzima en soportes sólidos por enlaces físicos o químicos o bien su retención por medio de una membrana o un medio poroso permitiría solventar algunas, si no todas, las desventajas mencionadas para el uso de la enzima soluble (54).

A pesar de ello, las primeras referencias sobre inmovilización de naringinasa son relativamente recientes. En 1971 se publicó el primer artículo sobre la obtención de derivados insolubles en agua de naringinasa (55). La enzima se inmovilizó por oclusión en copolímeros

de anhídrido maleico con distintos etilenos sustituidos y hexametilendiamina. Los derivados inmovilizados mostraron una disminución de la actividad enzimática del 55-85% como consecuencia de la inmovilización y además perdían el 90% de la actividad cuando actuaban de forma continua sobre zumos de cítricos. En los cinco años posteriores se han patentado distintos sistemas de naringinasa inmovilizada para desamar-gar zumos de pomelo con poco rendimiento (56-59) debido tanto a la baja actividad y estabilidad de los derivados obtenidos como al hecho de que la naringina se adsorbía a los soportes usados.

Los mejores resultados se han obtenido cuando se ha inmovilizado naringinasa bien por adsorción en DEAE-Sephadex (22), o en tanino-amino-hexilcelulosa (23), o bien por unión covalente a vidrio poroso con glutaraldehído (24) o a quitina usando glutaraldehído y borohidruro sódico (35).

Todos estos derivados inmovilizados presentaron buena estabilidad operacional cuando actuaron sobre disoluciones acuosas de naringina; sin embargo, dicha estabilidad decreció drásticamente cuando se les hizo actuar sobre jugos de Natsudaidai, variedad de naranja amarga usada comúnmente para la obtención de zumos. De todas formas, el mejor de los derivados de naringinasa obtenidos se dió cuando se

usó como soporte tanino-aminohexilcelulosa. El derivado obtenido permitió desamargar 1600 toneladas de jugo de Natsudaidai durante un mes, usándose para tal fin un reactor de lecho fijo con 50 kg de derivado inmovilizado.

La disminución de la actividad observada cuando se utiliza naringinasa inmovilizada para desamargar zumos cítricos, se debe probablemente a una o varias de las causas siguientes : contaminación física del catalizador, inhibición de la enzima por algunos compuestos presentes en el zumo (por ejemplo citrato o glucosa) o por la desorción de la enzima del soporte. Ultimamente, este problema de pérdida de enzima se ha solventado ocluyendo la enzima en membranas de fibras huecas polisulfónicas anisotrópicas (13, 60), siendo los resultados obtenidos, a nivel de laboratorio, muy esperanzadores.

En general, la inmovilización de naringinasa en los soportes mencionados anteriormente, se ha caracterizado, respecto a la enzima soluble, por una ampliación del rango de pH en el que la enzima mostró actividad, aunque su pH óptimo no resultó alterado, y por un incremento de 10-15°C en la temperatura óptima de actuación y de dos veces superior en la estabilidad térmica. La constante de Michaelis disminuyó en todos los casos como consecuencia de la inmovilización, variando

entre 0,48 y 0,86 mM para el sustrato naringina.

Como ya se ha dicho, la característica más importante del uso de los derivados de naringinasa inmovilizada descritos en la bibliografía, reside en la pérdida brusca de actividad operacional al actuar sobre zumos naturales o reconstituidos. Es, por tanto, necesario obtener derivados inmovilizados que aseguren la unión de la enzima al soporte a través del suficiente número de enlaces covalentes de tal forma que se minimice la pérdida de enzima y, a la vez, permitan mantener la conformación nativa de la misma con la suficiente flexibilidad como para permitir la acción catalítica.

## 2.7.- DIFUSION Y REACCION EN SISTEMAS DE ENZIMAS INMOVILIZADAS

La similitud fenomenológica de los sistemas catalíticos heterogéneos en ingeniería química (61, 62) con los biocatalizadores inmovilizados en biotecnología (63-65) ha sido importante para el desarrollo del análisis cinético de estos últimos. El interés en investigar los factores que influyen en su comportamiento cinético es debido al uso creciente de los biocatalizadores inmovilizados (células y enzimas) con fines analíticos y sintéticos (66, 67).

Hay que hacer notar, que los estudios de enzimas inmovilizadas son importantes, además, para comprender el comportamiento "in vivo" de ciertas enzimas, dado que muchas de ellas actúan embebidas en membranas o adosadas a partículas subcelulares. Así, con el auxilio de modelos simples en los cuales las enzimas están atrapadas en, o adheridas a, soportes sintéticos o membranas es posible describir y estudiar fenómenos similares a los que tienen lugar en sistemas naturales (68, 69).

La velocidad de conversión del sustrato por enzimas inmovilizadas tanto en sistemas naturales como artificiales, depende de la velocidad de transferencia del sustrato hasta el interior de la partícula biocatalítica donde se encuentran localizadas las moléculas de enzima; y la velocidad así observada y medida, puede ser considerablemente distinta a la velocidad correspondiente a la misma cantidad de enzima pero en disoluciones homogéneas. Además, cuando una enzima está unida a un soporte sólido, el modelo cinético del proceso también puede cambiar considerablemente, lo que conduce a cambios en los valores de los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{MAX}$ . La ecuación cinética real de tales sistemas es difícil de obtener, ya que resulta complicado cuantificar parámetros tales como cambios en la conformación de la misma provocados por la modificación química, microambiente que rodea a la molécula de enzima, impedimentos estéricos de la matriz, efectos del microentorno sobre la acción catalítica, o efectos de la difusión interna y externa.

Por ello, los parámetros cinéticos observados son sólo efectivos, siendo reflejados a su vez por el uso de constantes cinéticas aparentes  $K_M$  y  $V_{MAX}$ .

Al considerar una reacción catalizada por enzimas inmovilizadas, hay que tener en cuenta, fundamentalmente, tres etapas a través de las cuales el sustrato se convierte en producto. En primer lugar, el sustrato que se encuentra en el seno de la disolución externa a la partícula de derivado, debe ser transportado hasta la superficie del soporte donde se encuentra inmovilizada la enzima. A continuación, el sustrato debe difundirse a través de los poros de la partícula, para, finalmente ser convertido enzimáticamente en producto. El producto así formado, deberá difundirse a su vez hasta la superficie exterior del soporte, siendo entonces transportado hasta el seno de la disolución (70).

Si la enzima se encuentra inmovilizada sólo en la superficie exterior de la partícula, únicamente existe resistencia a la difusión externa; si, por el contrario, la superficie catalíticamente activa está situada también en el interior de la partícula, la velocidad de conversión puede estar limitada indistintamente por una resistencia a la difusión externa, por una interna o, incluso, por ambas (71). Estos fenómenos, muchas veces, no son

reconocidos por los investigadores, pudiendo causar marcadas diferencias en la medida de propiedades cinéticas que todos ellos realicen.

Mientras que las limitaciones difusionales externas son frecuentemente pequeñas y pueden hacerse despreciables mediante una eficiente mezcla del seno de la disolución, el efecto de la difusión interna sobre el comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas en un soporte poroso puede ser muy significativo. A menudo, la mejor manera de reducir experimentalmente las limitaciones difusionales internas, consiste en disminuir el tamaño de las partículas del soporte o la actividad del derivado inmovilizado. Así, la influencia de la difusión interna se ha demostrado variando el espesor de una película de poliacrilamida (72) y membranas de colodión (73) o el diámetro de los poros de partículas de vidrio (74) y Sephadex (75), que se han usado como soportes de las enzimas. En concordancia con la teoría, un aumento en la longitud característica, determina la correspondiente disminución en el factor de eficacia. Sin embargo, en algunos casos, estas alternativas no son convenientes o posibles, y es preferible entonces usar técnicas que permitan calcular las constantes cinéticas intrínsecas a partir de datos obtenidos en condiciones de limitaciones difusionales internas.

En estas condiciones, se han propuesto métodos de cálculo para determinar los valores intrínsecos de velocidad máxima y constante de Michaelis, métodos que han sido recopilados por algunos autores (65). Debido a la complejidad del tratamiento matemático, no resulta sorprendente que todos estos métodos presenten dificultades cuando se pretenden aplicar. Uno de los casos (76), por ejemplo, se cumple sólo si la representación de los datos experimentales por los métodos gráficos estandar conduce a líneas rectas, resultado que no siempre se puede alcanzar (77, 78). En otras ocasiones (79), se puede determinar la velocidad máxima intrínseca, sólo si previamente se conoce la constante de Michaelis intrínseca.

Los métodos más comunmente empleados (77, 78, 80, 81) son aquellos en los que la velocidad máxima se estima en base a elevar la concentración de sustrato en el seno de la disolución hasta niveles a los que la enzima inmovilizada se encuentra saturada, independientemente de las limitaciones difusionales. Obviamente, este procedimiento presenta dificultades de aplicabilidad cuando se trabaja con sustratos relativamente insolubles o con enzimas que presentan un valor de  $K'_M$  elevado. Adicionalmente, para determinar la  $K'_M$ , estas técnicas requieren disponer de un número elevado de puntos experimentales a bajas concentraciones de sustrato, en cuyo caso las limitaciones

difusionales son notables. El cumplimiento de esta condición se halla además dificultado experimentalmente, ya que las velocidades de reacción observadas en estas condiciones son pequeñas y por lo tanto difíciles de determinar.

Otra posibilidad para evaluar los parámetros cinéticos intrínsecos estriba en partir de datos experimentales obtenidos operando en un reactor integral, es decir, con una conversión de salida elevada sin necesidad de reciclo, abarcando un rango lo suficientemente amplio de caudales y concentraciones de sustrato. Sin embargo es necesario disponer de un modelo de diseño del reactor que considere adecuadamente la interacción existente entre la reacción y la difusión interna. Este método se basa en minimizar la suma de los cuadrados de las diferencias existentes entre las predicciones del modelo y los resultados experimentales, según una función de la forma :

$$\sigma = \sum_{i=1}^n (X_{i(\text{model})} - X_{i(\text{exp})})^2 \quad (1)$$

donde  $X_{i(\text{model})}$  es la conversión predicha por el modelo,  $X_{i(\text{exp})}$  es la obtenida experimentalmente y  $n$  es el número de experimentos realizados. La serie de valores de los parámetros cinéticos que

minimizan la función  $\sigma$  es considerada como estadísticamente la mejor (65).

Los efectos de la transferencia de materia dentro de una estructura porosa fueron analizados cuantitativamente por primera vez por Thiele en Estados Unidos, Damköhler en Alemania y Zeldovitch en Rusia, en el periodo comprendido entre los años 1937 y 1939 (82). El resultado más importante de estos análisis es la descripción cuantitativa del factor que determina la eficacia de un catalizador. El factor de eficacia, generalmente denominado  $\eta$ , se define como la relación entre la velocidad de reacción real observada y la que se mediría en ausencia de efectos difusionales. Este parámetro se emplea normalmente para determinar si las reacciones químicas o bioquímicas que usan catalizadores que se encuentran en un soporte sólido poroso, se hallan limitadas por difusión en el poro y/o en la partícula.

Los modelos de enzimas inmovilizadas que se han usado para describir cuantitativamente la interacción de la reacción química con la difusión interna se han restringido, usualmente, a una membrana porosa (83, 84), o a partículas esféricas (85), conteniendo una enzima distribuida uniformemente. Afortunadamente, estos modelos pueden generalizarse a partículas de diferentes geometrías e incluso formas irregulares, siempre que se defina

correctamente la longitud característica de los mismos (86). En tales casos, se plantea una ecuación diferencial no lineal, que únicamente tiene soluciones analíticas en los casos límite de cinéticas de orden cero y uno, obteniéndose las siguientes expresiones para el factor de eficacia en ambos casos (74) :

Cinética de primer orden :

$$\eta = \frac{3}{\phi} \left( \frac{1}{\tanh \phi} - \frac{1}{\phi} \right)$$

Cinética de orden cero :

$$\eta = 1 \quad \text{si} \quad \phi \leq \sqrt{6/\beta'}$$

$$\eta = 1 - \rho_e^3 \quad \text{si} \quad \phi > \sqrt{6/\beta'}$$

donde :

$$\phi = R \sqrt{\frac{V'_M}{\text{Deff.} \cdot K'_M}} \quad , \quad \beta' = \frac{K'_M}{C_{SR}}$$

Y  $\rho_e$  viene definido por la siguiente expresión :

$$\phi^2 \beta' = \frac{3}{(1 - \rho_e) \left[ 1/2 (1 + \rho_e) - \rho_e^2 \right]}$$

Bajo estos supuestos, las ecuaciones obtenidas para la velocidad global de reacción a bajas y altas concentraciones de sustrato son, esencialmente, las mismas que las formuladas en la bibliografía de ingeniería química (87-91).

Sin embargo, para cuando se desea analizar el rango completo de la cinética del tipo Michaelis-Menten, se han propuesto expresiones analíticas en forma de desarrollos en serie (92, 93), aunque estos resultados son de valor limitado en la práctica. De hecho y muy frecuentemente, las ecuaciones diferenciales que se obtienen han sido resueltas mediante cálculo numérico, y los resultados presentados en términos de cantidades adimensionales de modo que la interacción de la difusión interna con la reacción química viene caracterizada por módulos adimensionales. Algunos autores, han definido estos módulos de manera que sean una función de la concentración de sustrato (76, 84), mientras que en otros tratamientos los módulos se han hecho depender, solamente,

de parámetros cinéticos y de transporte (94-97).

La mayoría de los investigadores han resuelto el problema de reacción química con limitaciones difusionales internas en el caso de que la reacción enzimática obedezca a una cinética del tipo Michaelis-Menten simple. En estos casos los resultados se presentan, normalmente, en forma de curvas generalizadas del factor de eficacia frente a dos módulos adimensionales que engloban las constantes cinéticas intrínsecas, la difusividad efectiva y la concentración de sustrato (84, 98).

El factor de eficacia es el parámetro cuya determinación presenta mayores dificultades, si bien en algunos casos determinados se ha recurrido a soluciones ingeniosas o particulares para su obtención. Por ejemplo, Moo-Young y Kobayashi (84) han obtenido una expresión para el factor de eficacia, en función de los que se pueden deducir en los casos límite de cinéticas de orden cero y uno, dicha expresión adopta la siguiente forma :

$$\eta = \frac{\eta'_0 + \beta' \eta'_1}{1 + \beta'}$$

donde:

$\eta_0'$  = factor de eficacia para cinética de orden cero.

$\eta_0'$  = factor de eficacia para cinética de primer orden.

Este método aproximado simplifica el cálculo de los factores de eficacia para cinéticas del tipo Michaelis-Menten simple, puesto que evita el uso de métodos numéricos de resolución y, según sus autores, proporciona valores de  $\eta$  que no se desvían de forma ostensible con los obtenidos mediante la resolución de la ecuación diferencial por cálculo numérico. Los resultados de las simulaciones de otros autores permiten obtener los perfiles de concentración en el interior de las partículas de catalizador (99).

Sin embargo, y aunque muchos sistemas bioquímicos pueden caracterizarse por una cinética del tipo Michaelis-Menten simple, son de gran importancia otros tipos de cinéticas más complejas tales como aquellas que consideran inhibición por sustrato, por productos o reacciones reversibles. En estos casos la ecuación diferencial que describe la interacción de la reacción con la difusión interna tiene que resolverse también por métodos numéricos más o menos sofisticados, y los módulos adimensionales definidos se complican más que en el caso de la cinética Michaeliana.

Hay que tener en cuenta que las resistencias difusionales causan no sólo el agotamiento del sustrato, sino también la acumulación de producto en el microentorno de las enzimas inmovilizadas. Como resultado, la inhibición de la reacción enzimática por uno o varios productos es más pronunciada en presencia que en ausencia de limitaciones difusionales. Sólo unos pocos autores (84, 100, 101) han realizado el tratamiento cuantitativo del efecto combinado de disminución de sustrato y acumulación de producto en el microentorno y su repercusión en el comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas.

Por otra parte la inhibición por sustrato es otro tipo de inhibición enzimática que se supone juega un papel importante en la regulación del metabolismo intracelular. Para una reacción enzimática que es inhibida por sustrato, el factor de eficacia puede rebasar la unidad, a la vez que el sistema puede presentar múltiples comportamientos de estado estacionario. Bajo ciertas circunstancias, la disminución de la velocidad de reacción causada por la inhibición por sustrato dentro de la partícula, es menor que la disminución causada por la pérdida de concentración debida a las limitaciones difusionales. Así, la velocidad en el interior de la partícula es mayor en estos casos que cuando no existiera limitación a la difusión interna y hubiera la misma concentración de sustrato que en el seno de la disolución. Al igual que sucedía en el caso de la reacción inhibida por producto, apenas se encuentran

referencias bibliográficas en las que se resuelva este problema, y sólo algunos autores (84, 101, 102) obtienen curvas generalizadas del factor de eficacia para este caso.

En la bibliografía disponible apenas se han encontrado trabajos que realicen un análisis generalizado de los factores de eficacia cuando las reacciones enzimáticas transcurren según una cinética de Michaelis-Menten reversible; sino que consideran únicamente los problemas de limitaciones difusionales externas (103-105). Sin embargo, sí se encuentran trabajos que hacen referencia a sistemas catalíticos heterogéneos no enzimáticos con cinéticas de este tipo. De esta manera, Smith y Amundsen (106) realizaron estudios teóricos y experimentales de la hidrólisis de formiato de etilo sobre Dowex-50, una resina de cambio catiónico, sistema en el que debe tenerse en cuenta también la reacción inversa. Para una reacción simple reversible de primer orden, estos autores obtienen la misma función del factor de eficacia que la que se puede obtener para una cinética irreversible, variando únicamente el valor del módulo adimensional  $\phi_L$  o módulo de Thiele. En otro caso particular (107) se ha desarrollado un método gráfico generalizado para calcular los factores de eficacia en una geometría plana, para una reacción simple reversible que siga una cinética de Langmuir-Hinshelwood.

El único trabajo conocido en el que se obtiene el factor de eficacia en estado no estacionario para reacciones enzimáticas del tipo Michaelis-Menten reversible (108), ha sido realizado estudiando la hidrólisis de lactosa por  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en una resina de fenolformaldehído. Estos autores tienen en cuenta en su estudio las limitaciones difusionales tanto externas como internas, concluyéndose de sus investigaciones que son estas últimas las predominantes, pudiendo despreciarse las primeras debido a la eficiente mezcla existente en el dispositivo experimental utilizado. Las ecuaciones diferenciales planteadas en este caso, se resuelven utilizando el método de las diferencias finitas, pero sin embargo, los valores del factor de eficacia obtenidos, no se presentan en forma de curvas generalizadas sino que son utilizados en el diseño de un reactor tanque discontinuo, en el que el volumen de catalizador es muy inferior al volumen total del reactor. Como ha sido discutido por otros autores (109), cuando el volumen de partículas catalíticas es inferior al 10% del volumen total del reactor, el factor de eficacia obtenido realizando el estudio en estado no estacionario, es aproximadamente igual que el obtenido en estado estacionario, puesto que, en estos casos, la acumulación de producto en el interior de las partículas de catalizador es despreciable.

## 2.8.- DISEÑO Y SIMULACION DE REACTORES EN PROCESOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS

En procesos con enzimas inmovilizadas pueden usarse diferentes tipos de reactores. Básicamente se pueden clasificar, según el modo de operación, en reactores discontinuos (o por cargas) y continuos.

El reactor tanque discontinuo (BR), es el más simple de todos, necesita poco equipo adicional y está especialmente indicado para estudios experimentales a pequeña escala. El mayor problema se plantea en la operación de recuperación de la enzima, que debe realizarse mediante filtración o ultrafiltración, pudiendo producirse entonces la inactivación del biocatalizador (110). Se encuentran en la bibliografía pocos artículos en los que se haga referencia al uso de este tipo de reactores para procesos con enzimas inmovilizadas de interés práctico (111, 112).

Los dos tipos principales de reactores continuos son el reactor tubular de lecho fijo (PBR) y el reactor tanque continuo agitado (CSTR). Un híbrido entre estos dos es el reactor de lecho fluidizado (FBR).

En un CSTR ideal, el contenido del reactor está perfectamente mezclado y, por lo tanto, la composición del medio es igual en cualquier punto del reactor; así, la velocidad de reacción se determina a partir de las concentraciones de sustrato y de producto en la corriente de salida. Este tipo de reactores se emplea mucho en aplicaciones con sistemas de enzimas inmovilizadas (113-117); para su correcto funcionamiento es necesario dotarlo de un filtro en la salida del reactor con el fin de retener en el seno de la disolución las partículas del soporte donde está inmovilizada la enzima.

Sin duda alguna, el reactor tubular de lecho fijo, (PBR), es el más ampliamente usado para este tipo de operaciones. Bajo condiciones de flujo pistón, el reactor tubular produce conversiones más elevadas que el tanque continuo agitado para un mismo tiempo de residencia (118). El relleno puede estar constituido por esferas, cápsulas, discos, escamas, cilindros etc. Algunos ejemplos representativos de tales sistemas incluyen enzimas inmovilizadas sobre vidrio poroso (119-122), esferas de resinas intercambiadoras tales como DEAE-celulosa y DEAE-Sephadex (123), discos de gel de poliacrilamida (72), láminas de polímeros (124) y escamas de membrana de colágeno (125, 126).

En este último tipo de reactores el área de contacto fluido-enzima es elevada pero, como contrapartida, pueden aparecer problemas debido a la fuerte caída de presión, sobre todo si las partículas que se introducen en el reactor tubular son deformables y/o agregativas, pudiendo además producirse una distribución irregular del flujo. Cuando los reactores de lecho fijo operan industrialmente, deben utilizarse caudales de alimentación de sustrato relativamente elevados, con los cuales poder disminuir las altas caídas de presión, así como también partículas de gran tamaño (127).

En caso de que los sustratos sean insolubles, y se encuentren en forma de partículas o coloides, pueden taponar las columnas de relleno. Este efecto se disminuirá utilizando recirculación o con un lecho fluidizado. En estos casos la alta velocidad a través del lecho reduce la posibilidad de segregación, depósito y taponamiento del reactor. En un reactor tanque continuo agitado pueden procesarse sustratos en forma de partículas usando velocidades de agitación elevadas (128).

La elección del tipo de reactor está condicionada de alguna manera por el orden de reacción que sigue la cinética característica usada en cada caso particular. Cuando la reacción enzimática es de pseudo primer orden respecto a la concentración de sustrato

( $K_M \gg C_{SRO}$ ), es preferible usar un PFR, puesto que el volumen de reactor necesario es el mismo para un CSTR que para un PFR.

Cuando existe inhibición por sustrato, ésta es mucho más acusada si se trabaja con un reactor tubular de flujo pistón. Se puede reducir alimentando el sustrato en distintos puntos a lo largo del reactor. El efecto es mucho menor en un CSTR, debido a que la enzima actúa a una concentración de sustrato idéntica a la que existe en la corriente de salida. Se puede demostrar teóricamente que cuando la inhibición por sustrato es importante, es posible la existencia de más de un estado estacionario en un CSTR bajo ciertas condiciones de operación, y puede que algunos valores de conversión sean totalmente inalcanzables (129).

El efecto de la inhibición por producto es mucho más importante, especialmente cuando se requieren conversiones elevadas. Este es más pronunciado en un reactor tanque continuo agitado que en uno de lecho fijo, puesto que la enzima se encuentra siempre expuesta a la concentración final de producto; sin embargo es muy frecuente que en un reactor tubular la presencia de un producto inhibidor reduzca drásticamente la productividad (130).

Conocida la cinética de la reacción y el tipo de reactor a emplear, es posible realizar un acercamiento matemático al comportamiento de dicho sistema mediante la realización del correspondiente modelo matemático. En el desarrollo de estos modelos para reactores enzimáticos, pueden hacerse algunas suposiciones generales. Estas suposiciones, que son válidas en muchos casos de interés práctico, simplifican el análisis matemático considerablemente. Son las siguientes:

a) Puesto que la mayor parte de las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar en el rango de temperaturas fisiológicas, con bajas entalpías, el proceso en el reactor se mantendrá en condiciones isotérmicas.

b) Las partículas con las enzimas inmovilizadas se encuentran distribuidas de manera uniforme, por lo tanto, no hay, estadísticamente, variaciones significativas entre dos puntos del reactor.

c) En los reactores isotérmicos tubulares puede suponerse una contribución despreciable de la dispersión turbulenta longitudinal en relación con el transporte debido al flujo global, así como que no hay gradientes de concentración en la dirección radial.

A pesar de estas suposiciones generales que permiten simplificar el tratamiento

matemático, hay que tener en cuenta que cuando una enzima está atrapada en una matriz portadora, sus propiedades se alteran significativamente modificándose la actividad enzimática. Quizá el más relevante de todos estos efectos es la transferencia de materia del sustrato y de los productos; por lo tanto, es importante discutir el diseño del reactor enzimático afectado por el problema de la transferencia de materia. Muchos de los procedimientos de la catálisis heterogénea convencional son aplicables a los sistemas de reactores con enzimas inmovilizadas (131).

Datos obtenidos con reactores enzimáticos de laboratorio, revelan la presencia de resistencias a la transferencia de materia en el transporte del sustrato fuera y dentro del sistema enzimático inmovilizado (132-138). La cinética aparente de la reacción se ha observado que depende de la velocidad de flujo (velocidad lineal) de sustrato en el lecho. La constante de Michaelis aparente, varía con dicha velocidad de flujo, aproximándose al valor de  $K'_M$  de la enzima libre a velocidades muy altas (139-140). También influyen profundamente en las velocidades de reacción cambios en los tamaños de partícula de los derivados inmovilizados (141-144), estableciendo así el papel de los efectos difusionales en el poro. Un estudio experimental detallado ha mostrado claramente que las ecuaciones de diseño de los reactores ideales basadas en la cinética de Michaelis-

-Menten no son adecuadas, en general, para explicar muchas de las observaciones experimentales (145). Es, por lo tanto, necesario desarrollar modelos matemáticos que expliquen cuantitativamente la combinación de los efectos difusionales y la reacción química.

Para un sistema de reacción dado, el factor de eficacia depende inversamente del tamaño de la partícula. Se ha estimado que partículas extremadamente finas, de 30  $\mu$  ó menos de diámetro y tamaño de poro medio menor de 2000 Å, pueden usarse sin tener en cuenta las barreras difusionales en los poros en un sistema inmovilizado vidrio poroso-glucosa oxidasa (144).

Debido a que la concentración de sustrato en un CSTR es igual a la concentración en la corriente de salida, está claro que los efectos de la difusión interna en la velocidad de reacción son mayores en un reactor tanque contínuo que en un PFR, donde existe un rango de concentraciones de sustrato desde el valor inicial de la alimentación hasta el valor final en la salida. Por lo tanto, para reacciones catalizadas con enzimas inmovilizadas con limitaciones difusionales internas, es más favorable operar con un reactor tubular en flujo pistón que con un CSTR (146,147).

Para una reacción de primer orden controlada por difusión interna, en un reactor de lecho de relleno conteniendo partículas esféricas, se han obtenido fácilmente las ecuaciones de diseño del reactor. Rovito y Kittrel (144) y Bunting y Laidler (148) han obtenido factores de eficacia experimentales para diferentes tamaños de partículas. Estos valores, se han comparado con las predicciones teóricas y se ha podido ver un ajuste razonablemente bueno del modelo de pseudo primer orden.

Como se discutió anteriormente, no pueden obtenerse soluciones analíticas con cinéticas de Michaelis-Menten o más complejas debido a la no linealidad de la expresión cinética y hay que recurrir a métodos numéricos para la resolución de la ecuación diferencial.

Davidson y col. (149), se aproximan al análisis de la transferencia de materia intradifusional usando modelos cinéticos de orden cero, de primer orden y de Michaelis-Menten y comparan los valores de los factores de eficacia en los diferentes modelos. Su análisis se realiza en un reactor de lecho de relleno conteniendo escamas de membrana enzima-colágeno. A partir de datos cinéticos observados experimentalmente (por ejemplo, la conversión como una función del tiempo espacial), estos autores evalúan las constantes cinéticas. Por tanto,

suponen valores de las constantes cinéticas intrínsecas; con ellos calculan el factor de eficacia y, con él, la conversión. Si el valor predicho por el modelo es diferente del valor observado experimentalmente repiten el procedimiento con nuevos valores de velocidad máxima y constante de Michaelis intrínsecas hasta que los valores teóricos coincidan con los experimentales. Las constantes cinéticas estimadas con este método representan los valores intrínsecos de los parámetros libres de efectos difusionales.

La importancia de las dimensiones de la columna en el diseño de un reactor de lecho fijo ha sido estudiada por diversos autores. Así, Tosa y col. (150) han deducido que la velocidad de hidrólisis de acetil-DL-metionina por aminoacilasa es independiente de las dimensiones de la columna; otros autores (151) confirman esta observación, afirmando que la selección altura/diámetro no parece tener una influencia significativa en el diseño de un reactor de lecho fijo con tripsina inmovilizada. Sin embargo, Lee y col. (104) sostienen que para un reactor de glucosa isomerasa existe una relación H/D óptima para la cual se consigue una productividad máxima. Otros autores (152), hacen referencia a que la velocidad de formación de ácido L-aspártico es independiente de la relación altura/diámetro de la columna, para un rango comprendido entre 4,27 y 14,94.

No se tienen referencias de trabajos en donde se plantee el diseño de los reactores de lecho fijo en columna, atendiendo al hecho de que el factor de eficacia de la reacción varía a lo largo de la longitud del reactor, como consecuencia de la conversión experimentada por las especies reaccionantes. Únicamente, Lee y Tsao (74) han calculado valores globales para el factor de eficacia en esas condiciones y estos afirman que el  $\eta$  calculado usando la media logarítmica de las concentraciones de sustrato inicial y final, da una estimación razonable para el factor de eficacia global.

Sin embargo, se comprende fácilmente que sea necesario profundizar en este aspecto como paso previo al diseño del reactor y su posterior optimización, planteando el diseño de este tipo de reactores teniendo en cuenta la variación del factor de eficacia a lo largo de la longitud del mismo.

### 3.- MATERIALES Y METODOS

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- MATERIALES

La enzima naringinasa se obtuvo de Sigma Chemical Co., y es una preparación de Penicillium sp. que contiene actividad  $\alpha$ -ramnosidasa (EC 3.2.1.40, 500 U/g) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21, 5 U/g).

El sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido se adquirió de Sarsintex (Francia).

El sustrato naringina fue gratuitamente suministrado por Zoster, S.A. (Murcia).

La prunina fué sintetizada en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Murcia, según el método descrito en el apartado 3.2.8, y posee un 99,5% de pureza según análisis por cromatografía líquido-líquido de alta resolución.

La naringenina fué suministrada por Sigma Chemical Co.

Para inmovilizar la enzima, se usó como soporte vidrio poroso, de tamaño de poro controlado, recubierto de una capa de glicerilo (CPG). Se emplearon cinco tamaños de poro diferentes (40, 100, 200, 460 y 2000 Å) manteniéndose constante el tamaño de partícula (37-74  $\mu$ ). El soporte de tamaño de poro superior fué suministrado por Sigma Chem. Co. bajo el nombre comercial de Glyceryl-glass, mientras que el resto fué adquirido a Pierce bajo el nombre comercial de Glycophase G<sup>TM</sup>.

Todos los demás reactivos empleados en el presente trabajo fueron de grado analítico, y se utilizaron sin ningún tipo de purificación previa.

### 3.2.- METODOS

#### 3.2.1.- Determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó por una modificación del método Lowry, propuesta por Hartree (153). Un análisis estandar se realizó bajo el siguiente esquema : la disolución problema de proteínas se diluyó hasta 1 ml con agua bidestilada; se le adicionaron 0,9 ml de disolución A y la mezcla resultante se calentó durante 10 min en un baño a 50°C. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y posteriormente se le adicionaron 0,1 ml de disolución B, agitando y manteniendo la disolución a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente se añadieron 3 ml de disolución C y se volvió a incubar la mezcla en un baño a 50°C durante 10 min. más. Se dejó enfriar de nuevo a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia de la disolución resultante a 650 nm, frente a un blanco exento de proteínas. Se determinó la concentración de proteína mediante la correspondiente curva de calibrado, utilizando albúmina de suero bovino como patrón. La curva de calibrado se ajustó por regresión lineal, obteniéndose la ecuación :

$$a = 2,82 c + 0,039$$

siendo  $a$  la absorbancia a 650 nm y  $c$  la concentración de proteína en mg/ml.

Disolución A : 2 g de tartrato sódico potásico y 100 g de carbonato sódico disueltos en 500 ml de NaOH 1 M y llevados a 1 l con agua bidestilada.

Disolución B : 2 g de tartrato sódico potásico y 1 g de sulfato cúprico pentahidratado disueltos en 90 ml de agua bidestilada y 10 ml de NaOH 1 M.

Disolución C : 1 volumen de reactivo Folin-Ciocalteu por cada 15 volúmenes de agua bidestilada. Esta disolución se prepara en el momento de usarla y debe tener una normalidad comprendida entre 0,15 y 0,18 N.

### 3.2.2.- Determinación de la masa molecular de la naringinasa por HPLC.

Una disolución de la preparación de naringinasa usada se sometió a HPLC en una columna de permeación en gel Protein PAK 300 SW (7,5 mm x 30 cm) mediante un equipo cromatográfico de la casa Waters.

La columna se equilibró con tampón fosfato 50 mM pH 6,5. La presión de trabajo varió siempre entre 30 y 40 atm y el caudal de eluyente se mantuvo constante en 0,9 ml/min. Se inyectaron alícuotas de 10  $\mu$ l de una disolución de naringinasa de 1 mg/ml, detectándose los componentes por medida de la absorbancia a 280 nm, Su cuantificación se llevó a cabo por integración de las áreas respectivas, mediante un integrador Hewlett-Packard modelo 3392 A, capaz de registrar además los tiempos de retención de cada componente.

La determinación de la masa molecular aparente se realizó previo calibrado de la columna con disoluciones de 0,5 mg/ml en tampón fosfato 50 mM pH 6,5, de las siguientes proteínas : lisozima (Mr, 14300), tripsinógeno (Mr, 24000), pepsina (Mr, 34000), ovoalbúmina (Mr, 45000),  $\beta$ -galactosidasa (Mr, 133000) y aldolasa (Mr, 450000). El volumen muerto se determinó con azul dextrano y el volúmen aplicado de cada una de las proteínas patrón fué de 25  $\mu$ l. Se calculó el coeficiente de partición  $K_D$  de cada una de las proteínas patrón mediante la relación

$$K_D = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

siendo :  $V_E$  el volumen de elución,  $V_0$  el volumen muerto y  $V_T$  el volumen total de la columna, y se

representaron frente al logaritmo de Mr (masa molecular relativa), obteniéndose una recta cuya ecuación ajustada por mínimos cuadrados fué :

$$K_D = -0,4467 \log Mr + 2,6854 \quad (r = 0,9942)$$

conocido el valor de  $K_D$  de la naringinasa, se pudo establecer su masa molecular.

### 3.2.3.- Espectros de absorción de p-nitrofenol y p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

Los espectros de absorción del p-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnósido y p-nitrofenol se realizaron con disoluciones 36  $\mu$ M tanto del sustrato como del producto en NaOH 0,5 M. Los espectros UV-Vis se registraron en un espectrofotómetro Bausch and Lomb modelo Spectronic 2000, entre 200 y 600 nm, empleando una velocidad de barrido de 50 nm/min y cubetas de 1 cm de paso óptico.

### 3.2.4.- Absortividades molares de naringina y prunina.

Para determinar la relación existente entre las absortividades molares de naringina y prunina, se usaron disoluciones de ambas 0,029 y 0,566 mM, respectivamente, en una mezcla acetoni--trilo : agua (32 : 68, V/V). Se inyectaron cantidades variables, entre 10 y 100  $\mu$ l, de ambas disolu\_

ciones en un cromatógrafo Waters, provisto con una columna  $\mu$ Boundapak C<sub>18</sub>, de 10  $\mu$  de tamaño de partícula y se utilizó como eluyente una mezcla acetonitrilo : agua (32 : 68, V/V) alimentada a 0,9 ml/min. Se relacionó en cada caso el valor del área del pico cromatográfico con la cantidad de naringina o -prunina inyectada. La relación se ajustó a una línea recta, calculándose a partir de su pendiente el valor de la absortividad molar.

### 3.2.5.- Inmovilización de naringinasa

Se ha inmovilizado naringinasa en soportes de vidrio poroso mediante unión covalente. Se han empleado distintos métodos de inmovilización que tienden a implicar en la unión al soporte diferentes residuos de aminoácidos de la proteína.

#### 3.2.5.1.- En derivados aminoarílicos

El esquema de inmovilización fué el siguiente :

A 150 mg de soporte, se le añadieron 10 ml de ácido peryódico (14 mg/10 ml); se hizo vacío a fin de eliminar el aire existente en los poros del soporte, y se agitó la suspensión mecánicamente durante una hora

a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó el derivado aldehídico formado con tampón fosfato 0,1 M de pH 7,8. A continuación se adicionaron 10 ml de una disolución de p-fenilendiamina (1 mg/ml en el citado tampón), agitándose la suspensión de forma mecánica. A los 20 y 40 minutos de comenzada la reacción, se le añadieron 0,5 mg de borohidruro sódico. Transcurrida una hora se lavó el derivado aminoarílico con tampón fosfato 0,1 M de pH 7,8.

El derivado así formado se activó por adición de 10 ml de ácido clorhídrico 2 M y 4 ml de nitrito sódico al 4%, dejándose reaccionar la suspensión resultante en un baño de hielo durante una hora con agitación. Se lavó el diazo derivado así obtenido con el mismo tampón y, seguidamente, se le adicionaron 10 ml de una disolución de enzima (0,5 mg/ml de tampón). La suspensión resultante se dejó reaccionar 48 horas a 3-5°C con agitación continua. Transcurrido dicho periodo se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 5 ml del tampón fosfato utilizado en la inmovilización.

Los grupos activos del soporte que no reaccionaron con la enzima, se bloquearon por reacción con 10 ml de disolución de fenol 0,01% en acetato sódico al 10%.

Se lavó el derivado así obtenido con el tampón de acoplamiento, y se resuspendió en tampón ftalato ácido de potasio - ácido clorhídrico 0,1 M de pH 3,5, almacenándose en cámara fría de esta manera.

#### 3.2.5.2.- En derivados aldehídicos.

Se activaron 150 mg de CPG-Glycophase con ácido peryódico exactamente igual que en el procedimiento de inmovilización anterior. Al derivado obtenido, se le hizo reaccionar con 10 ml de una disolución de naringinasa (10,5 mg/10 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,8) durante una hora en cámara fría (3-5°C). A los 20 y 40 minutos de comenzada la reacción, se adicionaron 0,5 mg de borohidruro sódico. Finalizado el tiempo de acoplamiento se retiró el sobrenadante y se lavó abundantemente el derivado. Por último, éste se resuspendió en tampón ftalato/clH 0,1 M pH 3,5 y se almacenó en cámara fría.

#### 3.2.5.3.- En derivados tiólicos.

Se acoplaron 10 ml de  $\beta$ -mercaptoetilamina (10 mg en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,8) a 150 mg de CPG-Glycophase por el mismo procedimiento que se empleó para inmovilizar la p-fenilendiamina (3.2.5.1). Al tiol

derivado de vidrio así obtenido se le adicionaron 10 ml de una disolución de enzima (0,5 mg / ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,8) y 0,3 ml de una disolución de acoplamiento (que contenía 1,82 g de ferricianuro potásico, 4,86 g de cloruro amónico y 7,1 ml de hidróxido amónico, llevados a 100 ml con agua bidestilada), y la mezcla resultante se dejó reaccionar durante toda una noche (unas 15 horas) en cámara fría y con agitación mecánica. Transcurrido el periodo de acoplamiento, se retiró el sobrenadante y se lavó abundantemente el derivado obtenido con tampón de acoplamiento. Se resustendió en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1M pH 3,5 y se almacenó a 3-5°C.

#### 3.2.5.4.- En derivados aminados

Se acoplaron 10 ml de una disolución de etilendiamina (14 l en tampón fosfato 0,1 M pH 7,8) a 150 mg de CPG-Glycofase por el mismo procedimiento que anteriormente se usó para inmovilizar p-fenilendiamina y  $\beta$ -mercaptoetilamina (métodos 3.2.8.1 y 3.2.8.3). Una vez lavado, se adicionaron, al derivado aminado así obtenido, 10 ml de una disolución de enzima (0,5 mg/ml del mismo tampón) y 0,1 ml de una disolución de 1-etil-3-(metil amino propil) carbodiimida (1 mg/ml) y se dejó reaccionar la mezcla resultante durante 15 horas en cámara fría con agitación mecánica. se retiró el sobrenadante y se lavó el derivado

de enzima inmovilizada obtenido con tampón de acoplamiento. Se almacenó en cámara fría suspendido en tampón ftalato/ClH 0,1 M de pH 3,5.

### 3.2.5. Medida de actividad enzimática

#### 3.2.5.1. Con p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido como sustrato.

La actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa se determinó utilizando como sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido. El procedimiento seguido fué el siguiente:

Para la enzima soluble, a 0,5 ml de disolución de tampón ftalato ácido de potásio ClH 0,1 M de pH 3,5 se le adicionaron 0,5 ml de disolución de sustrato 3,5 mM en el mismo tampón. La disolución resultante se incubó a 57°C hasta alcanzar el equilibrio térmico y se le adicionaron 5  $\mu$ l de disolución de enzima de concentración 1 mg/ml. Se extrajeron alícuotas de 50  $\mu$ l cada cinco minutos durante 20 min. Cada alícuota se diluyó hasta 3 ml con hidróxido sódico 0,5 M y se midió su absorbancia a 400 nm frente a un blanco que contenía la alícuota a tiempo cero. Las medidas se realizaron por triplicado.

Para los derivados de enzima inmovilizada, los volúmenes de reactivos fueron 2,3 ml del tampón, 2,5 ml de la disolución de sustrato y 0,2 ml de enzima inmovilizada, que contenía 150 mg de derivado en 10 ml de tampón, mantenida en suspensión mediante agitación mecánica. Se extrajeron con el tiempo alícuotas de 100  $\mu$ l que fueron filtradas a través de una malla de nylon de 10  $\mu$  de tamaño de poro para separar el derivado inmovilizado y 50  $\mu$ l del filtrado se procesaron de la misma manera que en el ensayo de la enzima soluble.

Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que liberó un micromol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones especificadas anteriormente.

#### 3.2.6.2. Con naringina como sustrato

Para la medida de la misma actividad enzimática  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa frente a su sustrato natural naringina, se siguió el método siguiente :

Cuando se utilizó enzima soluble, se incubó durante 5 min. a 57°C, 1 ml de mezcla de reacción que contenía una

disolución de naringina 5 mM en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M pH 3,5. La reacción enzimática se inició por la adición de 4  $\mu$ l de disolución de enzima de concentración 1 mg/ml. A tiempos conocidos se extrajeron alícuotas de 10  $\mu$ l y se analizó su contenido en naringina y prunina por cromatografía líquido-líquido de alta resolución, de acuerdo con el procedimiento de Fischer y Wheaton (45) modificado de la forma ya expuesta en el apartado 3.2.4. Un cromatograma típico se realizó en 7 minutos y los componentes separados de las muestras se detectaron por su absorbancia a 280 nm.

Para los derivados de enzima inmovilizada, se incubaron a 57°C 9,9 ml de disolución de naringina 5 mM en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M pH 3,5. A continuación, se añadió 0,1 ml de enzima inmovilizada con el mismo contenido que en el descrito en el apartado anterior. Cada 5 minutos, durante 30 minutos, se extrajeron alícuotas de 100  $\mu$ l que se filtraron mediante una malla de nylon - de 10  $\mu$  de tamaño de poro, se tomaron 10  $\mu$ l del filtrado y se analizó su contenido en naringina y prunina de la misma manera que en el ensayo de medida de actividad de la enzima soluble.

En ambos casos se cuantificó el cambio producido en las áreas de los picos correspondientes a naringina y prunina observado en los cromatogramas, con el tiempo de reacción, y se relacionó con la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa.

Una unidad de actividad enzimática  $\alpha$ -ramnosidasa se definió como la cantidad de enzima que liberó un micromol de prunina por minuto bajo las condiciones óptimas de ensayo descritas.

### 3.2.7.- Obtención de los valores de conversión en un reactor tubular de lecho fijo con naringinasa inmovilizada.

Se empleó para ello el derivado obtenido al inmovilizar naringinasa en CPG-460 previamente derivatizado a aminoaril-vidrio, mediante los métodos descritos en el apartado correspondiente. Se empaquetaron 100 mg del citado derivado en una columna de 1 cm de diámetro interno, alcanzando el lecho una altura de 0,35 cm. El reactor, termostatado, se equilibró a 57°C, siendo alimentado a continuación con disoluciones de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido en tampón ftalato ácido de potasio/ClH de pH 3,5, de concentraciones comprendidas entre 0,4 y 3,5 mM. Se emplearon caudales de alimentación variables entre 5 y 15 ml/min. En cada uno de los casos, una vez alcanzado el régimen

estacionario, se recogieron alícuotas del efluente del reactor, cuyo contenido en p-nitrofenol se determinó por el procedimiento descrito en el apartado 3.2.6.1.

De la misma forma se alimentó el reactor con disoluciones de naringina en el mismo tampón, de concentraciones variables entre 0,1 y 5 mM empleándose para ello caudales comprendidos entre 2,5 y 6 ml/min. Al igual que se hizo cuando se usó el sustrato sintético, cuando se alcanzó el régimen estacionario, se recogieron alícuotas cuyo contenido en naringina y prunina se analizó usando el procedimiento descrito en el apartado 3.2.6.2.

### 3.2.8.- Obtención y purificación de prunina

Para la obtención de prunina, producto junto con la ramnosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa, se utilizó un reactor de lecho fijo de naringinasa inmovilizada. En dicho reactor, no se detectó existencia alguna de actividad  $\beta$ -glucosidasa. Se reciclaron a través de dicho reactor 15 ml de una disolución de naringina 5 mM en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M de pH 3,5, durante 10-15 minutos. La disolución obtenida se analizó por cromatografía líquida de alta resolución,

siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.6.2, obteniéndose en la reacción enzimática una conversión porcentual de naringina en prunina del 89,89%.

Para conseguir una disolución de prunina exenta de las impurezas representadas por la naringina sin hidrolizar, la ramnosa y el ftalato ácido de potasio del tampón usado, se inyectaron en el cromatógrafo líquido alícuotas de 2 ml (máximo volumen de inyección permitido) de la mezcla de reacción, recogiendo a la salida la fracción correspondiente al componente prunina, identificado por su tiempo de retención. Para evitar el solapamiento entre los picos cromatográficos de los distintos componentes, que se producía al usar volúmenes de inyección tan grandes, se utilizó como eluyente una mezcla acetonitrilo : agua (20:80; V/V), que permitió aumentar los tiempos de retención, separando proporcionalmente la elución de los componentes.

Una vez recogidos 25-30 ml de prunina disuelta en el eluyente anteriormente citado, se realizó una extracción líquido-líquido con tertbutanol, añadiendo cloruro sódico para facilitar la separación entre las fases orgánica y acuosa, y se retiró la fase orgánica haciendo uso de un embudo de decantación. A continuación, se evaporó el tertbutanol, obteniéndose un residuo sólido que, cuando se disolvió en una mezcla acetonitrilo : agua (32:68; V/V) y se

analizó mediante HPLC, dió como resultado un pico mayoritario cuyo tiempo de retención se correspondió con el de la prunina, y otro más pequeño, debido a una mínima cantidad de ftalato ácido de potasio que acompañaba a la prunina como contaminante. De este manera se determinó que la prunina obtenida poseía un 99,5% de pureza.

4.- RESULTADOS EXPERIMENTALES Y  
DISCUSION

#### 4.- RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

Siguiendo la metodología expuesta en los apartados anteriores se procede, en el presente, a la exposición detallada y discusión de los resultados experimentales obtenidos. Así, sucesivamente, se ha determinado la masa molecular de la enzima objeto de estudio, se ha propuesto y puesto a punto un nuevo método para la medida de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa usando el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y se ha modificado y mejorado el método de medida de actividad por HPLC utilizando naringina como sustrato. Posteriormente, se ha procedido a la inmovilización de la enzima y se han obtenido las condiciones óptimas de actuación tanto de la forma soluble como del mejor de los derivados inmovilizados. Asimismo, se han calculado las constantes cinéticas intrínsecas de la naringinasa soluble e inmovilizada actuando frente a los dos sustratos, así como las constantes de inhibición para los productos de las reacciones enzimáticas. Por último, se ha experimentado con un reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada, obteniéndose

las conversiones de salida para diversos caudales y concentraciones de los sustratos, valores que han servido para, en una etapa posterior, comprobar la validez del modelo de diseño desarrollado para este tipo de reactores.

#### 4.1.- CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO DE ALTA RESOLUCION DE NARINGINASA. DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR. CRITERIO DE PUREZA

En primer lugar, se ha determinado la masa molecular de la proteína, usando cromatografía líquido-líquido de alta resolución. Este valor es de particular importancia para establecer el tamaño de poro mínimo que debe poseer el soporte de vidrio poroso empleado en la inmovilización de la enzima, para permitir el acceso de ésta a la estructura interior de dicho soporte.

Para ello, una disolución de la preparación enzimática, se sometió a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el procedimiento detallado en el apartado correspondiente de métodos. Como elemento separador, se empleó una columna de cromatografía de permeación en gel, permitiendo esta técnica registrar, simultáneamente, la existencia de proteínas de masas moleculares diferentes a la naringinasa en la preparación, y calcular la masa molecular aparente de la naringinasa mediante la correspondiente

curva de calibrado, realizada previamente utilizando proteínas patrones de masas moleculares conocidas.

El registro cromatográfico resultante reveló la existencia de una sólo especie de masa molecular, no pudiendo detectarse ninguna otra señal diferenciada del ruido propio del detector, incluso a las mayores sensibilidades empleadas. Ello permitió afirmar que la preparación enzimática fué esencialmente pura en cuanto a que presentaba uniformidad en su composición. Sin embargo, cuando se determinó el contenido en proteína de disoluciones de diferentes concentraciones de la preparación enzimática, por una modificación del método de Lowry (153), el resultado reveló que todas las disoluciones ensayadas contenían una décima parte de la proteína teóricamente puesta en la disolución. Visto el comportamiento cromatográfico, esta divergencia podría ser explicada en función de una de las dos causas siguientes:

- 1) El 90% del peso sólido de la preparación estaría constituido por sales o estabilizantes cuya absorbancia a 280 nm es nula.
- 2) El contenido de residuos aromáticos de la naringinasa podría ser muy inferior al de la albúmina de suero bovino usada como patrón, y la respuesta del método de medida de proteínas propuesto por Lowry y col. (154) y modificado por Hartree (153), es proporcional al contenido en dichos residuos.

Se dializó entonces una disolución de naringinasa de concentración conocida, frente a agua bidestilada. Se empleó para ello una célula de ultrafiltración Amicón, dotada de membranas que sólo permiten el paso de especies de masa molecular inferior a 10000. Se recogió el ultrafiltrado, enrasándolo a un volumen final conocido, para determinar su contenido en proteína por el mismo procedimiento anterior. Puesto que el resultado no se alteró en cuanto a la diferencia entre la cantidad teórica de proteína, según peso, y la cantidad determinada con respecto a un patrón de albúmina de suero bovino, se estimó que la segunda de las causas propuestas era la que explicaba más adecuadamente los resultados experimentales. Además, quedó comprobado que en alguna referencia bibliográfica se citan divergencias como la mencionada (155). Así pues, en lo sucesivo, se ha considerado que la preparación enzimática usada estaba constituida únicamente por naringinasa.

Además de su uso como criterio de pureza, la cromatografía de permeación en gel permitió establecer la masa molecular aparente de la naringinasa de Penicillium sp. empleada. La banda de naringinasa eluyó a un volumen de elución,  $V_E$ , de 8,77 ml, para una columna cuyos volúmenes total,  $V_T$  y muerto,  $V_0$ , fueron 14,00 y 5,92 ml, respectivamente. Con estos datos, el coeficiente de partición,  $K_D$ , es de 0,35. Sustituido este valor en la correspondiente ecuación

de la recta de calibrado de la columna (que se encuentra representada en la Figura 3), se puede calcular la masa molecular aparente de la enzima. El valor resultante fué de 166700, siendo éste el primer valor de masa molecular calculado para la naringinasa, pues no se han encontrado referencias bibliográficas en las que tal dato se haya citado, independientemente de la fuente de enzima empleada. La misma falta de información existe en cuanto a la posible presencia de estructura oligomérica de las naringinasas estudiadas, comportándose al parecer todas ellas como una proteína homogénea. A este respecto hay que decir que tan sólo en una ocasión se ha referenciado la separación en dos proteínas diferentes de una preparación de naringinasa, correspondiendo dichas proteínas a las actividades  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa por separado (29), y aún así, no se hace ninguna referencia a masa, o cualquier otro parámetro molecular, de las dos fracciones separadas.

#### 4.2.- METODOS DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD $\alpha$ -RAMNOSIDASA DE NARINGINASA

La medida de la actividad naringinasa implica la determinación individualizada de las actividades  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, y la cuantificación de la contribución de cada una de ellas a la actividad global de la enzima.

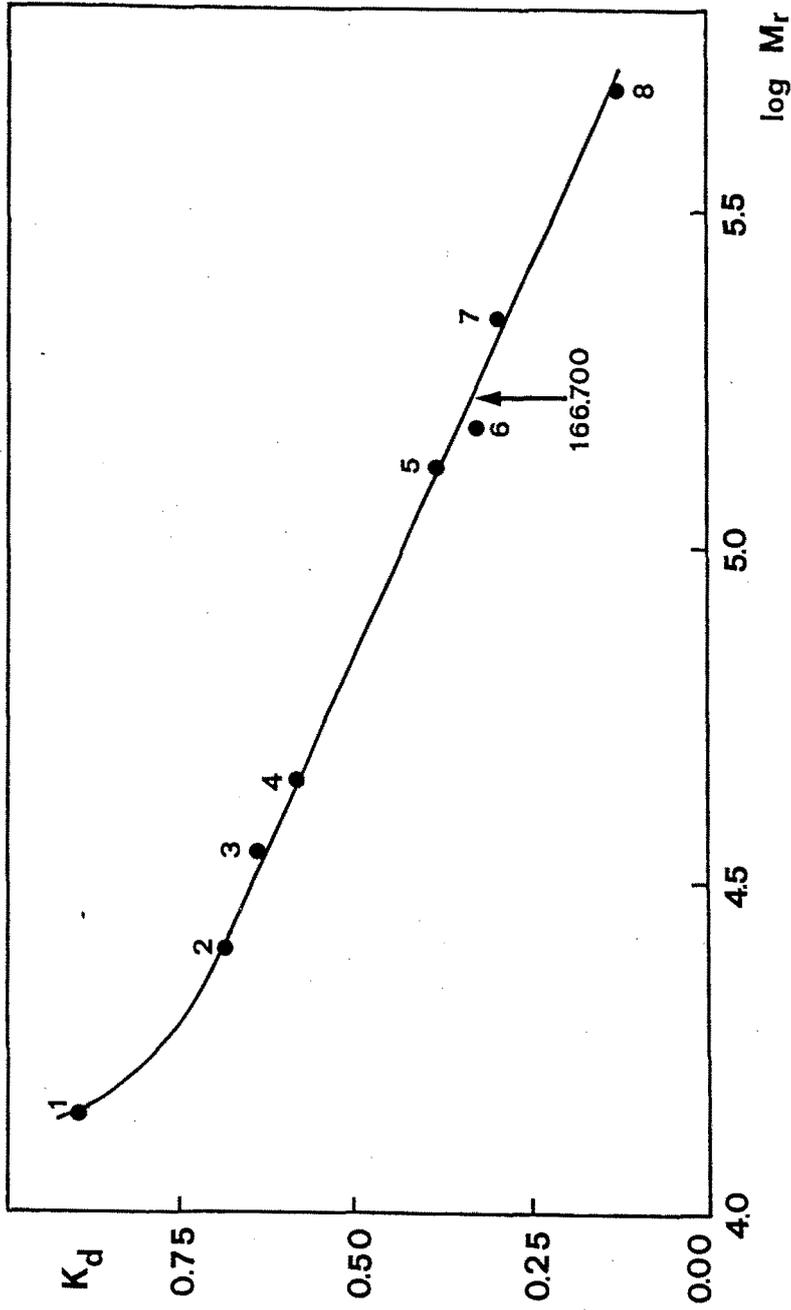


FIGURA 3.- Determinación de la masa molecular de naringinasa por HPLC. Relación entre  $K_D$  y la masa molecular de las proteínas patrón: (1) Lisozima, (2) Tripsinógeno, (3) Pepsina, (4) Ovoalbúmina, (5)  $\beta$ -Galactosidasa, (6) Aldolasa, (7) Catalasa y (8) Ferritina.

Por otra parte, y puesto que tan sólo la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa es la importante a nivel del proceso de desamargado de zumos de cítricos, es importante la necesidad de disponer de un método específico de medida que permita diferenciar las dos actividades. Como ya se ha discutido en el apartado 2.5., no existe en la bibliografía ningún método que permita cuantificar dicha actividad de forma rápida, sensible, económica y diferenciada de la actividad global naringinasa.

Por todo ello, en el presente trabajo se ha utilizado el p-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnósido como sustrato de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa. En presencia de naringinasa, dicho sustrato es hidrolizado a ramnosa y p-nitrofenol de acuerdo con la reacción mostrada en la Figura 4.

Ya que el p-nitrofenol es coloreado a pH básico, se puede seguir el curso de la reacción enzimática cuantificando la aparición de este producto. Para ello se realizaron espectros de absorción en las condiciones de medida colorimétrica usadas, para seleccionar una longitud de onda donde la absorción pudiera sólo asignarse al p-nitrofenol y no al sustrato p-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnósido. Los espectros de absorción realizados mostraron la existencia de un máximo de absorbancia para el p-nitrofenol a 400 nm, tal como puede observarse en la Figura

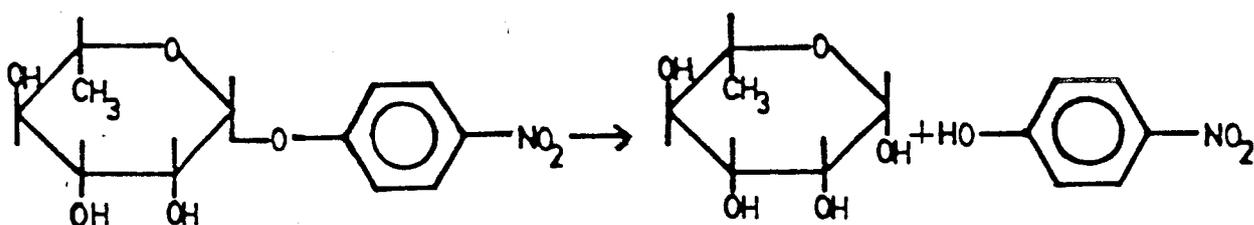


FIGURA 4.- Hidrólisis del p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido por la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa.

5. El sustrato no mostró absorción a dicha longitud de onda, siendo el pequeño hombro que puede observarse a 400 nm asignable a un ligero grado de hidrólisis del p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido en medio fuertemente alcalino; sin embargo, la hidrólisis del sustrato en estas condiciones fué lenta, por lo que este hecho no provocó interferencias en la medida de actividad enzimática. Por lo tanto, se utilizó en lo sucesivo una longitud de onda de 400 nm para seguir la aparición del p-nitrofenol como consecuencia de la acción enzimática.

A fin de relacionar el incremento de absorbancia a 400 nm producido por la aparición del p-nitrofenol con las unidades de actividad  $\alpha$  -ramnosidasa utilizadas en los ensayos, se calculó la absortividad molar del p-nitrofenol en las condiciones alcalinas mencionadas en el correspondiente apartado de métodos, puesto que la medida de la actividad  $\alpha$  -ramnosidasa de la naringinasa con dicho sustrato no ha sido descrita en la bibliografía. Se utilizaron disoluciones de p-nitrofenol en NaOH 0,5 M, cubriendo un rango de concentraciones comprendido entre 4,66 y 45,9  $\mu$  M, realizándose las medidas por sextuplicado; los valores experimentales se ajustaron a una recta, por análisis de regresión lineal, cuya ecuación fué:

$$A = 2,3 \times 10^{-3} + 21,44 \text{ [PNP]}$$

$$(r = 0,9992)$$

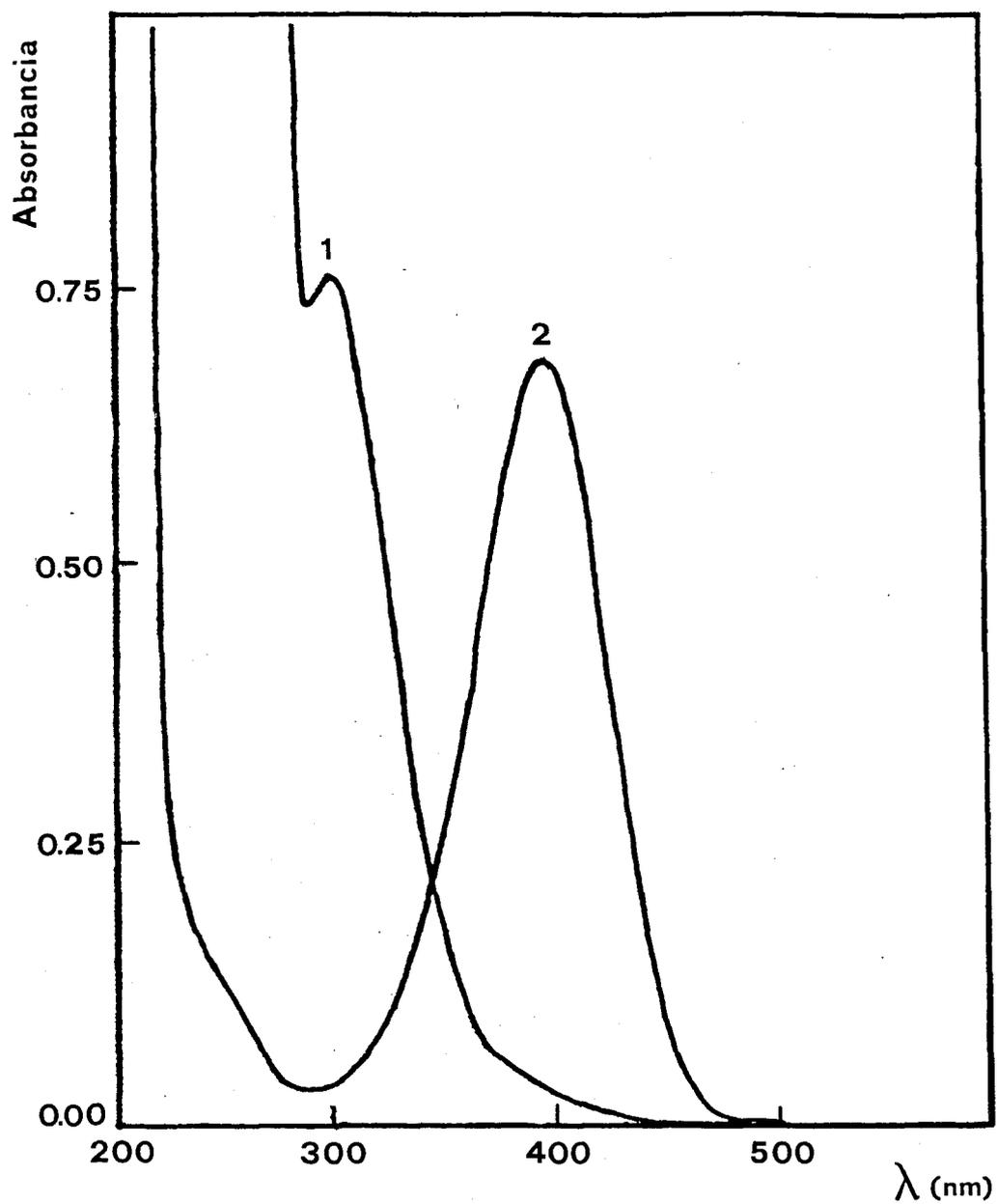


FIGURA 5.- Espectros de absorción de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido  $36 \mu\text{M}$  (1) y p-nitrofenol  $36 \mu\text{M}$  (2), realizados en NaOH 0,5 M.

Donde A representa la absorbancia y la concentración de p-nitrofenol viene dada en mM.

El valor calculado entonces para la absortividad molar del p-nitrofenol fué de:

$$\epsilon_{\text{PNP}} = 21,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Se calculó la desviación estándar de las medidas, resultando ser  $\sigma = 0,99$ .

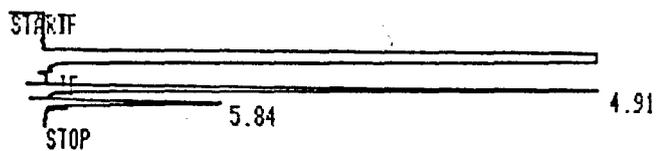
El error absoluto del valor numérico para un  $p=0,05$  y  $n=60$  ( $t=2$ ) fué de 1,98 y el error relativo en la medida fué de 1,19%. Por otra parte, y como ya se dijo anteriormente, la naringina es hidrolizada por la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa a ramnosa y prunina, y ésta es a su vez sustrato de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, hidrolizándose a glucosa y naringenina. Debido a que la preparación enzimática usada en el presente trabajo, presenta un contenido en actividad  $\beta$ -glucosidasa cien veces menor que de actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, en los ensayos enzimáticos usando naringina como sustrato, nunca se detectó la actuación de la segunda actividad enzimática de la naringinasa, por lo cual en lo sucesivo, cuando se hable de la actividad enzimática, se referirá, aunque no se especifique, a la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa.

Sin lugar a dudas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es el método más fiable y específico de los referenciados en la bibliografía para la caracterización de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa frente al sustrato natural naringina. Mediante la cromatografía en fase reversa es posible discriminar naringina, prunina y naringenina, así como otros flavonoides análogos; las interferencias en el método de medida de actividad enzimática son nulas, así como el error que se pueda cometer. Cuando se utiliza el más usado de los eluyentes referenciados en la bibliografía, esto es, acetonitrilo: agua, 20:80 (V/V), se consigue una buena separación de los picos en el cromatograma y tiempos de retención relativamente pequeños. Sin embargo, este tiempo (unos 20 minutos), que no es muy elevado para resolver mezclas de flavonoides, no parece el idóneo para la medida de actividad enzimática, ya que para la obtención de una curva de progreso de la reacción, con tan sólo cinco puntos, se requerirían unos 80-100 minutos. Debido a esto, la medida de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa sobre el sustrato naringina, llevada a cabo en el presente trabajo, ha requerido la utilización de una proporción distinta de la mezcla de eluyente, concretamente acetonitrilo:agua, en porcentajes 32:68 (V/V), con lo que el cromatograma típico se obtuvo en 7 minutos y una curva progreso de actividad enzimática se consiguió en unos 28-35 minutos, sin que los picos se solapen en el cromatograma.

Para poder seguir el curso de la reacción enzimática cuantificando la prunina producida, se determinaron en primer lugar, las absorptividades molares de sustrato y producto a 280 nm, de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Los resultados experimentales obtenidos evidenciaron la relación lineal existente entre las áreas de los picos resultantes de los cromatogramas y las cantidades de naringina y prunina inyectadas. El ajuste por mínimos cuadrados de dichas rectas permitió obtener los valores de ambas pendientes, cuyo cociente representa la relación existente entre las absorptividades molares de naringina y prunina. El valor encontrado para dicho cociente fué de 65,2. De esta manera puede obtenerse el porcentaje de prunina presente en una muestra, a partir de los valores de las áreas correspondientes a naringina y prunina proporcionadas en cada cromatograma.

En la Figura 6 puede verse un cromatograma típico, que corresponde a un porcentaje de prunina del 93,52%. Puesto que en ningún caso se integró el área de la banda de absorción correspondiente al disolvente, el porcentaje de naringina presente en la muestra se obtuvo directamente por diferencia hasta 100 del porcentaje de prunina.



RUN # 20  
 WORKFILE ID: B  
 WORKFILE NAME:

RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
4.91	3.7786E+07	PB	0.182	81.876
5.84	8364200	BB	0.215	18.124

TOTAL AREA= 4.6151E+07  
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

FIGURA 6.- Cromatograma correspondiente a una alícuota de la reacción de hidrólisis de naringina por la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa. Los picos de naringina y prunina vienen determinados por los tiempos de retención 4,91 y 5,84 minutos, respectivamente.

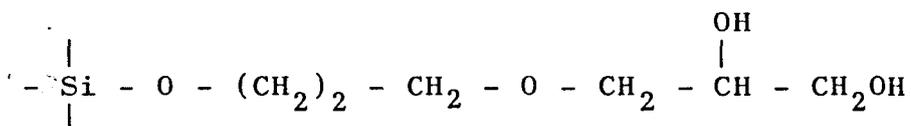
#### 4.3.- INMOVILIZACION Y PROPIEDADES GENERALES DE NARINGINASA INMOVILIZADA

En el presente trabajo, y de acuerdo con los objetivos propuestos, se ha estudiado el comportamiento bioquímico de la enzima naringinasa de Penicillium sp. Se han caracterizado los parámetros usuales en enzimología, tales como pH, temperatura y fuerza iónica óptimos, actuando tanto frente al sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido como al sustrato natural naringina. Asimismo se han determinado los parámetros cinéticos, velocidad máxima y constante de Michaelis usando los dos sustratos citados. La caracterización se ha llevado a cabo tanto con enzima soluble como inmovilizada en soportes de vidrio poroso.

Se ha realizado la inmovilización de la naringinasa por cuatro métodos diferentes, tendentes a implicar en la unión al soporte cuatro residuos de aminoácidos diferentes. Para el único derivado activo obtenido, se ha estudiado, a su vez, la influencia del tamaño de poro sobre la actividad, así como la estabilidad al almacenamiento y operacional.

#### 4.3.1.- Inmovilización en vidrio poroso

La naringinasa se inmovilizó por enlace covalente a través de distintos residuos de aminoácidos. Como soporte se empleó vidrio poroso de tamaño de poro controlado, recubierto de una monocapa de residuos de glicerilo unidos covalentemente, lo que le confiere un caracter hidrofílico y neutro. La estructura parcial de dicho soporte es:



Esta capa de glicerilo recubre el vidrio poroso tanto por el exterior como por el interior de los poros, mostrando un grupo funcional cada  $90 \text{ \AA}^2$ . Las partículas de vidrio son de forma esférica, con un radio comprendido entre 37 y  $74 \mu\text{m}$  para todos los tamaños de poro.

Este soporte presenta una gran estabilidad a las diferentes condiciones de operación, químicas, mecánicas o térmicas, habituales en el trabajo con los materiales biológicos inmovilizados. Todo ello los convierte en una clara alternativa a los carbohidratos poliméricos, que no admiten altas presiones de operación ni caudales elevados. Por otra parte, al estar recubierto de una monocapa de glicerilo, se minimizan los problemas de

adsorción y electrostáticos típicos de los soportes de vidrio sin recubrir, causados por las cargas negativas de los residuos de silicato. Por último, la presencia de grupos glicol, confiere a dicho soporte unas grandes posibilidades de derivatización en condiciones suaves, compatibles con los materiales biológicos a inmovilizar.

Se derivatizó dicho soporte de cuatro formas diferentes a fin de poder implicar en la unión enzima-soporte preferentemente a cuatro residuos de aminoácido diferentes, a saber, aminos, tioles, fenoles y carboxilato.

Para ello, se activó el soporte por oxidación con ácido peryódico. Este tratamiento oxidó los grupos glicoles del recubrimiento de glicérido a grupos aldehído, que quedaron ligados al soporte, dando ácido fórmico libre, que fué arrastrado en los lavados. Los grupos aldehído pueden reaccionar con grupos amino formando bases de Schiff, cuyo doble enlace se redujo con borohidruro sódico para evitar la reversibilidad por desplazamiento característica de este tipo de enlaces. El grupo amino puede pertenecer a la propia enzima, con lo cual se consigue un derivado de enzima ligada por residuos  $\epsilon$ -amino de lisilo u otros amino libres. También puede pertenecer a otra molécula diferente, en cuyo caso se pueden acoplar al soporte aquellos grupos que se desee.

Así, el uso de p-fenilendiamina,  $\beta$ -mercaptoetilamina o etilendiamina, produjo derivados con grupos aminoarilo, tiol, o amino libres, respectivamente, capaces de reaccionar con la enzima a través de residuos diferentes de aminoácidos. De esta forma, la reacción del derivado que poseía grupos aminoarilo con ácido nitroso produjo una sal de diazonio que se acopló a la enzima a través del anillo fenólico de la tirosina, fundamentalmente, aunque se ha publicado que también pueden participar en el enlace residuos de arginilo y serilo (156).

La activación de los grupos carboxilato de los residuos de ácido aspártico o glutámico de la enzima con carbodiimida, permitió unirla al derivado amínico de vidrio, formando un enlace tipo amida, mientras que la adición de un oxidante como el ferricianuro, a la suspensión resultante de mezclar el derivado con grupos tioles y la enzima, condujo a la formación de un puente disulfuro mixto entre los grupos tioles del soporte y los de la enzima.

Se determinó entonces, la actividad de cada uno de los derivados, resultando positiva dicha determinación tan sólo cuando la naringinasa se inmovilizó a través de residuos tirosilo, lo que es indicativo de que la modificación química de residuos lisilo, cisteinilo y aspartilo o glutamilo de la enzima conduce a una inactivación, bien

por la propia modificación química o por los cambios conformacionales asociados a la misma.

Además de la selección del método de inmovilización y del residuo de aminoácido que se implica en la unión al soporte, la configuración de éste último puede tener una gran importancia en la actividad mostrada por el producto final. De hecho, el tamaño de poro puede ser determinante respecto a la capacidad de carga de enzima en el soporte y a la estabilidad operacional. Además de ello, es el principal causante de la aparición de limitaciones difusionales que puedan restringir severamente la actividad enzimática (66). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se inmovilizó la enzima en soportes que poseían cinco tamaños nominales de poro (40,100,200,460 y 2000 Å) manteniendo constante la modificación química, el tamaño de partícula del soporte y la naturaleza química del mismo.

Los tamaños de poro empleados presentan rangos de separación del orden de 1000-8000, 1000-30000, 2000-100000, 8000-250000 y 150000-1250000, respectivamente (157), por lo que era de esperar que la proteína empleada, cuya masa molecular es de 166700, penetre en el CPG-460, y CPG-2000, quedándose en la superficie del CPG-40, CPG-100 y CPG-200.

Como se observa en la Tabla 1, en todos los parámetros cuantificados, los rendimientos mayores se obtuvieron al inmovilizar la naringinasa sobre CPG-460, los tamaños de poro mayores y menores resultaron con peores rendimientos de actividad inmovilizada y más baja actividad del derivado. Tal como puede observarse, en ningún caso se inmovilizó la totalidad de la actividad ofrecida, aumentando el porcentaje de actividad inmovilizada, así como la que correspondería por gramo de derivado, al incrementarse el tamaño de poro. Este fenómeno puede explicarse teniendo en cuenta que la superficie interna de los soportes es cada vez más accesible a la enzima conforme aumenta el tamaño de poro; lo que se traduce en un aumento del área superficial del soporte en contacto con la proteína y el consiguiente aumento en la posibilidad de incrementarse el número de enlaces formados.

El rendimiento de proteína, así como la actividad específica de los derivados han sido estimados en base a la actividad mostrada por la enzima soluble y los derivados inmovilizados, debido a que la cantidad de proteína inmovilizada en cada caso no se pudo medir directamente por las razones ya citadas.

La inmovilización de la enzima en CPG-2000 se tradujo en un descenso

Tabla 1.- Rendimientos de la inmovilización covalente de naringinasa a través de residuos tirosilo a soportes de vidrio de diferente grado de porosidad. Los parámetros cuantificados están calculados en base a los resultados de actividad enzimática mostrada por el derivado inmovilizado respecto a la actividad enzimática puesta a inmovilizar o mostrada por la enzima soluble.

TAMAÑO DE PORO	RENDIMIENTO DE INMOVILIZACION $\left[ \frac{(\text{UAE}/\text{mg prot})\text{IME}}{(\text{UAE}/\text{mg prot})\text{SE}} \right] (\%)$	ACTIVIDAD ESP. DEL DERIVADO $\left[ \frac{\text{UAE}}{\text{mg prot.}} \right]$	RENDIMIENTO DE ACT. INMOVILIZ. (%)	RENDIMIENTO DE PROT. INMOVILIZ. (%)	ACTIVIDAD DERIVADO $\left[ \frac{\text{UAE}}{\text{g gel seco}} \right]$
40	98	7,7	20	20	52
100	100	9,3	33	33	102
200	100	8,8	41	41	120
460	100	8,9	46	46	128
2000	103	9,9	3	3	10

en los valores de los parámetros. Este tamaño de poro permite la libre entrada de la proteína a toda la superficie disponible del soporte, pero debido al gran tamaño del poro, la superficie disponible es relativamente pequeña, reduciéndose por tanto el porcentaje de actividad inmovilizada y la actividad por gramo de derivado. Por otra parte, aunque con similares especificaciones, el CPG-2000 fué suministrado por una casa comercial diferente y, de hecho, su comportamiento a lo largo de los procesos de activación, derivatización y acoplamiento de proteína fue diferente al mostrado por los demás soportes. Este comportamiento diferente resultó fácilmente apreciable cuando se derivatizó el soporte para obtener grupos aminoarilo. En tal circunstancia, todos los soportes, excepto el CPG-2000, adquirieron coloración, que cambió desde muy débil al iniciarse el acoplamiento de la p-fenilendiamina, hasta un rojo parduzco al finalizar el acoplamiento. A su vez, el color del derivado sufrió cambios de tono al activarlo con ácido nitroso y al acoplar la proteína. Todas estas transformaciones visibles no se produjeron en el CPG-2000, o lo hicieron tan tenuemente que no se pudieron apreciar las diferencias en el color.

#### 4.3.2.- Estabilidad al almacenamiento y operacional del derivado inmovilizado

La estabilidad al almacenamiento es un factor importante a considerar en la caracterización de un derivado de enzima inmovilizada, ya que es necesario disponer de una preparación de reserva a partir de la cual se extraigan alícuotas para realizar los ensayos pertinentes. Para que los resultados sean comparables, es absolutamente necesario que las alícuotas sean exactamente iguales en sus propiedades a lo largo del tiempo empleado para la caracterización, por lo que el derivado debe ser totalmente estable en las condiciones de almacenamiento. En caso contrario, la preparación de una muestra de derivado de enzima inmovilizada para cada determinación, se convierte en una tarea tediosa y sujeta a errores.

Por ello, se ha estudiado la estabilidad al almacenamiento de la naringinasa inmovilizada en CPG-460 a través de residuos tirosilo, ya que fué el derivado con el que se obtuvieron mejores rendimientos. El derivado inmovilizado se almacenaba en cámara fría a 3-5 °C, suspendido en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M de pH 3,5. De esta suspensión se extrajeron alícuotas con el tiempo y se ensayó su actividad enzimática utilizando el método estándar descrito previamente, expresándose en cada caso la actividad relativa a la que

mostró el mismo derivado recién inmovilizado. La representación gráfica de los resultados obtenidos se encuentra en la Figura 7, observándose una estabilidad total durante los 120 primeros días de almacenamiento. Este período de mantenimiento de actividad total fué más que suficiente para realizar las series de ensayos necesarios tendentes a la caracterización del derivado. La pérdida brusca del 50% de la actividad observada a los 200 días del almacenamiento debe atribuirse a un fallo en el suministro de energía eléctrica a los laboratorios del Departamento, provocándose un aumento de la temperatura de la cámara fría de 10 a 15 °C durante un período de tiempo indeterminado (en todo caso nunca superior a 30 días), coincidiendo con el período estival. Posteriormente se observó una pérdida de actividad más gradual y coherente, deduciéndose por tanto que de no ser por el fallo en el sistema de refrigeración el derivado inmovilizado obtenido hubiera mantenido su actividad casi por completo un mínimo de un año.

La estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas es uno de los factores más importantes que afectan al éxito de la industrialización de un sistema inmovilizado. Con objeto de establecerla, se realizaron los experimentos necesarios con naringinasa inmovilizada en CPG-460 a través de residuos tirosilo de la proteína. Como el interés industrial de la enzima reside en el desamargado

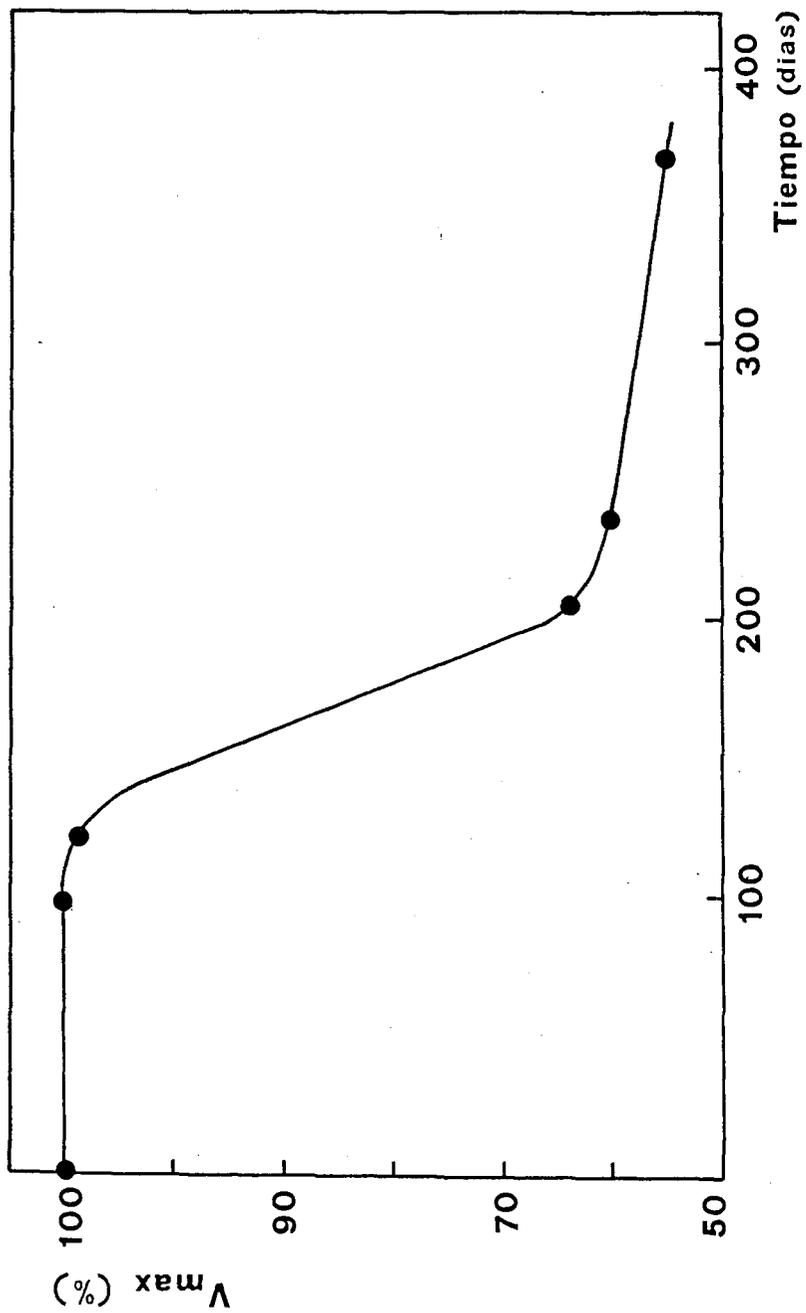


FIGURA 7.- Variación de la actividad frente al almacenamiento a 3-5 °C de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460, utilizando p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ranósido como sustrato y en las condiciones óptimas de actuación de la enzima.

de los zumos cítricos, y el elemento responsable del amargor es la naringina, se ha ensayado la estabilidad operacional del derivado inmovilizado actuando sobre el sustrato naringina, cuando se encuentra sólo en la disolución, a una concentración del 0,03%, así como formando parte de un zumo simulado que contiene un 0,02% de naringina, 3% de glucosa, 2% de fructosa, 5% de sacarosa y 1,5% de ácido cítrico (25), cantidades que corresponden a una composición media de los jugos cítricos, ó de un zumo de pomelo natural con un contenido en naringina del 0,03%. Dichas disoluciones se alimentaron con un caudal de 0,5 ml/min, a un reactor tubular de lecho fijo de 1 cm de diámetro interno y 0,35 cm de altura, termostatado a 40 °C, que contenía 100 mg del derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa, determinando el valor de la conversión a la salida del reactor por análisis del efluente del mismo a distintos tiempos de operación, tal y como se indica en el apartado de métodos, y relacionando estos valores de conversión de sustrato con los obtenidos en los primeros minutos de actuación, siempre a partir del momento en que el reactor alcanzó las condiciones de régimen estacionario.

En la Figura 8 se expresan de forma gráfica los resultados obtenidos. Como cabía esperar, y de acuerdo con lo referenciado en la bibliografía (22-24,35), el derivado

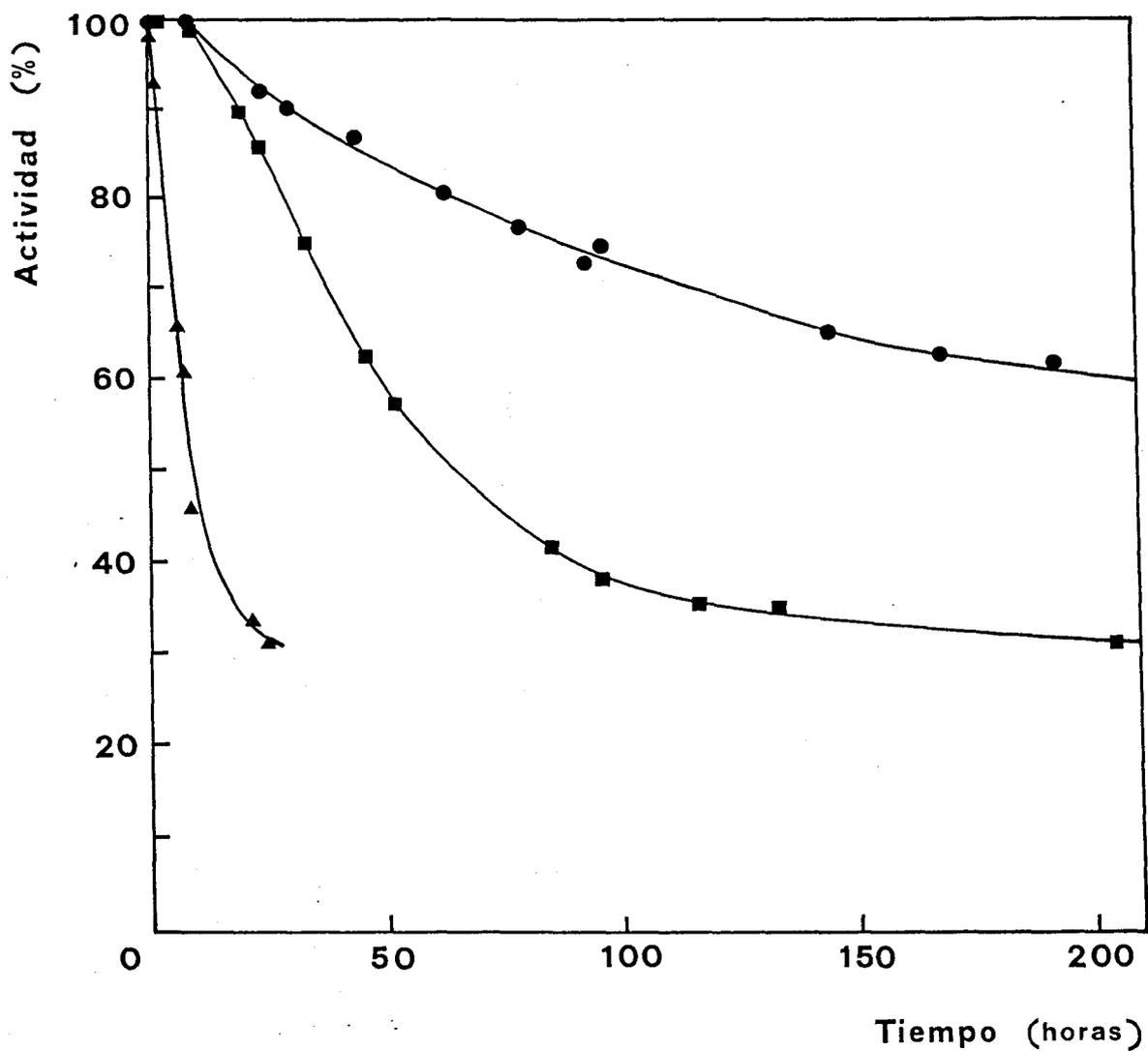


FIGURA 8.- Medida de la estabilidad operacional del derivado CPG-460-AA-naringinasa a 40 °C y utilizando como sustratos: (●) disolución de naringina al 0,03%, (■) zumo simulado y (▲) zumo de pomelo natural.

mostró una mayor estabilidad cuando actuó frente a la disolución de naringina, siendo ostensiblemente menor con el zumo simulado, y muy baja cuando se trató de hidrolizar la naringina presente en el zumo de pomelo natural. La actividad enzimática del derivado inmovilizado decrecía durante las 100 primeras horas de operación al actuar sobre naringina, descenso que fué más acusado cuando se trabajó con el zumo simulado, para mantenerse prácticamente constante a partir de ese tiempo. El derivado retenía el 60% y el 35% de la actividad mostrada inicialmente para la disolución de naringina y la de zumo simulado, respectivamente. Cuando se alimentó el reactor con zumo de pomelo natural, pudo observarse una mayor pérdida de actividad del derivado inmovilizado, hasta tal punto, que a las 25 horas de funcionamiento continuado la enzima había perdido un 70% de la actividad mostrada al principio de la operación. Esta pérdida de actividad puede atribuirse, tanto al efecto de inhibición de los componentes del zumo, como al taponamiento y ensuciamiento provocado en el lecho por la gran cantidad de pectinas en suspensión que llevaba el zumo. Puesto que en el zumo simulado, también se encontraban presentes algunos de los compuestos que inhiben de forma más acusada la actividad enzimática, parece ser la segunda de las razones la principal responsable de la pérdida de actividad.

La estabilidad a la operación continua del derivado inmovilizado cuando se

le hizo actuar frente a la disolución de naringina y al zumo simulado, resultó ser menor que la de otros referenciados en la bibliografía (22-24,35), aunque, en estos casos, los experimentos fueron realizados a temperaturas ostensiblemente menores (25 °C) a la óptima de la enzima (57-60 °C). Sin embargo, el hecho de que la pérdida de actividad se estabilizara al cabo de un cierto número de horas de utilización, apuntó hacia una mejor adecuación del derivado usado en el presente trabajo, para su utilización de forma continua, que los obtenidos por dichos autores que conducen gradualmente a la pérdida total de actividad. Cuando se hizo fluir zumo natural a través del lecho de CPG-460-AA-naringinasa, los resultados obtenidos fueron relativamente mejores que los referenciados en la bibliografía (22,23), ya que en estos casos se habla de que al cabo de un día de operación se pierde prácticamente toda la actividad enzimática, mientras que en el presente trabajo a las 25 horas de utilización continuada, el derivado inmovilizado retuvo aún el 30% de la actividad enzimática mostrada inicialmente.

Representando el logaritmo del porcentaje de actividad retenido por el derivado inmovilizado frente a los tiempos de operación y ajustando los resultados obtenidos a una línea recta mediante regresión lineal, se pudo obtener la constante de velocidad de desactivación suponiendo que ésta obedezca

a una cinética de primer orden. En la Figura 9 puede verse esta representación para el derivado CPG-460-AA-naringinasa, y los valores obtenidos para las constantes de desactivación fueron  $3,46 \times 10^{-3}$ ,  $1,16 \times 10^{-2}$  y  $4,93 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ , según que el derivado inmovilizado actuara sobre disoluciones de naringina sola, zumo simulado y zumo de pomelo, respectivamente. Como se sabe, los valores más bajos de esta constante implican una estabilidad operacional más elevada y permiten además cuantificar las estabilidades relativas en función de la alimentación usada.

#### 4.3.3.- Variación de la actividad con la concentración de enzima

Para estudiar la dependencia de la actividad enzimática con la cantidad de enzima en el caso del sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, se varió la concentración de enzima soluble de 1 a 20  $\mu\text{g}$  en un volumen de reacción final de 1 ml, y la del derivado inmovilizado entre 0,5 y 7,5 mg de gel seco, manteniendo el resto de las condiciones experimentales según se especifican en el apartado correspondiente de métodos. La proporcionalidad entre la cantidad de enzima presente en el medio de reacción y la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido producida por la misma, se representa en las Figuras 10 y 11,

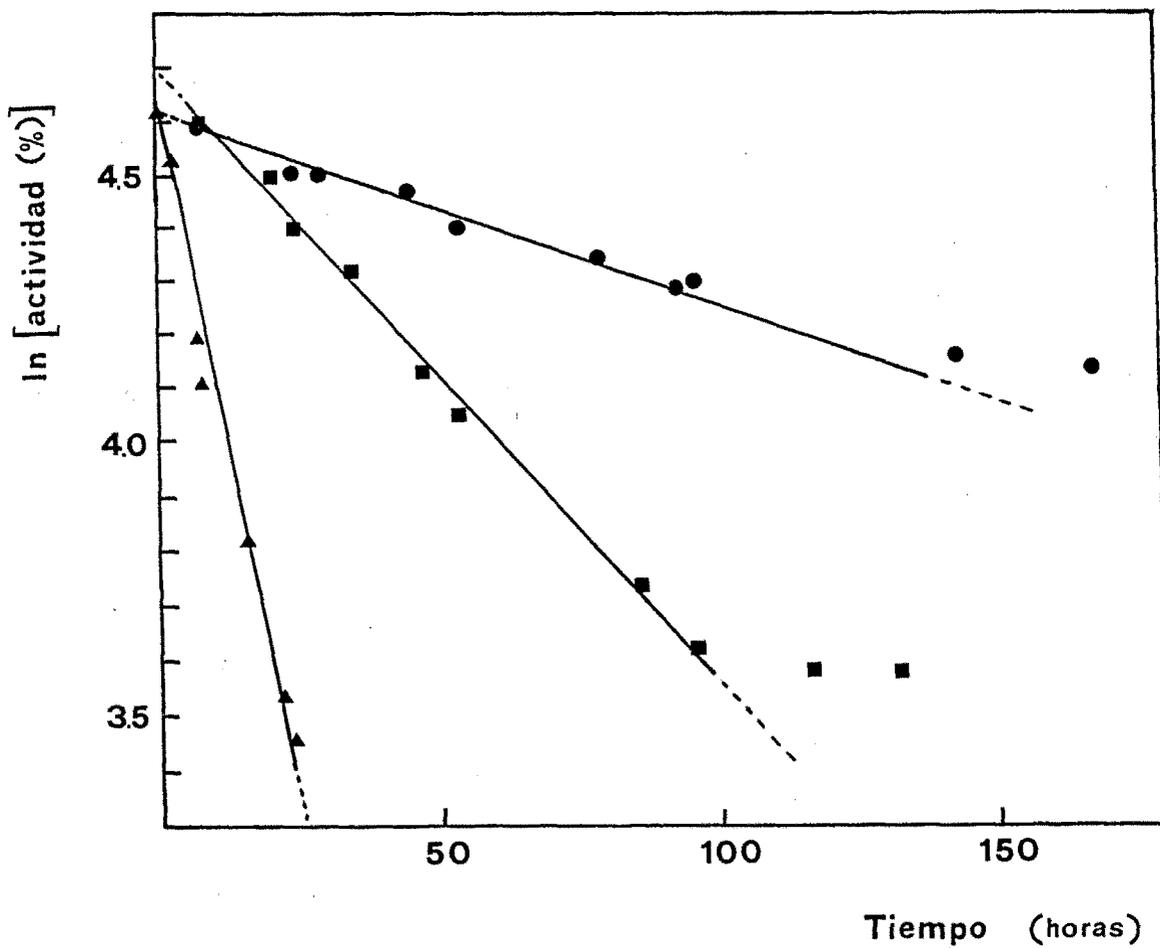


FIGURA 9.- Relación entre el logaritmo de la actividad y el tiempo de operación para el derivado CPG-460-AA-naringinasa, utilizando como sustratos: (●) disolución de naringina al 0,03%, (■) zumo simulado y (▲) zumo de pomelo natural.

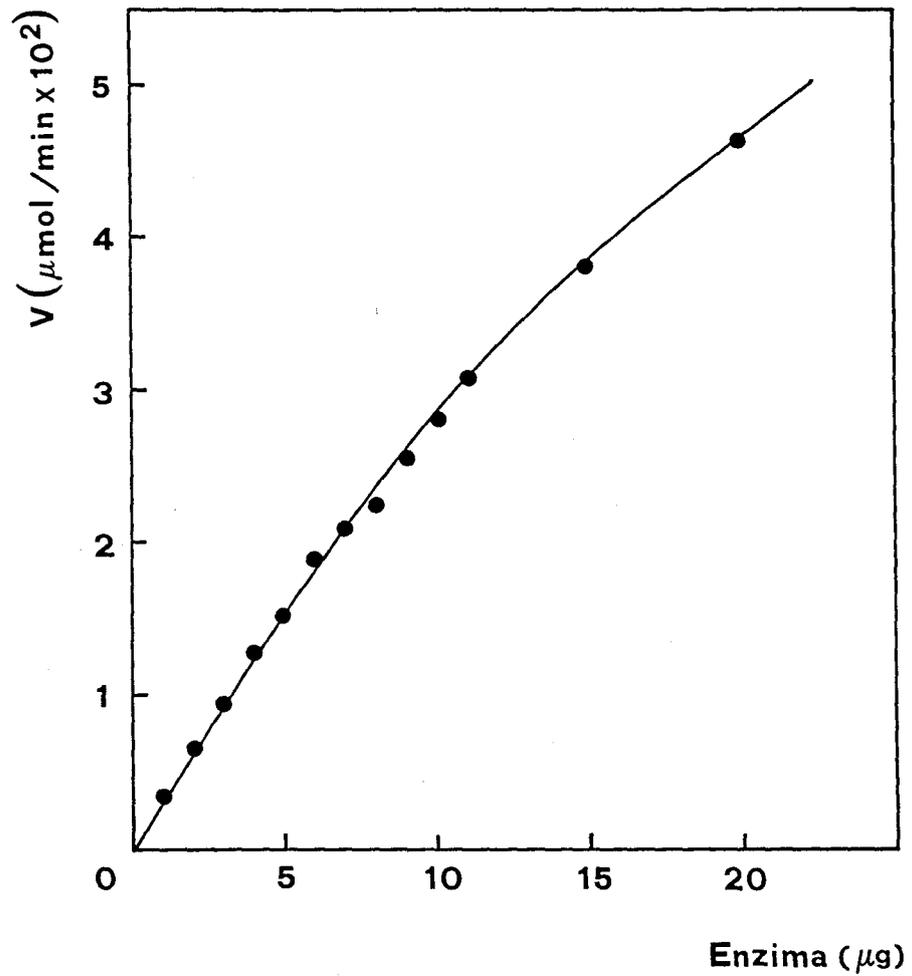


FIGURA 10.- Variación de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble con la cantidad de enzima añadida al medio de reacción, actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

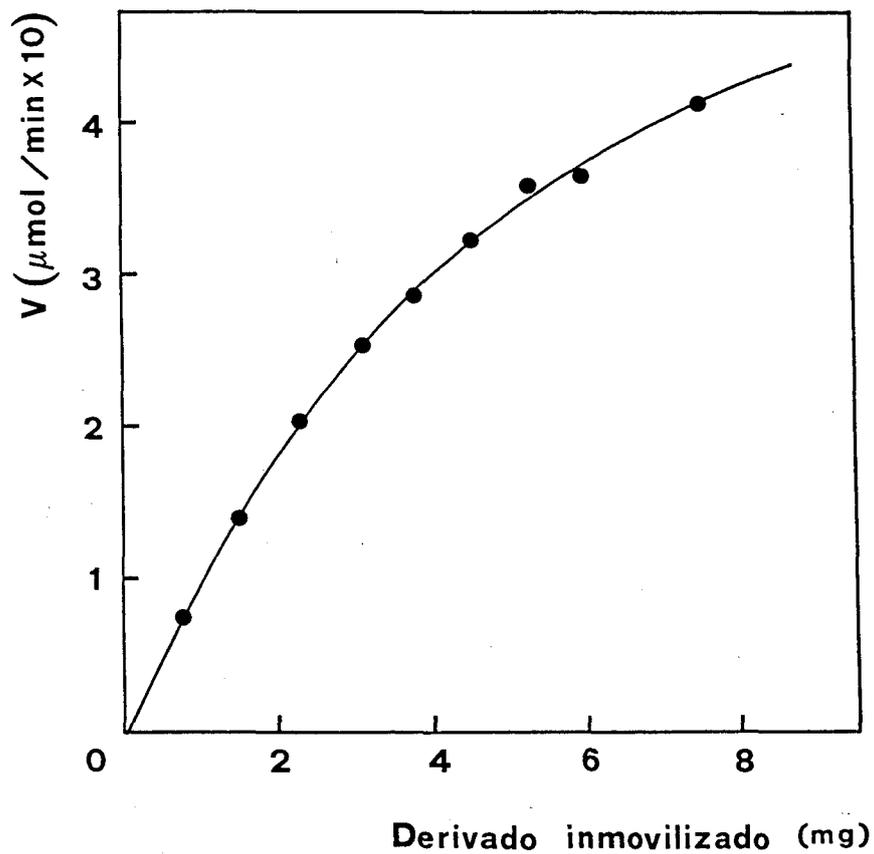


FIGURA 11.- Variación de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa inmovilizada en CPG-460 a través de residuos tirosilo con la cantidad de derivado inmovilizado en el medio de reacción, actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido. Cada gramo de derivado contiene 13,5 mg de proteína.

tanto para la enzima soluble como para el derivado inmovilizado.

En dichas Figuras, se observa una dependencia lineal hasta 7  $\mu$ g de enzima soluble y hasta 3 mg de gel para el caso de enzima inmovilizada, siendo éstos los límites que se emplearon en lo sucesivo para realizar los análisis enzimáticos de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa sobre el sustrato sintético.

Normalmente, la cantidad de enzima seleccionada para un ensayo de actividad fué de 5  $\mu$ g para la enzima soluble y de 3 mg de gel para el derivado inmovilizado.

De la misma forma que se hizo con el sustrato sintético, se estudió la dependencia de la actividad enzimática con la cantidad de enzima, usando como sustrato la naringina. Para ello se varió la concentración de enzima soluble desde 1 a 20  $\mu$ g y la del derivado inmovilizado entre 0,5 y 7,5 mg de gel. En ambos casos se mantuvieron las demás condiciones experimentales tal y como se especifica en el apartado 3.2.6.2.

Los resultados experimentales evidenciaron una linealidad entre la velocidad

de hidrólisis de la naringina y la cantidad de enzima presente en el medio de reacción hasta 4  $\mu\text{g}$  de enzima soluble y hasta 2 mg de gel para el derivado inmovilizado. En los ensayos de actividad, la cantidad de enzima seleccionada fué de 3  $\mu\text{g}$  para la enzima soluble y 1,5 mg de gel para la enzima inmovilizada.

Estos valores fueron muy bajos en cualquiera de los casos, si se los compara con el único trabajo publicado (10) en el que se aportan datos en este sentido. En esta publicación, se habla de una respuesta lineal entre 10 y 50  $\mu\text{g}$  de enzima soluble, usando naringina como sustrato. Sin embargo, una serie de factores experimentales impiden establecer una comparación directa entre este valor y los aquí obtenidos. En primer lugar, la preparación enzimática empleada por los autores es una preparación comercial conocida como "Naringinasa C", que puede tener otras proteínas que no muestren actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y, en segundo, porque emplearon el método de Davis, que, como ya se ha comentado, refleja esencialmente la actividad  $\beta$ -glucosidasa actuando sobre el producto de la reacción enzimática catalizada por la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa; y normalmente la actividad  $\beta$ -glucosidasa es menor que la  $\alpha$ -ramnosidasa.

#### 4.3.4.- Determinación de las condiciones óptimas de actuación de la enzima

Las condiciones óptimas de actuación de una enzima pueden depender de muy diversos factores. Algunos de ellos son intrínsecos, tales como la fuente de obtención de la enzima, mientras que otros dependen de las condiciones del medio en que se realiza la medida, sustrato empleado o forma en que se encuentra la enzima. A fin de establecer unos criterios comparativos que permitieran obtener conclusiones, se estudiaron las condiciones óptimas de actuación de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa de Penicillium sp., tanto en forma soluble como inmovilizada actuando frente a los dos sustratos empleados en el presente trabajo, p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y naringina.

Para el estudio del efecto del pH del medio sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa, tanto en su forma soluble como inmovilizada, actuando sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, se trabajó en un rango de pH comprendido entre 2,4 y 5, utilizando tres sistemas reguladores de pH: regulador Glicina/ClH para un rango de pH comprendido entre 2,4 y 3,6, regulador Ftalato ácido de potasio/ClH para el rango 3,4 - 3,9 y regulador Acetato sódico/ácido acético para pH comprendidos

entre 3,7 y 5,0. La concentración de todas las disoluciones fué 0,1 M.

Como se observa en la Figura 12 el pH óptimo mostrado por la enzima tanto en su forma soluble como inmovilizada, frente al sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido fué de 3,5.

Cuando se estudió el efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad enzimática usando naringina como sustrato, se utilizaron dos disoluciones reguladoras distintas: tampón Glicina/ClH 0,1 M para pH comprendido entre 2,5 y 3, y tampón Ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M, para pH desde 3,25 hasta 4. Los resultados experimentales obtenidos apuntaron hacia la confirmación del valor 3,5 como pH óptimo de actuación de la enzima naringinasa soluble e inmovilizada en la hidrólisis de naringina, como también lo fué en la hidrólisis enzimática del sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

Este pH óptimo es el inferior de los observados en otras naringinasas de distintas fuentes frente al sustrato natural naringina; en tales casos el pH óptimo está comprendido entre 3,5 y 5 para las primeras preparaciones enzimáticas de origen fúngico (20,25,34) ó entre 4,0 y 5,0 para las obtenidas

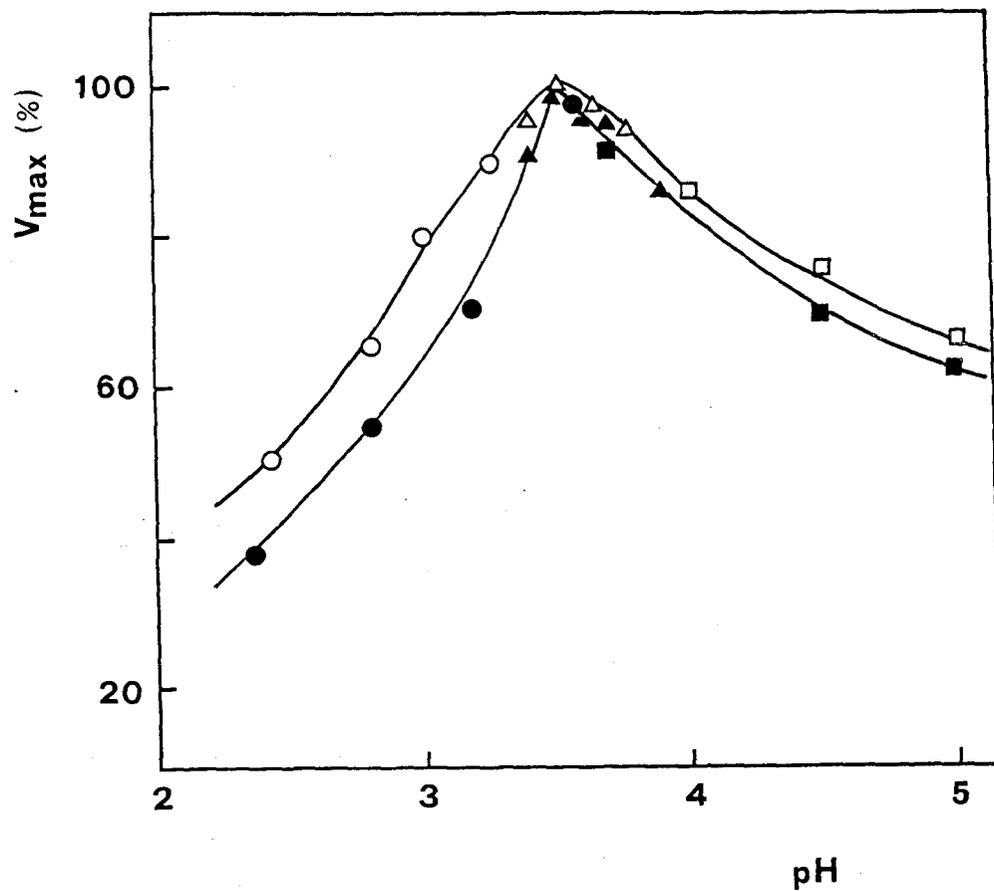


FIGURA 12.- Efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble ( puntos negros) e inmovilizada en aminoaril-CPG-460 (puntos blancos), actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

(○, ●) Tampón Glicina/ClH 0,1 M.

(Δ, ▲) Tampón Ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M.

(□, ■) Tampón Acetato sódico/ácido acético 0,1 M.

a partir de Aspergillus niger (10,22-25). Sin embargo, el valor de pH obtenido en este trabajo coincide con el que presentan los zumos cítricos. La pérdida de actividad fué bastante más acusada a valores de pH más ácidos y decayó lentamente al incrementarse el pH tanto para la enzima en forma soluble como para el derivado inmovilizado, lo que permitiría también el uso del sistema enzimático, tanto en su forma soluble como inmovilizado, para el desamargado de zumos no cítricos que generalmente presentan un pH superior. Por otra parte, la comparación de las curvas pH-actividad para la enzima soluble e inmovilizada, reflejó un efecto estabilizador de los enlaces soporte-proteína sobre la estructura terciaria frente a la desnaturalización por pH, pues se obtuvo una curva que se expande sobre un rango más amplio de dicho pH.

Es importante resaltar el hecho de que dado que el tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0.1 M suministró un medio en el que la actividad enzimática, tanto en soluble como inmovilizada, fué superior a la mostrada en otros tampones, se escogió dicha disolución reguladora como estándar para la realización de los demás ensayos.

Se estudió también el efecto de la temperatura del medio de reacción sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa, tanto en su forma nativa, como inmovilizada

a través de residuos tirosilo a un soporte de vidrio poroso de tamaño de poro 460 Å, actuando sobre el sustrato sintético utilizado en este trabajo. El rango de temperaturas ensayado en ambos casos fué de 35 a 73 °C, margen suficientemente amplio como para obtener variaciones significativas de actividad que permitieran el establecimiento de la temperatura óptima de actuación de la enzima. El medio de reacción se mantuvo en todos los casos constante mediante el uso del tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M de pH=3,5, y de la concentración de sustrato que fué de 1,4 mM en ambos casos.

La Figura 13 refleja en una representación de Arrhenius, la variación de la actividad enzimática con la temperatura. El valor máximo de actividad para la hidrólisis del p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido se mostró a 57 °C, tanto cuando dicha hidrólisis se realizó con enzima soluble como cuando se usó el derivado inmovilizado.

Esta misma temperatura óptima se determinó cuando se usaba naringina como sustrato.

El valor de temperatura necesaria para la consecución de la máxima actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la preparación fué más elevado que lo publicado habitualmente

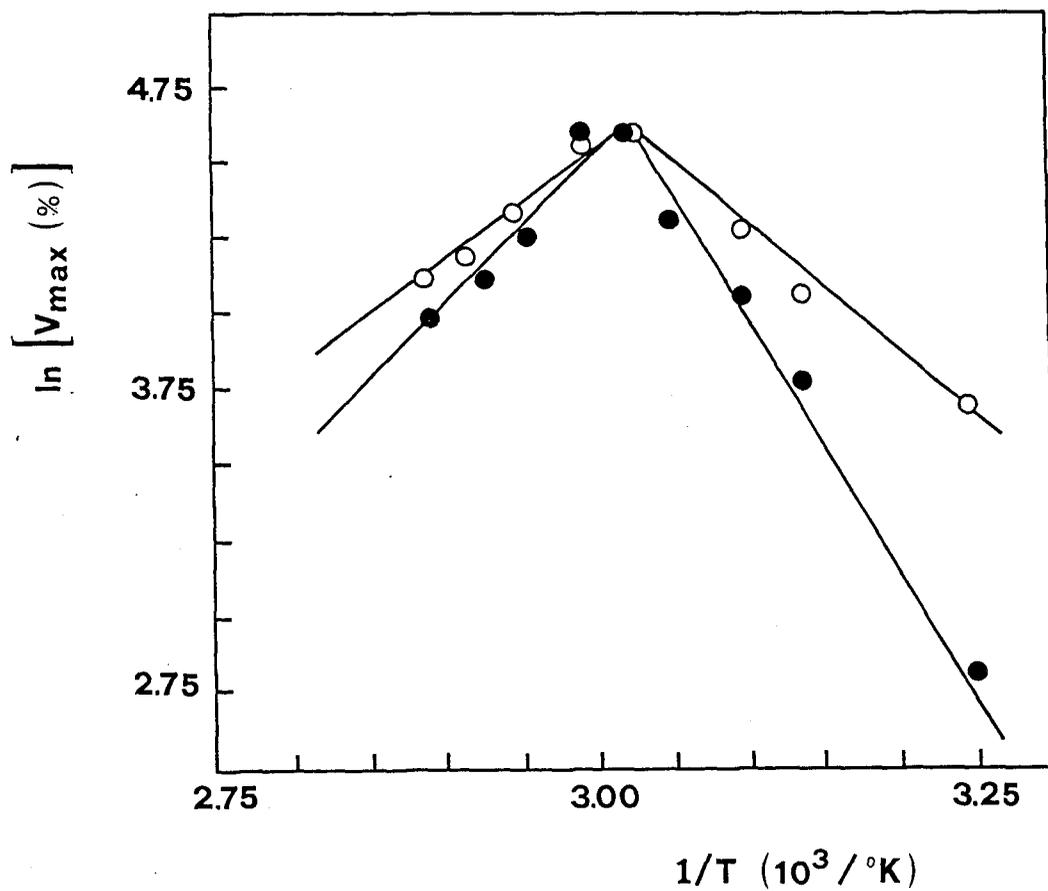


FIGURA 13.- Representación de Arrhenius para la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble (●) e inmovilizada en aminoaril-CPG-460 (○), actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

por los diversos autores para naringinasas de otras fuentes (19,22-25,35). Tan sólo ha sido superada por los 60-65 °C referenciados como temperatura óptima de una naringinasa de Coniothyrium diplodiella (26).

La forma de la curva temperatura-actividad resultó bastante más aguda en el caso de utilizar enzima soluble, que cuando se usó el derivado inmovilizado. Un desplazamiento de diez grados, en uno u otro sentido, de la temperatura óptima se tradujo en una reducción de la actividad catalítica de la enzima soluble al 50%. Sin embargo, esta pérdida de actividad fué bastante menos acusada cuando se utilizó la enzima inmovilizada; en este caso la actividad máxima se redujo sólo hasta un 65-70%. Por lo tanto, este parámetro se constituye en un valor crítico cuando se trata de analizar de forma comparativa el nivel de actividad  $\alpha$ -D-ramnosidasa en preparaciones de naringinasa soluble, siendo también importante, pero no tan decisivo, cuando se utiliza naringinasa inmovilizada.

Además, el que la curva temperatura-actividad mostrada por la enzima inmovilizada fuera más amplia que la de la enzima soluble, reflejó un efecto estabilizador de los enlaces de la proteína al soporte, los cuales parecen mantener parcialmente la estructura

terciaria al sobrepasar, en uno u otro sentido, la temperatura óptima de actuación.

De la pendiente de la recta obtenida en la zona de incremento de actividad se puede calcular el valor de la energía de activación del proceso. Del ajuste por regresión lineal de ambas rectas, se obtuvieron los valores de la energía de activación que fueron 14,9 y 7,9 Kcal/mol para la forma soluble y la inmovilizada respectivamente. Como puede observarse el valor de la energía de activación de la naringinasa disminuyó con la inmovilización, lo que implica una mayor eficacia catalítica del derivado inmovilizado frente a la enzima soluble.

Para estudiar la dependencia de la actividad enzimática de la naringinasa, soluble e inmovilizada, actuando sobre los sustratos sintético y natural con la fuerza iónica del medio de reacción, se varió la concentración de tampón ftalato ácido de potasio/ClH desde 0,025 hasta 0,5 M. La concentración de sustrato en el fluido de ensayo fué de 1,4 mM y se mantuvo constante en todos los experimentos, al igual que el resto de las condiciones óptimas, pH y temperatura.

En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos. En ella se observa en ambos casos que la actividad máxima se alcanzó a una concentración de tampón 0,1 M. La enzima en forma soluble fué mucho más sensible a los cambios de la fuerza iónica que el derivado inmovilizado. Se ha llegado a comprobar que para una concentración de tampón ftalato ácido de potasio/ClH 1 M (valor anormalmente alto), el derivado inmovilizado mostraba un 83% de la actividad máxima, lo cual da idea del gran efecto estabilizador que los enlaces enzima-soporte ejercen sobre la actividad enzimática.

Finalmente, puede decirse que las condiciones óptimas de actuación de la enzima naringinasa, tanto en forma soluble como inmovilizada, son las mismas con independencia de si el sustrato utilizado fué el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido o la naringina.

#### 4.4.- DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE NARINGINASA

Se ha procedido a la obtención de las constantes cinéticas de la naringinasa utilizando los dos sustratos objeto de estudio, el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y la naringina. En el primer caso, se han calculado dichas

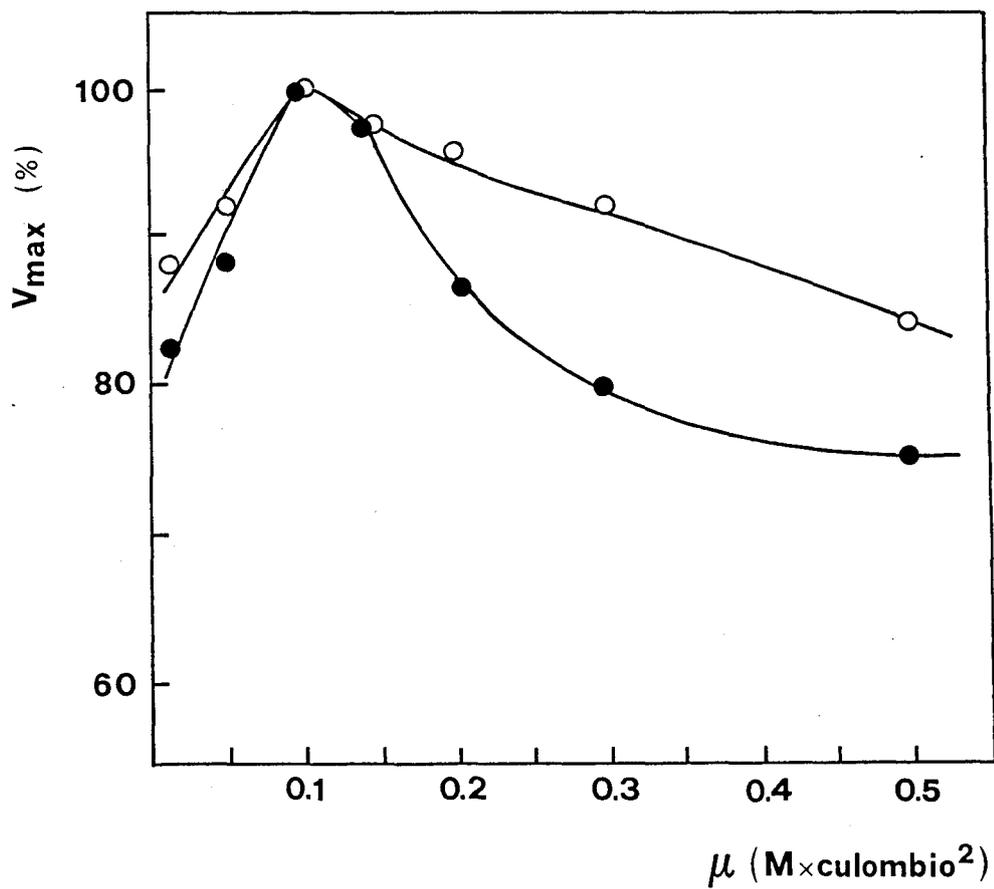


FIGURA 14.- Efecto de la fuerza iónica del medio de reacción sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble (●) e inmovilizada en CPG-460 a través de residuos tirosilo (○), actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

constantes para la enzima soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-40 y CPG-460, realizándose, asimismo, para este último tamaño de poro diferentes inmovilizaciones con distintas concentraciones de enzima. Cuando se ha usado naringina como sustrato, se han estimado los parámetros cinéticos intrínsecos para la naringinasa soluble y para el derivado CPG-460-AA-naringinasa.

Conocidas las condiciones óptimas de ensayo de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble, así como del más activo de los derivados inmovilizados obtenidos, se procedió a su caracterización cinética frente al sustrato propuesto p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido. Para ello se realizaron los correspondientes ensayos de actividad, tal y como se describieron en el apartado 3.2.6.1, en los que la concentración de sustrato se varió entre 0,455 y 3,155 mM.

En el caso de la enzima soluble, cuando se representaron las velocidades iniciales de reacción frente a la concentración de sustrato, se obtuvo la típica hipérbola rectangular que presentan las enzimas con comportamiento cinético michaeliano, tal y como puede observarse en el recuadro interior de la Figura 15.

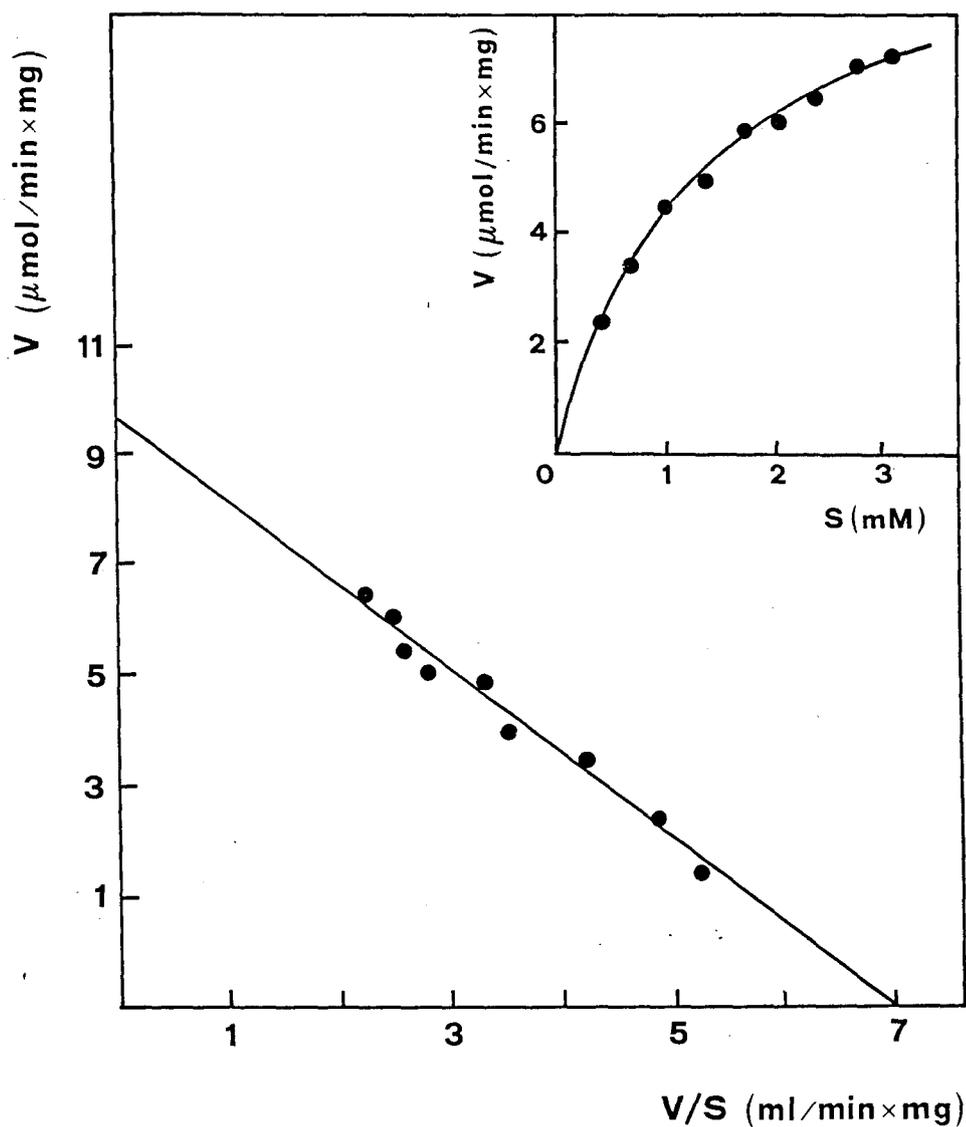


FIGURA 15.- Representación de Eadie-Hofstee de la dependencia de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble con la concentración de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido. En el recuadro superior derecho se expresa esta misma relación en forma directa.

Las constantes cinéticas se calcularon a partir de la representación de Eadie-Hofstee (158-159), en base a los resultados experimentales, ajustándose dichos datos a una recta, tal y como se observa en la misma Figura 15, cuyo análisis por regresión lineal condujo a un valor de la constante de Michaelis de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido de 1,52 mM. De la misma representación anteriormente citada, se obtuvo el valor de la velocidad máxima, que fué de 10,66  $\mu$  moles de p-nitrofenol formados por minuto y por miligramo de proteína.

Asimismo, se analizó la dependencia de la actividad enzimática en función de la concentración de sustrato y los resultados se representaron gráficamente, de acuerdo con el método de Eadie-Hofstee, para determinar la constante de Michaelis y la actividad específica de los derivados de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-40 y CPG-460.

Para el derivado CPG-40, los resultados experimentales se ajustaron a una línea recta (según se observa en la Figura 16); a partir de la pendiente se calculó la constante de Michaelis, cuyo valor fué de 2,86 mM, y de la ordenada en el origen se obtuvo un valor para la velocidad máxima de 7,7  $\mu$  moles producidos por minuto y por miligramo de proteína.

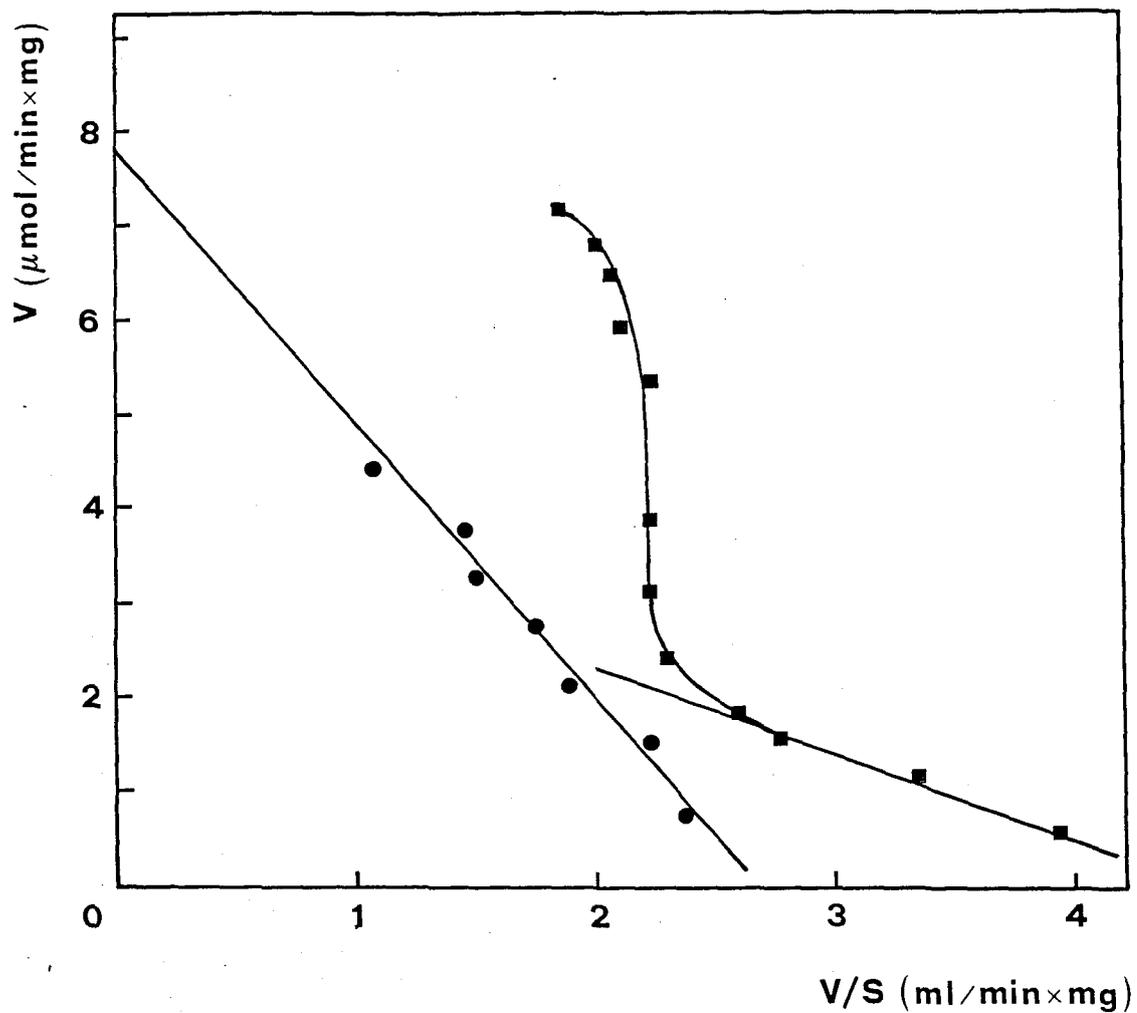


FIGURA 16.- Representación de Eadie-Hofstee para naringinasa inmovilizada en aminoaryl-CPG-40 (●) y en aminoaryl-CPG-460 (■), actuando sobre el sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, en las condiciones estándar de ensayo.

Dichos valores, corresponden a las constantes cinéticas intrínsecas del derivado, libre de limitaciones difusionales internas. La linealidad observada en la representación de Eadie-Hofstee para el derivado CPG-40 puede evidenciar dos fenómenos distintos: que la reacción enzimática se encuentre controlada cinéticamente, o bien que la inmovilización de la proteína se haya realizado únicamente en la superficie del soporte, hecho que por otra parte estaría apoyado por el valor de la masa molecular de la enzima, obtenido experimentalmente por HPLC, y los límites de exclusión característicos del tamaño de poro del soporte.

Por el contrario, la representación de Eadie-Hofstee para el derivado CPG-460 (ver Figura 16), condujo a una curva sigmoide representativa de la existencia de limitaciones difusionales internas (77,100), ya que en este caso la enzima estaría inmovilizada en el interior de la matriz porosa. Este hecho está plenamente de acuerdo con el valor de masa molecular obtenido para la naringinasa y los límites de exclusión del soporte CPG-460.

A fin de obtener los valores de las constantes cinéticas intrínsecas del derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa, se procedió a realizar sucesivas inmovilizaciones

con menor carga de enzima, hasta obtener un derivado en el que las limitaciones difusionales internas fueran despreciables, pudiendo establecerse un control cinético para la hidrólisis del sustrato, es decir, hasta que la representación de Eadie-Hofstee condujera a una línea recta. Se obtuvieron, por tanto, cuatro derivados inmovilizados distintos con 13,5, 2,5, 1,0 y 0,4 mg de proteína por gramo de soporte, respectivamente. Aplicando el análisis lineal de Eadie-Hofstee a los valores de velocidad inicial obtenidos para distintas concentraciones de sustrato y efectuando las correspondientes representaciones gráficas, se obtuvieron en todos los casos, tal y como puede verse en la Figura 17, curvas sigmoides representativas de la no eliminación de las limitaciones difusionales internas, aún en el caso del derivado inmovilizado con una concentración de proteína inferior a la del derivado inmovilizado en CPG-40. Este hecho vino a demostrar que la linealidad obtenida en la representación de Eadie-Hofstee para el CPG-40-AA-naringinasa fué debida a que la proteína se encontraba inmovilizada única y exclusivamente en la superficie del soporte, como se había supuesto a tenor de los valores de la masa molecular de la enzima y del tamaño de poro del soporte.

En la Tabla 2, se encuentran resumidos los rendimientos obtenidos en las distintas inmovilizaciones covalentes de naringi-

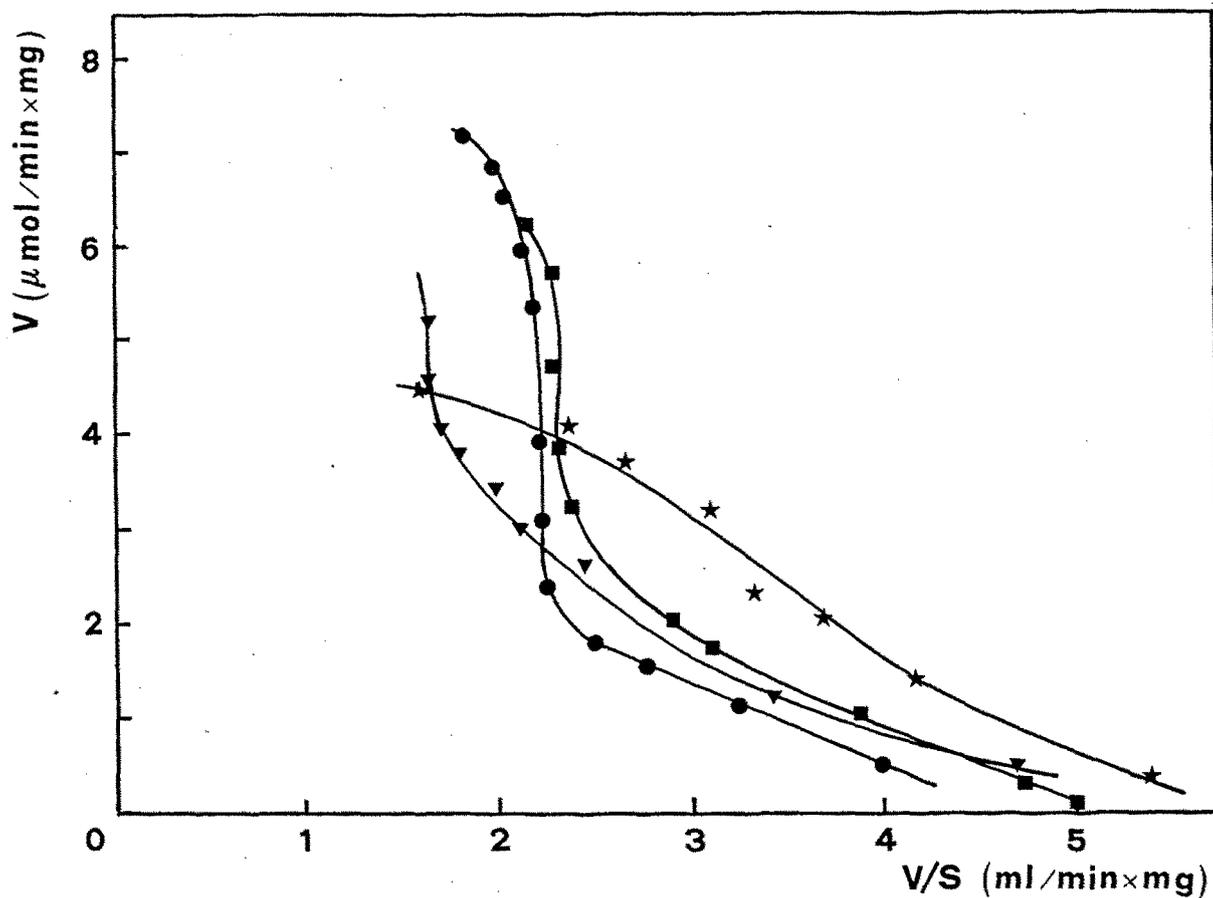


FIGURA 17.- Representación de Eadie-Hofstee para naringinasa inmovilizada en CPG-460 a través de residuos tirosilo con distintas concentraciones de enzima: (●) 13,52 mg proteína/g CPG, (■) 2,5 mg proteína/g CPG, (▼) 1 mg proteína/g de CPG y (★) 0,4 mg de proteína/g de CPG. Se ha utilizado como sustrato el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y las medidas de actividad enzimática han sido realizadas en las condiciones estándar de ensayo.

Tabla 2.- Rendimientos de la inmovilización covalente de naringinasa a través de residuos de tirosilo a un soporte de vidrio, variando la concentración de enzima.

PROTEINA INMOVILIZADA $\left[ \frac{\text{mg prot.}}{\text{g CPG}} \right]$	ACTIVIDAD ESP. DEL DERIVADO $\left[ \frac{\text{UAE}}{\text{mg prot.}} \right]$	RENDIMIENTO DE LA INMOVILIZACION $\left[ \frac{(\text{UAE/mg prot})\text{IME}}{(\text{UAE/mg prot})\text{SE}} \right]$ (%)	RENDIMIENTO DE LA ACTIVIDAD INMOVILIZADA (%)	ACTIVIDAD DEL DERIVADO $\left[ \frac{\text{UAE}}{\text{g gel seco}} \right]$
13,5	8,9	97	46	128
2,5	8,2	90	43	22
1,0	6,8	74	34	7
0,4	6,2	68	27	3

nasa a través de residuos tirosilo a un soporte de vidrio poroso variando la concentración de proteína. Es curioso observar la ligera disminución que experimenta el valor de la actividad específica de los distintos derivados inmovilizados al disminuir la concentración de enzima por gramo de soporte. Esta variación anómala puede atribuirse a que conforme el derivado va teniendo menor actividad, el volumen de suspensión del mismo que hay que añadir al medio de reacción es cada vez mayor, y por tanto las concentraciones máximas de sustrato alcanzables van siendo gradualmente menores. Es decir que a medida que disminuye la actividad del derivado inmovilizado, es más difícil alcanzar la saturación, por tanto los valores de velocidad máxima obtenidos son ostensiblemente menores de los que se obtendrían si se pudiera alcanzar dicha saturación.

Debido a los problemas que representó la medida de velocidades iniciales con derivados inmovilizados de tan baja actividad enzimática, se abandonó este método de evaluación de las constantes cinéticas intrínsecas, y se usó otro que permitiera calcular dichas constantes a partir de datos obtenidos en condiciones de limitaciones difusionales internas (77,78,80,81). Como se puede observar en la Figura 16, el valor de la constante de Michaelis intrínseca se obtuvo de la pendiente de la recta obtenida en la extrapolación a concentración

de sustrato nula de los resultados obtenidos a bajas concentraciones de sustrato. La velocidad máxima intrínseca se calculó trazando una recta, cuya pendiente era la  $K_M'$  obtenida anteriormente, en la zona de concentración de sustrato elevada. El corte con el eje de ordenadas de dicha recta corresponde al valor de la citada velocidad máxima. De esta manera se obtuvo un valor para  $K_M'$  de 0,96 mM y una velocidad máxima de 8,8  $\mu$  moles de producto producidos por minuto y por miligramo de proteína.

En la Tabla 3 se encuentran resumidos los valores de las constantes cinéticas obtenidas para la enzima soluble y para los derivados inmovilizados de naringinasa en aminoaril-CPG-40 y CPG-460, utilizando el sustrato sintético.

De la observación del valor de la constante de Michaelis intrínseca calculado para el derivado inmovilizado en CPG-460, se deduce que la inmovilización de la naringinasa en el interior del soporte, condujo a un derivado que mostró una especificidad hacia el sustrato p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido, aproximadamente tres veces superior a la mostrada por la enzima soluble. De la comparación de los valores de  $K_M'$  de la naringinasa inmovilizada en CPG-40 y CPG-460 respectivamente, se concluye que la distribución de enlaces entre la proteína

Tabla 3.- Valores de las constantes cinéticas para naringinasa soluble e inmovilizada a través de residuos de tirosilo en soportes de distinto tamaño de poro, actuando sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

	$K'_M$ (mM)	$V'_{MAX}$ (UAE/mg prot.)
ENZIMA SOLUBLE	1,52	10,66
CPG-40-AA-NARINGINASA	2,86	7,7
CPG-460-AA-NARINGINASA	0,96	8,8

y el soporte es un parámetro que determinó la conformación final activa de la naringinasa inmovilizada. Este fenómeno es fácilmente explicable si se tiene en cuenta que cuando una proteína se inmoviliza en la superficie de un soporte o en el interior de un material poroso, tanto el número de grupos funcionales implicados en la unión enzima-soporte como la distribución de los mismos puede ser totalmente diferente en un caso u otro, con lo cual, ambos derivados inmovilizados pueden presentar comportamientos marcadamente distintos aunque se mantenga constante el nivel de modificación química en el proceso de inmovilización.

Posteriormente, y de forma análoga a cuando se usó como sustrato el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, se procedió a la obtención de los parámetros cinéticos de la naringinasa soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-460, utilizando el sustrato natural naringina.

Así, se obtuvo un valor para la constante de Michaelis de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble de 7 mM, mientras que los datos que se pueden encontrar en la bibliografía oscilan entre 0,64 y 2,2 mM (22-24,35). Estos datos han sido obtenidos usando también naringina como sustrato, pero midiendo la actividad por el método de

Davis, o alguna de sus modificaciones, lo que cuestionaría en bastante medida la posible comparación por las razones ya aducidas.

Es importante destacar, el elevado valor de la constante de Michaelis obtenido para la naringina. Teniendo en cuenta el hecho de que la solubilidad máxima de la naringina en el medio de reacción empleado y a 57 °C es del orden de 10 mM, el uso del sustrato natural no permitió alcanzar la saturación de la enzima, con lo cual el valor de velocidad máxima deducido a partir del ajuste lineal de los valores de velocidad inicial según el método de Eadie-Hofstee, que fué de 150 UAE/mg proteína, es aproximado y bastante cuestionable.

Por otra parte, resulta notoria la diferencia de valores de la constante de Michaelis que se han obtenido en el presente trabajo para los dos sustratos empleados, y que apuntó a una mejor adecuación del sustrato sintético al centro activo de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa. Si se tiene en cuenta además la imposibilidad de alcanzar la saturación de la enzima soluble con el sustrato natural naringina, se corrobora aún más la adecuación del sustrato sintético para la determinación de niveles de naringinasa, dado que en este caso sí es posible alcanzar dicha saturación.

Cuando se estudió la dependencia de la actividad enzimática del derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa con la concentración de sustrato y los resultados experimentales obtenidos se representaron gráficamente usando el método de Eadie-Hofstee, se obtuvo una curva sigmoide que evidenciaba la existencia de limitaciones difusionales internas como puede observarse en la Figura 18.

Para calcular los valores de las constantes cinéticas intrínsecas,  $K_M'$  y  $V_{MAX}'$ , se utilizó el método anteriormente citado para el sustrato sintético.

De esta forma se estimó para la constante de Michaelis intrínseca un valor de 2,8 mM y para la velocidad máxima intrínseca de 31 UAE/mg proteína.

El valor de  $K_M'$  obtenido en el presente trabajo para la enzima inmovilizada actuando sobre naringina es algo más elevado que los referenciados en la bibliografía, que varían entre 0,48 y 0,86 mM, aunque se mantiene la tónica general de la disminución de la constante de Michaelis como consecuencia de la inmovilización (22,23).

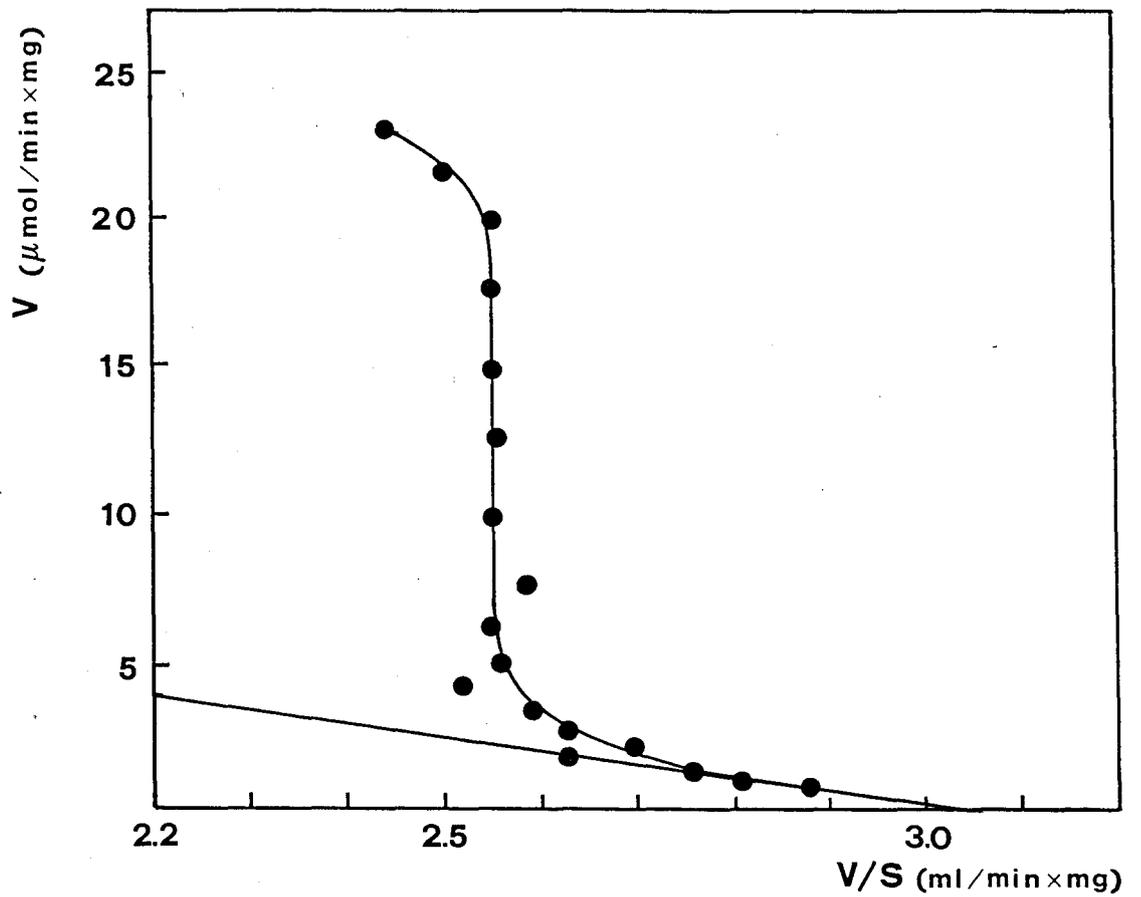


FIGURA 18.- Representación de Eadie-Hofstee para naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 donde se muestra el efecto de la concentración de naringina sobre la actividad enzimática en las condiciones estándar de ensayo.

En cuanto al valor de la velocidad máxima, no es comparable con los referenciados en la bibliografía por las razones aducidas en varias ocasiones respecto al método de medida empleado, ni tampoco con el obtenido en el presente trabajo para la enzima soluble, ya que en este caso no se pudo alcanzar la saturación de la enzima.

En la Tabla 4 se encuentran resumidos los valores de las constantes cinéticas intrínsecas para la naringinasa soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-460, actuando sobre naringina.

#### 4.5.- ESTUDIOS DE INHIBICION

En el presente trabajo se ha investigado el efecto inhibitorio de los cuatro productos intermedios o finales de la actuación enzimática global de la naringinasa: ramnosa, prunina, glucosa y naringenina sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa tanto en su forma soluble como inmovilizada, así como el efecto de la concentración de p-nitrofenol que es uno de los productos de la hidrólisis del sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido por dicha actividad enzimática.

Tabla 4.- Valores de las constantes cinéticas intrínsecas para la naringinasa soluble e inmovilizada, actuando sobre el sustrato natural naringina.

	$K_M'$ (mM)	$V_{MAX}'$ (UAE/mg prot)
ENZIMA SOLUBLE	7,0	150
CPG-460-AA-NARINGINASA	2,85	31

Existen publicaciones en las que se exponen estudios de inhibición de la actividad naringinasa, medida normalmente por el método de Davis, por diferentes azúcares cuya presencia se ha detectado en los zumos cítricos (19,24-26,35). Así, se ha ensayado el efecto de algunas sustancias, como: sorbitol, sacarosa, fructosa, ácidos tartárico y málico, etc. Sin embargo, para los productos que inhiben la actividad, y exceptuando un único trabajo (35), los estudios se han limitado a la cuantificación del porcentaje de actividad perdida en presencia del inhibidor a la concentración promedio encontrada en los zumos, no habiéndose obtenido suficientes datos experimentales para calcular la constante y determinar el tipo de inhibición.

#### 4.5.1.- Inhibición por p-nitrofenol

Los estudios del efecto inhibitor del p-nitrofenol sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa, tanto en forma soluble como inmovilizada, actuando sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido se realizaron utilizando disoluciones de sustrato de concentraciones: 0,0701, 0,701, 1,40, 2,10, 2,80 y 3,15 mM, variando la concentración de inhibidor desde 0 hasta 1,4 mM.

Los valores de velocidad inicial estimados, se representaron gráficamente por el método de Dixon (160), pudiéndose observar que las rectas obtenidas en presencia de inhibidor, interseccionaron con el eje de ordenadas a valores negativos, lo que implicaría que la reacción de hidrólisis del sustrato sintético se hace reversible en presencia del producto p-nitrofenol.

Debido al intenso color amarillo que dicho producto desarrolla en un medio fuertemente alcalino, las medidas de velocidad inicial, en presencia de concentraciones relativamente elevadas de p-nitrofenol, fueron sumamente difíciles, obteniéndose en la mayoría de los casos valores de absorbancia superiores a la unidad. Este problema experimental dificultó en gran manera, la obtención de una constante de inhibición fiable, ya que las medidas estaban sujetas a un gran error. Por ello, el valor de la constante de inhibición del p-nitrofenol se obtuvo, sustituyendo en la ecuación de velocidad (ecuación 17) los valores de las constantes cinéticas intrínsecas, así como los de las constantes de equilibrio y de inhibición por ramnosa (ver apartados 4.6 y 4.5.2) y los datos experimentales de velocidades de reacción, obteniéndose bajo estas condiciones un valor medio para la constante de inhibición por p-nitrofenol de 0,15 mM, para el CPG-460-AA-naringinasa.

#### 4.5.2.- Inhibición por ramnosa

Los estudios del efecto inhibitor de la ramnosa sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble e inmovilizada covalentemente en vidrio poroso, se realizaron utilizando disoluciones de sustrato sintético comprendidas entre 0,07 y 3,15 mM, variando la concentración de inhibidor desde 0 hasta 3,4 mM, así como disoluciones de naringina de concentraciones comprendidas entre 1 y 4 mM, variando, en este caso, la concentración de azúcar de 0 a 6 mM.

Los resultados obtenidos tanto con la enzima en forma soluble como inmovilizada, fueron representados gráficamente según el método de Dixon, obteniéndose sendas familias de rectas que, una vez ajustadas por regresión lineal, interseccionaron en puntos situados en el segundo cuadrante de los ejes cartesianos, tal como puede observarse en las Figuras 19 a 22.

Según el tratamiento de Dixon y de acuerdo con los comportamientos de inhibición observados para las cuatro series de resultados experimentales, el efecto de la ramnosa sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa

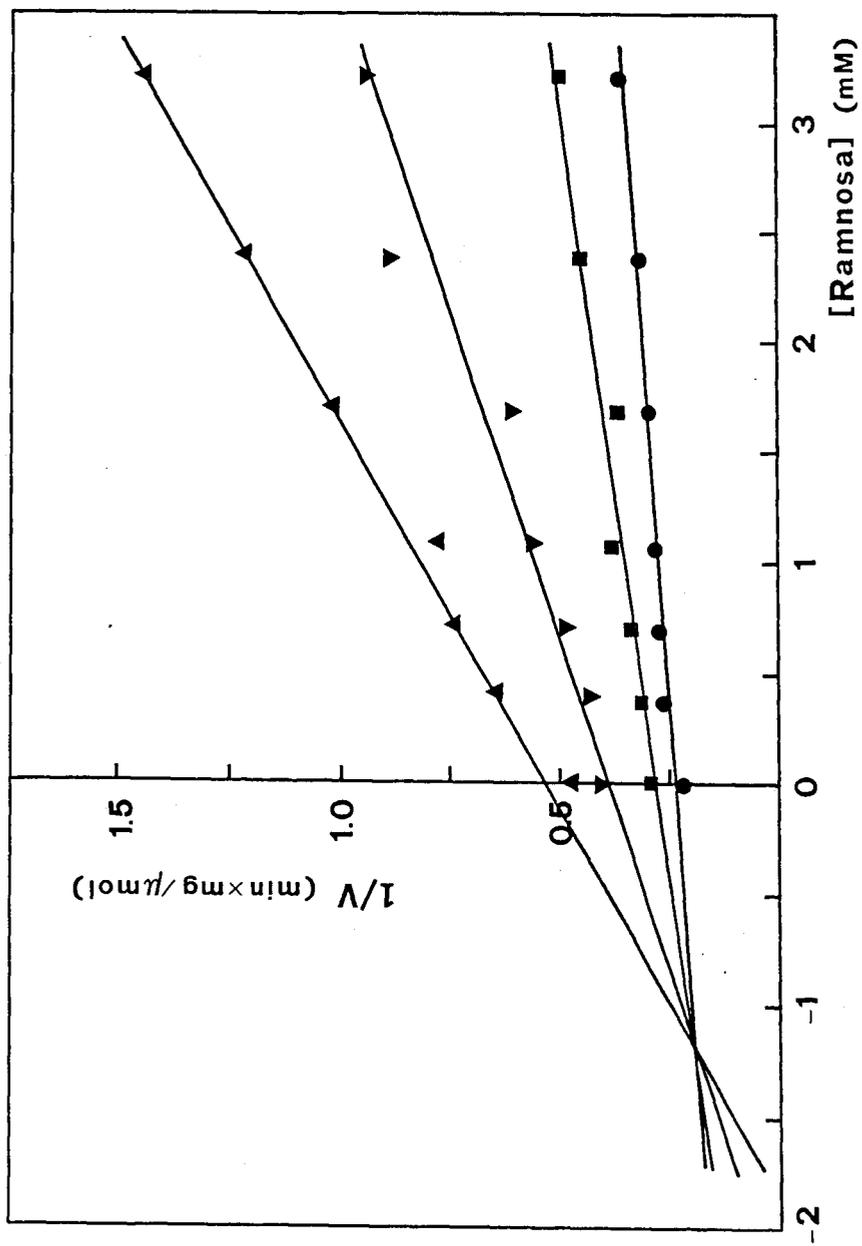


FIGURA 19.- Representación de Dixon de la inhibición por ramnosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble actuando sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido 0,35 mM ( $\blacktriangle$ ), 0,46 mM ( $\blacktriangledown$ ), 0,75 mM ( $\blacksquare$ ) y 1,05 mM ( $\bullet$ ).

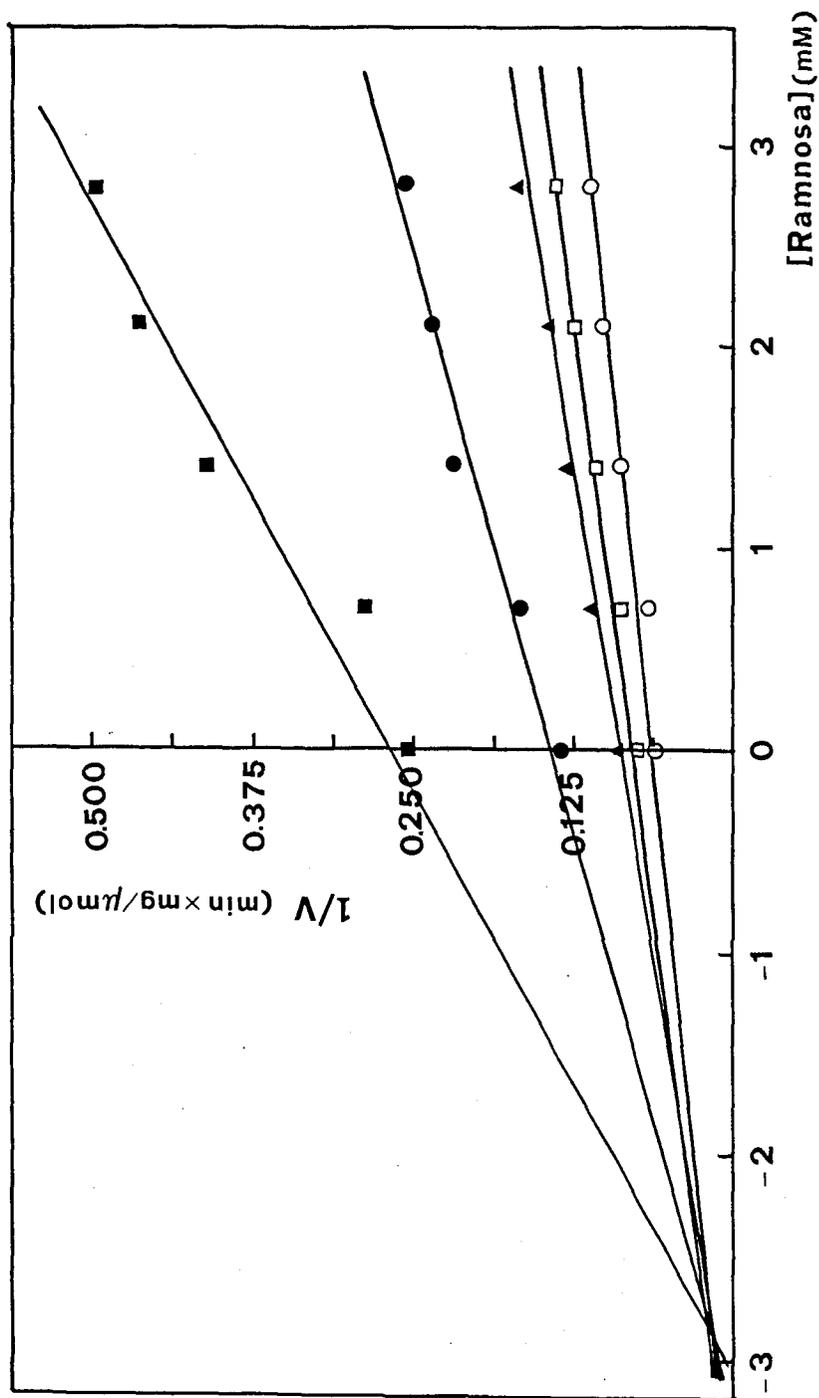


FIGURA 20.- Representación de Dixon de la inhibición por ramnosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido 0,7 mM ( $\blacksquare$ ), 1,4 mM ( $\bullet$ ), 2,1 mM ( $\blacktriangle$ ), 2,8 mM ( $\square$ ) y 3,15 mM ( $\circ$ ).

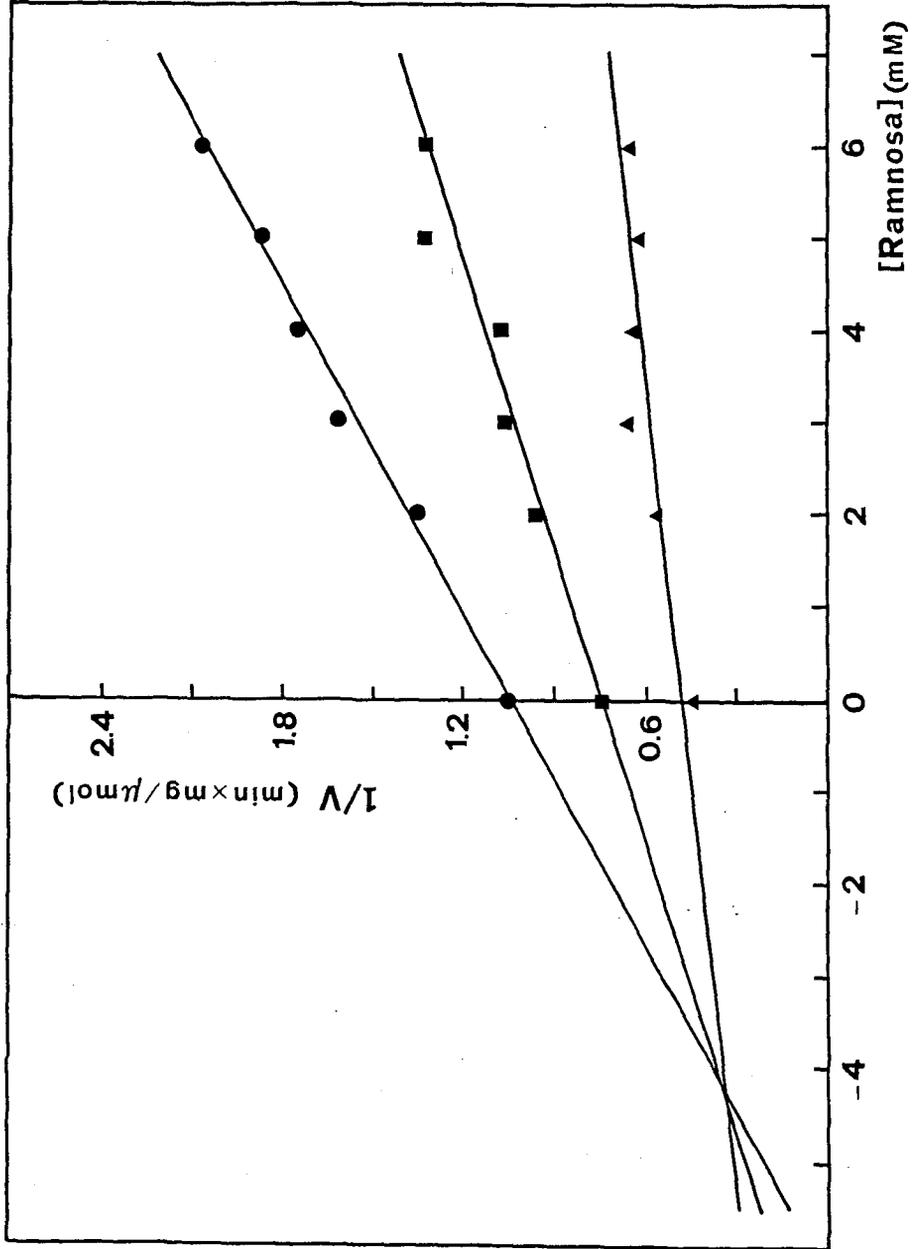


FIGURA 21.- Representación de Dixon de la inhibición por ramosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble actuando sobre naringina 1 mM (●), 2 mM (■) y 3 mM (▲).

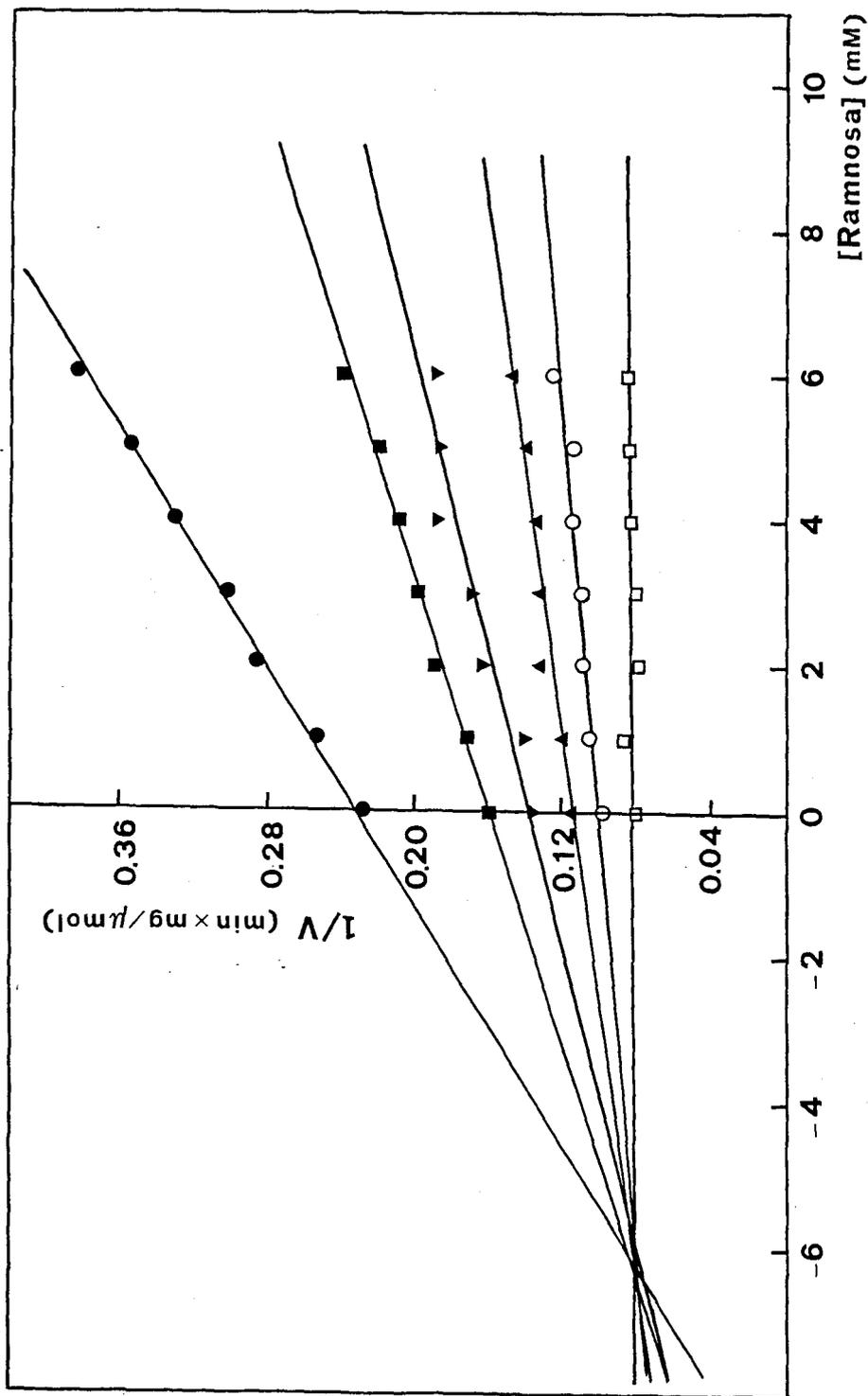


FIGURA 22.- Representación de Dixon de la inhibición por ramnosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre naringina 1 mM (●), 1,5 mM (■), 2 mM (▼), 2,5 mM (▲), 3 mM (○) y 4 mM (□).

de la naringinasa soluble e inmovilizada, se ajustó a una inhibición reversible de tipo competitivo. Los puntos de corte de las familias de rectas permitieron calcular los valores de las constantes de inhibición. Así, los valores obtenidos fueron de 1,2 y 4,27 mM para la enzima soluble y de 3 y 6,12 mM para el derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa, utilizando respectivamente, el sustrato sintético y la naringina.

Con los valores de constante de inhibición de que se dispone, es de destacar que, debido a que la ramnosa inhibe más a la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa cuando ésta actúa sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, que cuando actúa sobre naringina, el uso del sustrato sintético presenta la ventaja de ser un indicador más sensible que el natural de la presencia de este tipo de inhibidor en el medio de reacción.

De la comparación de los valores de constante de inhibición obtenidos con la enzima en forma soluble y con el derivado inmovilizado, se puede deducir que la naringinasa en forma soluble es más sensible al efecto inhibidor de la ramnosa que cuando se encuentra inmovilizada. Lo anterior es otra ventaja más de la inmovilización covalente de naringinasa a través de residuos tirosilo, a un soporte de vidrio poroso.

Estos resultados acerca del efecto inhibitor de la ramnosa sobre la naringinasa con el sustrato sintético y con el natural, apenas son comparables con los referenciados en la bibliografía. Como ya se ha dicho, sólo se ha estudiado de manera cualitativa el efecto de la concentración de ramnosa sobre la actividad enzimática y con naringina como sustrato. A este respecto cabe citar que no se ha encontrado, por ejemplo, un efecto inhibitor notable sobre preparaciones enzimáticas que contienen enzimas pécticas (como el Pectinol 10-M) (19), mientras que sí se ha encontrado que el efecto es más acusado sobre otras preparaciones de naringinasa que contienen poligalacturonasas (36).

#### 4.5.3.- Inhibición por glucosa

Para estudiar el efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad enzimática de la naringinasa, tanto en forma soluble como inmovilizada, se usaron concentraciones de sustrato sintético comprendidas entre 0,2 y 2 mM y la de azúcar varió desde 0 hasta 0,2 M, y las disoluciones de naringina tuvieron concentraciones variables entre 0,5 y 2 mM. En este último caso se usó el mismo rango de concentraciones de glucosa que para el sustrato sintético.

Los resultados experimentales obtenidos se representaron, de la misma manera que para la inhibición por p-nitrofenol y ramnosa por el método de Dixon, y se obtuvieron cuatro familias de rectas que, ajustadas por mínimos cuadrados, se cortaron en puntos situados en el segundo cuadrante de los ejes cartesianos. Como se puede observar en las Figuras 23 a 26, las inhibiciones fueron todas reversibles y de tipo competitivo, con constantes de inhibición de 0,12 y 0,43 M para la enzima soluble y 0,27 y 0,26 M para el derivado CPG-460-AA-naringinasa, actuando ambos frente al sustrato sintético y natural, respectivamente.

Estos valores son bastante más elevados que los encontrados en la inhibición por ramnosa, lo que indica que el efecto inhibidor de la glucosa es mucho más bajo, siendo menor de nuevo este efecto para el derivado inmovilizado que para la enzima soluble.

Comparando el grado de inhibición de la glucosa sobre la actividad enzimática  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble actuando sobre el sustrato sintético y el natural, se deduce que el efecto inhibidor de la glucosa fué más acusado cuando el sustrato es el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido. Este fenómeno también se daba en el estudio de la variación de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa

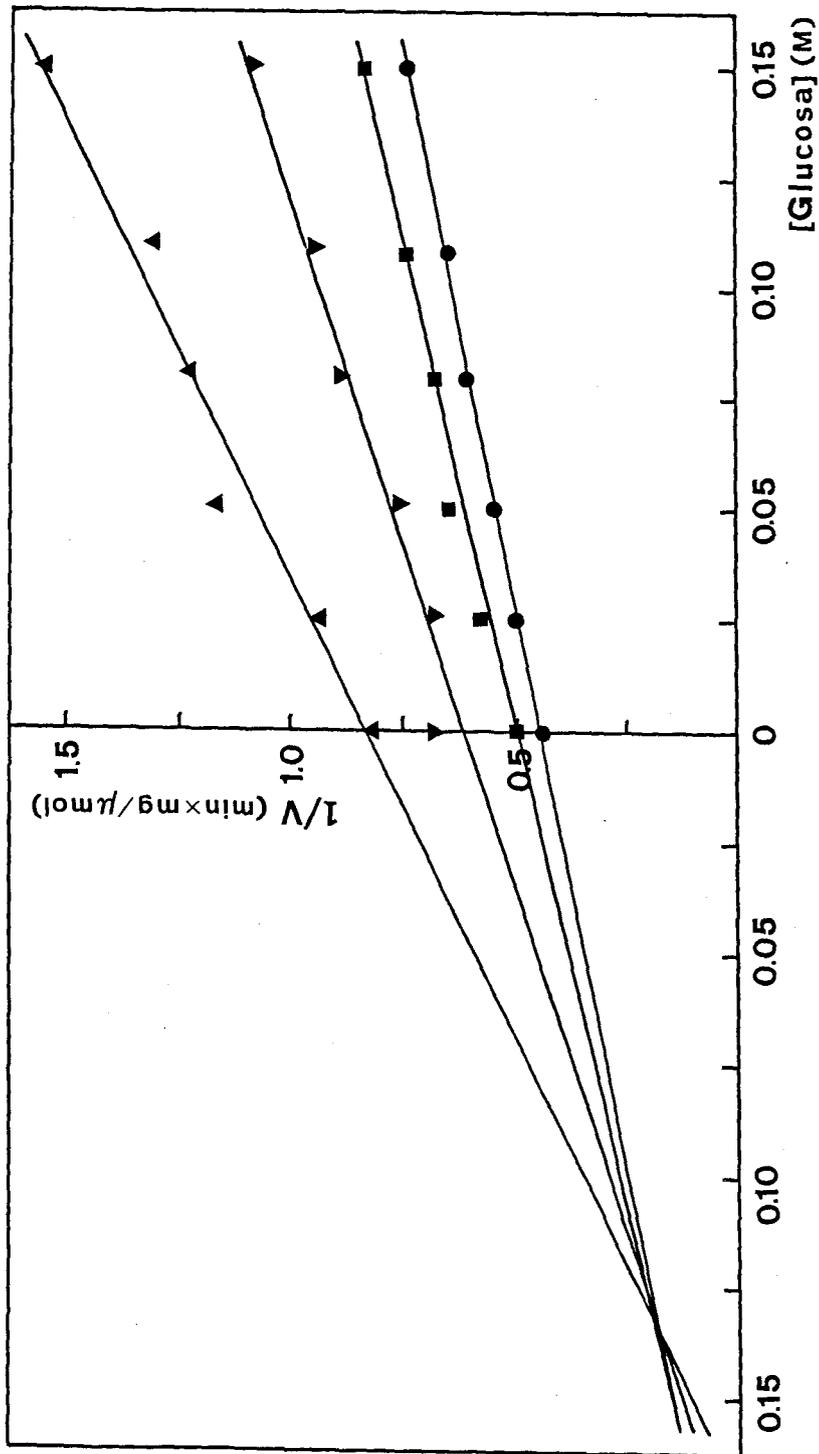


FIGURA 23.- Representación de Dixon de la inhibición por glucosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble actuando sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido 0,21 mM ( $\blacktriangle$ ), 0,26 mM ( $\blacktriangledown$ ), 0,35 mM ( $\blacksquare$ ) y 0,46 mM ( $\bullet$ ).

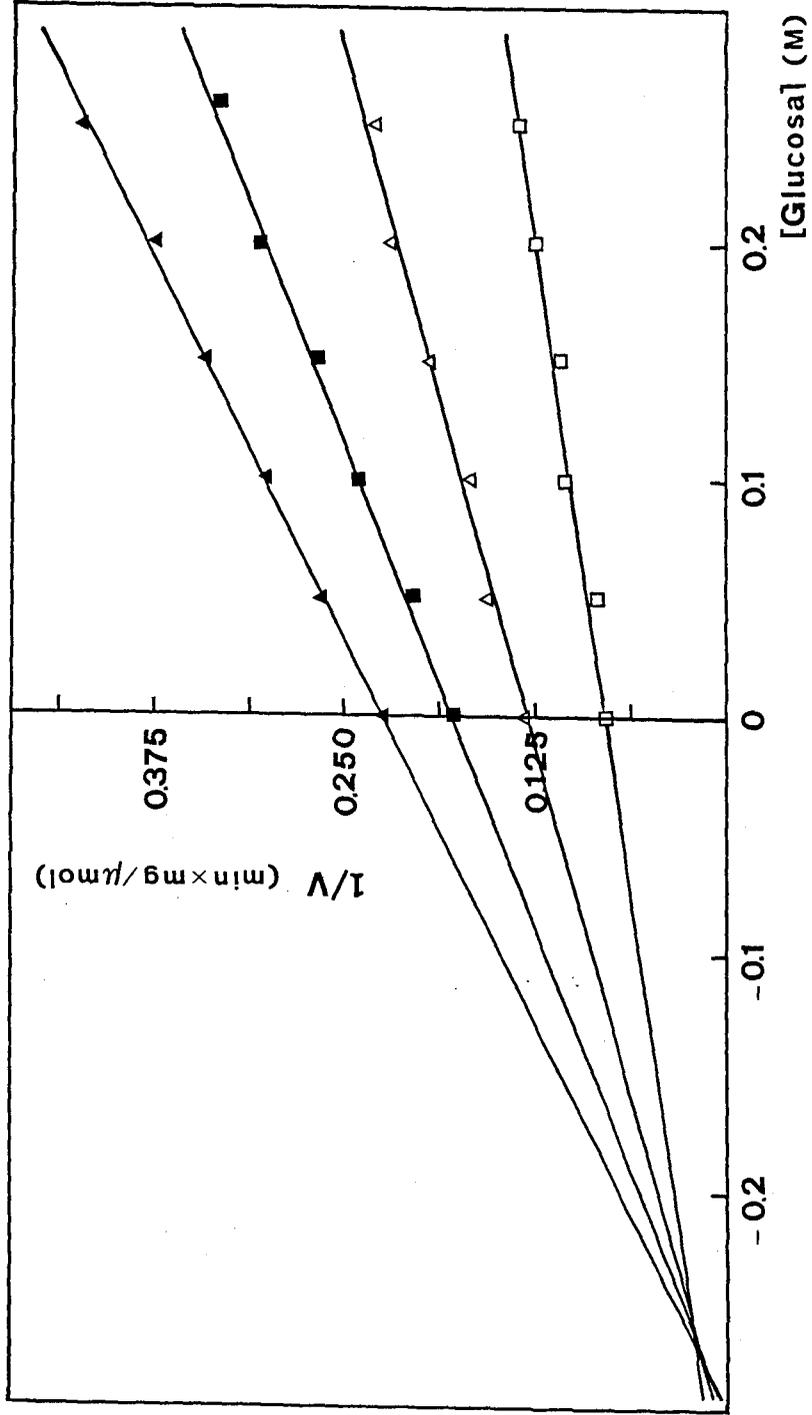


FIGURA 24.- Representación de Dixon de la inhibición por glucosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ranósido 0,7 mM ( $\blacktriangle$ ), 1 mM ( $\blacksquare$ ), 1,4 mM ( $\triangle$ ) y 2 mM ( $\square$ ).

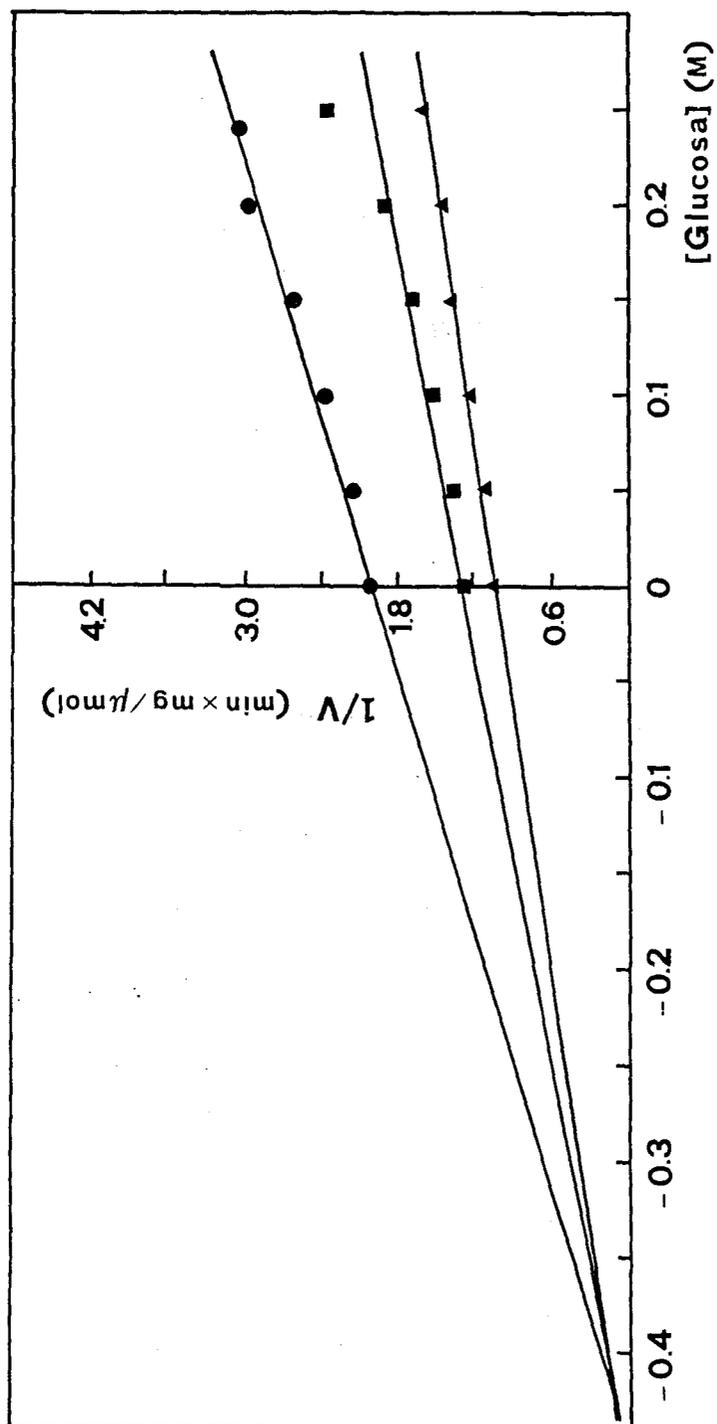


FIGURA 25.- Representación de Dixon de la inhibición por glucosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa soluble actuando sobre naringina 1 mM (●), 1,5 mM (■) y 2 mM (▲).

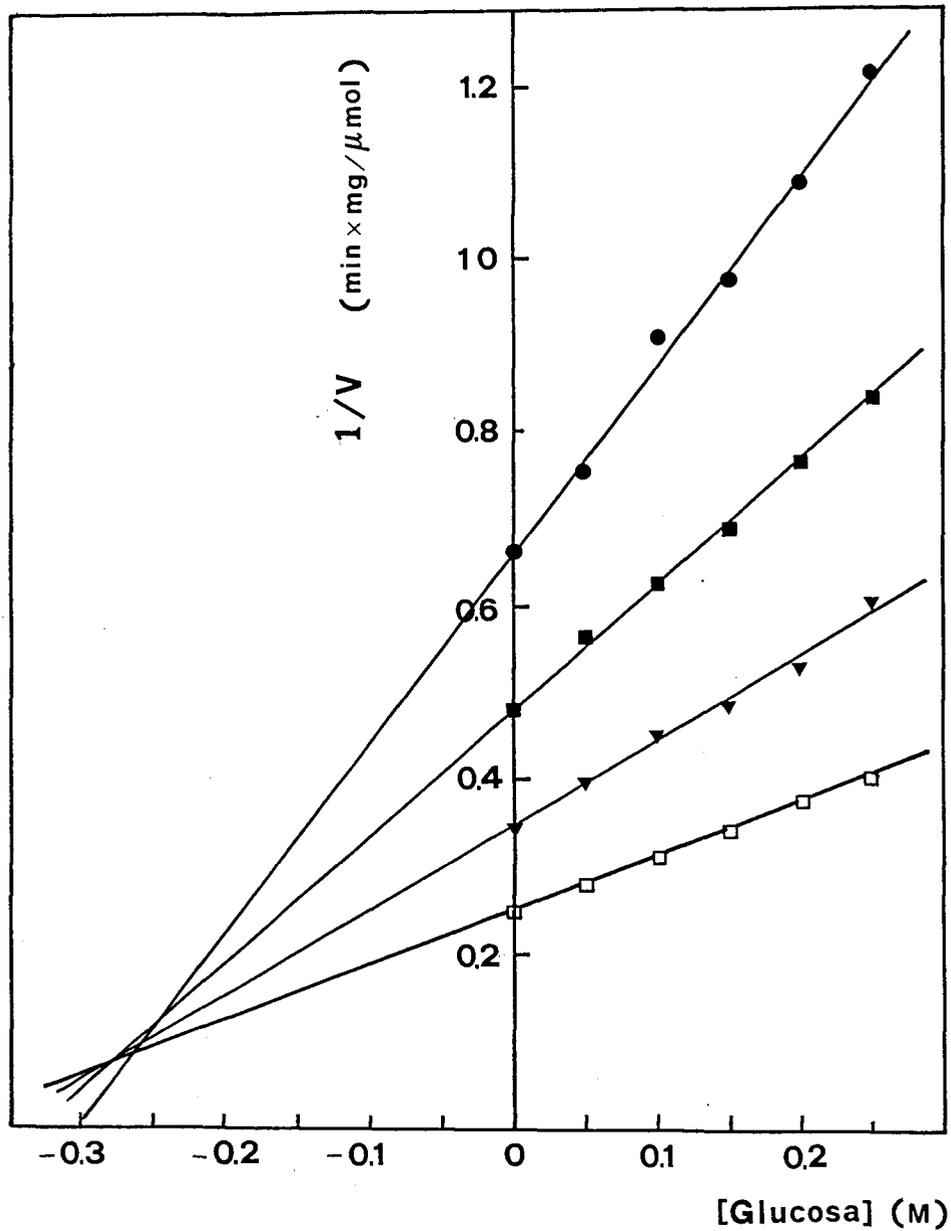


FIGURA 26.- Representación de Dixon de la inhibición por glucosa de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre naringina 0,5 mM (●), 0,75 mM (■), 1 mM (▼) y 1,5 mM (□).

con la concentración de ramnosa. Sin embargo, esta diferencia es mucho menos acusada cuando la enzima se encuentra inmovilizada, encontrándose en este caso valores para las constantes de inhibición prácticamente iguales con independencia del sustrato utilizado. Lo que se ha dicho para la ramnosa, de que aunque en un primer momento pueda parecer negativo el hecho de que se den mayores inhibiciones sobre el sustrato sintético que se propone para la medida de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, sin embargo es una ventaja desde el punto de vista del análisis enzimático debido a su mayor sensibilidad para detectar componentes que puedan afectar a la actividad.

De forma contraria a lo obtenido para la inhibición por ramnosa, y a los resultados del estudio inhibitor de la glucosa sobre la actividad enzimática usando el sustrato sintético, en el caso de utilizar naringina, el valor de la constante de inhibición es menor para el derivado inmovilizado que para la enzima soluble, lo cual implica que la actividad enzimática  $\alpha$ -ramnosidasa es más sensible a la presencia de glucosa en el medio cuando la enzima está inmovilizada que cuando actúa en forma soluble. De todas formas, las constantes de inhibición obtenidas para el sustrato natural naringina, son tan elevadas que se puede decir que para que la glucosa disminuya ostensiblemente la actividad enzimática debe encontrarse en el medio de reacción a

concentraciones muy elevadas, mayores, en todo caso, de las normales en zumos cítricos.

El estudio de la inhibición por la glucosa de la actividad enzimática global de la naringinasa, se ha realizado en muy pocos casos, y las distintas citas bibliográficas aportan resultados también distintos dependiendo de la procedencia de la preparación enzimática utilizada y del método seguido en la medida de la actividad. Los experimentos realizados con Pectinol 100-D (19) dan como resultado que concentraciones elevadas de glucosa inhiben ligeramente la actividad de esta enzima, utilizando para ello el método de Davis. También con este método de medida, pero con otra preparación enzimática (20), se admite que el método de medida no es válido para cuantificar la primera actividad enzimática de la naringinasa; sin embargo se analiza el efecto de la concentración de glucosa sobre la velocidad de reacción, afirmándose que este azúcar únicamente afecta a la segunda etapa de la reacción, o sea, que es la actividad  $\beta$ -glucosidasa la que es inhibida por la adición de glucosa, sin intervenir para nada en la primera etapa de la reacción.

Con la preparación enzimática de Coniothyrium diplodiella (25), se ha observado que la actividad naringinasa se inhibía considerablemente a concentraciones de glucosa elevadas

(0,2 M). Este mismo resultado, fué el obtenido con la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa procedente de Aspergillus niger, a concentraciones de glucosa 0,15 M, utilizando, de la misma manera que en el caso anterior, el método de Davis para cuantificar la actividad naringinasa.

En una referencia bibliográfica en la que se analiza el efecto de la concentración de glucosa sobre dos preparaciones comerciales de naringinasa, denominadas N1B y N2B (36), los resultados experimentales no están de acuerdo con lo que se discute en el texto. Los autores siguieron el progreso de la reacción enzimática por fluorodensitometría, método de medida que permite conocer en cada momento los porcentajes de naringina, prunina y naringenina, por lo que se puede apreciar cuando están inhibidas las actividades  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa. Analizando las gráficas referenciadas, cuando se utilizó una concentración alta de glucosa (100 mg/ml), la segunda actividad enzimática se inhibió apreciablemente, acumulándose la prunina; sin embargo, cuando se utilizó una mezcla de azúcares con una baja concentración de glucosa (20 mg/ml) la actividad  $\beta$ -glucosidasa no se inhibió tanto, y sin embargo también se acumuló prunina en porcentaje aún mayor; los autores de este trabajo afirman que la prunina inhibe la primera actividad, pero realmente, en este segundo caso de mayor acumulación de prunina, la desaparición de naringina es

la misma que cuando el ensayo enzimático se hizo en ausencia de azúcares, con lo cual la primera actividad  $\alpha$ -ramnosidasa no se inhibe por prunina y, por lo tanto, la ligera inhibición de esta primera actividad, en el primer caso, es debida a la mayor concentración de glucosa en el medio.

El único trabajo en el que se refiere una constante de inhibición para la glucosa, se ha publicado recientemente (35); en él se ha realizado un estudio del efecto inhibitor de la glucosa sobre la naringinasa de Aspergillus niger actuando sobre naringina y utilizando bajas concentraciones de glucosa (del orden de milimolar), considerando a la glucosa como un producto de la reacción y sin tener en cuenta que este azúcar se encuentra en los zumos cítricos a concentraciones del orden de molaridad, y que es a estas concentraciones a las que es interesante realizar los estudios de inhibición para una posible aplicación a nivel práctico. Se referencia además una constante de inhibición reversible no competitiva, resultados que difieren bastante de lo encontrado en el presente trabajo, y que puede ser asignado a la diversidad de comportamiento que exhiben las naringinasas dependiendo de la fuente y del grado de purificación.

#### 4.5.4.- Inhibición por prunina y naringenina

Para analizar el efecto de la concentración de prunina sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-460, actuando tanto sobre el sustrato natural como sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, se llevaron a cabo una serie de experimentos variando las concentraciones de sustrato sintético entre 0,35 y 1,75 mM, las de naringina entre 1 y 3 mM y las de prunina entre 0 y 4 mM.

Los resultados obtenidos tanto para la enzima soluble como para el derivado inmovilizado, indican que la prunina, el  $\beta$ -glucósido de naringenina, no inhibe la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa procedente de Penicillium sp. utilizada en el presente trabajo, ni actuando frente al sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido ni frente a la naringina.

El único trabajo que hace referencia a la posible inhibición del intermedio prunina sobre la naringinasa, es un estudio en el que se indica que la prunina, en concentraciones similares a las producidas en la reacción, sólo inhibe ligeramente a la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa (36), resultado bastante discutible por las razones ya expuestas anteriormente.

La naringenina es una flavanona virtualmente insoluble en disoluciones acuosas. A fin de estudiar su efecto sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa, es preciso disolver el aglicón en un disolvente menos polar y miscible con el agua, y añadirla de esa forma a la disolución en la que se ensaya la actividad enzimática. En la única referencia bibliográfica en la que se realiza tal tipo de estudio (19), la naringenina fué disuelta en una mezcla isopropanol:agua (30:70 V/V), adicionándose después los volúmenes adecuados de esta disolución (3,5 mM) al medio de reacción para conseguir las concentraciones deseadas de naringenina.

En el presente trabajo se repitieron las condiciones experimentales expresadas por los mencionados autores para estudiar el efecto de la naringenina sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble e inmovilizada, actuando tanto sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, como sobre su sustrato natural naringina, no siendo posible obtener resultados de ningún tipo, debido a dos razones: en primer lugar, la naringinasa empleada en el presente estudio (tanto soluble como inmovilizada) no mostró actividad  $\alpha$ -ramnosidasa ni siquiera para las menores concentraciones de naringenina empleadas (0,05 mM), y no a causa del efecto inhibitor del aglicón, sino porque la presencia del isopropanol en el medio de reacción condujo a la desnatu-

realización de la enzima. De hecho, la realización de ensayos de actividad sin naringenina, pero en presencia del isopropanol que se añadiría para lograr la mencionada concentración del aglicón, dió resultados negativos en cuanto a la actividad enzimática. Por otro lado, la naringenina presentó en medio básico (el medio de medida es NaOH 0,5 M) una elevada absorción a la longitud de onda de absorción del p-nitrofenol (400 nm), dificultando en gran manera las medidas de velocidad.

Sin embargo, y a pesar de estas dificultades, no parece que la concentración de naringenina en los zumos donde sea necesaria la actuación de la naringinasa para el desamargado, sea muy notable, siendo por lo tanto de importancia secundaria la determinación del efecto del aglicón sobre la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de la naringinasa soluble e inmovilizada.

A modo de resumen, en la Tabla 5, se encuentran recogidos los valores de las constantes de inhibición, así como los de la constante de Michaelis intrínseca obtenidos con la naringinasa soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-460, actuando sobre el sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y sobre naringina, respectivamente.

Tabla 5.- Resumen de las constantes de Michaelis y de inhibición para naringinasa soluble e inmovilizada en aminoaril-CPG-460, actuando ambas sobre el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y sobre la naringina.

ENZIMA	SOLUBLE	$K_M$ (mM)	$K_i$ (mM)				
			p-nitrofenol	ramnosa	glucosa	prunina	naringenina
CPG-460-AA-NARINGINASA	p-nitrofenil- - $\alpha$ -L-ramnósido	1,52	-----	1,2	$1,2 \times 10^2$	N.O.	N.O.
	naringina	7,0	-----	4,3	$4,3 \times 10^2$	N.O.	N.O.
CPG-460-AA-NARINGINASA	p-nitrofenil- - $\alpha$ -L-ramnósido	0,96	0,15	3,0	$2,7 \times 10^2$	N.O.	N.O.
	naringina	2,85	-----	6,1	$2,6 \times 10^2$	N.O.	N.O.

N.O. = No observada.

#### 4.6.- DETERMINACION DE LA CONVERSION DE EQUILIBRIO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la experimentación orientada a la obtención de la constante de inhibición del p-nitrofenol, ya comentados anteriormente en el apartado 4.5.1, se procedió a realizar una serie de ensayos tendentes a obtener el valor de la conversión de equilibrio, con la cual poder calcular la constante de equilibrio del sistema.

Para ello, se prepararon distintas mezclas de reacción, con concentraciones de sustrato comprendidas entre 0,5 y 3,44 mM, y añadiendo cantidades variables de naringinasa soluble (de 3 a 6  $\mu\text{g/ml}$ ) y de derivado inmovilizado (de 3 a 6 mg de gel/ml), manteniendo, en todos los casos, el pH y la temperatura en sus valores óptimos. Las mezclas se dejaron reaccionar durante un largo período de tiempo (aproximadamente 48 horas) y al cabo del mismo se analizó el contenido en p-nitrofenol, pudiéndose obtener de esta manera los valores de la conversión de equilibrio. Se tomó como valor definitivo la media aritmética de dichas conversiones, obteniéndose así un valor para la conversión de equilibrio de 0,55.

Asimismo, se observó que las conversiones obtenidas eran todas iguales e independientes de la concentración de sustrato inicial, con lo cual puede decirse que la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido, es una reacción reversible de primer orden. Con el valor de la conversión de equilibrio se calculó la constante de equilibrio del sistema, definida como:

$$K_{eq} = \frac{X_E}{1 - X_E}$$

obteniéndose para dicha constante un valor de 1,22.

Este efecto de reversibilidad de la reacción no se observó cuando la enzima, en forma soluble o inmovilizada, se hizo actuar sobre el sustrato natural naringina, puesto que se pudo llegar con relativa facilidad a alcanzar la conversión unidad.

#### 4.7.- RESULTADOS DEL REACTOR DE LECHO FIJO CON NARINGINASA INMOVILIZADA

A fin de comprobar la validez de las hipótesis propuestas en el presente trabajo para desarrollar la ecuación cinética que define el comportamiento del sistema enzimático y el modelo de reactor tubular de lecho fijo conteniendo partículas esféricas de naringinasa inmovilizada que se desarrolló posteriormente, se procedió a obtener las conversiones de salida de un reactor tubular, usando como sustrato disoluciones de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido y de naringina, tal y como se describió en el apartado correspondiente.

##### 4.7.1.- Sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido

Para conseguir el fin propuesto, se montó un reactor tubular de lecho fijo donde se empaquetaron 100 mg de derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa. Las dimensiones del reactor fueron de 1 cm de diametro interno y 0.35 cm de altura, y se mantuvo durante toda la experimentación termostatado a 57 °C.

Se procedió a alimentar el reactor descrito con disoluciones del sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido en tampón ftalato ácido de potasio/ClH 0,1 M pH 3,5 de concentraciones comprendidas entre 0,4 y 3,5 mM alimentando cada una de las disoluciones a tres caudales distintos: 5, 10,17 y 15,0 ml/min.

Se midieron las concentraciones de producto en el efluente del reactor en cada caso, usándo el procedimiento descrito en el apartado correspondiente de métodos, obteniéndose así una serie de valores de la conversión para distintas condiciones de alimentación al reactor (concentración y caudal de sustrato). Estos resultados experimentales se encuentran resumidos en la Tabla 6, y serán los que previa comparación con los valores obtenidos con el modelo prupuesto, verificarán la validez del mismo.

#### 4.7.2.- Sustrato natural naringina

De forma análoga a lo descrito en el apartado anterior, se procedió a alimentar el reactor de lecho fijo con distintas disoluciones de naringina en tampón ftalato ácido

Tabla 6.- Conversiones de salida del reactor tubular de lecho fijo de CPG-460-AA-naringinasa, usando como sustrato p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido.

$C_{SR0}$ (mM)	F (ml/min)	$X_{exp.}$
0,437	5,0	0,52
0,437	10,2	0,51
0,437	15,0	0,44
0,875	5,0	0,51
0,875	10,2	0,45
0,875	15,0	0,39
1,750	5,0	0,49
1,750	10,2	0,39
1,750	15,0	0,32
3,500	5,0	0,43
3,500	10,2	0,35
3,500	15,0	0,25

de potasio/ClH 0,1 M de pH 3,5 de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 5 mM. Cada una de las disoluciones se alimentó a seis caudales distintos: 2,5, 3,2, 3,6, 4,0, 4,8 y 6,0 ml/min. Asimismo, el reactor se mantuvo en todo momento termostatado a 57°C.

Una vez alcanzado el régimen estacionario, se recogieron alícuotas del efluente de salida del reactor, y se analizaron siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.6.2. Se obtuvieron así valores de la conversión para distintas condiciones de alimentación al reactor, tal y como puede verse en la Tabla 7. Estos valores de conversión son los que posteriormente se compararon con los obtenidos por el modelo de diseño del reactor de lecho fijo, pudiendo así comprobarse la validez del modelo propuesto para dos sistemas enzimáticos que obedezcan a cinéticas distintas de las que forman parte de la generalización para la cual está desarrollado el diseño de reactores.

Tabla 7.- Conversiones de salida del reactor tubular de lecho fijo de CPG-460-AA-naringinasa, usando naringina como sustrato.

$C_{SRO}$ (mM)	F (ml/min)	$X_{exp.}$
0,5	3,2	0,67
0,5	3,6	0,65
0,5	4,0	0,62
0,5	4,8	0,55
0,5	6,0	0,42
1,0	3,2	0,64
1,0	3,6	0,61
1,0	4,0	0,58
1,0	4,8	0,52
1,0	6,0	0,43
2,0	2,5	0,66
2,0	3,2	0,60
2,0	3,6	0,56
2,0	4,0	0,53
2,0	4,8	0,45
2,0	6,0	0,34
3,0	2,5	0,63
3,0	3,2	0,57
3,0	3,6	0,53
3,0	4,0	0,50
3,0	4,8	0,41
4,0	2,5	0,60
4,0	3,2	0,53
4,0	3,6	0,47
4,0	4,0	0,43
4,0	4,8	0,33
5,0	2,5	0,56
5,0	3,2	0,46
5,0	3,6	0,42
5,0	4,0	0,36

5.- DESARROLLO TEORICO

## 5. DESARROLLO TEORICO

### 5.1.- DIFUSION Y REACCION EN PARTICULAS ESFERICAS POROSAS

La complejidad del fenómeno de difusión acoplado al de reacción en el interior de catalizadores porosos determina que, a la hora de formular cualquier modelo matemático, haya que introducir una serie de hipótesis que tiendan a simplificarlo, sin que esto vaya en detrimento de su aplicabilidad. De esta manera, se han asumido, como base del modelo que aquí se presenta, las siguientes:

a) La enzima se encuentra uniformemente distribuida en toda la partícula catalítica.

b) El proceso evoluciona en estado estacionario y en régimen isotérmico.

c) La resistencia a la transferencia de materia entre la disolución y la superficie exterior de la partícula es despreciable.

d) Las partículas de catalizador son esferas de igual tamaño.

e) La difusión del sustrato y de los productos dentro de la partícula de catalizador se rige por la primera ley de Fick, y las difusividades no varían de un punto a otro de la partícula.

f) La reacción enzimática implica un sólo sustrato.

#### 5.1.1.- Ecuaciones diferenciales del proceso

En la Figura 27 está representado el esquema de una partícula esférica de catalizador, en el que se exponen las cotas radiales, las concentraciones de sustrato y producto en un punto de la partícula y en la superficie de la misma, siendo estas últimas iguales a las que existen en el seno de la disolución.

Bajo los supuestos anteriormente citados, las ecuaciones diferenciales que rigen el proceso global de difusión y reacción química para el sustrato y el producto en coordenadas esféricas son, respectivamente :

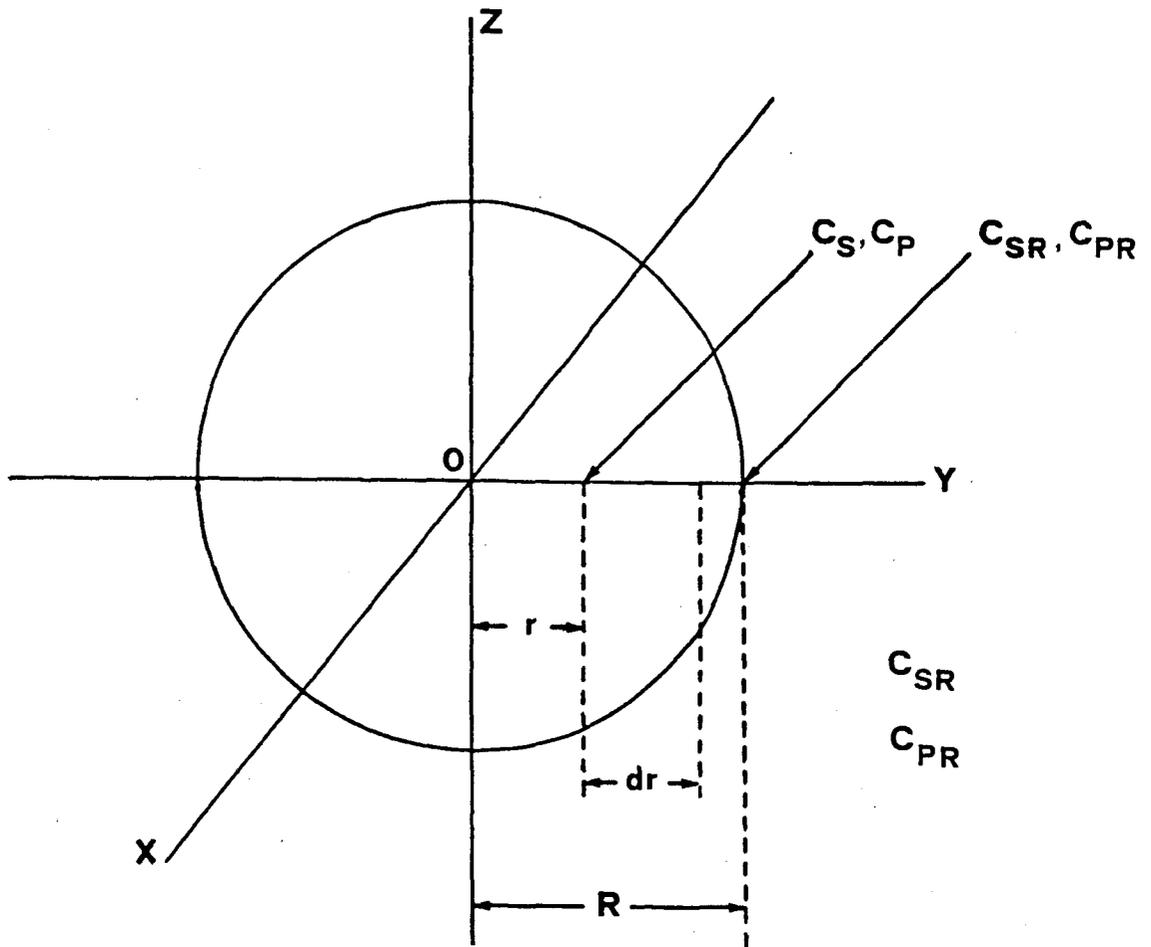


FIGURA 27.- Esquema de una partícula esférica de catalizador, en el que se exponen las cotas radiales, las concentraciones de sustrato y producto en un punto de la partícula y en la superficie de la misma.

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dC_S}{dr} \right) = \frac{1}{D_S} v_S \quad (1)$$

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dC_P}{dr} \right) = - \frac{j_P}{D_P} v_S \quad (2)$$

donde  $v_S$  es la velocidad local de desaparición del sustrato debido a la reacción enzimática por unidad de volumen de partícula catalítica,  $D_S$  y  $D_P$  las difusividades del sustrato y producto, respectivamente, y  $j_P$  el coeficiente estequiométrico del producto.

Las condiciones de contorno asociadas a las ecuaciones 1 y 2 son :

$$r = 0 ; \quad C_S = C_{S0} ; \quad C_P = C_{P0}$$

$$r = R ; \quad C_S = C_{SR} ; \quad C_P = C_{PR} \quad (3)$$

$$r = 0 ; \quad \frac{dC_S}{dr} = 0 ; \quad \frac{dC_P}{dr} = 0$$

Al objeto de generalizar el tratamiento, haciéndolo independiente de las características particulares de cada proceso, se definen las siguientes variables adimensionales:

$$\begin{aligned}\rho &= \frac{r}{R} \\ S &= \frac{C_S}{C_{SR}} \\ P &= \frac{C_P}{C_{SR}} \\ v &= \frac{V_S}{V'_M}\end{aligned}\quad (4)$$

Las ecuaciones 1 y 2 se convierten entonces en :

$$\frac{1}{\rho^2} \frac{d}{d\rho} \left( \rho^2 \frac{dS}{d\rho} \right) = \phi_S v \quad (5)$$

$$\frac{1}{\rho^2} \frac{d}{d\rho} \left( \rho^2 \frac{dP}{d\rho} \right) = - \phi_P v \quad (6)$$

donde  $\phi_S$  y  $\phi_P$  son módulos adimensionales de difusión definidos por las ecuaciones :

$$\phi_S = \frac{R^2 V'_M}{C_{SR} D_S} \quad (7)$$

$$\phi_P = \frac{R^2 V'_M j_P}{C_{SR} D_P} \quad (8)$$

Puesto que estos módulos no obedecen a ninguna forma particular de la ley de velocidad de la reacción enzimática, a diferencia de otros utilizados en tratamientos semejantes (77 , 86, 101, 111), nos lleva a la consideración de que tales módulos han de ser tenidos en cuenta como naturales y absolutamente generales. Por la misma razón, las ecuaciones 5 y 6, son de total aplicabilidad a procesos como el que aquí se describe, con independencia de cual sea su ley de velocidad química.

Las condiciones de contorno del sistema aplicables a las ecuaciones 5 y 6 son :

$$\begin{aligned} \rho = 0 ; \quad S = S_0 ; \quad P = P_0 \\ \rho = 1 ; \quad S = 1 ; \quad P = C_R \\ \rho = 0 ; \quad \frac{dS}{d\rho} = 0 ; \quad \frac{dP}{d\rho} = 0 \end{aligned} \quad (9)$$

donde se ha designado por  $C_R$  a la relación:

$$C_R = \frac{C_{PR}}{C_{SR}} \quad (10)$$

A partir de las ecuaciones 5 y 6, teniendo en cuenta las definiciones de  $\phi_S$  y  $\phi_P$  y las condiciones de contorno anteriores, se llega a la relación siguiente entre las magnitudes P y S:

$$P = C_R + j_P \text{ Dif} (1-S) \quad (11)$$

donde:

$$\text{Dif} = \frac{D_S}{D_P} \quad (12)$$

De la misma manera que las ecuaciones 5 y 6, la relación 11 no depende de la ecuación de velocidad de la reacción enzimática,  $V_S$ .

### 5.1.2.- Factor de eficacia

Para reacciones en el interior de partículas catalíticas, se define el factor de eficacia como la relación entre la velocidad media - efectiva de reacción en toda la partícula y la velocidad que tendría lugar en la misma en ausencia de limitaciones difusionales, es decir, bajo unas con-centraciones de reactantes y productos uniformes e iguales a las del líquido en contacto con la super-ficie externa de la partícula. Su expresión matemá-tica es :

$$\eta = \frac{\langle v_S \rangle_{\text{partícula}}}{v_S \text{ superficie}} = \frac{\langle v \rangle_{\text{partícula}}}{v \text{ superficie}} \quad (13)$$

Para partículas esféricas, se verifica que :

$$\langle v_S \rangle_{\text{partícula}} = \frac{3}{4 \pi R^3} \int_0^R v_S 4 \pi r^2 dr \quad (14)$$

o bien, recordando las definiciones de  $\rho$  y  $v$  rea-lizadas en el apartado 5.1.1. :

$$\langle v \rangle_{\text{partícula}} = 3 \int_0^1 v \rho^2 d\rho \quad (15)$$

con lo que la expresión del factor de eficacia es:

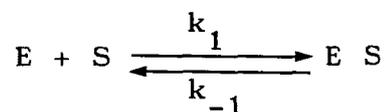
$$\eta = \frac{3}{v_{\text{superficie}}} \int_0^1 v \rho^2 d\rho \quad (16)$$

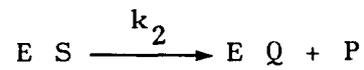
La evaluación de este factor de eficacia exige el conocimiento previo del perfil radial de velocidad de reacción ó, en su defecto, el perfil de concentraciones y además la ley de velocidad de la reacción enzimática.

5.1.3.- Aplicación del modelo a procesos enzimáticos reversibles, tipo Michaelis-Menten y con inhibición competitiva por producto

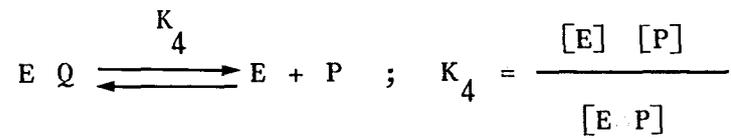
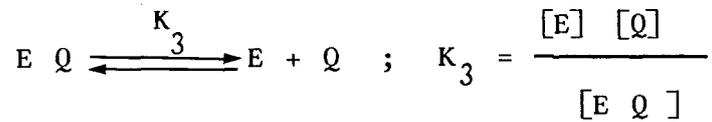
Supongamos una reacción enzimática cuyo mecanismo se pueda esquematizar de la forma siguiente :

a) Etapas de reacción :

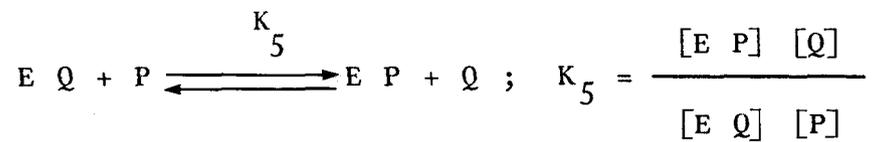




b) Etapas de inhibición :



c) Etapa de equilibrio entre los dos complejos



Para el mecanismo anterior, la ecuación adimensional de velocidad, se expresa de la forma :

$$v = \frac{c_S - \frac{c_P}{K_{eq}}}{K'_M + c_S + \frac{K'_M}{K_P} c_P + \frac{K'_M}{K_Q} c_Q} \quad (17)$$

Esta ecuación de velocidad engloba, respectivamente, a todos los procesos enzimáticos que transcurren con cinéticas de tipo Michaelis-Menten reversible, con inhibición competitiva por el producto y Michaelis-Menten simple. En particular, cuando  $K_{eq}$  tiene un valor muy elevado, es decir tiende a infinito, el proceso es típicamente irreversible; y si esto ocurre para  $K_P$  y  $K_Q$ , los efectos inhibidores debidos a uno, o a ambos, productos no son significativos. En el caso de reacciones de hidrólisis, en las que las concentraciones de ambos productos P y Q son iguales, la ecuación de velocidad en forma adimensional queda simplificada de la siguiente manera :

$$v = \frac{C_S - \frac{C_P}{K_{eq}}}{K'_M + C_S + K'_M \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right) C_P} \quad (18)$$

Introduciendo las variables S y P, definidas anteriormente, la ecuación 18 se transforma en :

$$v = \frac{S - \frac{P}{K_{eq}}}{\frac{K'_M}{C_{SR}} + S + K'_M P \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)} \quad (19)$$

Eliminando la variable P, mediante la ecuación 11, y teniendo en cuenta que para los casos citados anteriormente  $j_p = 1$ , queda :

$$v = \frac{1 + \frac{\text{Dif}}{K_{\text{eq}}}}{1 - K'_M \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)} \frac{s - \gamma}{\beta + s} \quad (20)$$

donde  $\beta$  y  $\gamma$  son módulos adimensionales definidos por :

$$\beta = \frac{\frac{K'_M}{C_{SR}} + K'_M (C_R + \text{Dif}) \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)}{1 - K'_M \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)} \quad (21)$$

$$\gamma = \frac{C_R + \text{Dif}}{K_{\text{eq}} + \text{Dif}} \quad (22)$$

Sustituyendo el valor de v, dado por la ecuación 20, en la ecuación 5, se obtiene finalmente :

$$\frac{1}{\rho^2} \frac{d}{d\rho} \left( \rho^2 \frac{dS}{d\rho} \right) = \phi'_S \frac{S - \gamma}{\beta + S} \quad (23)$$

donde, a su vez :

$$\phi'_S = \phi_S \frac{1 + \frac{\text{Dif}}{K_{eq}}}{1 - K'_M \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)} \quad (24)$$

La ecuación 23 contiene, como única variable función de  $\rho$ , a la concentración adimensional de sustrato,  $S$ , y describe, por sí sola, el proceso global de difusión-reacción en la partícula esférica de catalizador. En ella, el parámetro  $\gamma$  mide el grado de aproximación de la reacción química a la situación de equilibrio de forma que, cuando  $\gamma = 1$  (lo que corresponde a un valor de  $C_R = K_{eq}$ ) se habrá alcanzado éste. Para valores de  $\gamma$  inferiores a la unidad, el proceso evoluciona en sentido directo, formándose producto a partir del sustrato, y para valores de  $\gamma$  superiores a la unidad el proceso químico transcurre en sentido contrario. En la Tabla 8 se indica, de modo esquemático, la evolución de  $v$ ,  $S$  y  $P$  en el interior de la partícula esférica,

TABLA 8.- Evolución de  $v$ ,  $S$  y  $P$  en el interior de una partícula esférica de catalizador, en función del módulo adimensional  $\gamma$ .

VALORES DE $\gamma$	PROCESO	VALORES DE $v$	VALORES DE $S$	VALORES DE $P$
$\gamma = 0$	Irreversible	$v > 0$	$S \leq 1$	$P \geq C_R$
$0 < \gamma < 1$	Reversible directo	$v > 0$	$S \leq 1$	$P \geq C_R$
$\gamma = 1$	Equilibrio	$v = 0$	$S = 1$	$P = K_{eq}$
$\gamma > 1$	Reversible inverso	$v < 0$	$S \geq 1$	$P \leq C_R$

en función de los valores de  $\gamma$ . En particular, para las reacciones irreversibles ( $k_{eq} \rightarrow \infty$ ),  $\gamma = 0$ , cualquiera que sea el valor de  $C_R$ , excepto cuando  $C_R \rightarrow \infty$ , en donde todo el sustrato se habrá convertido en producto y no habrá, por lo tanto, reacción.

Respecto a los módulos  $\beta$  y  $\phi'_S$  cabe reseñar que, en el caso de cinéticas irreversibles con inhibición competitiva por el producto, o Michaelis-Menten simple, adoptan formas más sencillas. La Tabla 9 muestra, globalmente, las expresiones de  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en función del tipo de cinética que se considere.

#### 5.1.4.- Resolución de la ecuación diferencial

La ecuación 23 se puede desdoblar en un sistema equivalente de dos ecuaciones diferenciales de primer orden, a través de la definición de una variable auxiliar :

$$Y = \rho^2 \frac{dS}{d\rho} \quad (25)$$

con lo cual se llega a :

TABLA 9.- Valores de los módulos adimensionales de la ecuación 23 para diferentes cinéticas.

Cinética Módulo	Michaelis-Menten simple	Inhibición competitiva por el producto	Reversible
$\beta$	$\frac{K'_M}{C_{SR}}$	$\frac{K'_M}{C_{SR}} + K'_M \left( C_R + \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right) \right)$ $1 - K'_M \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)$	$\frac{K'_M}{C_{SR}} + K'_M \left( C_R + \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right) \right)$ $1 - K'_M \text{Dif} \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)$
$\phi'_S$	$\frac{R^2 V'_M}{C_{SR} D_S}$	$R^2 V'_M$ $C_{SR} D_S \left( 1 - K'_M \text{Dif} \left[ \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right] \right)$	$R^2 V'_M \left( 1 + \frac{\text{Dif}}{K_{eq}} \right)$ $C_{SR} D_S \left( 1 - K'_M \text{Dif} \left[ \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right] \right)$
$\gamma$	0	0	$\frac{C_R + \text{Dif}}{K_{eq} + \text{Dif}}$

$$\frac{dS}{d\rho} = \frac{Y}{\rho^2} \quad (26)$$

$$\frac{dY}{d\rho} = \phi'_S \frac{S - \gamma}{\beta + S} \rho^2 \quad (27)$$

Las condiciones de contorno asociadas a este sistema son :

Para S y su derivada :

$$\rho = 0 ; \quad S = S_0 \quad (\text{desconocido})$$

$$\rho = 1 ; \quad S = 1 \quad (28)$$

$$\rho = 0 ; \quad \frac{dS}{d\rho} = 0$$

Para Y y su derivada :

$$\rho = 0 ; \quad Y = 0 \quad (29)$$

$$\rho = 0 ; \quad \frac{dY}{d\rho} = 0$$

Puesto que las condiciones iniciales de Y, S y sus derivadas son todas conocidas, menos una, se ha optado por resolver el sistema mediante un procedimiento clásico de valores iniciales, como es el método de Runge-Kutta (véase Apendi

ce I). Complementariamente se ha introducido un procedimiento de cálculo de  $S_0$ , mediante iteraciones sucesivas y rápidamente convergentes, basado en la condición de contorno arriba expresada de que  $S=1$  para  $\rho = 1$ . En síntesis, el procedimiento consiste en tomar, arbitrariamente, un valor de  $S_0$  en cada uno de los intervalos :

$$\gamma \leq S_0 \leq 1 \quad \text{cuando} \quad \gamma \leq 1 \quad (30)$$

$$1 \leq S_0 \leq \gamma \quad \text{cuando} \quad \gamma > 1 \quad (31)$$

y, mediante el procedimiento de Runge-Kutta, obtener el perfil radial de  $S$  desde  $\rho = 0$  hasta  $\rho = 1$ . Si, con el valor supuesto de  $S_0$ , se llega a un valor de  $S$  en  $\rho = 1$  de modo que :

$$\left| (S)_{\rho=1} - 1 \right| \leq E \quad (32)$$

el valor supuesto para  $S_0$  será el correcto. En caso contrario, se repite el cálculo del perfil con un nuevo valor de  $S_0$  que se determina según unos criterios de convergencia adecuados. Se define  $E$  como la tolerancia permitida para el perfil.

El procedimiento descrito se ha convertido en el correspondiente programa de ordenador, en lenguaje Fortran V, y procesado en un ordenador Cii Honeywell-Bull, del Centro de Proceso de Datos

de la Universidad de Murcia, En el Apéndice II se expone el diagrama de flujo de dicho programa. Este ajusta automáticamente el valor del incremento del radio adimensional que debe utilizarse en el algoritmo de Runge-Kutta, en función de la precisión exigida por los resultados. A su vez, ésta puede ser elegida arbitrariamente por el operador. Por otra parte, al no haberse seguido ninguno de los métodos que precisan de la utilización de matrices, el programa es breve y sencillo y no necesita para su procesado equipos con elevada memoria. Además, los tiempos de C.P.U. exigidos para una precisión de  $\pm 0,5\%$  (que es la utilizada en el presente trabajo), son muy pequeños, en todos los casos del orden de 30 miliminutos para el equipo indicado, pudiendo ser menores e aquellos que dispongan de coprocesadores - aceleradores de la velocidad de cálculo. Finalmente, el programa se ha mostrado operativo en la región de levados valores de  $\phi'_S$ , condiciones que para otros autores (161) han resultado un obstáculo insalvable.

Una vez obtenido el perfil adimensional de concentraciones en el interior de la partícula catalítica, se puede integrar la ecuación 16 por el método de Newton, regla del trapecio, o cualquier otro, ecuación que para el caso de cinéticas reversible, con inhibición competitiva por producto o Michaelis-Menten simple, adopta la forma:

$$\eta = \frac{3(\beta + 1)}{1 - \gamma} \int_0^1 \frac{S - \gamma}{\beta + S} \rho^2 d\rho \quad (33)$$

En el presente trabajo se ha utilizado la regla del trapecio, e implementado en el programa de ordenador anterior de modo que, simultáneamente a la obtención del perfil de concentraciones adimensionales, se obtiene el correspondiente valor del factor de eficacia,  $\eta$ .

#### 5.1.5.- Resultados producidos por el modelo y discusión de los mismos

Siguiendo la metodología anteriormente expuesta, se han obtenido los perfiles radiales de concentración adimensional de sustrato para distintos valores de los módulos  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Los resultados obtenidos han sido agrupados en familias de curvas que vienen caracterizadas por valores fijos de  $\beta$  y  $\gamma$ . Para cada familia se ha realizado un barrido del módulo  $\phi'_S$  de forma que su variación cubriera todo el rango de valores previsible.

En las Figuras 28 y 29 se representan dos de estas familias, que corresponden a un valor de  $\gamma = 0$  y distintos valores de  $\beta$ . En ellas, se observa que, al aumentar el módulo  $\phi'_S$ , la caída de concentración en el interior de la partícula es mayor, lo que significa que las limitaciones difusivas aumentan. A valores muy altos de  $\phi'_S$ , la concentración de sustrato cae a cero prácticamente desde la superficie de la partícula.

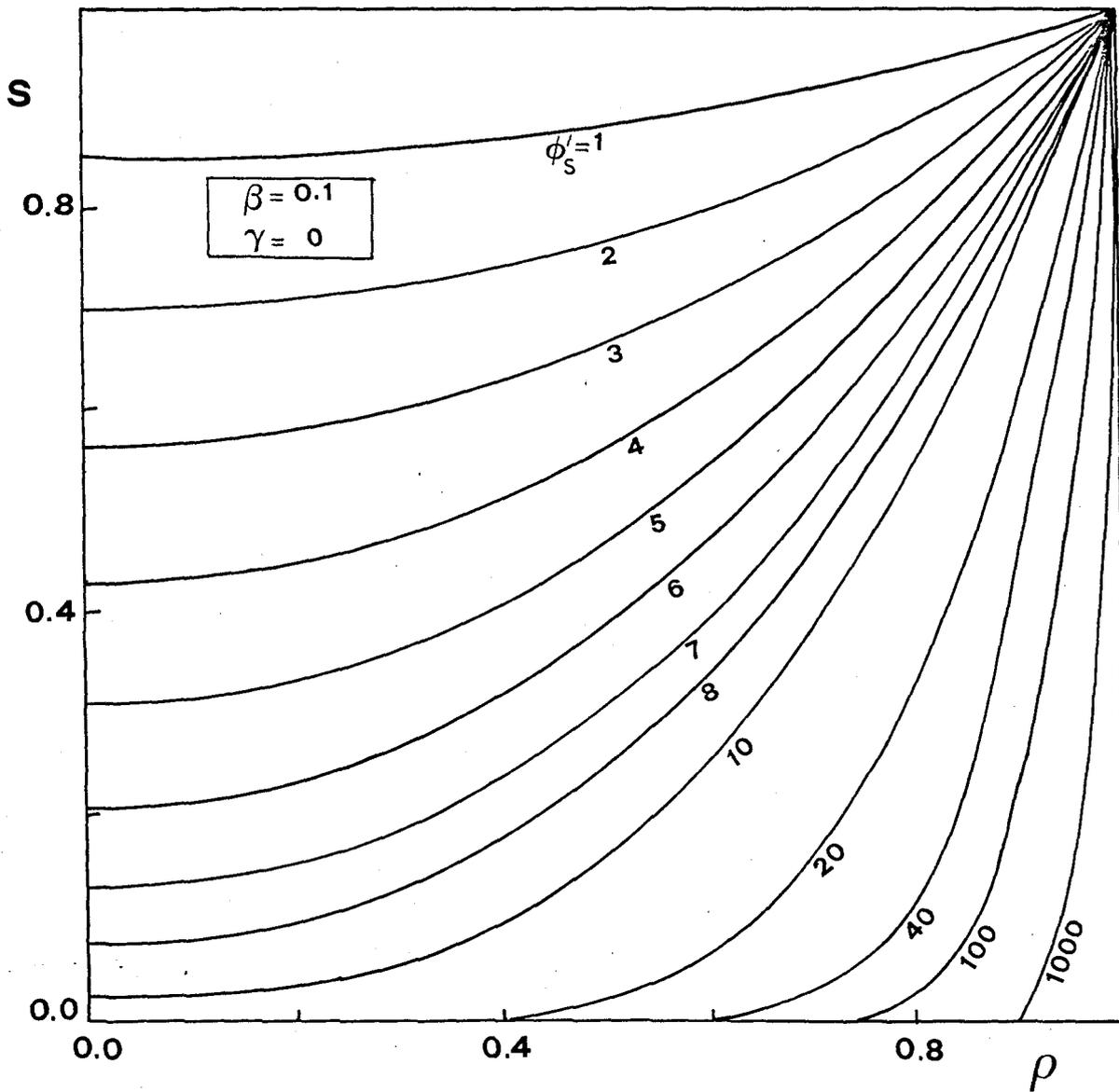


FIGURA 28.- Perfiles de concentración adimensional en la partícula catalítica para distintos valores de  $\phi'_S$ , manteniéndose constantes los módulos  $\beta$  y  $\gamma$ .

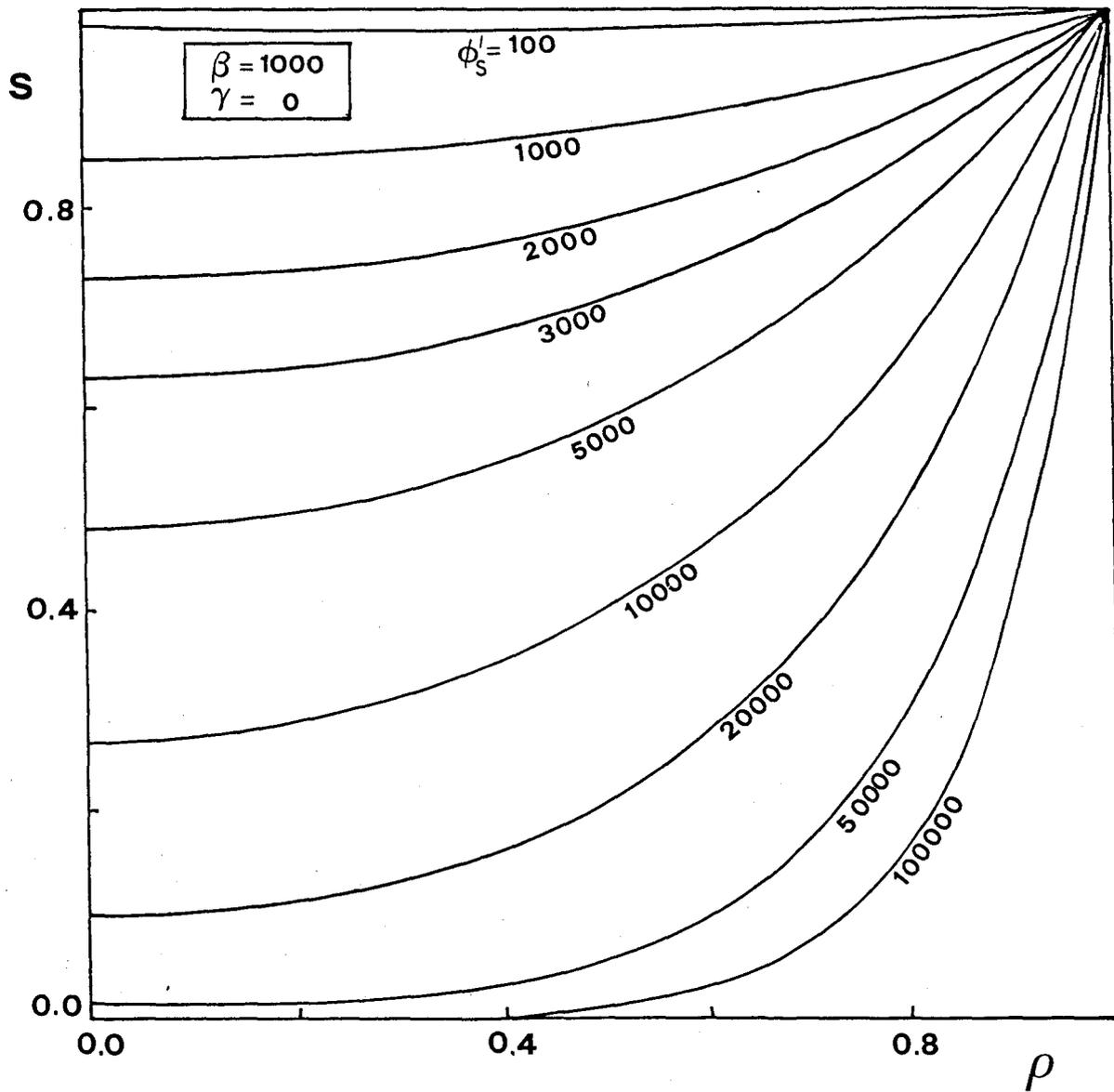


FIGURA 29.- Perfiles de concentración adimensional en la partícula catalítica para distintos valores de  $\phi'_S$ , manteniéndose constantes los módulos  $\beta$  y  $\gamma$ .

Para un mismo valor de  $\phi'_S$ , al aumentar  $\beta$ , manteniendo fijo el módulo  $\gamma$ , la caída de concentración se hace menos acusada, es decir, hay menos limitaciones difusionales. Esto mismo puede concluirse también comparando las Figuras anteriores si se observa que, para obtener el mismo perfil de concentraciones hace falta un valor de  $\phi'_S$  cada vez mayor a medida que aumenta el módulo  $\beta$ .

De todo esto se deduce que para un valor fijo de  $\gamma$ , las limitaciones difusionales en el interior de la partícula son más pequeñas cuanto mayor es el valor de  $\beta$  y menor el de  $\phi'_S$ .

De la misma manera se han calculado los correspondientes factores de eficacia en los siguientes intervalos de los módulos  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente :

$$0 \leq \phi'_S \leq 50000$$

$$0 \leq \beta \leq 10000$$

$$0 \leq \gamma \leq 2 \quad (\text{excepto } \gamma = 1)$$

En las Figuras 30 a 35 se muestran aquellos valores de  $\eta$  que pueden considerarse como más representativos, agrupados en familias de curvas, para el intervalo completo de  $\phi'_S$ , de modo que cada curva viene definida por un valor de

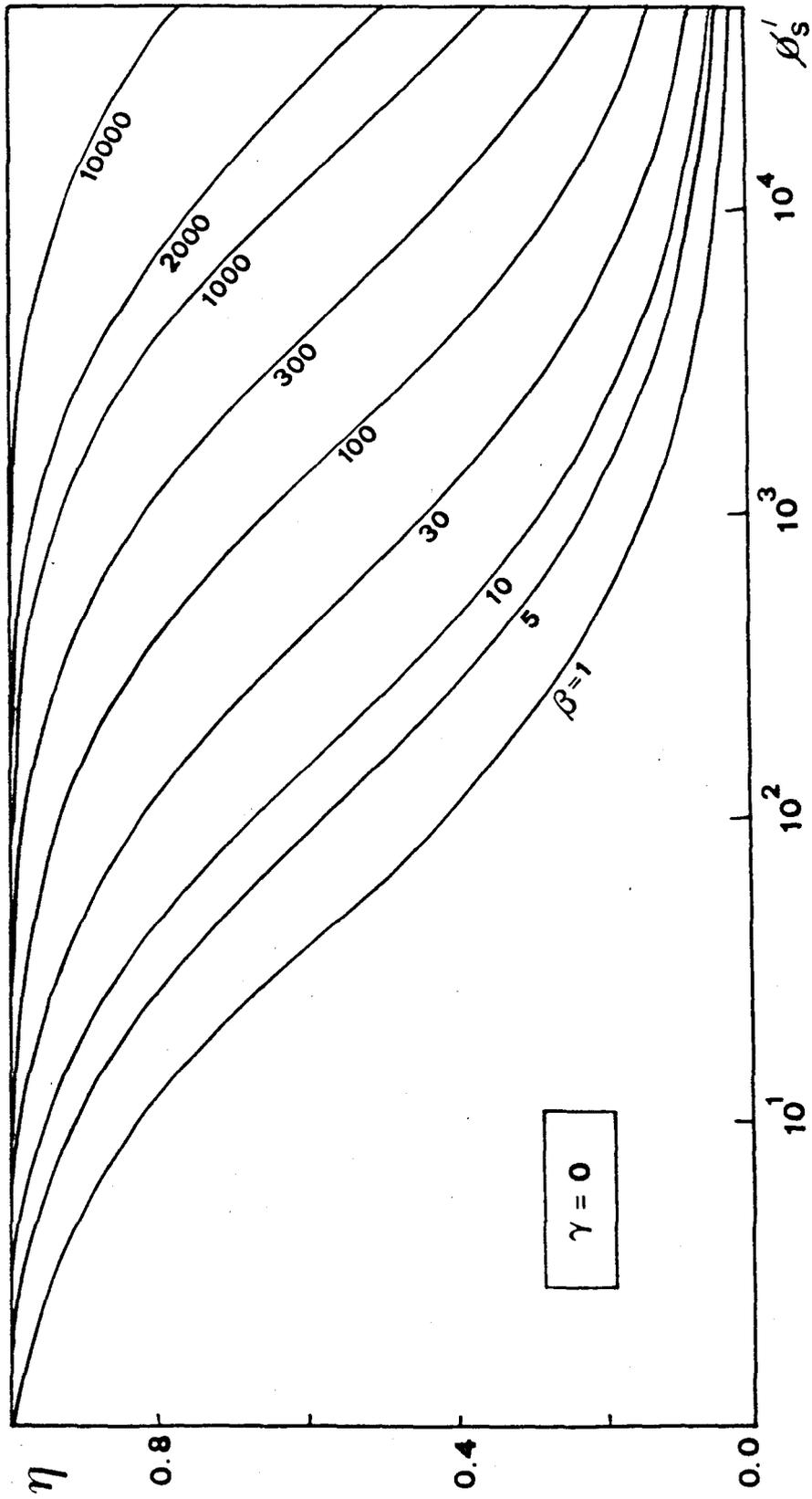


FIGURA 30.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi_s^1$ , y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

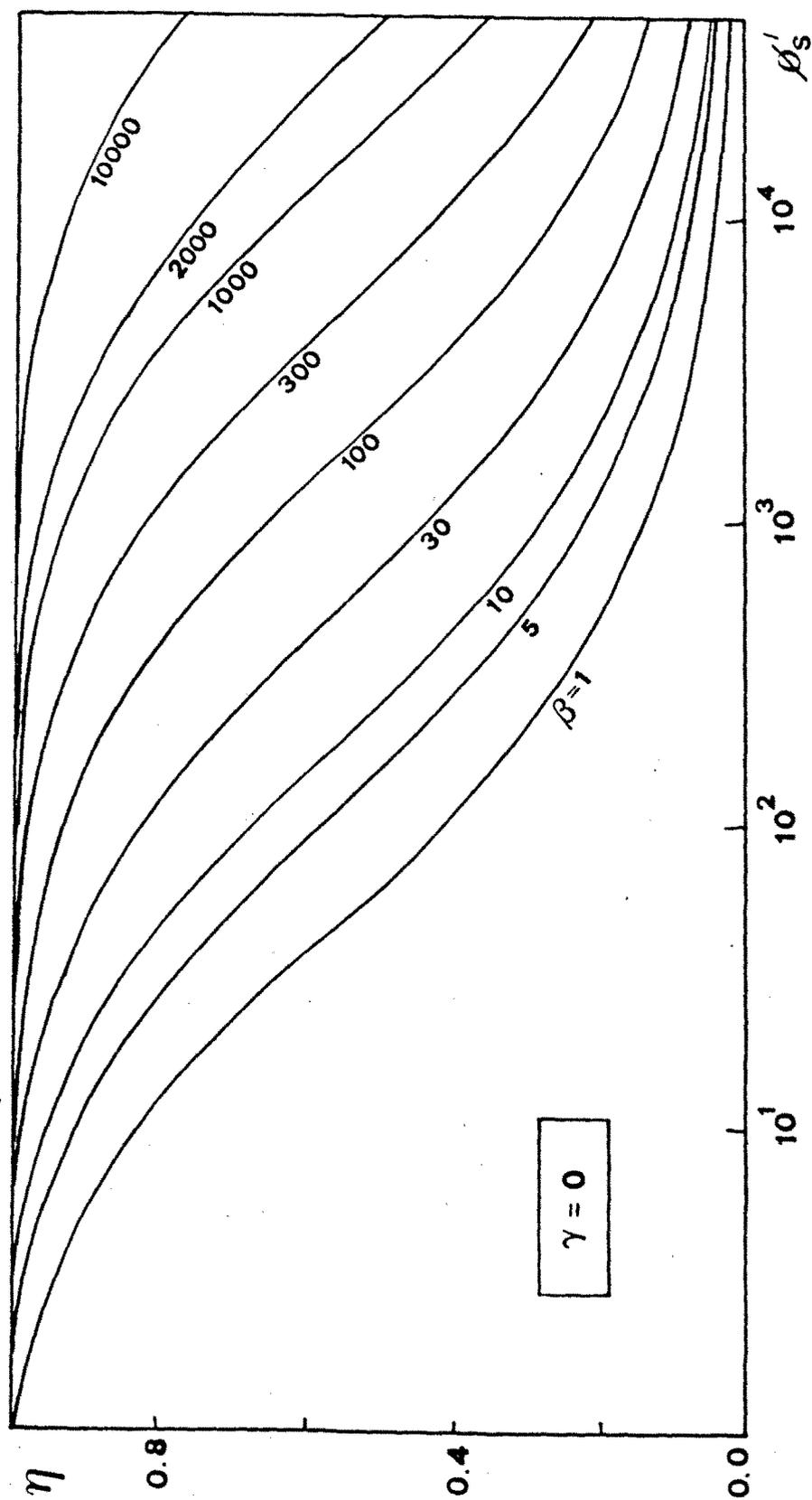


FIGURA 30.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi_S^I$ , y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

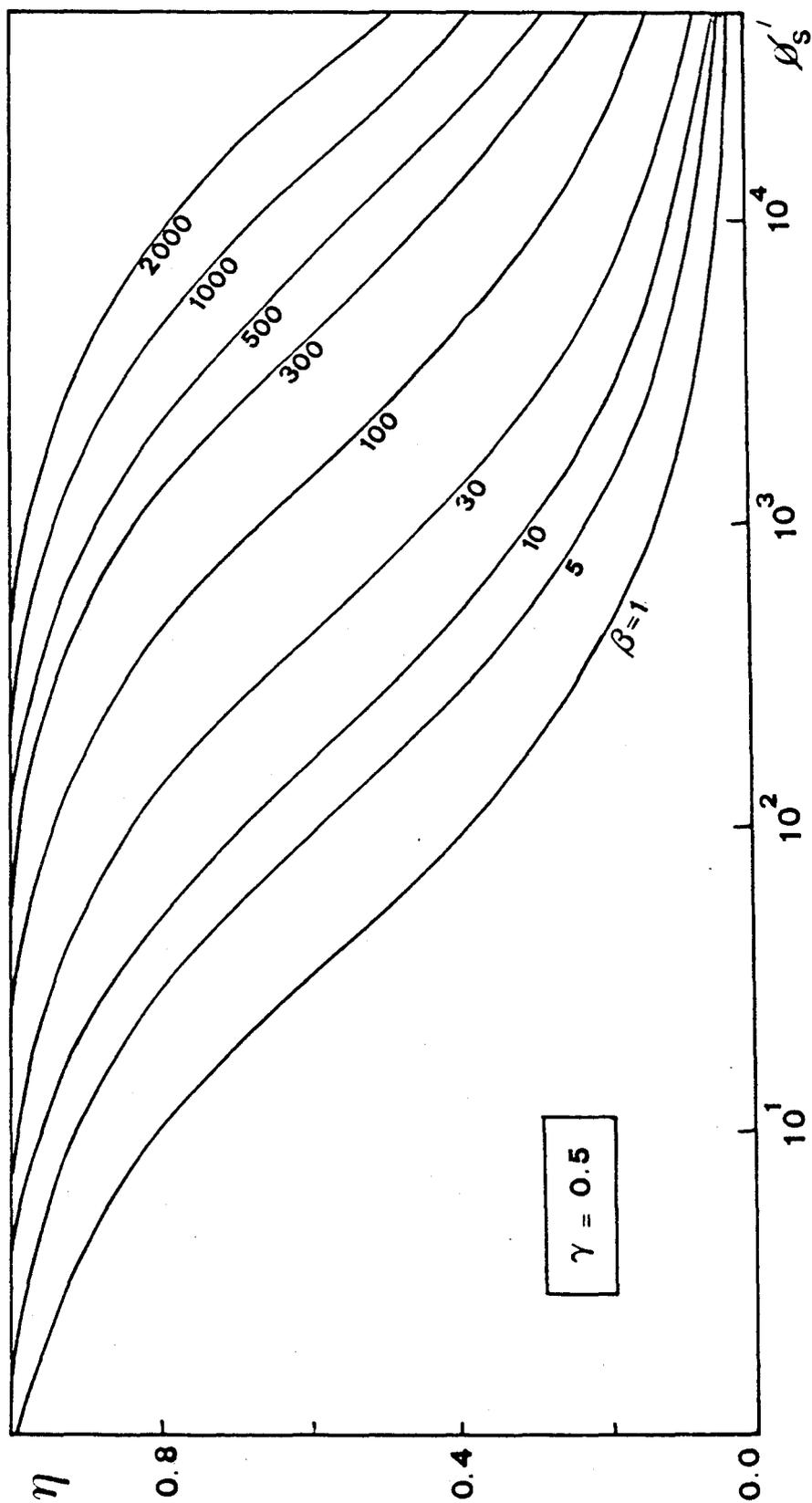


FIGURA 31.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi'_S$  y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

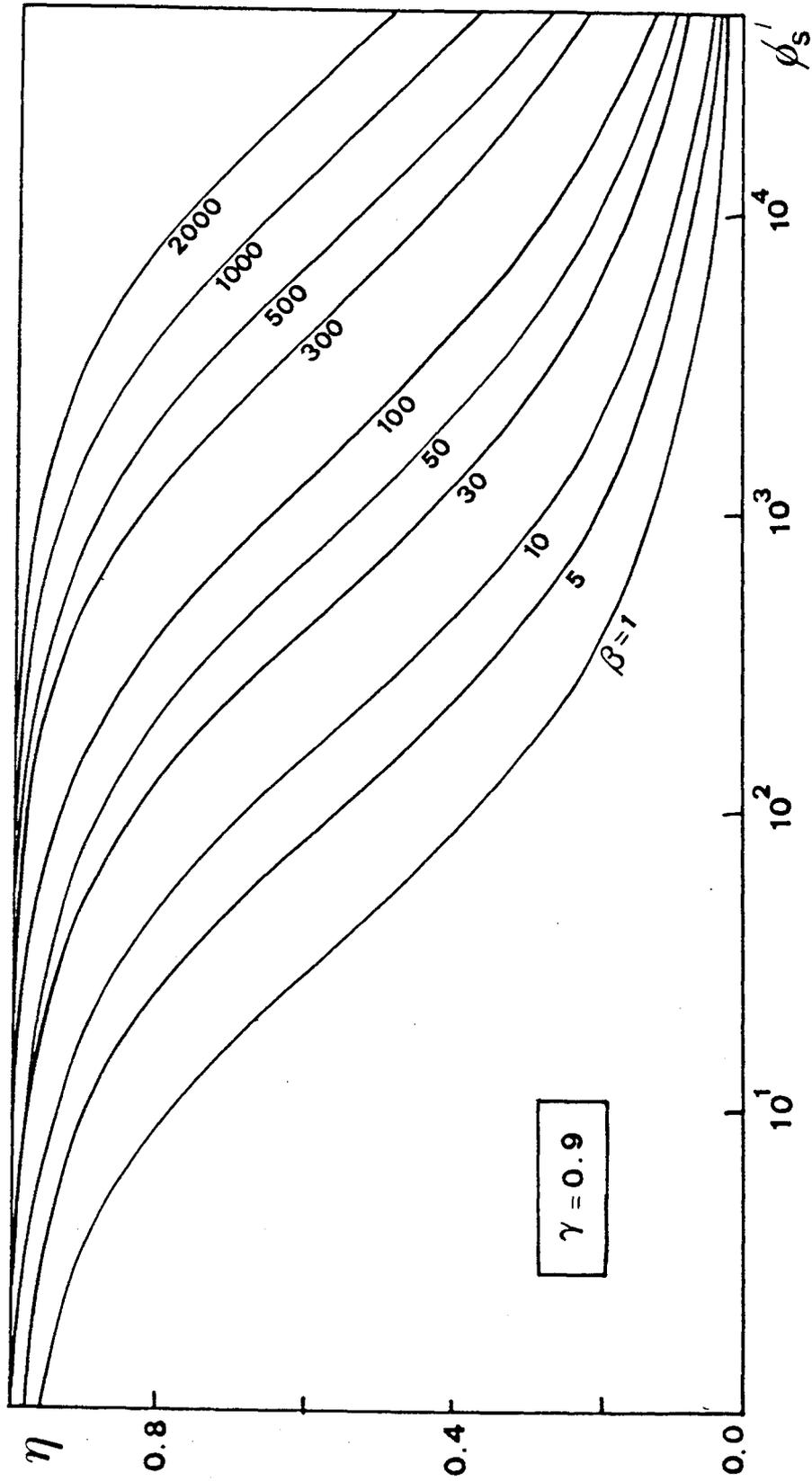


FIGURA 32.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi'_S$  y  $\beta$  mantenien-  
dose constante el valor de  $\gamma$ .

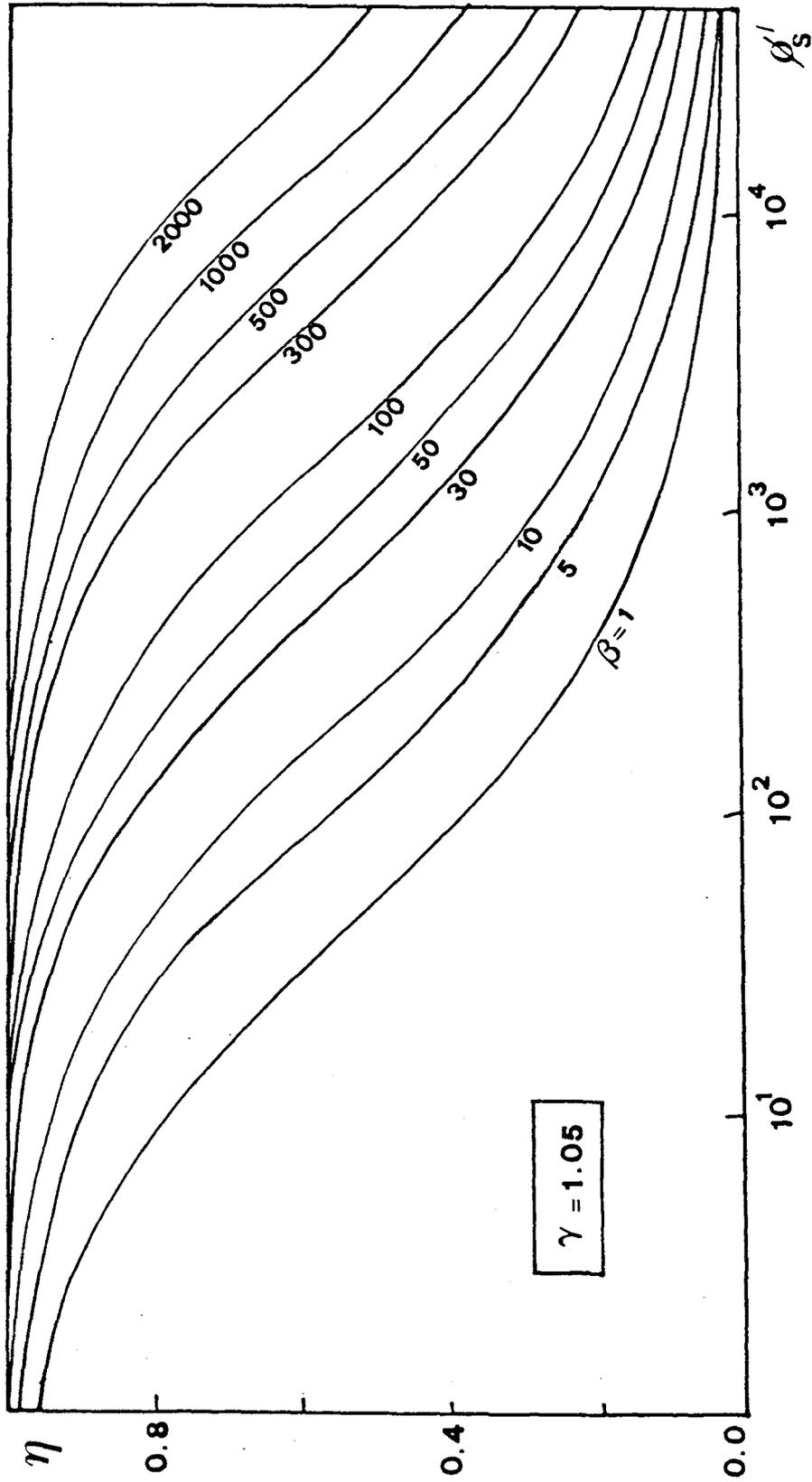


FIGURA 33.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi'_S$  y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

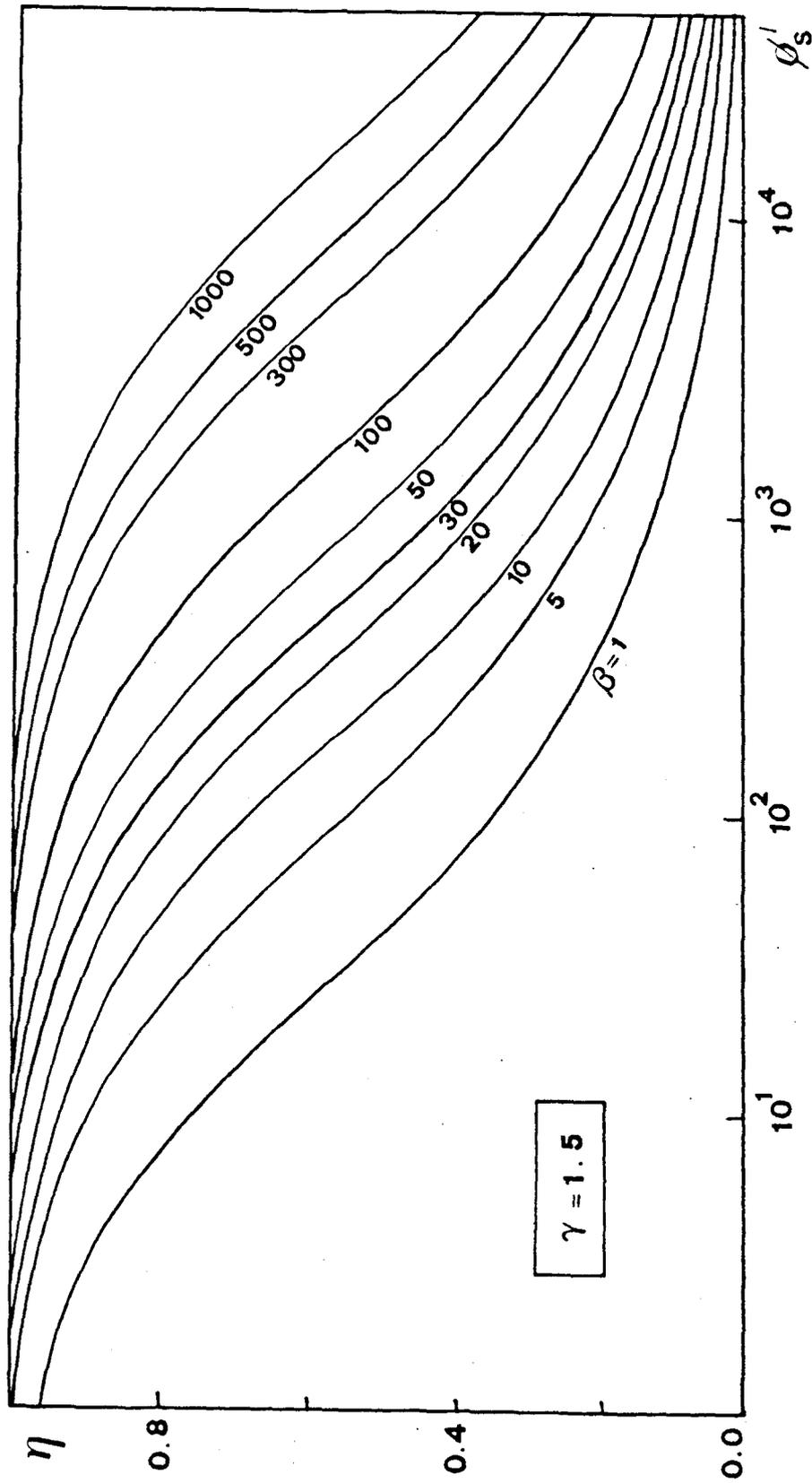


FIGURA 34.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi'_S$  y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

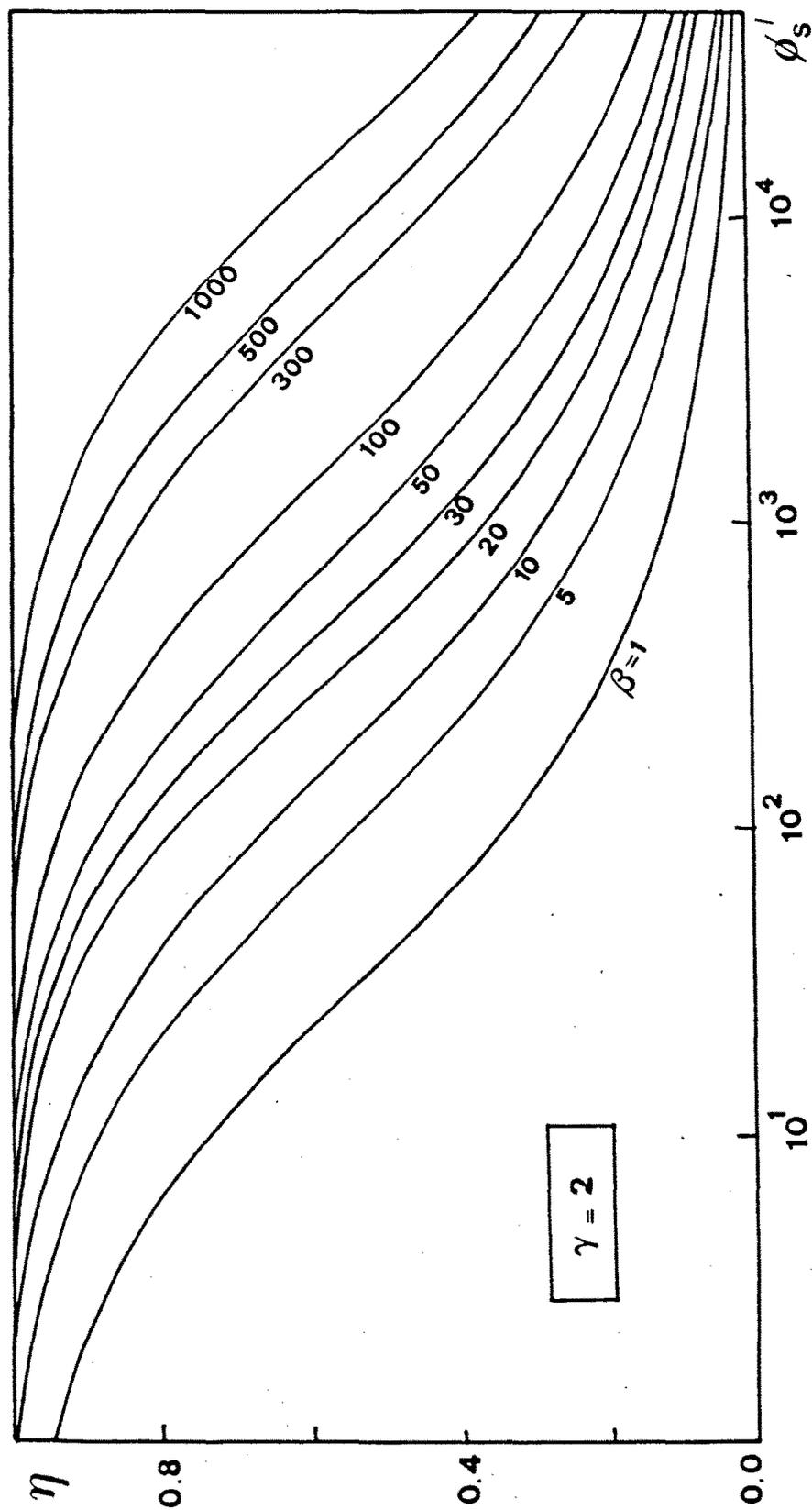


FIGURA 35.- Variación del factor de eficacia con los módulos  $\phi'_s$  y  $\beta$  manteniéndose constante el valor de  $\gamma$ .

$\beta$  y cada familia por un valor de  $\gamma$  .

De la consideración de las Figuras anteriormente citadas, se deduce que el factor de eficacia disminuye rápidamente al aumentar  $\phi'_S$ , tendiendo a cero para valores suficientemente elevados de éste módulo adimensional, lo que corresponde a procesos controlados, fundamentalmente, por la difusión interna. Por el contrario, para valores pequeños de  $\phi'_S$ ,  $\eta$  tiende a la unidad, indicativo de que las limitaciones difusionales en el interior de la partícula esférica son despreciables. Estos resultados están en buen acuerdo con los obtenidos por otros autores (76, 77, 79, 84, 86, 11, 144) para cinética de Michaelis-Menten irreversible o con inhibición competitiva por el producto.

De la observación de las Figuras, se puede deducir también que los factores de eficacia aumentan con el módulo  $\beta$ , para valores constantes de  $\phi'_S$  y  $\gamma$ . Este aumento es considerable a valores altos de  $\phi'_S$  y va haciéndose menor a medida que  $\phi'_S$  tiende a cero. Por último, es importante destacar que el parámetro  $\gamma$  es el que menos afecta al factor de eficacia, según se desprende de la comparación de las distintas familias de curvas.

## 5.2.- DISEÑO Y SIMULACION DE REACTORES DE LECHO FIJO PARA SISTEMAS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS EN PARTICULAS ESFERICAS

El reactor tubular de lecho fijo es el más usado en operaciones con sistemas de enzimas inmovilizadas. Este tipo de reactor, cuando actúa bajo condiciones de flujo pistón (PFR), produce conversiones de salida más elevadas que el reactor tanque continuo agitado, trabajando con un mismo tiempo de residencia. En este tipo de reactor el factor de eficacia de la reacción enzimática varía a lo largo del mismo como consecuencia de la conversión experimentada por las especies reaccionantes. Hasta el presente, en la bibliografía, únicamente se ha encontrado el cálculo de valores globales para el factor de eficacia, usando la media logarítmica de las concentraciones de sustrato inicial y final del reactor. En consecuencia, aunque esta aproximación pueda resultar válida en algunos casos, se ha entendido como necesario abordar el diseño del reactor tubular de lecho fijo para estos sistemas, teniendo en cuenta la variación que experimenta el factor de eficacia a lo largo del mismo.

### 5.2.1.- Ecuación de diseño

En el estado estacionario, un balance de materia para la especie reaccionante, aplicado al elemento de volumen de reactor de

longitud  $dL$ , que se muestra en la Figura 36, establece que :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{cantidad de sus} \\ \text{trato que entra} \\ \text{al elemento de} \\ \text{volumen, en la} \\ \text{unidad de tiempo} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{cantidad de sus} \\ \text{trato que sale} \\ \text{del elemento de} \\ \text{volumen, en la} \\ \text{unidad de tiempo} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{l} \text{cantidad de sus} \\ \text{trato que reac-} \\ \text{ciona en el ele} \\ \text{mento de volumen} \\ \text{en la unidad de} \\ \text{tiempo} \end{array} \right\}$$

Cuando el reactor opera en flujo pistón, la expresión matemática de este balance es :

$$F C_{SR} = F (C_{SR} + dC_{SR}) + (1 - \epsilon) V_S dV_R \quad (34)$$

donde  $\epsilon$  es la porosidad del lecho.

Simplificando :

$$F dC_{SR} + (1 - \epsilon) V_S dV_R = 0 \quad (35)$$

Se define la conversión a lo largo del reactor por la relación :

$$X = \frac{C_{SRO} - C_{SR}}{C_{SRO}} = \frac{C_{PR}}{C_{SRO}} \quad (36)$$

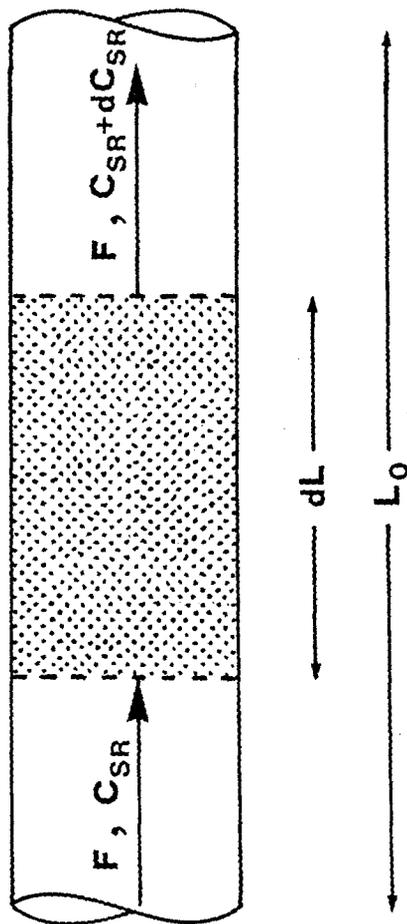


FIGURA 36.- Esquema del elemento de volumen del reactor tubular, donde se realiza el balance de materia.

Para una reacción que transcurra siguiendo la cinética de la ecuación 18, la velocidad de reacción a lo largo del reactor (en función de la conversión), viene dada por la expresión

$$V_S = V'_M \frac{1 - X (1 + KE)}{1 + \beta_0 - X (1 - \alpha)} \quad (37)$$

donde :

$$KE = \frac{1}{K_{eq}}$$

$$\beta_0 = \frac{K'_M}{C_{SRO}} \quad (38)$$

$$\alpha = K'_M \left( \frac{1}{K_P} + \frac{1}{K_Q} \right)$$

y  $V'_M$  es la velocidad máxima de reacción intrínseca por unidad de volumen de partícula catalítica.

Definiendo la longitud adimensional del reactor :

$$\lambda = \frac{L}{L_0} \quad (39)$$

se obtiene a partir de las ecuaciones 35, 37 y 39 la siguiente :

$$\frac{dX}{d\lambda} = \frac{D^2 L_0 (1 - \epsilon) V'_M}{4 F C_{SRO}} \eta \frac{1 - X (1 + KE)}{1 + \beta_0 - X (1 - \alpha)} \quad (40)$$

si se considera que el volumen total del reactor,  $V_R$ , para una longitud  $L_0$  vale :

$$V_R = \frac{\pi D^2}{4} L_0 \quad (41)$$

y, puesto que el tiempo medio de residencia se define por la relación :

$$\tau = \frac{V_R}{F} \quad (42)$$

la ecuación 40 puede escribirse de la siguiente forma :

$$\frac{dX}{d\lambda} = \frac{\tau (1 - \epsilon) V'_M}{C_{S0}} \eta \frac{1 - X (1 + KE)}{1 + \beta_0 - X (1 - \alpha)} \quad (43)$$

Definiendo un nuevo módulo adimensional :

$$\theta = \frac{\tau (1 - \epsilon) V'_M}{C_{SR0}} \quad (44)$$

se llega, finalmente, a la siguiente forma adimensional de la ecuación de diseño del reactor :

$$\frac{dX}{d\lambda} = \theta \eta \frac{1 - X (1 + KE)}{1 + \beta_0 - X (1 - \alpha)} \quad (45)$$

En dicha expresión, tanto la conversión  $X$ , como el factor de eficacia  $\eta$ , son funciones de la longitud adimensional del reactor  $\lambda$ . No obstante, como la dependencia explícita de  $\eta$  con  $\lambda$  no es conocida de antemano, la ecuación 45 no se puede integrar directamente. Para resolverla hay que usar el cálculo numérico utilizando el programa de ordenador descrito en el apartado 5.1.4., que permite la evaluación del factor de eficacia.

5.2.2.- Integración de la ecuación de diseño del reactor.

Las condiciones iniciales asociadas a la ecuación 45 son :

$$\lambda = 0 \quad ; \quad X = 0 \quad ; \quad \eta = \eta_0 \quad (46)$$

siendo  $\eta_0$  el factor de eficacia calculado en las condiciones de entrada al reactor. A partir de estas condiciones iniciales es posible obtener, para sucesivos valores de  $\Delta\lambda$ , el valor de la conversión hasta alcanzar el extremo del reactor en donde  $\lambda = 1$ . En este proceso hay que evaluar, para cada valor de la longitud adimensional del reactor,  $\lambda$ , el correspondiente factor de eficacia, a partir de los módulos adimensionales  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  definidos anteriormente y resumidos en la Tabla 9. Para ello, hay que tener en cuenta la variación con la conversión de los módulos de los que depende el factor de eficacia, variación que viene dada por las siguientes relaciones:

$$\phi'_S = \frac{\phi'_{S0}}{1 - X} \quad (47)$$

$$\beta = \frac{\frac{\beta_0}{1-X} + \alpha (C_R + \text{Dif})}{(1 - \alpha \text{Dif})} \quad (48)$$

$$\gamma = \frac{\text{Dif} + C_R}{\text{Dif} + K_{eq}} \quad (49)$$

$\phi'_{S0}$  es el valor del módulo  $\phi'_S$  en las condiciones de entrada al reactor, y en estas expresiones :

$$C_R = \frac{X}{1 - X}$$

Con todo lo anterior, la aplicación del método de Runge-Kutta conduce al algoritmo de cálculo que se muestra en el Apéndice III. Dicho algoritmo es la base de un programa de ordenador en lenguaje Fortran V, que utiliza como subrutina el programa citado en el apartado 5.1.4. En el Apéndice IV se encuentra desarrollado el diagrama de flujo correspondiente al mencionado programa para el diseño de este reactor de lecho fijo.

### 5.2.3.- Resultados y Discusión

Como resultado de la operación del programa de ordenador anteriormente descrito, se han obtenido los perfiles de conversión en función de la longitud adimensional del reactor, y los correspondientes del factor de eficacia para los siguientes intervalos de los módulos  $\phi'_{S0}$ ,  $\beta_0$  y  $\theta$ , respectivamente.

$$1 \leq \phi'_{S0} \leq 1000$$

$$0.1 \leq \beta_0 \leq 100$$

$$0.1 \leq \theta \leq 2000$$

Manteniendo constantes los valores de Dif y  $\alpha$  se han obtenido dos series de figuras, correspondientes a dos valores de la conversión de equilibrio. Las Figuras 37 a 40, corresponden a un valor de la conversión de equilibrio de 1, y las Figuras 41 a 44 son las correspondientes a un valor de 0.77. En las citadas Figuras se representan los valores de la conversión, X, frente a la longitud adimensional del reactor,  $\lambda$ , agrupándose los resultados en familias de curvas, de manera que cada curva viene definida por un valor de  $\theta$  y cada familia por los valores de  $\phi'_{S0}$ ,  $\beta_0$ ,  $K_{eq}$ ,

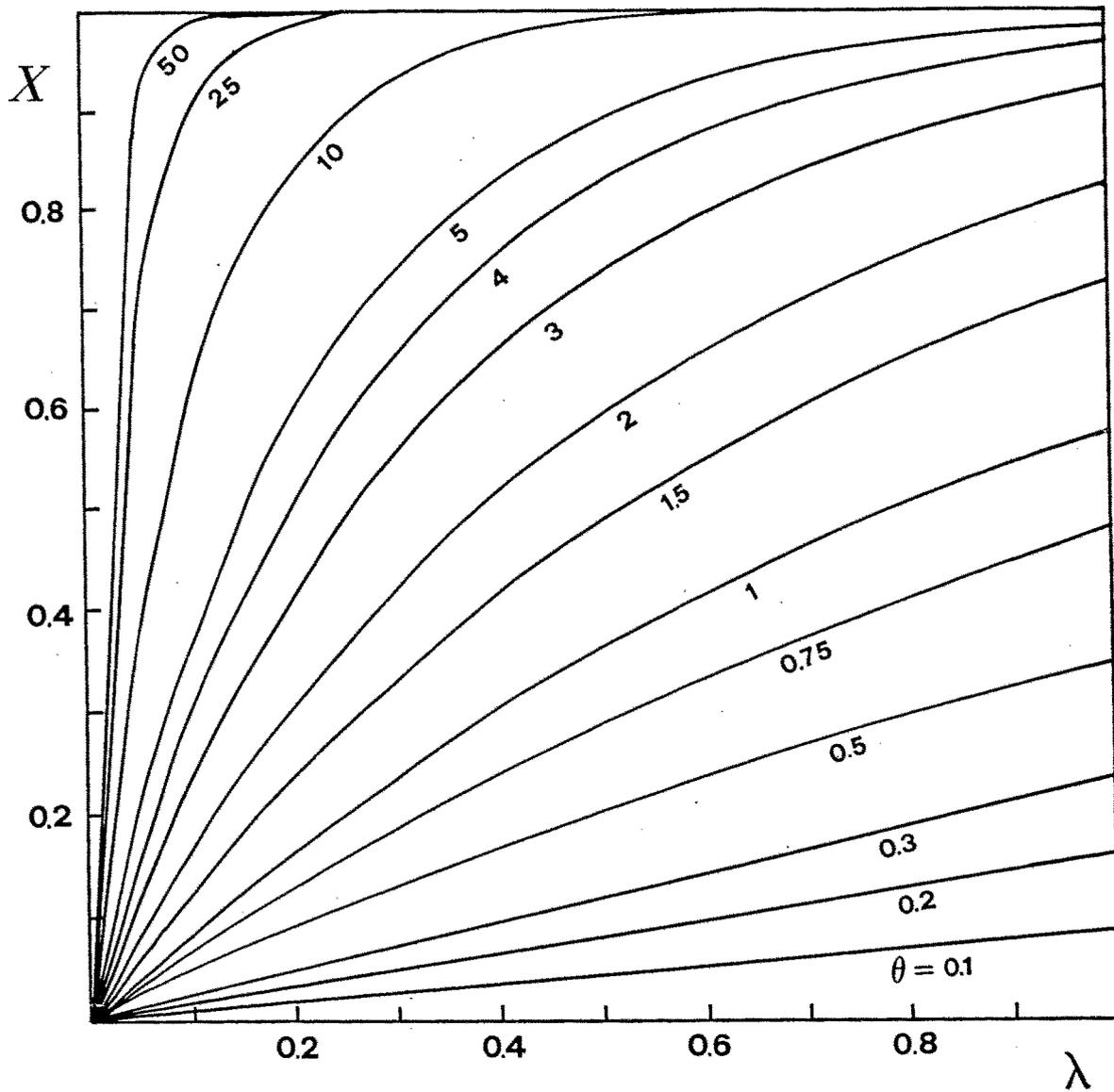


FIGURA 37.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 0,1$ ,  $\phi_{S0} = 1$ ,  $KE = 0$ ,  $Dif = 0,5$  y  $\alpha = 1$ .

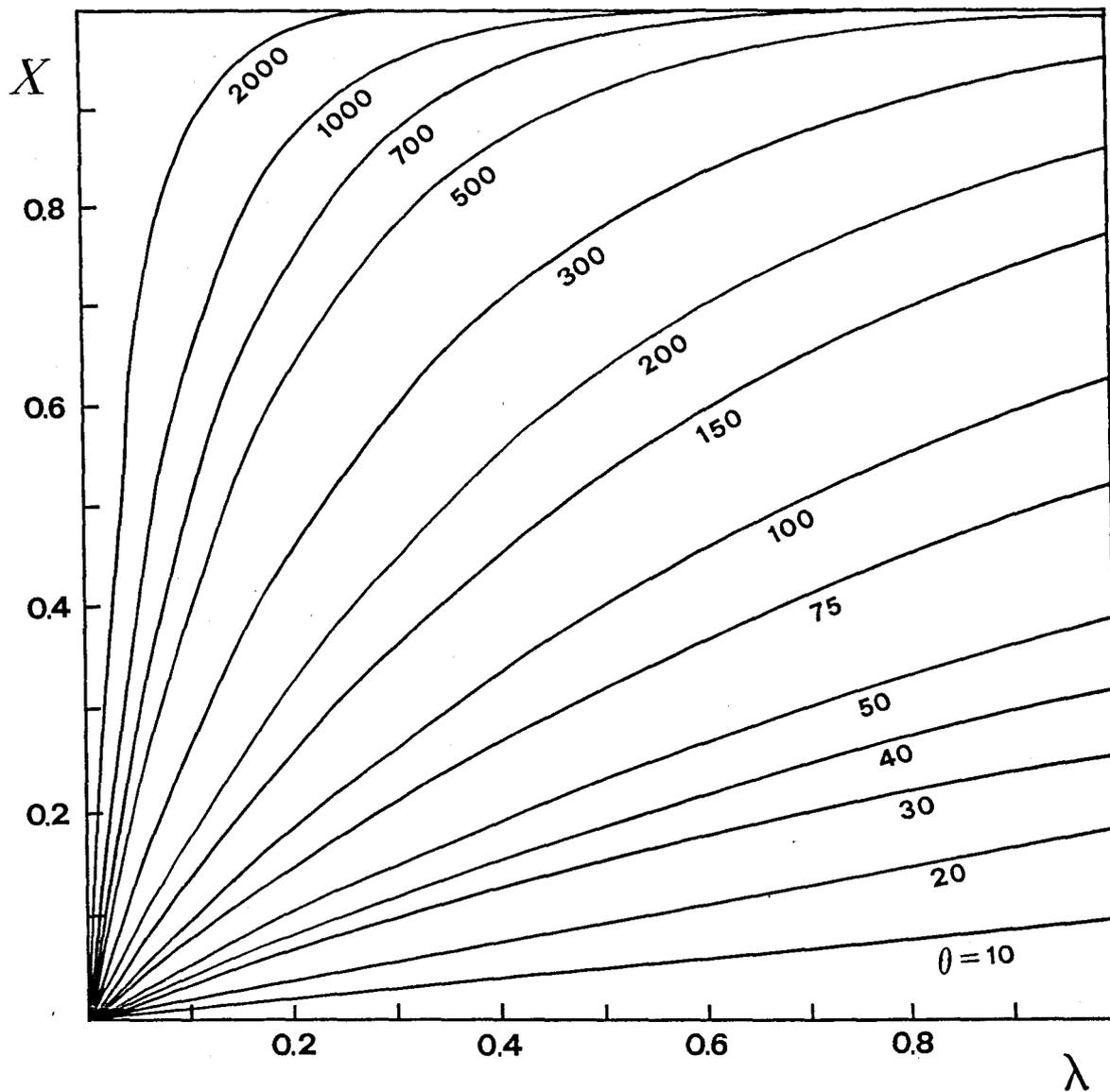


FIGURA 38.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0=100$ ,  $\phi_{S0}'=1$ ,  $KE=0$ ,  $Dif=0,5$  y  $\alpha=1$ .

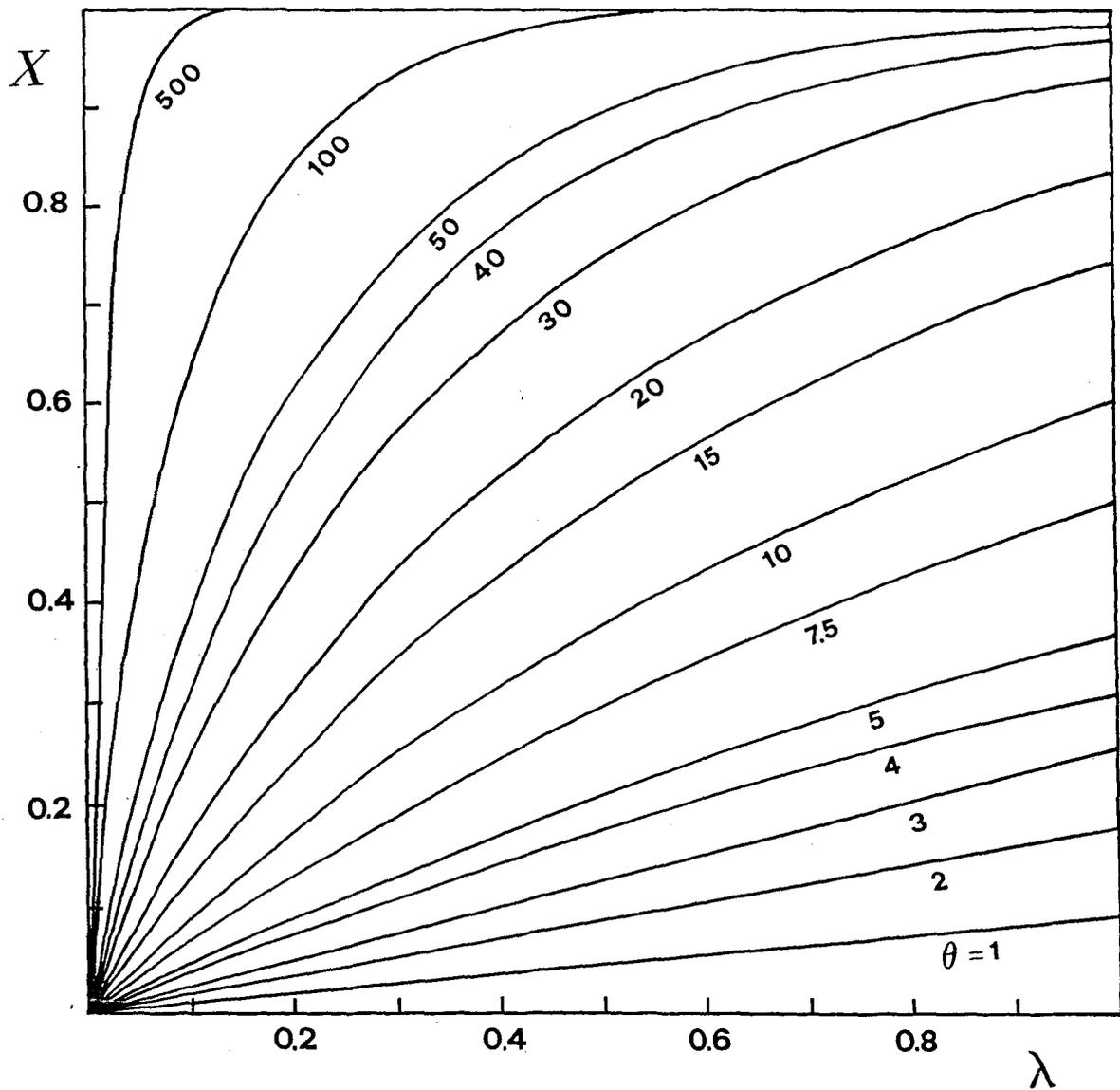


FIGURA 39.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 0,1$ ,  $\phi'_{S0} = 1000$ ,  $KE=0$ ,  $Dif=0,5$  y  $\alpha = 1$ .

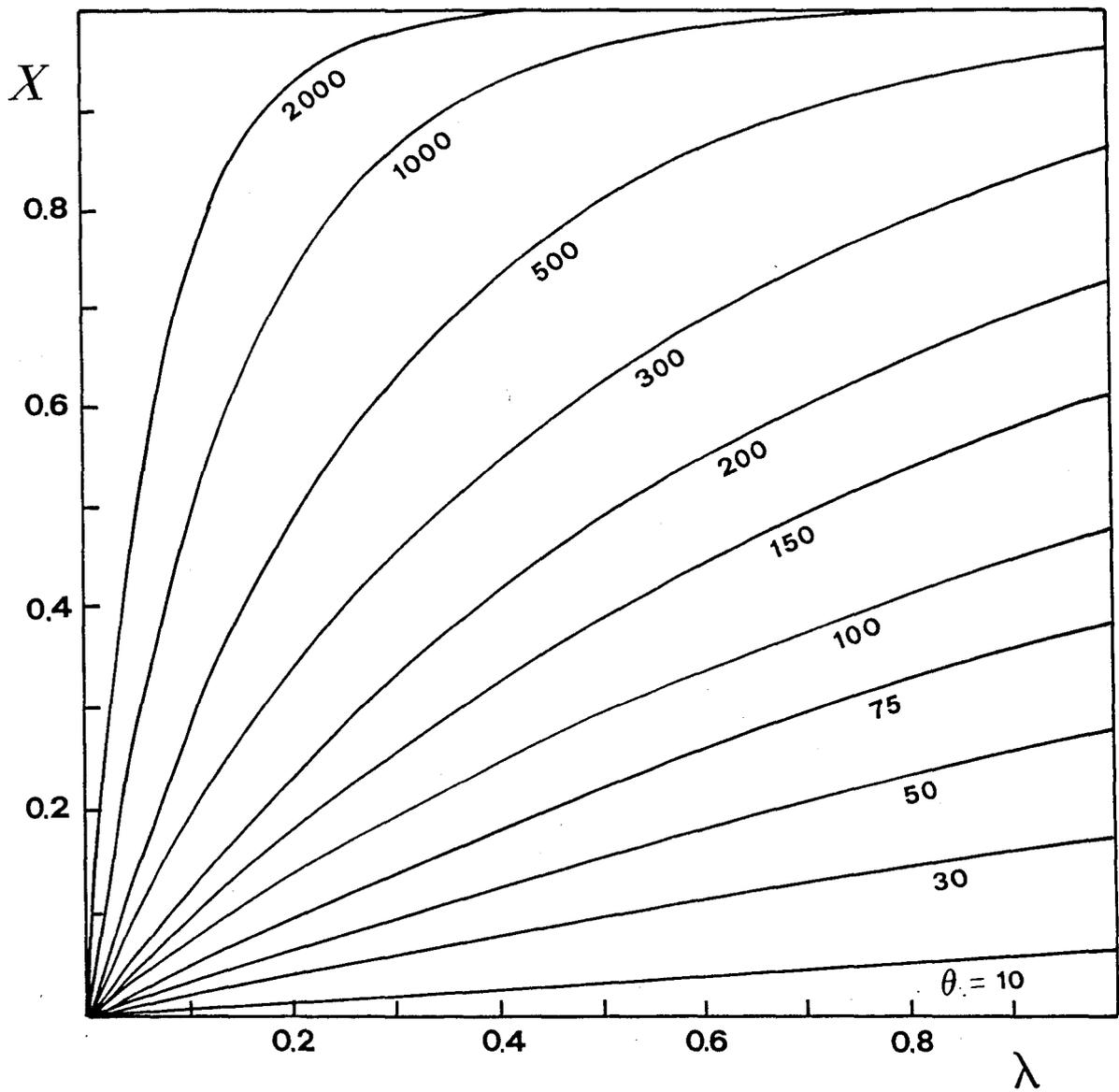


FIGURA 40.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 100$ ,  $\phi'_{S0} = 1000$ ,  $KE=0$ ,  $Dif=0,5$  y  $\alpha=1$ .

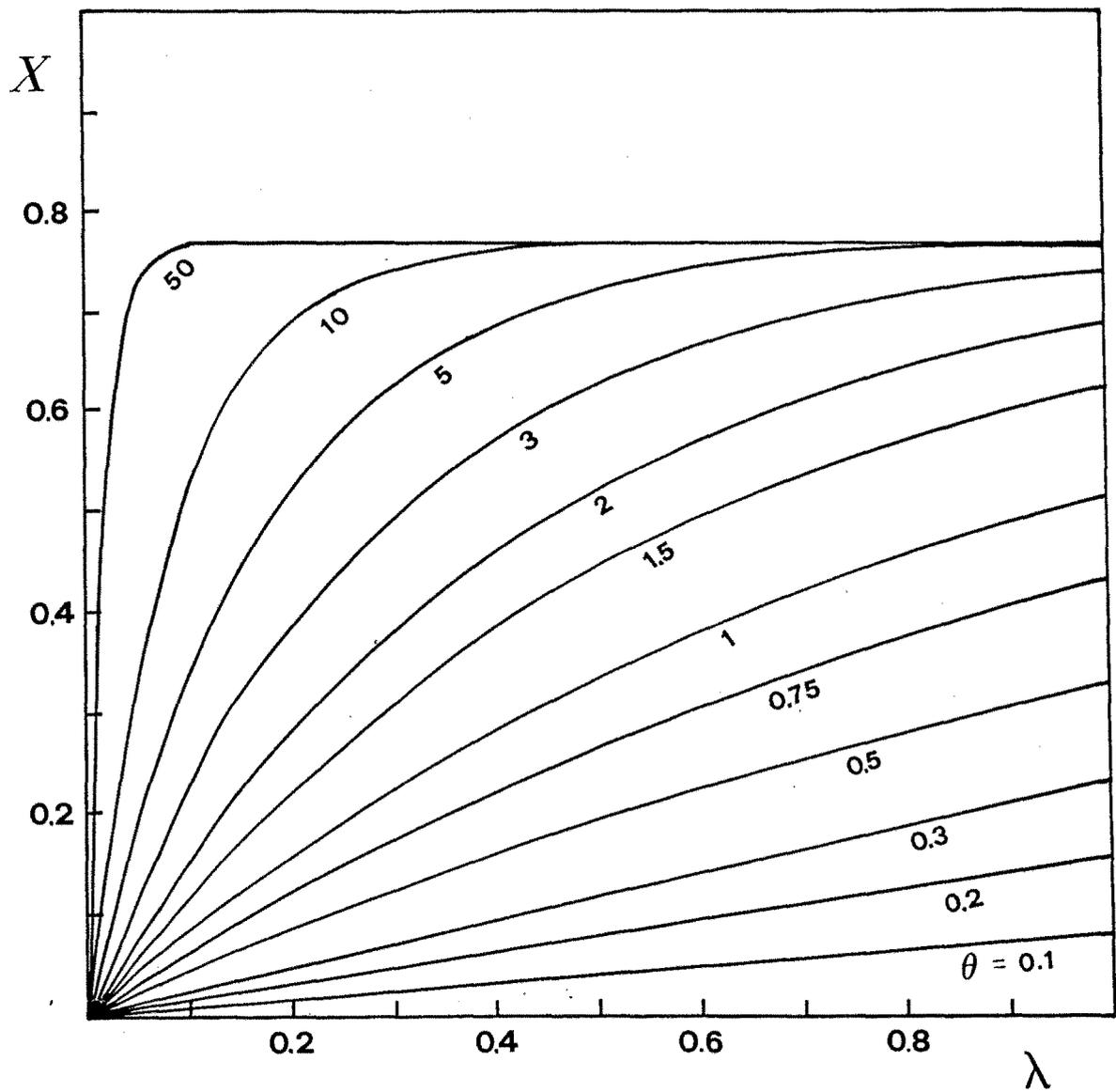


FIGURA 41.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 0,1$ ,  $\phi_{S0}' = 1$ ,  $KE = 0,3$ ,  $Dif = 0,5$  y  $\alpha = 1$ .

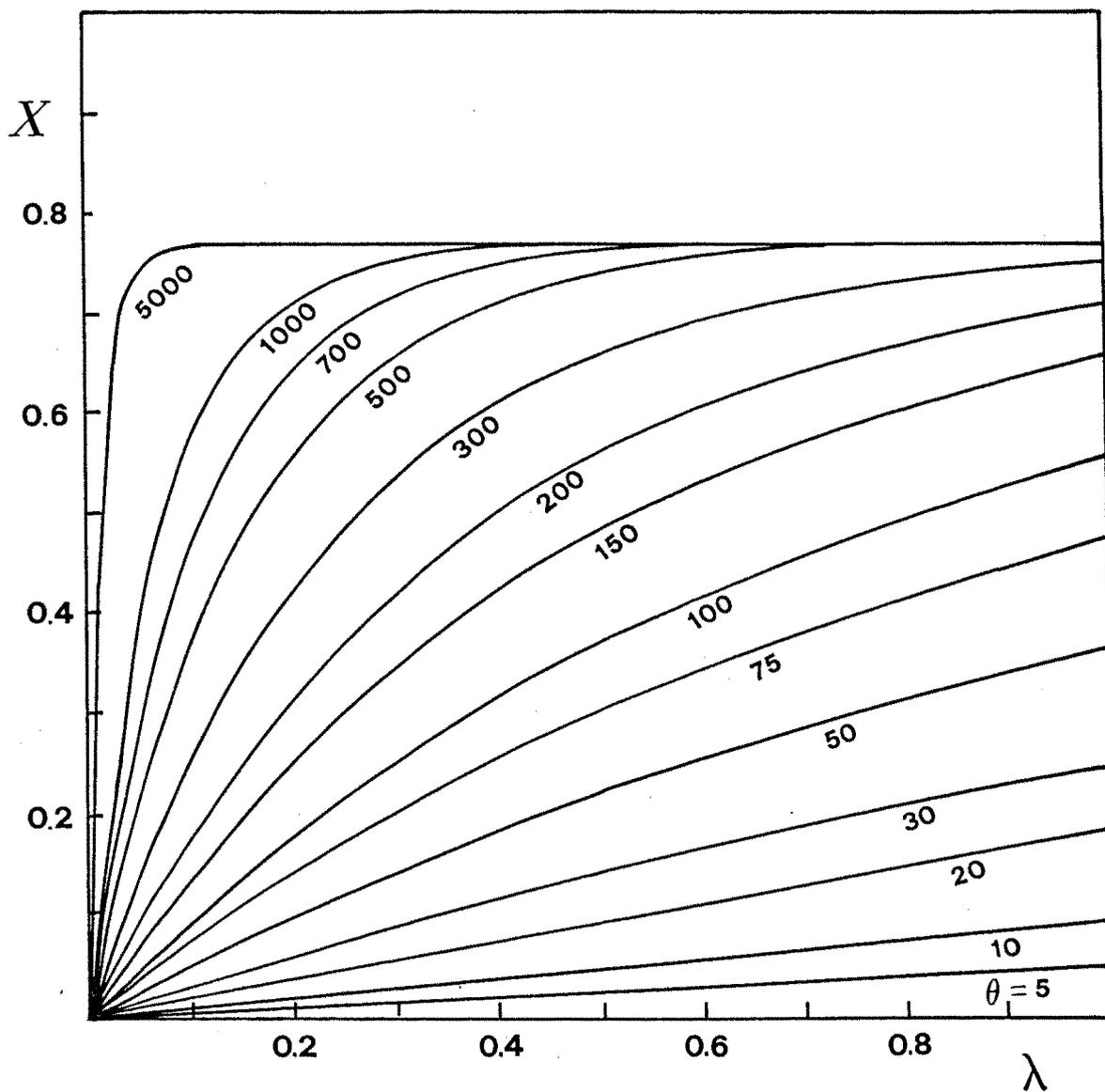


FIGURA 42.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0=100$ ,  $\phi'_{S0}=1$ ,  $KE=0,3$ ,  $Dif=0,5$  y  $\alpha=1$ .

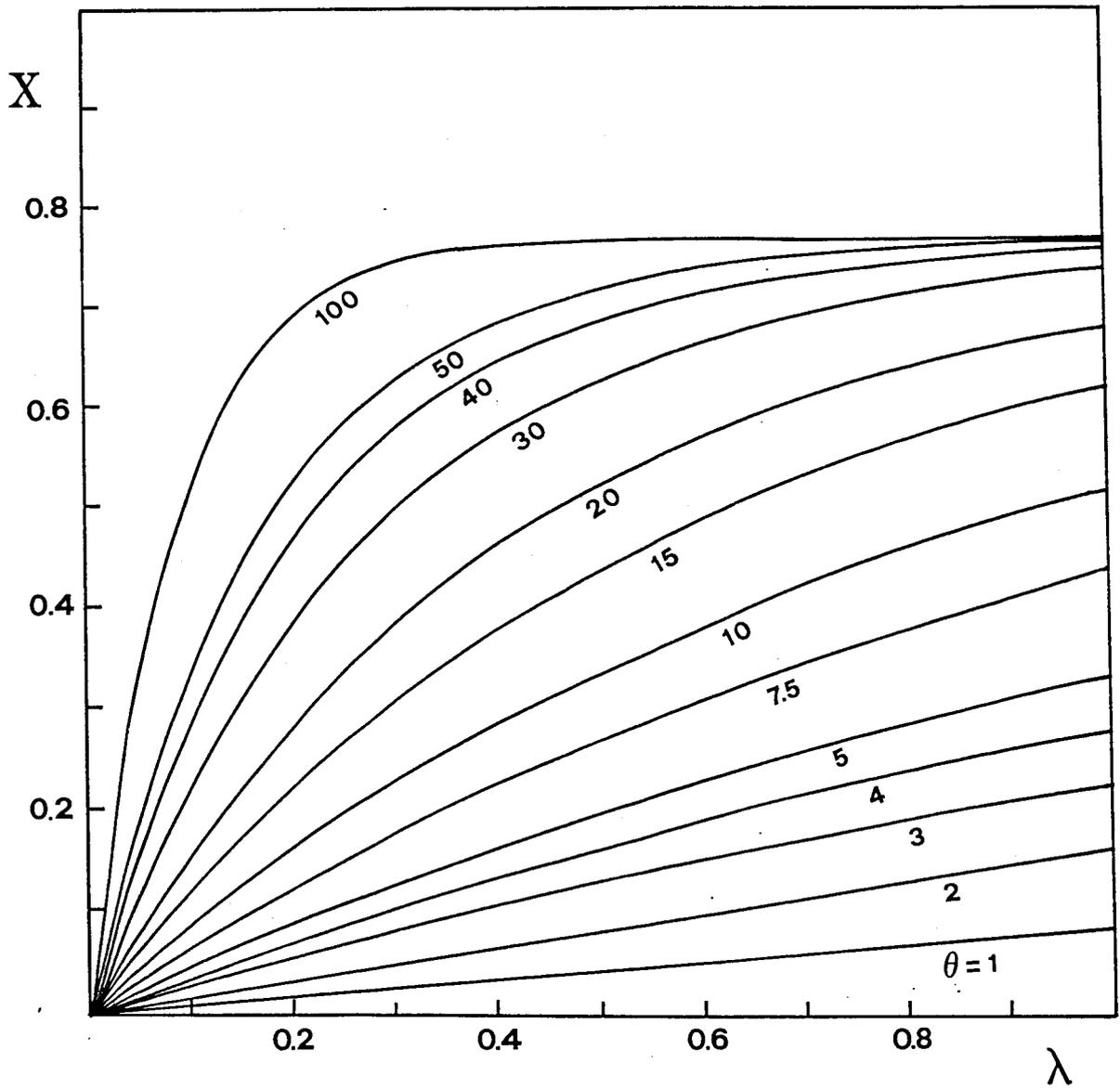


FIGURA 43.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 0,1$ ,  $\phi'_{S0} = 1000$ ,  $KE = 0,3$ ,  $Dif = 0,5$  y  $\alpha = 1$ .

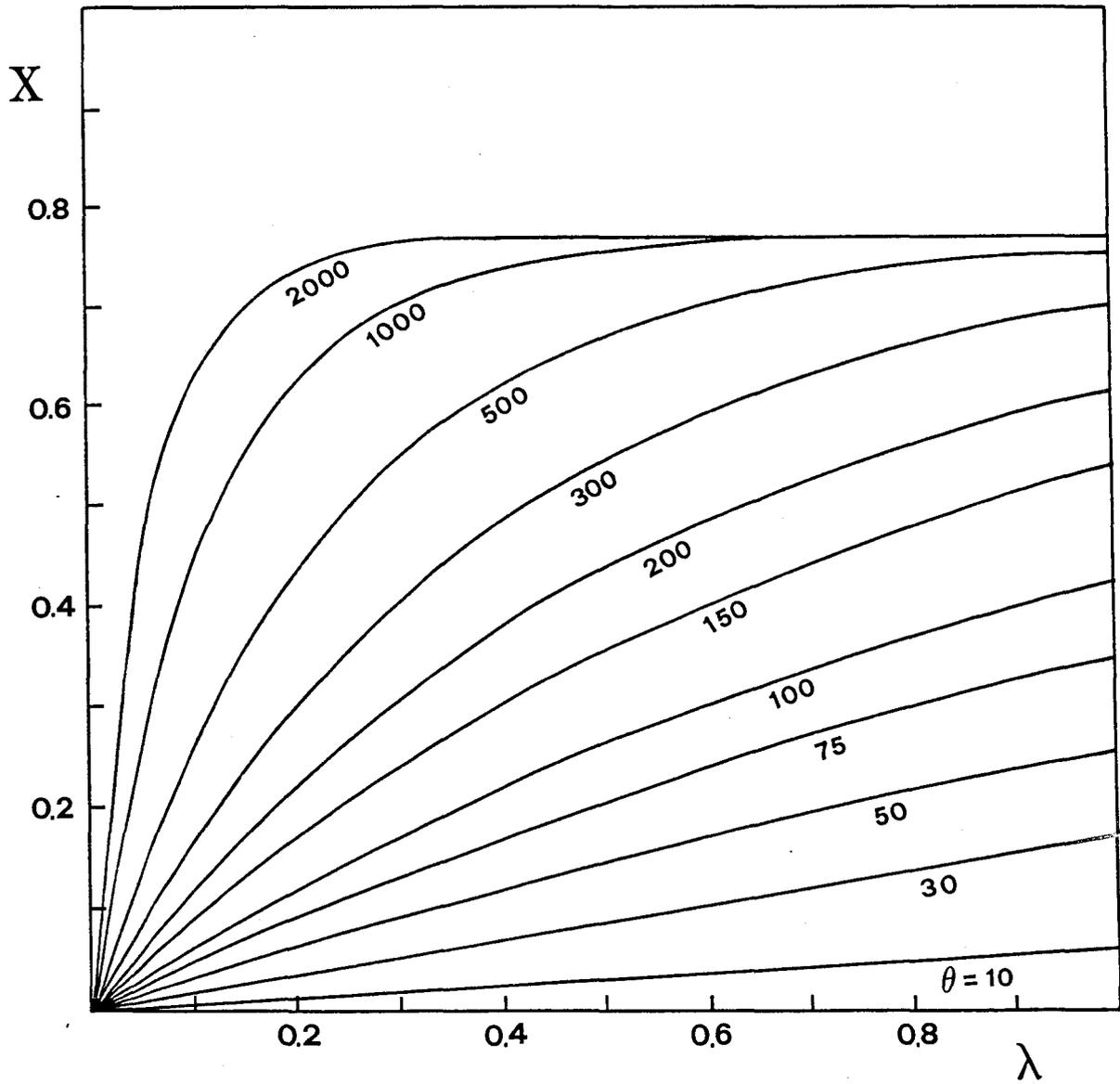


FIGURA 44.- Perfiles axiales de conversión en el reactor para distintos valores del módulo  $\theta$ , siendo  $\beta_0 = 100$ ,  $\phi_{S0}^* = 1000$ ,  $KE = 0,3$ ,  $Dif = 0,5$  y  $\alpha = 1$ .

Dif y  $\alpha$  , respectivamente.

De la consideración de dichas figuras se observa que para valores constantes de  $\phi'_{S0}$  y  $\beta_0$  , la conversión aumenta con  $\theta$  , es decir, con el tiempo de residencia en el reactor, observándose que para valores pequeños de  $\theta$  , X varía de forma prácticamente lineal con  $\lambda$  , mientras que a valores altos de este módulo, X alcanza rápidamente valores próximos a la unidad (o a la conversión de -- equilibrio en su caso). Todo lo anterior ocurre para longitudes adimensionales del reactor inferiores a la unidad, lo que demuestra que en estas condiciones existe una fracción importante del volumen del reactor que no es operativa, pudiendo incluso ocurrir que para valores muy altos de  $\theta$  se alcance la conversión de equilibrio prácticamente desde la entrada del reactor. Para unos valores dados de  $\phi'_{S0}$  y  $\theta$  , al aumentar  $\beta_0$  la conversión disminuye; es decir, al aumentar el valor de la constante de Michaelis intrínseca, la conversión experimentada en la corriente efluente del reactor es, como sería lógico esperar, menor. Para valores fijos de los módulos adimensionales  $\beta_0$  y  $\theta$  , la conversión aumenta conforme disminuye el valor de  $\phi'_{S0}$  . En resumen se confirma que la conversión de salida del reactor aumenta al disminuir la concentración de sustrato de la alimentación y, que para un mismo valor de la concentración, la conversión aumenta conforme más pequeño es el caudal y menor es el valor de  $\phi'_{S0}$  o, lo que es lo mismo, a medida que las limitaciones difusionales se hacen más pequeñas.

6.- CONTRASTE DEL MODELO

## 6.- CONTRASTE DEL MODELO

Puesto que el modelo teórico desarrollado en el apartado anterior está orientado tanto a la estimación de factores de eficacia como a la predicción de los perfiles axiales de conversión (y, por tanto, de la conversión de salida) en reactores tubulares de lecho fijo que operen con sistemas enzimáticos como los que se han descrito, un adecuado contraste del mismo debe incluir tanto la comparación de valores experimentales del factor de eficacia con los suministrados por el modelo como la comparación entre valores experimentales y teóricos de la conversión de salida en los citados reactores. Asimismo, y puesto que el modelo se ha generalizado a tres tipos de cinéticas, es conveniente que el contraste no quede limitado a una sola de ellas. Dado que en este trabajo se aportan datos originales sobre dos sistemas enzimáticos que obedecen, respectivamente, a una cinética de Michaelis-Menten reversible monosustrato y a otra irreversible con inhibición competitiva por uno de los productos,

se han utilizado dichos sistemas en orden a la citada comprobación. En ambos casos, y como queda reflejado en el apartado correspondiente, se ha operado con el derivado inmovilizado CPG-460-AA-naringinasa actuado, respectivamente, sobre los dos sustratos objeto del presente estudio: el p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ramnósido y la naringina.

Los valores experimentales del factor de eficacia y de la conversión a la salida del reactor tubular, que hayan de ser utilizados en la comprobación del modelo, pueden extraerse de los resultados obtenidos en la experimentación llevada a cabo con dichos sistemas en reactores tanque discontinuos o tubulares continuos, resultados que ya han sido discutidos en el apartado 4. En cuanto a la estimación de los correspondientes valores con el modelo, es requisito previo el conocimiento de todos los parámetros cinéticos y de transporte de dichos sistemas, a fin de poder evaluar, a partir de ellos, los módulos adimensionales que en él se contienen. En este sentido, y tal como se recoge en los apartados correspondientes, se han determinado los valores de las constantes cinéticas intrínsecas por lo que solo faltan por determinar las difusividades efectivas de las diferentes especies químicas implicadas en los dos procesos citados. Para este fin, se ha utilizado el procedimiento de estimación que a continuación se describe.

## 6.1.- ESTIMACION DE DIFUSIVIDADES DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS

De entre los diferentes métodos de estimación de difusividades de solutos en disoluciones líquidas, recogidos en la revisión efectuada por Bretsznajder (162), se ha seleccionado uno recomendado para su utilización en disoluciones acuosas de especies muy diluidas, circunstancias que, con gran aproximación, concurren en las especies implicadas en el presente trabajo ya que, para todas ellas, los niveles máximos de concentración están en el rango de 1-10 mM.

En síntesis, el procedimiento consiste en la aplicación de la relación:

$$\frac{D \mu}{T} = 7,4 \times 10^{-8} \frac{(X M)^{0,5}}{v_b^{0,6}}$$

donde:

D = difusividad del soluto a dilución infinita,  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ .

$\mu$  = viscosidad de la disolución, centipoises.

T = temperatura absoluta, °K.

X = parámetro de asociación.

M = peso molecular del disolvente.

$V_b$  = volumen normal del soluto en el punto normal de ebullición, ml/g mol.

La ecuación anterior puede usarse para temperaturas comprendidas entre 0 °C y 100 °C. Tanto el parámetro de asociación  $X$ , como  $V$  se han estimado a partir de los datos que se exponen en las tablas del libro de R.H. Perry, Chemical Engineer's Handbook (163).

Según comprobaciones de los propios autores, este método predice el valor de la difusividad de solutos en agua con una desviación media no superior al 10% siendo, para compuestos orgánicos como los que aquí se consideran, sensiblemente menor, al no existir en ellos características de elevada polaridad.

Dadas las características del sistema, muy alta relación entre el tamaño de poro y el de las moléculas de sustrato, la difusividad en los poros será igual a la del seno de la disolución y a todos los efectos así se han considerado.

6.2.- CINETICA DE MICHAELIS-MENTEN REVERSIBLE:  
SUSTRATO P-NITROFENIL- $\alpha$ -L-RAMOSIDO

El valor de la constante de Michaelis intrínseca y de las constantes de inhibición por p-nitrofenol y ramnosa, con para el sistema p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido/CPG-460-AA-naringinasa, respectivamente, 0,96 mM, 0,15 mM y 3,0 mM, tal y como se expone en las Tablas 3 y 5. El valor de la velocidad máxima intrínseca por unidad de volumen de la partícula catalítica, se ha calculado a partir de la actividad específica del derivado inmovilizado y es de  $3,7 \times 10^2$  mM min<sup>-1</sup>. La constante de equilibrio de la reacción ezimática se ha obtenido, como ya se expuso en el apartado 4.6, a partir de la conversión de equilibrio determinada experimentalmente y tiene un valor de 1.22. Para calcular el módulo adimensional  $\phi'_S$  se ha tomado el valor medio del radio de la partícula esférica del soporte, igual a 55  $\mu$ . Las difusividades de sustrato y producto se han estimado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, obteniéndose para el sustrato un valor de  $5,64 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> y para el producto  $8,34 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, de manera que el módulo Dif vale 0,68.

### 6.2.1.- Factor de eficacia

Para comprobar el grado de aproximación entre los valores experimentales del factor de eficacia y los calculados con el modelo propuesto en el presente trabajo se han determinado, en primer lugar, los valores de aquellos. Con este fin, se han utilizado los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el reactor tanque discontinuo (apartado 4.4) para concentraciones de sustrato comprendidas entre  $5,66 \times 10^{-2}$  y  $3,04$  mM. Puesto que las concentraciones de sustrato y producto en la disolución son conocidas, se puede determinar la velocidad media experimental de reacción como la relación de incrementos de concentración de sustrato o producto a los incrementos de tiempo. Asimismo, se puede estimar la velocidad que habría en ausencia de limitaciones difusionales sustituyendo, en la ecuación 17, los valores de las concentraciones de dichas especies y los de las constantes cinéticas intrínsecas. El cociente entre ambas velocidades proporciona el factor de eficacia experimental. Con los valores de  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  para las mismas condiciones experimentales, se ha procesado el programa y calculado los correspondientes valores de  $\eta$ . Aunque los valores experimentales de  $\eta$  utilizados en el contraste del modelo se han obtenido en un reactor discontinuo y el modelo se ha desarrollado para la situación

de estado estacionario, esta comparación es válida ya que el volumen ocupado por el biocatalizador es menor del 10% del volumen total del reactor, y en estas condiciones el valor asintótico del factor de eficacia en estado no estacionario es prácticamente igual al valor obtenido en estado estacionario (108,109). El hecho de que deban utilizarse para el cálculo del factor de eficacia experimental resultados obtenidos en un reactor discontinuo se debe, fundamentalmente, a que como los experimentos realizados en estado estacionario se han llevado a cabo en un reactor tubular, no es posible medir concentraciones de sustrato y producto y velocidades de reacción locales, sino únicamente las conversiones de salida del reactor.

En la Tabla 10 se resumen los valores de las concentraciones de sustrato y producto, así como los de la velocidad media de reacción y velocidad superficial a partir de las cuales se calcula el factor de eficacia experimental. También se encuentran en dicha tabla los valores de los módulos adimensionales  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y los del factor de eficacia obtenidos con el modelo. La comparación del factor de eficacia calculado con el experimental, se muestra en la Figura 45 en la que se aprecia una buena aproximación de la nube de puntos a la diagonal. El ajuste, por mínimos cuadrados, condujo a la relación:

TABLA 10.- Valores de los factores de eficacia experimentales y calculados con el modelo para el sistema p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido/CPG-460-AA-naringinasa.

$C_{SR}$	$C_{PR}$	$\langle V \rangle_{exp}$	$V_{sup}$	$\eta_{exp}$	$\phi'_S$	$\beta$	$\gamma$	$\eta_{teor}$
$5,66 \times 10^{-2}$	$1,35 \times 10^{-2}$	$2,70 \times 10^{-2}$	$7,86 \times 10^{-2}$	0,34	-256,47	-6,48	0,49	0,36
$6,57 \times 10^{-2}$	$7,43 \times 10^{-3}$	$2,25 \times 10^{-3}$	$4,76 \times 10^{-3}$	0,47	-220,95	-7,50	0,96	0,43
0,12	$2,48 \times 10^{-2}$	$5,50 \times 10^{-2}$	0,14	0,38	-126,23	-4,02	0,48	0,38
0,13	0,14	0,32	0,69	0,47	-11,52	-1,71	0,42	0,50
0,30	$5,30 \times 10^{-2}$	0,12	0,30	0,39	-48,88	-2,52	0,46	0,41
0,34	0,22	$5,00 \times 10^{-2}$	0,10	0,53	-43,20	-3,34	0,72	0,53
0,69	0,36	0,10	0,18	0,56	-21,04	-2,65	0,64	0,58
1,29	0,81	0,11	0,15	0,74	-11,25	-2,67	0,70	0,70
1,41	0,69	0,16	0,23	0,71	-10,30	-2,40	0,62	0,68
1,50	0,95	0,12	0,15	0,77	-9,68	-2,66	0,70	0,73
1,57	0,18	0,36	0,73	0,49	-9,25	-1,67	0,42	0,52
1,86	0,24	0,41	0,71	0,57	-7,80	-1,67	0,43	0,56
1,99	0,81	0,22	0,30	0,74	-7,29	-2,18	0,58	0,70
2,20	0,25	0,48	0,79	0,61	-6,60	-1,62	0,42	0,58
2,21	0,94	0,22	0,29	0,75	-6,57	-2,20	0,59	0,73
2,47	0,89	0,24	0,35	0,69	-5,88	-2,07	0,55	0,71
2,52	0,28	0,49	0,82	0,59	-5,76	-1,60	0,42	0,58
2,84	0,31	0,54	0,85	0,64	-5,11	-1,58	0,42	0,59
3,04	0,32	0,56	0,87	0,64	-4,78	-1,56	0,42	0,60

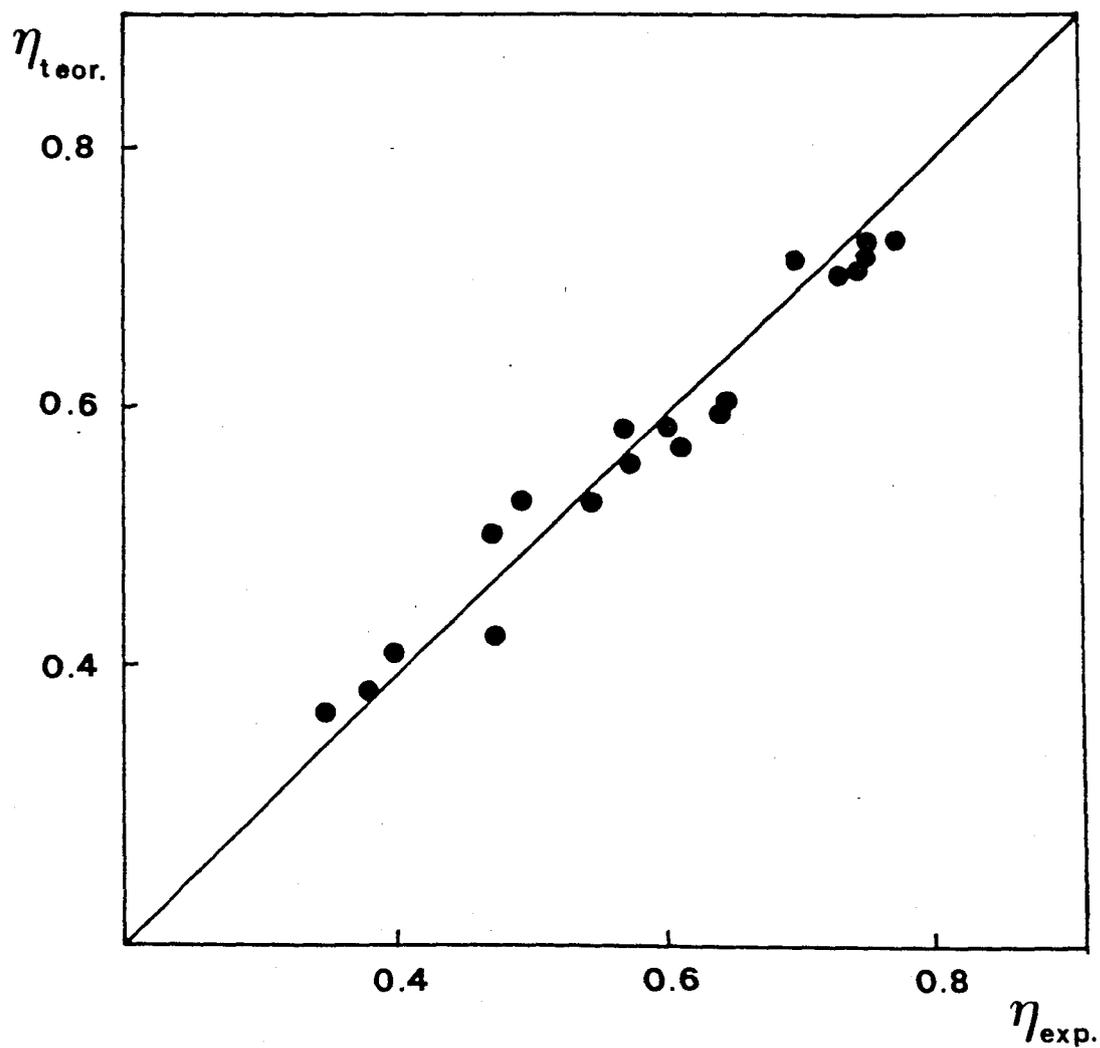


FIGURA 45.- Contraste entre los valores del factor de eficacia calculados con el modelo y los experimentales para naringinasa in movilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

$$\eta_{\text{calculado}} = 0,975 \eta_{\text{experimental}}$$

siendo el coeficiente de correlación lineal igual a 0,999. En consecuencia, puede decirse que el modelo predice el valor del factor de eficacia con bastante exactitud.

#### 6.2.2.- Conversión de salida del reactor tubular de lecho fijo

Los resultados de la experimentación efectuada con el reactor tubular de lecho fijo (apartado 4.7.1), se han comparado con las conversiones de salida del reactor procedentes del modelo de diseño del mismo. Para ello, se ha procesado el programa de ordenador, incluyendo en los módulos adimensionales implicados en dicho modelo los valores correspondientes a las diferentes situaciones experimentales.

En la Tabla 11, se resumen dichas condiciones (concentración de sustrato y caudal), así como las conversiones experimentales y teóricas obtenidas en cada caso. El grado de correlación obtenido se expresa en la Figura 46, en la que las conversiones teóricas y experimentales vienen especificadas en tanto por

TABLA 11.- Conversiones de salida del reactor tubular de lecho fijo experimentales y calculadas con el modelo para el sistema p-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnósido /CPG-460-AA-naringinasa.

$C_{SRO}$ (mM)	F (ml/min)	$X_{exp.}$	$X_{calc.}$
0,437	5,0	0,52	0,54
0,437	10,2	0,51	0,49
0,437	15,0	0,44	0,44
0,875	5,0	0,51	0,53
0,875	10,2	0,45	0,45
0,875	15,0	0,39	0,39
1,750	5,0	0,49	0,49
1,750	10,2	0,39	0,39
1,750	15,0	0,32	0,33
3,500	5,0	0,43	0,44
3,500	10,2	0,34	0,32
3,500	15,0	0,25	0,26

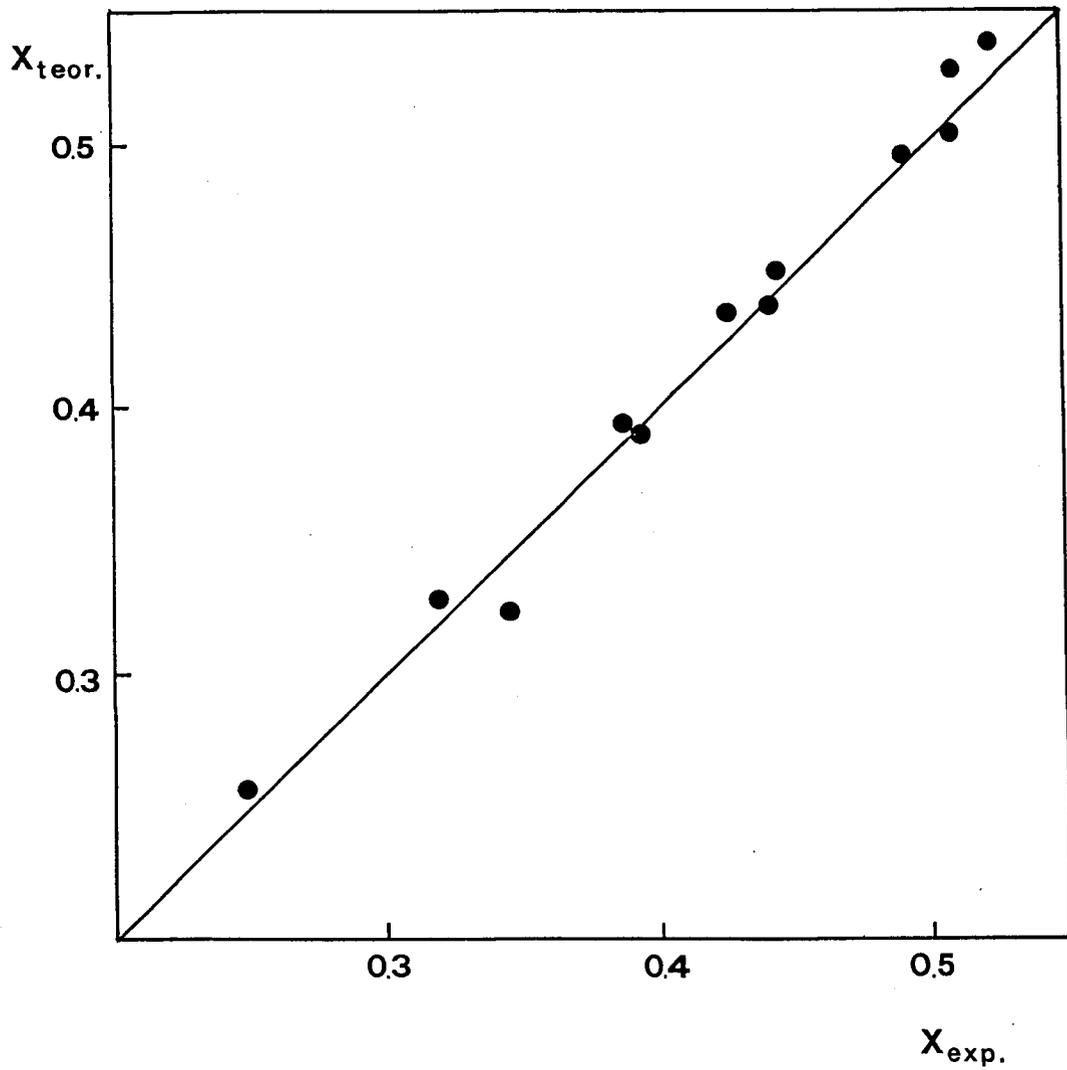


FIGURA 46.- Contraste entre los valores de conversión obtenidos experimentalmente y los que predice el modelo desarrollado para el diseño del reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460, cuando actúa sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido.

uno. Los puntos de contraste se ajustaron a una recta de ecuación:

$$X_{\text{calculado}} = 1,008 X_{\text{experimental}}$$

siendo el coeficiente de correlación lineal de 0,999. Como puede observarse en dicha Figura, existe una adecuada aproximación de la nube de puntos a la diagonal, con lo cual puede afirmarse que el modelo predice con bastante exactitud el valor de la conversión de salida del reactor tubular de lecho fijo, para el sistema estudiado.

### 6.3.- CINETICA DE MICHAELIS-MENTEN CON INHIBICION COMPETITIVA POR PRODUCTO: SUSTRATO NARINGINA

Para el sistema naringina/CPG-460-AA-naringinasa, los valores de la constante de Michaelis intrínseca y de inhibición por ramnosa son 2,85 y 6,12 mM, respectivamente, como ya se expuso en la Tabla 5. La velocidad máxima intrínseca por unidad de volumen de la partícula catalítica se ha calculado, de la misma manera que para el sustrato sintético, a partir de la actividad específica del derivado y tiene un valor de  $5,94 \times 10^3 \text{ mM min}^{-1}$ . Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.1, se ha estimado para la difusividad de la naringina

un valor de  $3,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  y para la de la ramnosa  $8,34 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , de manera que en este caso el módulo Dif vale 0.45.

### 6.3.1.- Factor de eficacia

La comparación entre los valores del factor de eficacia experimentales y teóricos para el sistema naringina/CPG-460-AA-naringinasa, se ha llevado a cabo de forma similar a la efectuada en el apartado 6.2.1. Así, con los valores de velocidad de reacción experimentales obtenidos con concentraciones de sustrato y producto variables entre 0.2 y 9.5 mM, se han calculado los factores de eficacia experimentales. Con los valores correspondientes de los módulos adimensionales, se ha procesado el programa y calculado los factores de eficacia teóricos respectivos. En la Tabla 12, se encuentran reflejados dichos factores de eficacia así como las concentraciones de sustrato y producto usadas, las velocidades de reacción media y superficial y los valores que adoptan cada uno de los módulos adimensionales  $\phi'_S$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , para las diversas condiciones ensayadas. En la Figura 47 se muestra, de forma gráfica, la comparación entre los factores de eficacia experimentales y calculados con el modelo. El ajuste por regresión lineal de la nube de puntos conduce a la ecuación:

TABLA 12.- Valores de los factores de eficacia experimentales y calculados con el modelo para el sistema naringina/CPG-460-AA-naringinasa.

$C_{SR}$	$C_{PR}$	$\langle V \rangle_{exp}$	$V_{sup}$	$\eta_{exp}$	$\phi'_S$	$\beta$	$\gamma$	$\eta_{teor}$
0,24	$1,01 \times 10^{-2}$	$2,02 \times 10^{-2}$	$4,61 \times 10^{-2}$	0,44	493,66	15,32	0,00	0,45
0,43	$6,50 \times 10^{-2}$	0,13	0,28	0,47	272,25	8,64	0,00	0,47
0,66	$9,20 \times 10^{-2}$	0,18	0,37	0,49	179,98	5,83	0,00	0,48
0,81	$4,53 \times 10^{-2}$	$7,00 \times 10^{-2}$	0,15	0,45	250,12	7,42	0,00	0,46
1,14	0,10	0,10	0,20	0,50	104,04	3,49	0,00	0,51
1,17	$6,86 \times 10^{-2}$	0,14	0,27	0,51	101,10	3,38	0,00	0,52
2,24	0,26	0,17	0,30	0,57	99,52	5,13	0,00	0,58
3,57	0,14	0,27	0,43	0,64	33,13	1,30	0,00	0,64
4,69	0,26	0,52	0,79	0,66	25,25	1,07	0,00	0,68
5,36	0,29	0,59	0,84	0,70	22,95	0,97	0,00	0,70
5,54	0,40	0,40	0,56	0,71	21,37	0,96	0,00	0,71
6,55	0,38	0,77	1,07	0,72	18,09	0,85	0,00	0,74
7,33	0,59	0,59	0,79	0,75	16,17	0,81	0,00	0,76
7,51	0,41	0,82	1,08	0,76	15,77	0,78	0,00	0,76
8,20	0,71	0,71	0,90	0,78	14,44	0,76	0,00	0,78
8,61	0,30	0,60	0,76	0,79	13,76	0,70	0,00	0,78
9,27	0,63	0,63	0,81	0,78	12,78	0,69	0,00	0,79
9,53	0,37	0,75	0,92	0,81	12,43	0,67	0,00	0,80

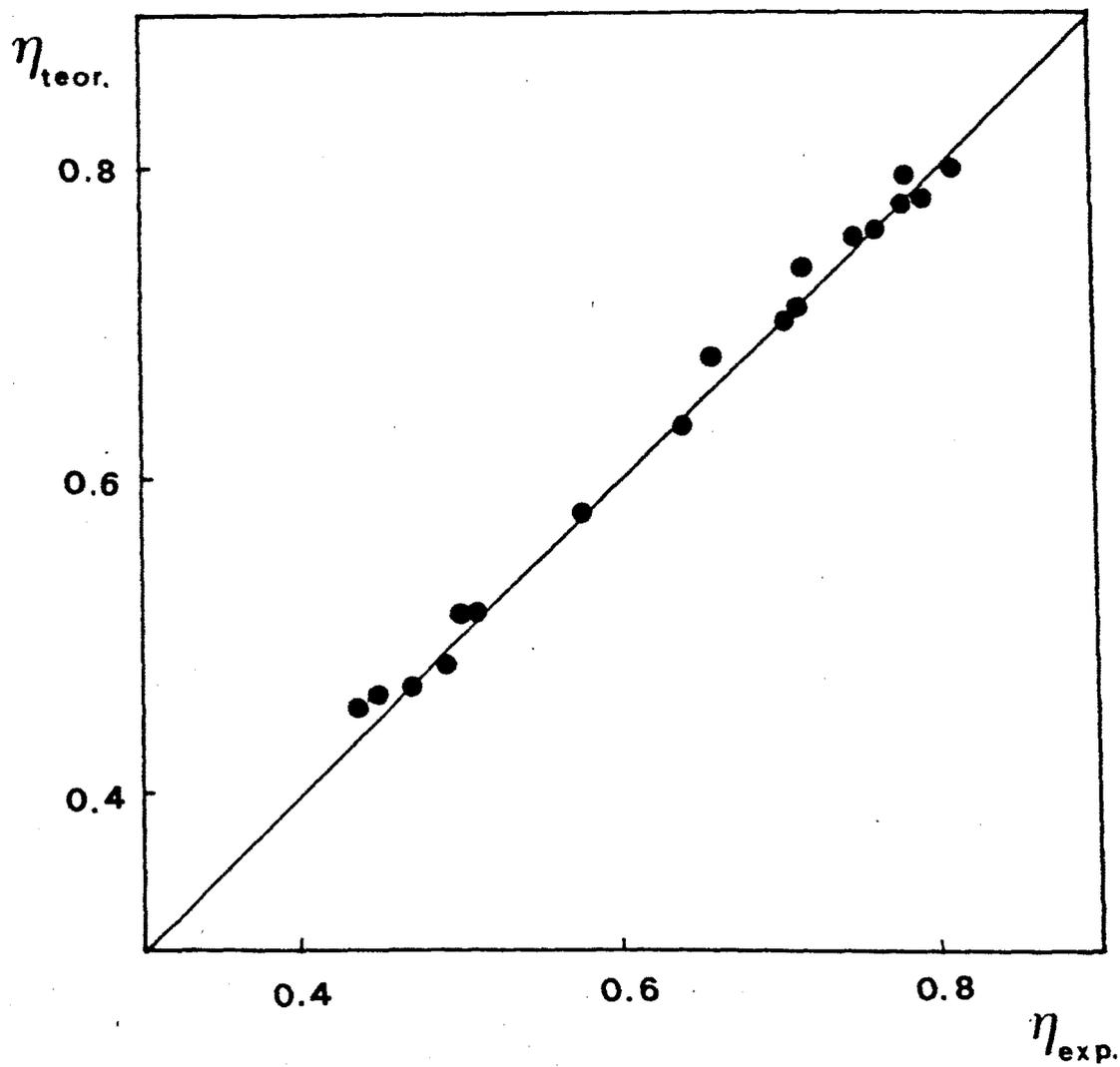


FIGURA 47.- Contraste entre los valores del factor de eficacia calculados con el modelo y los experimentales, para el sistema naringina/CPG-460-AA-naringinasa.

$$\eta_{\text{calculado}} = 1,004 \eta_{\text{experimental}}$$

siendo el coeficiente de correlación  $r=0,999$ . Como puede observarse, existe una buena concordancia entre los valores experimentales y teóricos, con lo cual se vuelve a comprobar la validez del modelo propuesto.

#### 6.3.2.- Conversión de salida del reactor tubular de lecho fijo

Para obtener las conversiones de salida del reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada usando naringina como sustrato, se planteó la necesidad de usar un derivado con menor actividad, de manera que no se obtuvieran conversiones tan elevadas que dificultaran su comparación con las teóricas. De esta manera, se usó un derivado inmovilizado con 10,8 UAE / g de soporte y, puesto que el tipo de enlace enzima-soporte era el mismo, se supuso que los valores de la constante de Michaelis intrínseca y el de la constante de inhibición por ramnosa se mantenían constantes.

No obstante, y para comprobar la veracidad de estos valores de las constantes cinéticas intrínsecas, se usó el método propuesto

en la bibliografía (65) y descrito en el apartado 2.7, que hace uso de resultados experimentales obtenidos operando con un reactor integral. Para utilizar este método, es necesario disponer de un modelo de diseño de reactor que considere adecuadamente la interacción de la reacción y la difusión interna. Puesto que ya se había comprobado la validez del modelo propuesto en este trabajo, se procedió a la aplicación del método citado para la obtención de las constantes cinéticas intrínsecas. Para ello se representaron gráficamente los valores de la función  $\sigma$  para distintos valores de  $V_M'$ ,  $K_M'$  y  $K_P$ . En las Figuras 48 a 50 se pueden observar dichas representaciones. Los valores de las constantes que minimizan la función  $\sigma$  son los estadísticamente mejores.

Con este método se obtuvieron los siguientes valores de las constantes cinéticas intrínsecas:

$$V_M' = 90 \text{ mM min}^{-1}$$

$$K_M' = 2,85 \text{ mM}$$

$$K_P = 5,0 \text{ mM}$$

Los resultados experimentales obtenidos utilizando un reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada que se encuentran reflejados en el apartado 4.7.2,

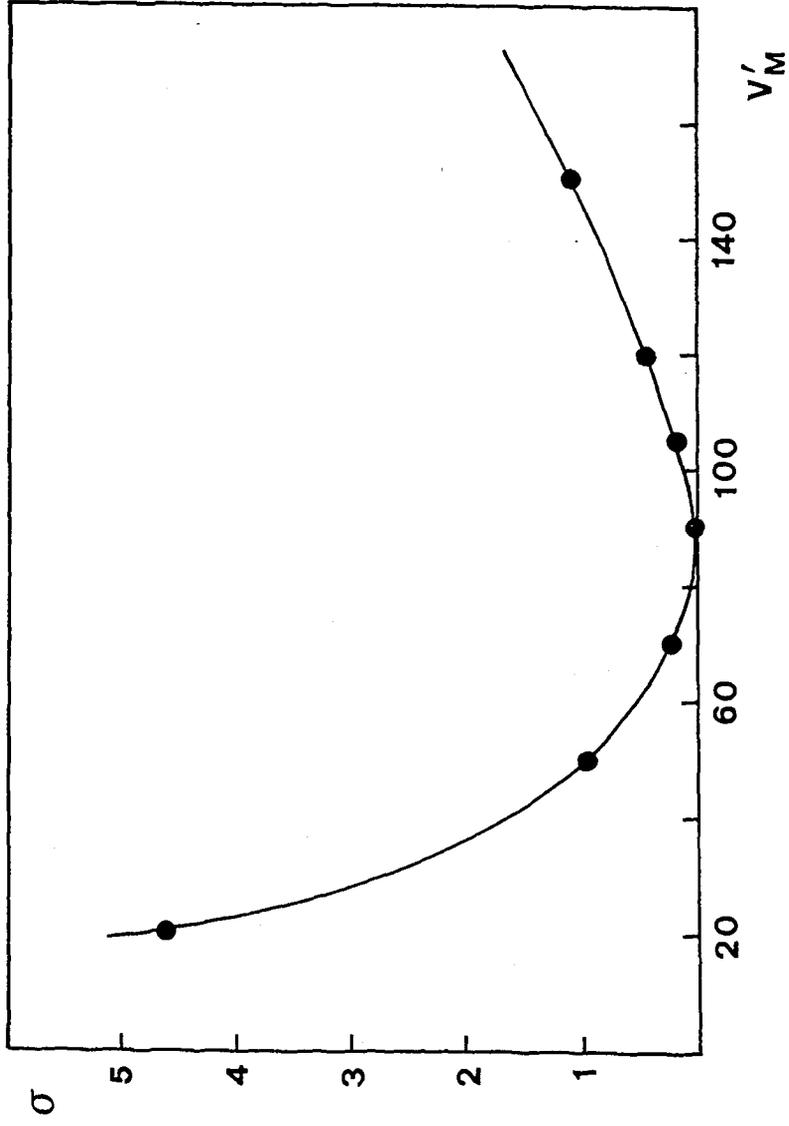


FIGURA 48.- Variación de la función  $\sigma$  con  $V'_M$  para la obtención del valor de la velocidad máxima intrínseca por unidad de volumen de partícula catalítica del derivado CPG-460-AA-naringina actuando sobre naringina.

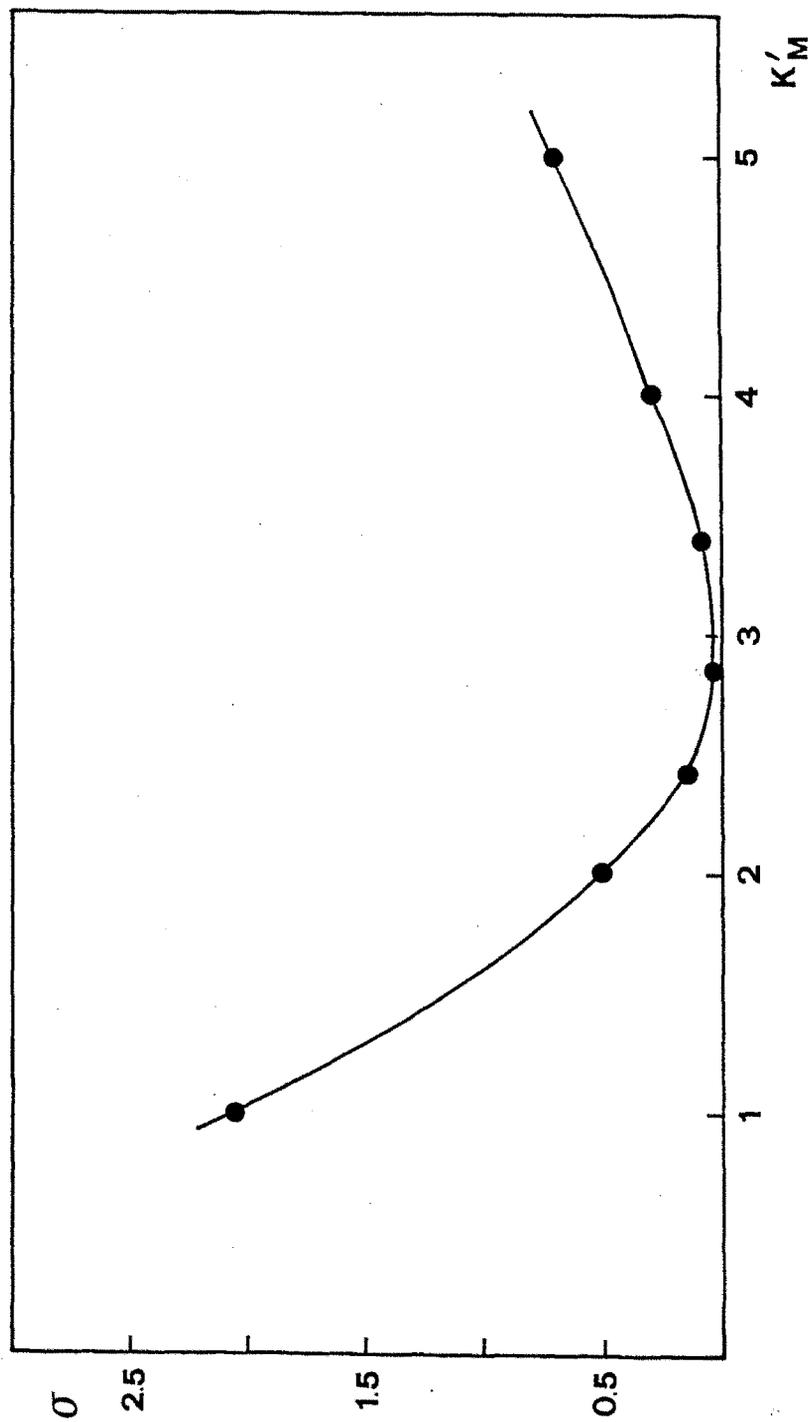


FIGURA 49.- Variación de la función  $\sigma$  con  $K'_M$  para la obtención del valor de la constante de Michaelis intrínseca del derivado CPG-460-AA-naringinasa actuando sobre naringina.

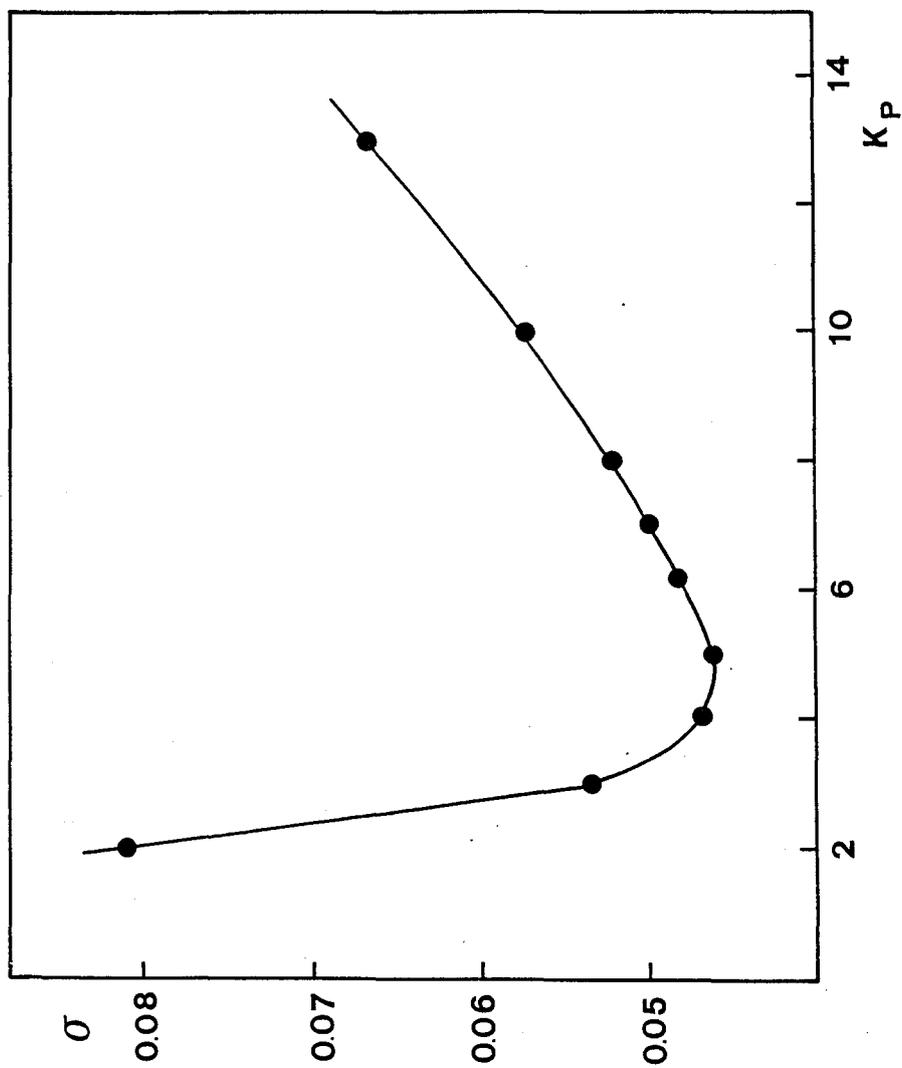


FIGURA 50.- Variación de la función  $\sigma$  con  $K_p$  para la obtención de la constante de inhibición por ramnosa de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 actuando sobre naringina.

se compararon con los predichos por el modelo de diseño del reactor. En la Tabla 13 se muestran resumidos los valores de las conversiones experimentales y teóricas para las diferentes situaciones experimentales ensayadas. El grado de ajuste se encuentra representado de forma gráfica en la Figura 51, en la que se representa la desviación sufrida por los valores experimentales frente a los teóricos. Los puntos de contraste se ajustaron por regresión lineal a una recta de ecuación:

$$X_{\text{calculado}} = 0,974 X_{\text{experimental}}$$

con un coeficiente de correlación  $r = 0,998$ . Como puede observarse en la Figura, existe una buena concordancia entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente, con lo cual se puede afirmar, que el modelo de simulación y diseño de un reactor tubular de lecho fijo para sistemas de enzimas inmovilizadas, predice con una desviación inferior al 5% la conversión de la corriente efluente de un reactor de este tipo a escala de laboratorio.

Es importante destacar, que el valor de la constante de inhibición para la ramnosa calculado por aplicación del modelo es ligeramente inferior al estimado experimentalmente. Esta pequeña variación no fué significativa al comparar las conversiones de salida del reactor teóricas y experimentales,

TABLA 13.- Conversiones de salida del reactor tubular de lecho fijo experimentales y calculadas con el modelo para el sistema naringina/ /CPG-460- AA -naringinasa.

$C_{SRO}$ (mM)	F (ml/min)	$X_{exp}$	$X_{calc}$
0,5	3,2	0,67	0,69
0,5	3,6	0,65	0,65
0,5	4,0	0,62	0,62
0,5	4,8	0,55	0,55
0,5	6,0	0,42	0,47
1,0	3,2	0,64	0,66
1,0	3,6	0,61	0,62
1,0	4,0	0,58	0,58
1,0	4,8	0,52	0,51
1,0	6,0	0,43	0,44
2,0	2,5	0,66	0,69
2,0	3,2	0,60	0,60
2,0	3,6	0,56	0,56
2,0	4,0	0,53	0,52
2,0	4,8	0,45	0,46
3,0	6,0	0,34	0,38
3,0	2,5	0,63	0,64
3,0	3,2	0,57	0,55
3,0	3,6	0,53	0,51
3,0	4,0	0,50	0,47
4,0	4,8	0,41	0,41
4,0	2,5	0,60	0,59
4,0	3,2	0,53	0,50
4,0	3,6	0,47	0,46
4,0	4,0	0,43	0,43
5,0	4,8	0,33	0,36
5,0	2,5	0,56	0,55
5,0	3,2	0,46	0,46
5,0	3,6	0,42	0,42
5,0	4,0	0,36	0,38

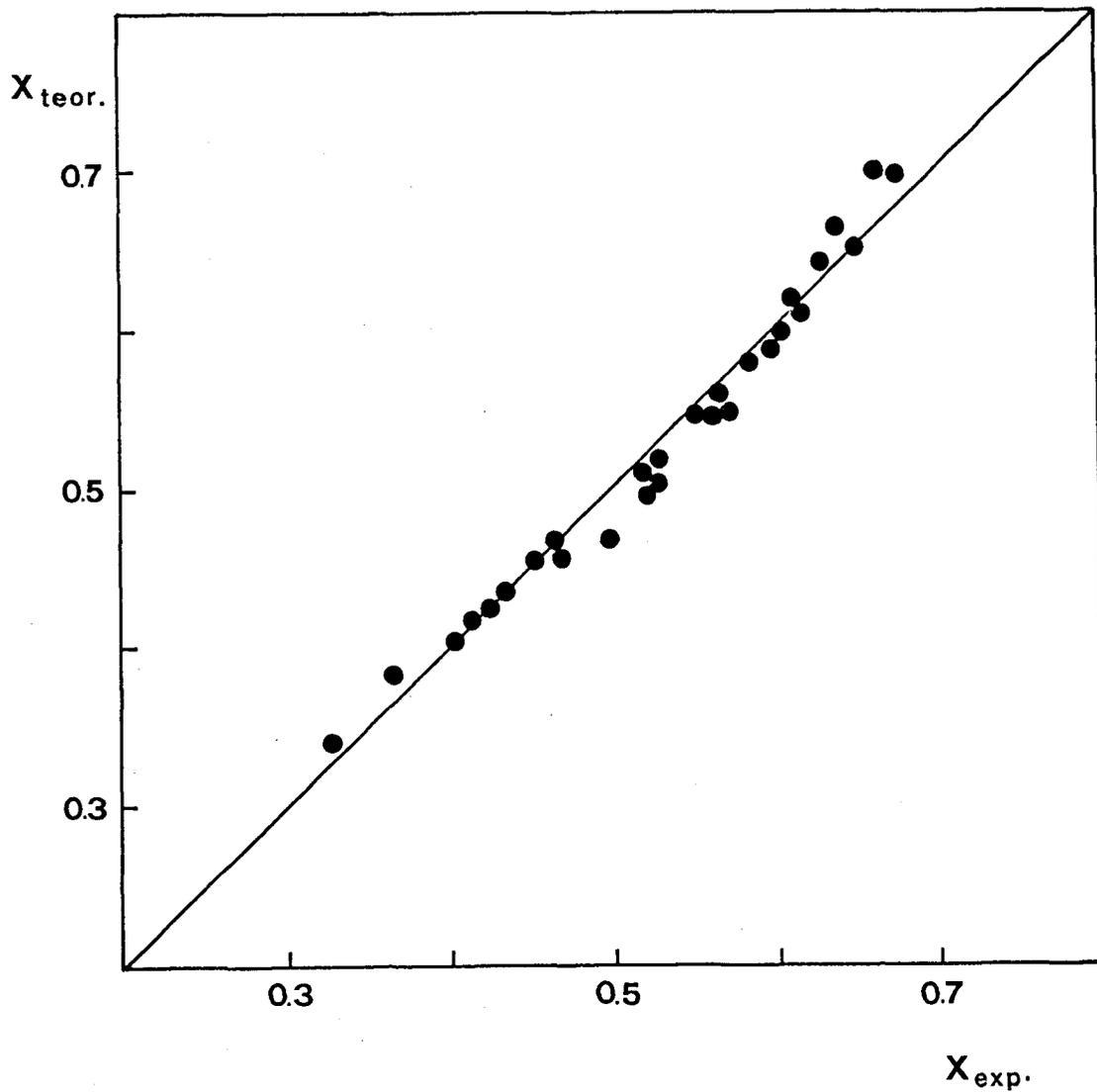


FIGURA 51.- Contraste entre los valores de conversión obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo de diseño del reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460, actuando sobre naringina.

como se pudo comprobar procesando el programa para un valor de constante de inhibición de 6,12 mM que fué el obtenido en la experimentación.

7.- CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

- 1ª) Se ha inmovilizado covalentemente el sistema enzimático naringinasa en soportes de vidrio poroso por cuatro métodos químicos distintos, tendentes a implicar en la unión al soporte a cuatro residuos diferentes de aminoácido de la enzima. La modificación química de los residuos de cisteínilo y de los grupos amino y carboxilato libre condujo a una inactivación de la enzima, resultando activo únicamente el derivado obtenido al acoplar la enzima al soporte a través de grupos fenólicos.
  
- 2ª) Se ha desarrollado un nuevo método de medida de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa de naringinasa. El método utiliza p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido como sustrato, y se ha mostrado como más sensible, específico y, a pesar de ser discontinuo, más rápido y económico que los referenciados en la bibliografía.

- 3ª) Se ha determinado la masa molecular aparente de naringinasa de Penicillium sp. por cromatografía líquida de permeación en gel de alta resolución. Se obtuvo un valor para este parámetro de 166.700, siendo ésta, la primera vez que se realiza la determinación del mencionado parámetro. Su conocimiento es importante para establecer el grado de penetración de la molécula enzimática en los poros de los soportes empleados para su inmovilización.
- 4ª) Se ha estudiado el efecto del tamaño de poro del soporte sobre la actividad enzimática. Los mejores rendimientos de inmovilización se obtuvieron cuando se empleó un tamaño de poro que permitió el acceso de la enzima al interior de la estructura del soporte. Tanto la protección que éste brinda a la enzima como la particular distribución de enlaces enzima-soporte para ese caso, deben ser los responsables de dicho comportamiento.
- 5ª) Se han caracterizado las propiedades generales de la enzima naringinasa, tanto soluble como inmovilizada, frente al sustrato sintético, p-nitrofenil-  $\alpha$  -L-ranósido y frente al natural, naringina. Se han determinado, en todos los casos, las condiciones óptimas de actuación (pH, temperatura, fuerza iónica y concentra-

ción de enzima), las constantes cinéticas (velocidad máxima y constante de Michaelis) y las constantes de inhibición de los productos implicados en las reacciones enzimáticas. Estos parámetros son absolutamente necesarios para el trabajo con, y a plicación de, estos sistemas.

6ª) La inmovilización de la enzima en el interior de la estructura del soporte CPG-460, dió lugar a la aparición de limitaciones difusionales internas, fenómeno que no sucedió con aquellos soportes en los que la inmovilización fué superficial, como CPG-40. Sin embargo, estas limitaciones difusionales fueron compensadas por la mayor densidad de carga enzimática, actividad y estabilidad del derivado de CPG-460 que el de CPG-40.

7ª) Se ha estudiado la estabilidad al almacenamiento de derivados de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460. Suspendidos en el tampón de óptima actividad a 3-5 °C, conservan un 90% de su capacidad hidrolítica inicial durante un año, lo que permitió su utilización en los ensayos enzimáticos necesarios sin cambios apreciables en las propiedades del derivado.

- 8<sup>a</sup>) La estabilidad operacional de derivados de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460 estuvo notablemente condicionada por el medio de reacción en el que se encontraba el sustrato naringina. La utilización de zumos de pomelo acortó considerablemente la vida media respecto a la calculada para una disolución tamponada de naringina, lo que hace perceptivo el estudio del efecto de los diferentes componentes de un zumo para comprender la notable diferencia observada.
- 9<sup>a</sup>) Se ha establecido que la hidrólisis del p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido por la enzima transcurre según una cinética de Michaelis-Menten reversible y muestra inhibición competitiva por los dos productos formados, ramnosa y p-nitrofenol. Cuando se empleó naringina como sustrato, la reacción fué irreversible y tan sólo la ramnosa inhibió competitivamente a la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa. El establecimiento de estos comportamientos constituyó una etapa esencial para el desarrollo posterior del modelo matemático que permitió la simulación del sistema.
- 10<sup>a</sup>) Se ha construido un reactor tubular de lecho fijo de naringinasa inmovilizada en aminoaril-CPG-460, a escala de laborato-

rio y alimentado con disoluciones de naringina y sustrato sintético de distintas concentraciones a diferentes caudales, se han obtenido las conversiones de salida en cada caso, datos que son válidos para posterior verificación del modelo de diseño y simulación de reactores en este trabajo propuesto.

- 11<sup>a</sup>) Se ha desarrollado un modelo matemático que describe cuantitativamente la interacción de la reacción enzimática con los efectos difusionales internos, para procesos heterogéneos monosustrato en los que la enzima se encuentra inmovilizada en partículas esféricas porosas. Se ha formulado la expresión matemática de su correspondiente factor de eficacia, lo que ha permitido el tratamiento de un sistema en el que tiene lugar una reacción enzimática que transcurre según una cinética de Michaelis-Menten reversible; la expresión de velocidad obtenida engloba así a otras menos complejas como son las de Michaelis-Menten simple y con inhibición competitiva por producto.

- 12<sup>a</sup>) Se han resuelto las ecuaciones diferenciales planteadas mediante cálculo numérico por el procedimiento de Runge-Kutta de cuarto orden; su algoritmo de cálculo

se ha transformado en el correspondiente programa de ordenador en lenguaje FORTRAN V y procesado, obteniéndose los perfiles de concentración adimensional de sustrato y los factores de eficacia. Presentados estos datos en forma de curvas generalizadas, han permitido cubrir la mayor parte de las situaciones experimentales que pudieran presentarse para un amplio rango de valores de los módulos adimensionales con los que se ha trabajado.

- 13<sup>a</sup>) Con el supuesto teórico de operación de los anteriores sistemas en reactores tubulares de lecho fijo, se ha formulado la ecuación de diseño de los mismos, que expresa la progresión de la conversión de sustrato a lo largo del reactor en función del factor de eficacia y demás parámetros adimensionales del sistema.
- 14<sup>a</sup>) Dicha ecuación diferencial se ha resuelto por el mismo procedimiento de cálculo numérico anterior, transformándose el algoritmo de cálculo en el correspondiente programa de ordenador, que utiliza el citado en la conclusión 12<sup>a</sup> como subrutina, para la estimación del factor de eficacia en cada posición longitudinal del reactor. Los resultados han permitido obtener los perfiles axiales de conversión en el reactor, también para un amplio intervalo de valores de los módulos adimensionales.

- 15<sup>a</sup>) Del contraste gráfico de los valores experimentales del factor de eficacia y de conversión de salida del reactor, con los predichos por la simulación, para los dos sistemas en estudio, puede concluirse la aplicabilidad del modelo propuesto para predecir el comportamiento de los mismos, ya que la nube de puntos se ajustó perfectamente a la diagonal con una desviación menor del 5%.
- 16<sup>a</sup>) La obtención de derivados inmovilizados de naringinasa de elevada actividad y estabilidad, así como la disponibilidad de un modelo del comportamiento de tales sistemas, posibilita el diseño de reactores tubulares de lecho fijo, en sus diversas escalas, para su utilización en procesos de transformación de industrias cítricas. De igual manera, la metodología seguida en este trabajo se constituye en herramienta adecuada para poner en operación otros sistemas diferentes al estudiado y de similares características.

8.- BIBLIOGRAFIA

8.- BIBLIOGRAFIA

- (1) CHANDLER B.V. y NICOL K.J. (1975)  
CSIRO Fd. Res. Q. 35, 79-85.
- (2) REED G (1975)  
en "Enzymes in Food Procesing" (G. Reed  
ed.) Academic Press. New York, 397-442.
- (3) KEFFORD J.F. (1959)  
Advan. Food Res., 9, 285-293.
- (4) CHASE J.R.T. (1974)  
Advances in Chemistry Series, 136, 257-  
-259.
- (5) ROMBOUTS F.M. y PILNIK W. (1978)  
Process Biochem., 13, 9-13.

- (6) HOROWITZ R.M. y GENTILI B. (1977)  
en "Citrus Science and Technology" (Nagy,S.,  
Shaw, Ph.E., Vedhuis, M.K., eds.) The  
Avi Publishing Co. Inc. Westport. Conn.,  
1, 397-419.
- (7) KAMIYA S., ESAKI S. y HAMA M. (1967)  
Agric. Biol. Chem., 31, 133-138.
- (8) ESAKI S., TANAKA R. y KAMIYA S. (1983)  
Agric. Biol. Chem., 47, 2319-2327.
- (9) DE VRY J. (1866)  
Jahresber Pharmacology, 1, 132-135.
- (10) GRIFFITHS F.P. y LIME B. (1959)  
Food Technol., 13, 430-433.
- (11) PULLEY G.N. y VON LOESECKE H.W. (1939)  
J. Amer. Chem. Soc., 61, 175-176.
- (12) MAURER R.H., BURDICK E.M. y WAIBEL  
C.W. (1950)  
Proc.Rio Grande Valley Hort. Inst. 4,  
147-151.

- (13) OLSON A.C., GRAY G.M. y GUADAGNI D.G.  
(1979)  
J. Food Sci. 44, 1358-1361.
- (14) BURDICK E.M. y MAURER R.H. (1950)  
U.S. Patent 2510709
- (15) KARTNIG T. y WEGSCHAIDER O. (1971)  
J. Chromatogr., 61, 375-382.
- (16) FOX D.V., SAVAGE W.L. y WENDER S.H.  
(1953)  
J. Amer. Chem. Soc., 75, 2504-2510.
- (17) HALL D.H. (1938)  
Chemistry and Industry, 57, 473-478.
- (18) TAUBER H. (1949)  
en "Chemistry and Technology of Enzymes"  
(Wiley, P., ed.) New York, 60-66.
- (19) TING S.V. (1958)  
Agric. Food. Chem. 6, 546-549.
- (20) THOMAS D.W., SMYTHE C.V. y LABBEE  
M.D. (1958)  
Food Research 23, 591-598.

- (21) KISHI K. (1959)  
Chemistry and Industry, Japan, 33, 185-188.
- (22) ONO M., TOSA T. y CHIBATA I. (1977)  
J. Ferment. Technol. 55, 493-500.
- (23) ONO M., TOSA T. y CHIBATA I. (1978)  
Agric. Biol. Chem. 42, 1847-1853.
- (24) PARK, N.H. y CHANG, H.N. (1979)  
J. Ferment. Technol. 57, 310-316.
- (25) ONO M. (1980)  
J. Ferment. Technol. 58, 387-389.
- (26) NOMURA D. (1965)  
Enzymologia 29, 273-282.
- (27) MORIKAWA E., TADISHI I. y TAKIGUCHI Y. (1968)  
Japanese Patent 68 28936; Chem. Abstr. (1969) 70. 95481 g.

- (28) OMURA H., CHIKANO T., ISHIZAKI K.  
y YAMAFUJI K. (1963)  
Kgushu Daigaku Nogakubu Gakugei Zasshi  
20, 321-330; Chem. Abstr. (1964) 61,  
3358 a.
- (29) DUNLAP W.J., HAGEN R.E. y WENDER  
S.H. (1962)  
J. Food Sci. 27, 597-601.
- (30) KI W.K., KIM J.K. y KIM M.C. (1973)  
Har'guk Sikp'um Kwahakhoe Chi. 5, 78-  
-83.
- (31) DAVIS W.B. (1947)  
Anal. Chem. 19, 476-488.
- (32) HABELT K. y PITTNER F. (1983)  
Anal. Biochem. 134, 393-397.
- (33) TIMELL T.E., GLAUDEMANS C.P.J. y CURRIE  
A.L. (1956)  
Anal. Chem. 28, 1916-1920.
- (34) OLSEN R.W. y HILL E.C. (1964)  
Proc. Fla. State Hort. Soc. 77, 321-325.

- (35) TSEN H.Y. (1984)  
J. Ferment. Technol. 26, 263-267.
- (36) VERSTEEG C., MARTENS L.J.H., ROMBOUTS  
F.M., VORAGEN A.G.J. y PILNIK W. (1977)  
Lebeusm. Wiss. u Technol. 10. 268-272.
- (37) ROE B. y BRUEMMER J.H. (1976)  
Proc. Fla. State Hort. Soc. 89, 191-194.
- (38) ROE B. y BRUEMMER J.H. (1977)  
Proc. Fla. State Hort. Soc. 90, 180-182.
- (39) BRUEL S.L., MARECHAL L.R., RIGO L.U.  
y VEIGA L.A. (1979)  
Arq. Biol. Technol. 22, 149-153.
- (40) OKADA S., YAMO M. y FUKUMOTO J. (1964)  
J. Ferment. Technol. Assoc. 22, 371-376.
- (41) OKADA S., KISHI K., HIGASHIHARA M.  
y FUKUMOTO J. (1963)  
J. Agric. Chem. Soc. 37, 84-89.
- (42) FISHER J.F., NORDBY H.E. y KEW J.J.  
(1966)  
J. Food Sci. 31, 947-950.

- (43) TATUM J.H. y BERRY R.E. (1973)  
J. Food Sci. 38, 340-341.
- (44) WARD R.S. y PELTER A. (1974)  
J. Chromatogr. Sci. 12, 571-583.
- (45) FISHER J.F. y WHEATON T.A. (1976)  
J. Agric. Food Chem. 24, 898-899.
- (46) FISHER J.F. (1978)  
J. Agric. Food Chem. 26, 1459-1460.
- (47) MICALI G. y CURRO P. (1980)  
Atti-Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat.  
Nat. 26, 269-278.
- (48) TRIFIRO A., BIGLIARIDI D., SHERARDI  
S. y BAZZARINI R. (1980)  
Industria Conserve 55, 194-197.
- (49) DAIGLE D.J. y CONKERTON E.J. (1982)  
J. Chromatogr. 240, 202-205.
- (50) VAN DE CASTEELE K., GEIGER H. y VAN  
SUMERE C.F. (1982)  
J. Chromatogr. 240, 81-94.

- (51) DAIGLE D.J. y CONKERTON E.J. (1983)  
J. Liquid Chromatogr. 6, 105-118.
- (52) PARK G.L., AVERY S.M., BYERS J.L.  
y NELSON D.B. (1983)  
Food Technol. 12, 98-105.
- (53) TING S.V., ROUSEFF R.L., DOUGHERTY  
M.H. y ATTAWAY J.A. (1979)  
J. Food Sci. 44, 69-73.
- (54) VIETH W.R. y VENKATASUBRAMANIAN, K.  
(1973)  
Chemtech 11, 677-683.
- (55) GOLDSTEIN L., LIFSHITZ A. y SOKOLOVSKY M.  
(1971)  
Int. J. Biochem. 2, 448-456.
- (56) DINELLI D. y MORISI F. (1972)  
Ital. Pat. Applic. 20545
- (57) KRASNOBAEV V. (1973)  
Germ. Pat. 2, 247, 022.

- (58) KRASNOBAEV V. (1974)  
Germ. Pat. 2, 233, 834.
- (59) GHANDLER B.V. y JOHNSON R.L. (1974)  
Aust. Prov. Pat. Applic. PB 6670
- (60) GRAY G.M. y OLSON A.C. (1981)  
J. Agric. Food Chem. 29, 1298-1301.
- (61) WEISZ P.B. (1973)  
Science, 179, 433-440.
- (62) LEVICH V.G. (1962)  
en "Physicochemical Hydrodynamics",  
Prentice Hall, Englewood Cliffs, New  
Yersey, 39-138.
- (63) McLAREN A.D. y PACKER L. (1970)  
Adv. Enzymol. 33, 245-308.
- (64) GOLDSTEIN L. (1976)  
en "Methods in Enzymology", (Mosback  
K., ed.), Academic Press, New York,  
vol. 44, 397-443.

- (65) ENGASSER J.M. y HORVATH C. (1976)  
en "Applied Biochemistry and Bioengineering" (Wingard L.B.; Katchalski E. and Goldstein L., eds), Academic Press, New York, vol. 1, 127-220.
- (66) MESSING R.A. (1975)  
en "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors", (Messing R.A. ed.), Academic Press, New York.
- (67) WINGARD L.B., BEREZIN J.V. y KLYOSOV A.A. (1980)  
en "Enzyme Engineering" (Wingard L.B., Berezin I.V. and Klyosov A.A., eds.), Plenum Publishing Corp., New York.
- (68) BUNOW B. (1980)  
J. Theor. Biol., 84, 611-627.
- (69) SHYMKO R.M. y GLASS L., (1976)  
J. Theor. Biol., (1976), 63, 355-374.
- (70) GONDO S., ISAYAMA S. y KUSUNOKI K., (1975)  
Biotechnol. Bioeng., 17, 423-431.

- (71) FROVWS M.J., VELLENGA K. y DE WILT H.G.J. (1976)  
Biotechnol. Bioeng., 18, 53-62.
- (72) BUNTING P.S. y LAIDLER K.J. (1972)  
Biochemistry, 11, 4477-4483.
- (73) GOLDMAN R., KEDEM O., SILMON J.H.,  
CAPLAN S.R. y KATCHALSKI E. (1968)  
Biochemistry, 7, 486-500.
- (74) LEE Y.Y., TSAO G.T. (1974)  
J. Food Sci., 39, 667-672.
- (75) AXEN R., MYRIN P.A. y JANSSON J.C.  
(1970)  
Biopolymers, 7, 486-500.
- (76) KOBAYASHI T. y LAIDLER K.J. (1973)  
Biochim. Biophys. Acta, 1, 302-311.
- (77) ENGASSER J.M. y HORVATH C. (1973)  
J. Theor. Biol., 42, 137-155.
- (78) HAMILTON B.K., GARDNER C.R. y COLTON  
C.K. (1974)  
A.I.Ch.E. J. 20, 503-510.

- (79) ENGASSER J.M. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta, 526, 301-310.
- (80) DE SIMONE J.A. y CAPLAN S.R. (1973)  
Biochemistry, 12, 3032-3040.
- (81) LEE G.K., LESCH R.A. y REILLY P.J.  
(1981)  
Biotechnol. Bioeng. 23, 487-497.
- (82) SATTERFIELD C.N. (1970)  
en "Mass Transfer in Heterogenous Cataly-  
sis", M.I.T. Press, Cambridge. Mass.  
U.S.A.
- (83) VIETH W.R., MENDIRATTA A.K., MOGENSEN  
A.O., SAINI R. y VENKATASUBRAMANIAN  
K. (1973)  
Chem. Eng. Sci., 28, 1013-1020.
- (84) MOO-YOUNG M. y KOBAYASHI T. (1972)  
Can. J. Chem. Eng., 50, 162-167.
- (85) FINK D.J., NA T.Y. y SCHULTZ J.S. (1973)  
Biotechnol. Bioeng., 15, 879-888.

- (86) MARSH D., LEE Y.K. y TSAO G.T. (1973)  
Biotechnol. Bioeng. 15, 483-492.
- (87) DOSCHER M.S. y RICHARDS F.M. (1963)  
J. Biol. Chem., 238, 2399-2406
- (88) SLUYTERMAN L.A.A. y DE GRAAG M.J.M.  
(1969)  
Biochim. Biophys. Acta, 171, 277-288.
- (89) SUNDARAM P.V., TWEEDALE H. y LAIDLER  
K.J. (1970)  
Can. J. Chem. Eng. 48, 1498-1504.
- (90) RONY P.R. (1971)  
Biotechnol. Bioeng., 13, 431-447.
- (91) BLAEDEL W.J., KISSEL T.R. y BOGUSLASKI  
R.C., (1972)  
Anal. Chem., 44, 2030-2307.
- (92) BLUM J.J. (1956)  
Biochim. Biphys. Acta, 21, 155-166.
- (93) THOMAS D., BROWN G. y SELEGNY E. (1972)  
Biochimie, 54, 229-244.

- (94) HORVATH C. y ENGASSER J.M. (1973)  
Ind. Eng. Chem. Fundam. 12, 229-235.
- (95) ROBERTS G.W. y SATTERFIELD C.N. (1965)  
Ind. Eng. Chem. Fundam., 4, 288-293.
- (96) GOLDMAN R., KEDEM O. y KATCHALSKI E.  
(1968)  
Biochemistry, 7, 4518-4531.
- (97) MAXHAM J.V. y HICKMAN H.J. (1974)  
J. Theor. Biol., 43, 229-235.
- (98) GUISAN J.M., MELO F.V. y BALLESTEROS  
A. (1981)  
Appl. Biochem. Biotechnol., 6, 37-  
51.
- (99) LEE D.D., LEE G.K., REILLY P.J. y LEE  
Y.Y., (1980)  
Biotechnol. Bioeng., 22, 1-17.
- (100) ENGASSER J.M. y HORVATH C. (1974)  
Biochemistry, 13, 3849-3854

- (101) RAMACHANDRAN P.A. (1975)  
Biotechnol. Bioeng., 17, 211-226.
- (102) ENGASSER J.M. y HORVATH C. (1974)  
Biochemistry, 13, 3855-3859.
- (103) MARC A. y ENGASSER J.M. (1982)  
J. Theor. Biol., 94, 179-189.
- (104) LEE S.B., KIM S.M. y RYV D.D.Y.  
(1979)  
Biotechnol. Bioeng., 21, 2023-2043.
- (105) BOERSMA J.G., VELLENGA K. y DE WILT  
H.G.J. (1979)  
Biotechnol. Bioeng., 21, 1711-1724.
- (106) SMITH N.L. y AMUNDSEN N.R., (1951)  
Ind. Eng. Chem., 43, 2156 - 2163.
- (107) KAO H.S.P. y SATTERFIELD C.N. (1968)  
Ind. Eng. Chem. Fundam., 7, 664-670.
- (108) GRULKE E.A., OKOS M.R. y SYVERSON  
A. (1977)  
J. Food Process Eng., 1, 351-372.

- (109) LEWIS W.E. y PAYNTER J.D. (1971)  
Chem. Eng. Sci., 26, 1357-1360.
- (110) O'NEILL S.P. (1972 a)  
Rev. Pure Appl. Chem. 22, 133-145.
- (111) REGAN D.L., LILLY M.D. y DUNNILL P.  
(1974)  
Biotechnol. Bioeng. 16, 1081-1093.
- (112) WARBURTON D., DUNNILL P. y LILLY M.D.  
(1973)  
Biotechnol. Bioeng. 15, 13-20.
- (113) SMILEY K.L. (1971)  
Biotechnol. Bioeng. 13, 309 - 315
- (114) O'NEILL S.P. (1971)  
Biotechnol. Bioeng., 13, 493-502.
- (115) WEETAL H.H. y HAVEWALA N.B. (1972)  
Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3,  
221-235.

- (116) RYU D.Y., BRUNO C.F., LEE B.K. y VENKATA-SUBRAMANIAN, K. (1972)  
Proc. Int. Ferment. Symp., 4 th, Ferment. Technol. Today, 307-318.
- (117) DUTTA R., ARMINGER W. y OLLIS D. (1973)  
Biotechnol. Bioeng., 15, 993-998.
- (118) LEVENSPIEL O., (1979)  
en "The Chemical Reactor Omnibook",  
Oregon State University. Corvallis. Oregon.  
USA.
- (119) WEETAL H.H. (1971)  
Res. Dev., 22, 18-25.
- (120) WEETAL H.H. (1973)  
Food. Prod. Dev., 1, 46-55.
- (121) WEETAL H.H., HAVEWALA N.B., PITCHER  
W.H. Jr., DETAR C.C., VANM W.P. y  
YAVERBAUM S. (1974 a)  
Biotechnol. Bioeng. 16, 689-701.
- (122) WEIBEL M.K. y BRIGHT H.J. (1971)  
Biochem. J., 124, 801-807.

- (123) BACHLER M.J., STRANDBERG G.W. y SMILEY K.L. (1970)  
Biotechnol. Bioeng., 12, 85-92.
- (124) SAMPSON D., HERSH L.S., COONEY D. MURPHY G.P. (1972)  
Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs., 18, 54-60.
- (125) GOLDBERG S. (1974)  
M.S. Thesis, Dep. Chem. Biochem. Eng., Rutgers Univ., New Brunswick, New Jersey.
- (126) SAINI R. y VIETH W.R. (1975)  
J. Appl. Chem. Biotechnol., 25, 115-120.
- (127) KOBAYASHI T. y MOO-YOUNG M. (1971)  
Biotechnol. Bioeng. 13, 893-910.
- (128) VIETH W.R. y VENKATASUBRAMANIAN K. (1974 c)  
Chemtech, 4 (7), 434-442.
- (129) O'NEILL S.P., LILLY M.D. y ROWE P.N. (1971 c)  
Chem. Eng. Sci., 26, 173-180.

- (130) LILLY M.D. y DUNNILL P. (1972)  
Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 3, 221-227.
- (131) VIETH W.R., VENKATASUBRAMANIAN K.,  
CONSTANTINIDES A. y DAVIDSON B. (1976)  
en "Applied Biochemistry and Bioenginee-  
ring" (Wingard, L.B., Katchalski,  
E. y Goldstein, L. eds.), Academic  
Press, New York, vol. 1, 221-327.
- (132) HORNBY W.E., LILLY M.D. y CROOK E.M.  
(1966)  
Biochem. J., 98, 420-425.
- (133) SHARP A.K. KAY G. y LILLY M.D. (1969)  
Biotechnol. Bioeng., 11, 363-369.
- (134) O'NEILL S.P., WYKES J.R., DUNNILL  
P. y LILLY M.D. (1971 a)  
Biotechnol. Bioeng. 13, 319-330.
- (135) VIETH W.R., WANG S.S., BERNATH F.R.  
y MOGENSEN A.O. (1972 c)  
en "Recent Developments in Separation  
Science" (Li, N.N. ed.), Chem. Rubber  
Publ. Co., Cleveland, Ohio, vol. 1,  
175-201.

- (136) KOBAYASHI T. y MOO-YOUNG M. (1973)  
Biotechnol. Bioeng., 15, 47-54.
- (137) CONSTANTINIDES A., VIETH W.R. y FERNANDES  
P. (1973)  
Mol. Cell. Biochem., 1, 127-135.
- (138) VENKATASUBRAMANIAN K., VIETH W.R. y BERNATH  
F.R. (1974 b)  
en "Enzyme Engineering", (Pye E.K., Wingard  
L.B.Jr., eds.), Plenum Press, New York, vol.  
2, 439-445.
- (139) WILSON R.J.H., KAY G. y LILLY M.D. (1968)  
Biochem. J., 108, 845-856.
- (140) HORNBY W.E., LILLY M.D. y CROOK E.M. (1968)  
Biochem J., 107, 669-705.
- (141) QUIOCHO F. y RICHARDS F.M. (1966)  
Biochemistry, 5, 4062-4071.
- (142) TOSA T., MORI T., FUSE N. y CHIBATA I.  
(1967)  
Enzymologia, 32, 153-162.
- (143) KAY G. y LILLY M.D. (1970)  
Biochim. Biophys. Acta, 198, 276-283.

- (144) ROVITO B.J. y KITTRELL J.R. (1973)  
Biotechnol. Bioeng., 15, 143-153.
- (145) PITCHER W.H. Jr. (1975)  
Catal. Rev. Sci. Eng., 12, 37-69.
- (146) MIYAMOTO K., FUJII Y., YAMAOKI N.  
OKAZAKI M. y MIURA Y. (1973)  
J. Ferment. Technol., 51, 566 -573.
- (147) WANG D.I.C., COONEY CH.L., DEMAIN  
A.L., DUNNILL P., HUMPHREY A.E. y  
LILLY M.D. (1979)  
en "Fermentation and Enzyme Technology"  
(J. Wiley ed.) Wiley Interscience  
Pub., New York, 339-365.
- (148) BUNTING P.S. y LAIDLER K.J. (1974)  
Biotechnol. Bioeng., 16, 119-127.
- (149) DAVIDSON B., VIETH W.R., WANG S.S.,  
ZWIEBEL, S. y GILMORE R. (1974)  
A.I.Ch.E. Symp. Ser., 144, 70-78.
- (150) TOSA T., MORI T. y CHIBATA I. (1971)  
J. Ferment. Technol., 49, 522-530.

- (151) MUKHERJEA R.N., BHATTACHARYA P., GHOSH B.K. y TARAPHDAR D.K. (1977)  
Biotechnol. Bioeng., 19, 1259-1269.
- (152) SATO T., MORI T., TOSA T., CHIBATA I., FURUI M., YAMASHITA K. y SUMI I. (1975)  
Biotechnol. Bioeng. 17, 1797-1802.
- (153) HARTREE E. (1972)  
Anal. Biochem. 48, 422-427.
- (154) LOWRY O.H., ROSEBROVGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)  
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- (155) MAJON A., LLORCA F.J., BONETE M.J., BASTIDA J., IBORRA J.L. (1985)  
Process Biochem., 2, 17-22.
- (156) SRERE P.A. y UYEDA K. (1976)  
Methods in Enzymology 44, 11-19.
- (157) PIERCE GENERAL CATALOG. (1977)  
Rockford (Illinois) 273-304.

- (158) EADIE G.S., BERNHEIM F. y BERNHEIM M.L.C. (1949)  
J. Biol. Chem. 181, 449-452.
- (159) HOFSTEE B.H.J. (1954)  
J. Biol. Chem. 207, 219-221.
- (160) DIXON M. y WEBB, E.C. (1979)  
en "Enzymes". Longman Group Ltd.,  
London. 332-380.
- (161) CHANG H.N. (1982)  
A.I.Ch.E. J. 28, 6, 1030-1032.
- (162) BRETSZNAJDER S. (1971)  
en "Prediction of Transport and other  
Physical Properties of Fluids" (P.V.  
Danckwerts ed.) Pergamon Press. Oxford.  
358-399.
- (163) LILEY, P.E. y GAMBILL, W.R. (1973)  
en "Chemical Engineer's Handbook"  
(Perry, R.H. y Chilton C.H. eds.),  
McGraw-Hill Book Co. New York. 3,  
234-235.

9.- NOMENCLATURA

## 9.- NOMENCLATURA

$C_P$  -- Concentración local del producto P en la partícula esférica.

$C_{P0}$  -- Concentración local del producto P en  $r = 0$ .

$C_{PR}$  -- Concentración local del producto P en  $r = R$ .

$C_Q$  -- Concentración local del producto Q en la partícula esférica.

$C_R$  -- Cociente entre las concentraciones de producto y sustrato en  $r = R$ .

$C_S$  -- Concentración local de sustrato en la partícula esférica.

$C_{S0}$  -- Concentración local de sustrato en  $r = 0$ .

$C_{SR}$  -- Concentración local de sustrato en  $r = R$ .

- $C_{SRO}$  -- Concentración de sustrato a la entrada del reactor.
- $D$  -- Diámetro del reactor tubular.
- Dif -- Relación  $D_S/D_P$ .
- $D_P$  -- Difusividad efectiva de un producto en el interior de la partícula esférica.
- $D_S$  -- Difusividad efectiva del sustrato en el interior de la partícula esférica.
- $E$  -- Error máximo permitido en el cálculo del factor de eficacia.
- $F$  -- Caudal de alimentación al reactor.
- $j_P$  -- Coeficiente estequiométrico del producto.
- $KE$  -- Inversa de la constante de equilibrio.
- $K_{eq}$  -- Constante de equilibrio de la reacción enzimática.
- $K_M$  -- Constante de Michaelis aparente.
- $K_M'$  -- Constante de Michaelis intrínseca.
- $K_P$  -- Constante de inhibición del producto P.
- $K_Q$  -- Constante de inhibición del producto Q.

- L -- Coordenada axial en el reactor.
- $L_0$  -- Longitud total del reactor tubular.
- P -- Concentración adimensional del producto P en el interior de la partícula catalítica  
 $= C_P / C_{SR}$ .
- $P_0$  -- Concentración adimensional del producto P en  $r = 0$ .
- r -- Coordenada radial en la partícula esférica
- R -- Radio de la partícula esférica.
- S -- Concentración adimensional de sustrato en el interior de la partícula esférica  
 $= C_S / C_{SR}$ .
- $S_0$  -- Concentración adimensional de sustrato en  $r = 0$ .
- v -- Velocidad adimensional de reacción.
- $\langle v \rangle_{part}$  -- Velocidad media adimensional de reacción
- $v_{sup}$  -- Velocidad adimensional de reacción en ausencia de limitaciones difusionales.
- $V_{MAX}$  -- Velocidad máxima de reacción aparente.
- $V'_{MAX}$  -- Velocidad máxima de reacción intrínseca.

- $V_M'$  -- Velocidad máxima intrínseca por unidad de volumen de la partícula catalítica.
- $V_R$  -- Volumen total del reactor.
- $V_S$  -- Velocidad de reacción del sustrato.
- $\langle V_S \rangle_{part}$  -- Velocidad media de la reacción enzimática por unidad de volumen de partícula catalítica.
- $V_{sup}$  -- Velocidad de reacción enzimática por unidad de volumen de partícula catalítica, en ausencia de limitaciones difusionales.
- $X$  -- Grado de conversión del sustrato, definido por la ecuación 36.
- $X_E$  -- Conversión de equilibrio.
- $Y$  -- Variable auxiliar definida en la ecuación 25.

### Símbolos Griegos

- $\alpha$  -- Parámetro adimensional definido por la ecuación 38.
- $\beta$  -- Módulo adimensional de concentración definido por la ecuación 21.
- $\beta_0$  -- Módulo en las condiciones de entrada al reactor, definido por la ecuación 38.
- $\gamma$  -- Módulo adimensional de reversibilidad definido por la ecuación 22.
- $\epsilon$  -- Porosidad del lecho, definida como el cociente entre el volumen de huecos y el volumen total de catalizador.
- $\eta$  -- Factor de eficacia, definido por la ecuación 13.
- $\eta_0$  -- Factor de eficacia en las condiciones de entrada al reactor.

- $\theta$  -- Módulo adimensional de tiempo definido por la ecuación 44.
- $\lambda$  -- Longitud adimensional del reactor, definida por la ecuación 39.
- $\rho$  -- Radio adimensional de la partícula esférica.
- $\tau$  -- Tiempo de residencia en el reactor, definido por la ecuación 41.
- $\phi_P$  -- Módulo adimensional de difusión definido por la ecuación 8.
- $\phi_S$  -- Módulo adimensional de difusión definido por la ecuación 7.
- $\phi'_S$  -- Módulo adimensional de difusión definido por la ecuación 24.
- $\phi'_{S0}$  -- Módulo  $\phi'_S$  en las condiciones de entrada al reactor.

10.- APENDICES

I.- Algoritmo para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales por el método de Runge-Kutta

I.- Algoritmo para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales por el método de Runge-Kutta

El procedimiento de Runge-Kutta puede emplearse, además de para la resolución de ecuaciones diferenciales de primer orden, para resolver, de forma aproximada, sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias. La evaluación efectiva de los errores en este procedimiento, es difícil. Por consiguiente, en la práctica, para la elección correcta de la anchura de paso  $h$  (en el presente caso, el incremento del radio adimensional), normalmente, se repite el cálculo después de dos pasos con una anchura de paso mitad. Si las diferencias entre los valores así averiguados se encuentran dentro del error permitido, quiere decir que se ha elegido correctamente la anchura de paso para este intervalo. En caso contrario, se divide de nuevo por dos la anchura de paso y se repiten las operaciones. Esta posibilidad de modificar la anchura de paso en el transcurso del cálculo, es una ventaja grande frente a otros procedimientos. Debido a esto y a consecuen-

cia de la exactitud relativamente elevada de la solución de aproximación, se emplea mucho en la práctica.

El algoritmo de cálculo para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales por el método de Runge-Kutta, se muestra en la Tabla I. Los valores de las variables que se encuentran en dicha Tabla, se pueden obtener, para cada subintervalo, a partir de las siguientes ecuaciones auxiliares:

$$\rho_1^{(n)} = \rho_4^{(n-1)}$$

$$\rho_2^{(n)} = \rho_1^{(n)} + \frac{\Delta \rho}{2}$$

$$\rho_3^{(n)} = \rho_1^{(n)} + \frac{\Delta \rho}{2}$$

$$\rho_4^{(n)} = \rho_1^{(n)} + \Delta \rho$$

$$S_1^{(n)} = S_F^{(n-1)}$$

$$S_2^{(n)} = S_1^{(n)} + \frac{1}{2} A_1^{(n)}$$

$$S_3^{(n)} = S_1^{(n)} + \frac{1}{2} A_2^{(n)}$$

$$S_4^{(n)} = S_1^{(n)} + A_3^{(n)}$$

$$S_F^{(n)} = S_1^{(n)} + \Delta S_T^{(n)}$$

$$Y_1^{(n)} = Y_F^{(n-1)}$$

$$Y_2^{(n)} = Y_1^{(n)} + \frac{1}{2} B_1^{(n)}$$

$$Y_3^{(n)} = Y_1^{(n)} + \frac{1}{2} B_2^{(n)}$$

$$Y_4^{(n)} = Y_1^{(n)} + B_3^{(n)}$$

$$Y_F^{(n)} = Y_1^{(n)} + \Delta Y_T^{(n)}$$

$$\left( \frac{dS}{d\rho} \right)_i^{(n)} = \frac{Y_i^{(n)}}{[\rho_i^{(n)}]^2}$$

(i = 1, 2, 3, 4)

$$\left( \frac{dY}{d\rho} \right)_i^{(n)} = \phi_S' \frac{S_i^{(n)} - \gamma}{\beta + S_i^{(n)}} [\rho_i^{(n)}]^2$$

(i = 1, 2, 3, 4)

$$A_i^{(n)} = \Delta \rho \left( \frac{dS}{d\rho} \right)_i^{(n)}$$

(i = 1, 2, 3, 4)

$$B_i^{(n)} = \Delta \rho \left( \frac{dY}{d\rho} \right)_i^{(n)}$$

(i = 1, 2, 3, 4)

$$S_1^{(n)} = A_1^{(n)}$$

$$S_2^{(n)} = 2 A_2^{(n)}$$

$$S_3^{(n)} = 2 A_3^{(n)}$$

$$S_4^{(n)} = A_4^{(n)}$$

$$Y_1^{(n)} = B_1^{(n)}$$

$$Y_2^{(n)} = 2 B_2^{(n)}$$

$$Y_3^{(n)} = 2 B_3^{(n)}$$

$$Y_4^{(n)} = B_4^{(n)}$$

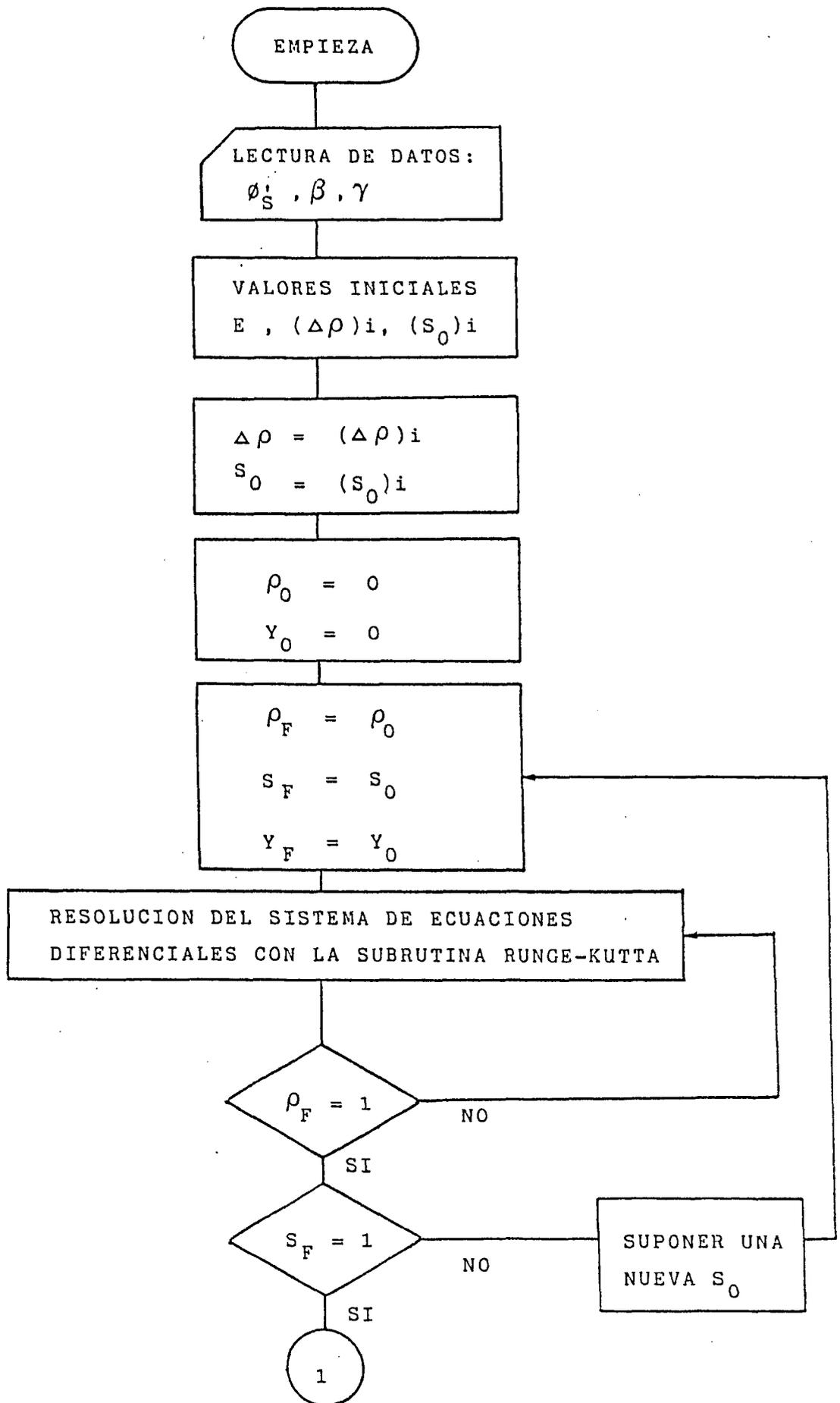


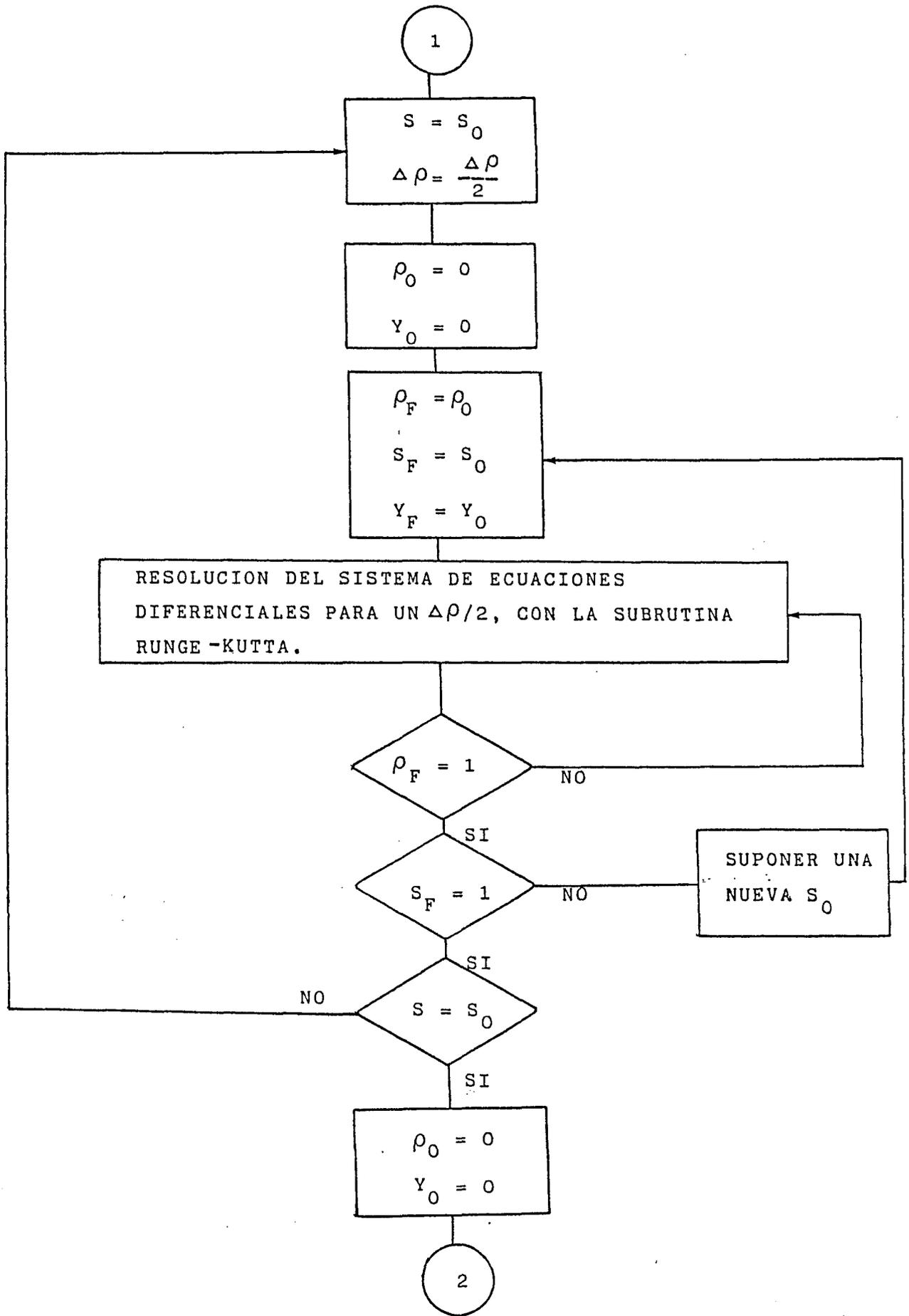
II.- Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención del perfil de concentraciones adimensionales y el factor de eficacia

II.- Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención del perfil de concentraciones adimensionales y el factor de eficacia

En el presente Apéndice se muestra el diagrama de flujo correspondiente al programa de ordenador utilizado para la obtención de los perfiles adimensionales de concentración en la partícula esférica de catalizador y del factor de eficacia. Asimismo, se encuentra el organigrama que corresponde a la subrutina de Runge-Kutta para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales planteado.

Las ecuaciones a usar en el cálculo de  $\rho_i$ ,  $(dS / d\rho)_i$ ,  $(dY / d\rho)_i$ ,  $A_i$ ,  $B_i$  (para  $i=1,2,3$  y  $4$ ),  $\Delta S_T$  e  $\Delta Y_T$  que se encuentran en los citados diagramas de flujo, están resumidas en el Apéndice I.





2

$$\rho_F = \rho_0$$

$$S_F = S_0$$

$$Y_F = Y_0$$

$$SU = 0$$

RESOLUCION DEL SISTEMA DE ECUACIONES  
DIFERENCIALES PARA UN  $\Delta\rho/2$ , CON LA SUBROUTINA  
RUNGE-KUTTA.

$$SU = SU + \left[ (v_i \cdot \rho_i^2) + (v_F \cdot \rho_F^2) \right] \frac{\Delta\rho}{2}$$

ESCRITURA  
RESULTADOS  
INICIALES  
 $S_i, v_i, \rho_i$

$\rho_F = 1$

NO

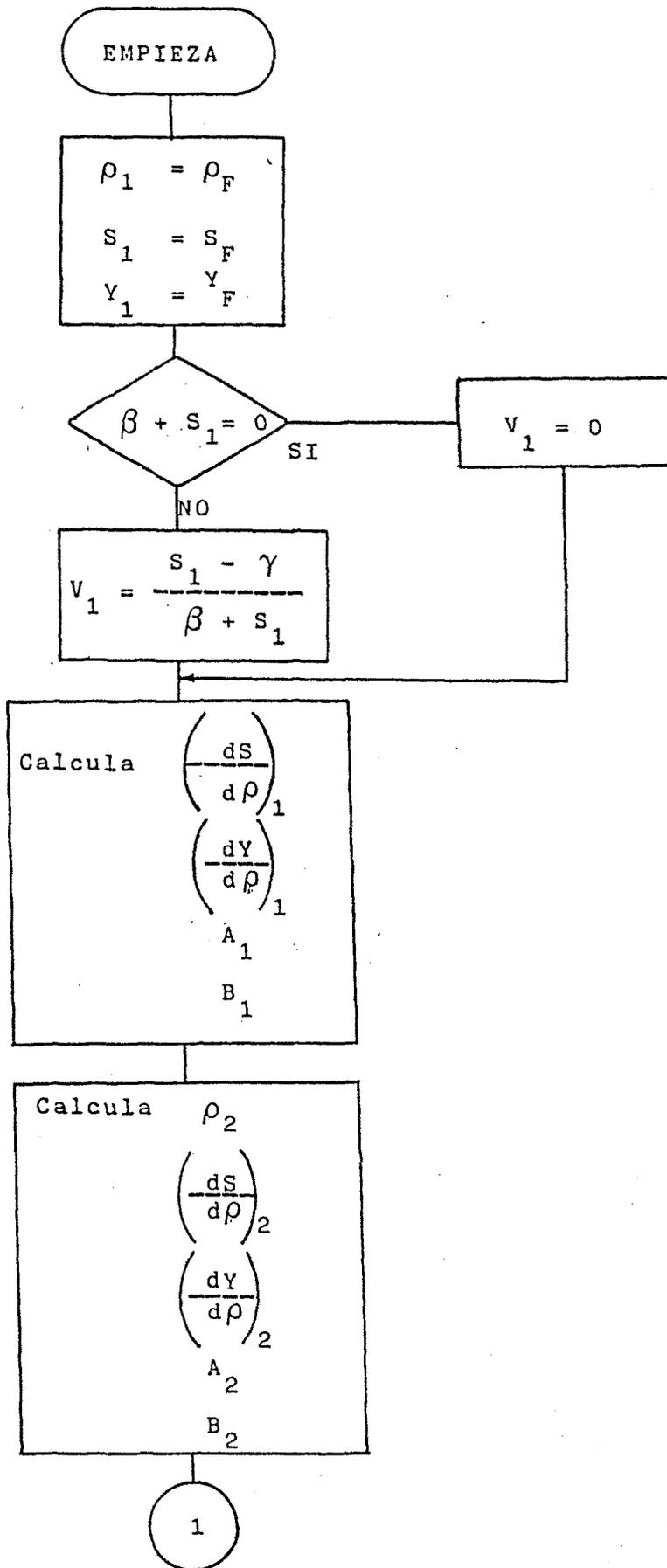
SI

$$\eta = \frac{3(\beta + 1)SU}{1 - \gamma}$$

ESCRITURA  
RESULTADOS  
FINALES  
 $S_F, v_F, \rho_F,$   
 $\eta.$

FIN

Subrutina Runge-Kutta



1

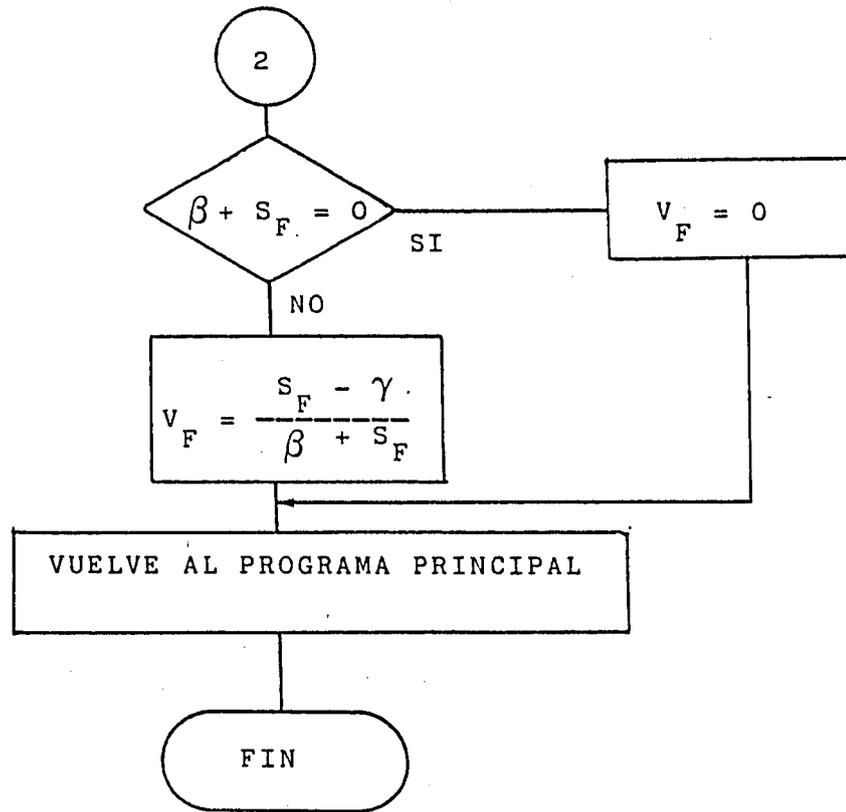
Calcula  $\rho_3$   
 $\left(\frac{dS}{d\rho}\right)_3$   
 $\left(\frac{dY}{d\rho}\right)_3$   
 $A_3$   
 $B_3$

Calcula  $\rho_4$   
 $\left(\frac{dS}{d\rho}\right)_4$   
 $\left(\frac{dY}{d\rho}\right)_4$   
 $A_4$   
 $B_4$

Calcula  $\Delta S_T$   
 $\Delta Y_T$

$\rho_F = \rho_1 + \Delta\rho$   
 $Y_F = Y_1 + \Delta Y_T$   
 $S_F = S_1 + \Delta S_T$

2



III.- Algoritmo para la resolución de  
la ecuación de diseño del reac-  
tor por el método de Runge-Kutta

III.- Algoritmo para la resolución de la ecuación de diseño del reactor por el método de Runge-Kutta

El algoritmo de cálculo para la resolución de la ecuación diferencial de diseño del reactor tubular utilizando el método de Runge-Kutta, se encuentra resumido en la Tabla II. Los valores para cada una de las variables que se muestran en dicha tabla, se pueden obtener fácilmente, haciendo uso de las siguientes ecuaciones auxiliares:

$$\lambda_1^{(n)} = \lambda_4^{(n-1)}$$

$$\lambda_2^{(n)} = \lambda_1^{(n)} + \frac{1}{2} \Delta \lambda$$

$$\lambda_3^{(n)} = \lambda_1^{(n)} + \frac{1}{2} \Delta \lambda$$

$$\lambda_4^{(n)} = \lambda_1^{(n)} + \Delta \lambda$$

$$X_1^{(n)} = X_1^{(0)} + \Delta X_T^{(n-1)}$$

$$X_2^{(n)} = X_1^{(n)} + \frac{1}{2} K_1^{(n)}$$

$$X_3^{(n)} = X_1^{(n)} + \frac{1}{2} K_2^{(n)}$$

$$X_4^{(n)} = X_1^{(n)} + K_3^{(n)}$$

$$\Delta X_1^{(n)} = K_1^{(n)}$$

$$\Delta X_2^{(n)} = 2 K_2^{(n)}$$

$$\Delta X_3^{(n)} = 2 K_3^{(n)}$$

$$\Delta X_4^{(n)} = K_4^{(n)}$$

$$K_i^{(n)} = \theta \eta X_i^{(n)} \frac{1 - X_i^{(n)} (1 + KE)}{1 + \beta_0 - X_i^{(n)} (1 - \alpha)} \Delta \lambda$$

(i = 1, 2, 3, 4)

Tabla II.- Algoritmo de cálculo para la resolución de la ecuación diferencial de diseño del reactor tubular por el método de Runge-Kutta.

Subinter- valo	$\lambda$	X	K	$\Delta X$
n	$\lambda_1^{(n)}$	$X_1^{(n)}$	$K_1^{(n)}$	$\Delta X_1^{(n)}$
	$\lambda_2^{(n)}$	$X_2^{(n)}$	$K_2^{(n)}$	$\Delta X_2^{(n)}$
	$\lambda_3^{(n)}$	$X_3^{(n)}$	$K_3^{(n)}$	$\Delta X_3^{(n)}$
	$\lambda_4^{(n)}$	$X_4^{(n)}$	$K_4^{(n)}$	$\Delta X_4^{(n)}$
	$\Delta X_T^{(n)} = \frac{1}{6} \sum \Delta X_i^{(n)}$			

IV.- Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención de los perfiles axiales de conversión en el reactor tubular de lecho fijo

IV.- Diagrama de flujo del programa de ordenador para la obtención de los perfiles axiales de conversión en el reactor tubular de lecho fijo

En este Apéndice, se refleja el diagrama de flujo correspondiente al programa de ordenador que proporciona los perfiles axiales de conversión en un reactor tubular de lecho fijo para sistemas de enzimas inmovilizadas en partículas esféricas porosas. Dicho programa, utiliza como subrutina el programa para la obtención del factor de eficacia, cuyo diagrama de flujo se muestra en el Apéndice II.

Las ecuaciones necesarias para calcular  $K_i$ ,  $\Delta X_i$ ,  $\lambda_i$  y  $X_i$  (para  $i = 1, 2, 3, 4$ ), se encuentran especificadas en el Apéndice III