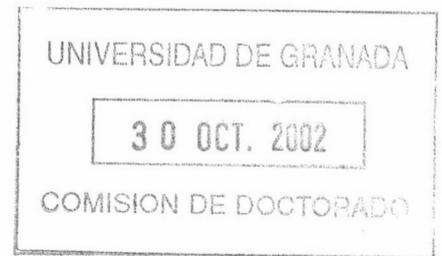


T 3/41

UNIVERSIDAD DE GRANADA

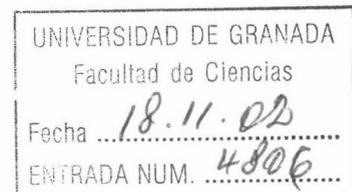
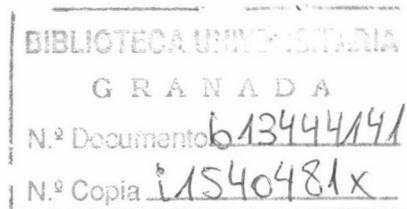
FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE LACTOSA MEDIANTE UN REACTOR DE FIBRA HUECA



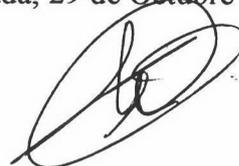
JOSÉ MARÍA VICARIA RIVILLAS

Granada, 2002

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE LACTOSA MEDIANTE UN
REACTOR DE FIBRA HUECA**

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas)
dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Ingeniería
Química"

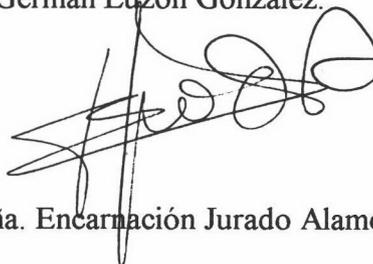
Granada, 29 de Octubre de 2002



Fdo: José María Vicaria Rivillas

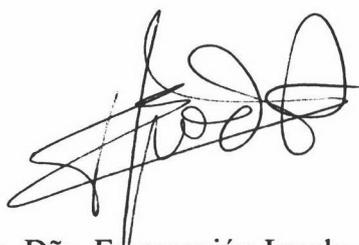
Dña Encarnación Jurado Alameda, Directora del departamento del mismo nombre

CERTIFICA: Que el presente trabajo "Estudio cinético de la hidrólisis de lactosa
mediante un reactor de fibra hueca" ha sido realizado en los laboratorios de este
Departamento por el Licenciado D. José María Vicaria Rivillas bajo la dirección de los
doctores Dña. Encarnación Jurado Alameda y D. Germán Luzón González.

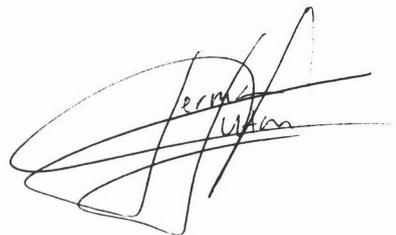


Fdo. Dra. Dña. Encarnación Jurado Alameda

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dra. Dña. Encarnación Jurado Alameda.
Catedrática de Ingeniería Química.



Dr. D. Germán Luzón González
Profesor Titular de Ingeniería Química

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A Dña. Encarnación Jurado Alameda y D. Germán Luzón González por la dirección, consejos, estímulo y gran dedicación realizada durante la elaboración del presente trabajo.

A los miembros del grupo de Bioreactores, y en especial a D. Fernando Camacho Rubio por todos los consejos y dedicación prestada en el desarrollo de la investigación y durante la interpretación de los resultados obtenidos.

A los compañeros del laboratorio de Tecnología Enzimática por la colaboración y ánimo prestado durante la elaboración de este trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, y en definitiva a todos aquellos amigos que dentro y fuera del mismo han contribuido desinteresadamente a que la elaboración de este trabajo fuera posible.



A Consuelo y a mis padres

1 RESUMEN

2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Hidrolizados de lactosa	2.1
2.1.1 Procesos tecnológicos industriales para la obtención de hidrolizados de lactosa	2.4
2.1.2 Diferentes métodos de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de lactosa	2.8
2.2 Producción de jarabes de fructosa-glucosa	2.14
2.3 Bioreactores de membrana	2.18
2.3.1 Ventajas y desventajas de la utilización de reactores de membrana	2.19
2.3.2 Clasificación de los reactores de membrana	2.21
2.3.2.1 Reactores de membrana de contacto directo	2.21
2.3.2.2 Reactores de difusión	2.23
2.3.2.3 Reactores multifase	2.25
2.3.3 Módulos de filtración de fibra hueca: características generales .	2.27
2.3.4 Factores a considerar en la selección de la membrana	2.35
2.4 Antecedentes sobre el mecanismo cinético de la hidrólisis enzimática de lactosa	2.41
2.4.1 Modelo cinético	2.42
2.4.2 Caracterización de la enzima β -galactosidasa	2.44
2.4.3 Actividad y desactivación enzimática	2.46
2.5 Antecedentes sobre el proceso cinético de isomerización enzimática fructosa-glucosa	2.49
2.5.1 Modelo cinético	2.49
2.5.2 Caracterización de la enzima glucosa isomerasa	2.53
2.5.3 Modelos cinéticos propuestos para la isomerización fructosa-glucosa mediante la enzima glucosa isomerasa	2.54

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y productos empleados	3.1
3.1.1 Hidrólisis de lactosa	3.1
3.1.2 Isomerización fructosa glucosa	3.2
3.2 Dispositivos experimentales utilizados en las reacciones enzimáticas	3.3
3.2.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	3.3
3.2.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	3.3
3.2.2.1 Mantenimiento y limpieza del RFHR	3.5
3.2.2.2 Medida de volumen del ECS y del lumen	3.5
3.3 Métodos	3.6
3.3.1 Método de análisis de glucosa (método GOD-POD)	3.6
3.3.2 Ensayo de actividad de β -galactosidasas	3.7
3.3.3 Ensayo de actividad de glucosa isomerasa	3.8
3.3.4 Estabilidad térmica de las enzimas	3.9
3.3.4.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	3.9
3.3.4.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	3.10
3.4 Procedimiento operativo para los ensayos cinéticos	3.10
3.4.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	3.10
3.4.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	3.11
3.5 Puesta a punto del dispositivo experimental de fibra hueca (RFHR)	3.11
3.5.1 Determinación del transporte de glucosa a través de la membrana	3.11
3.5.2 Influencia del caudal del circuito del ECS sobre el comportamiento del RFHR	3.12
3.5.3 Influencia de esfuerzos cortantes del ECS sobre la actividad de la enzima	3.13

4 RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1 Actividad enzimática	4.1
4.1.1 Influencia de la presencia de iones sobre la actividad de las lactasas	4.1

4.1.2	Influencia del pH sobre la actividad de las lactasas	4.5
4.1.3	Influencia de temperatura sobre la actividad de las enzimas	4.6
4.2	Isomerización fructosa-glucosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	4.19
4.3	Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	4.27
4.4	Isomerización fructosa-glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	4.39
4.5	Hidrólisis de lactosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	4.44

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1	Actividad enzimática	5.1
5.1.1	Influencia del pH sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa	5.1
5.1.2	Desactivación térmica de la enzima β -galactosidasa	5.6
5.1.3	Estabilización de la enzima β -galactosidasa en presencia de lactosa	5.14
5.1.4	Actividad de la enzima glucosa isomerasa	5.14
5.2	Isomerización fructosa-glucosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	5.15
5.3	Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)	5.22
5.3.1	Modelo cinético de hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP considerando desactivación enzimática de primer orden	5.22
5.3.2	Modelo cinético de hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP sin existencia de desactivación enzimática alguna	5.23
5.3.3	Modelo cinético propuesto para la hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP	5.31
5.4	Isomerización fructosa glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	5.39
5.4.1	Modelo de reactor de fibra hueca	5.39

5.4.2	Comprobación del modelo cinético	5.41
5.4.3	Comparación de los resultados obtenidos en el RDMP y RFHR	5.42
5.4.4	Modelo cinético en el reactor de fibra hueca	5.45
5.5	Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	5.51
5.5.1	Modelo de reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	5.51
5.5.2	Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR)	5.52
5.5.3	Comparación de los resultados obtenidos en el RDMP y RFHR	5.58
5.5.4	Modelo cinético de hidrólisis de lactosa con adsorción de la enzima libre en la membrana del módulo de ultrafiltración de un RFHR	5.61
5.5.5	Modelo cinético de hidrólisis de lactosa con adsorción del complejo enzima-galactosa EGa en la membrana del módulo de ultrafiltración de un RFHR	5.69
5.6	Comparación de los reactores en su aplicación industrial	5.78
 6 CONCLUSIONES		
 7 NOMENCLATURA		
 8 BIBLIOGRAFÍA		

1. RESUMEN

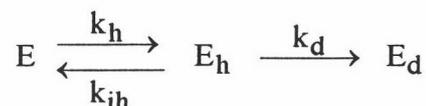
En este trabajo se analiza el estudio cinético de dos reacciones enzimáticas de importancia en la industria alimentaria: la isomerización fructosa-glucosa para producción de jarabes de fructosa y la hidrólisis de lactosa para la fabricación de productos deslactosados.

El estudio cinético de ambas reacciones se llevó a cabo en dos dispositivos experimentales, un reactor discontinuo mezcla perfecta y un reactor de fibra hueca con recirculación. Para la isomerización fructosa-glucosa se ha analizado la influencia que la concentración de fructosa (0.05 a 1.50 M) y la concentración de enzima (2.50 a 7.50 g L⁻¹) tienen sobre esta reacción a la temperatura de 40°C y con un módulo de fibra hueca de membrana fabricada con acetato de celulosa regenerado. Los experimentos de hidrólisis de lactosa llevados a cabo con la enzima Lactozym permiten analizar la influencia que la temperatura (25 a 40°C), concentración de lactosa monohidratada (10 a 75 g L⁻¹), concentración de enzima (0.10 a 3.00 g L⁻¹), módulo de fibra hueca y material de la membrana (acetato de celulosa regenerado y polisulfona) ejercen sobre esta reacción.

Se ha analizado la actividad que dos β -galactosidasas, Lactozym y Maxilact, de origen distinto presentan en un reactor discontinuo mezcla perfecta con diferentes concentraciones de iones, observándose que el comportamiento de ambas es similar. Así mismo se ha analizado la actividad que muestran frente al pH en un rango comprendido entre 6.00 y 7.30. Dos modelos cinéticos han sido planteados para explicar la dependencia de la actividad frente al pH, siendo un modelo que considera la formación de las especies enzimáticas EH_2^{+2} y E^- el que mejor ajusta los datos experimentales obtenidos. Los modelos planteados han sido aplicados satisfactoriamente a resultados planteados por otros autores.

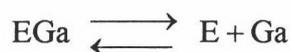
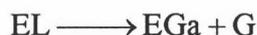
En la enzima Spezyme GI, utilizada en la reacción de isomerización fructosa-glucosa, no se advierte pérdida alguna de actividad en un reactor discontinuo mezcla perfecta en las condiciones experimentales ensayadas (medio de reacción con iones

Mg⁺² y rango de temperaturas comprendido entre 40 y 60°C). Para la hidrólisis de lactosa, la desactivación térmica que ambas enzimas, Lactozym y Maxilact, presentan en dos tampones, uno con iones K⁺ y Mg⁺² y otro con iones Na⁺, ha sido explicada mediante el modelo



que supone tan sólo activa la enzima nativa libre (E), mientras que las especies enzimáticas E_h y E_d no poseen actividad enzimática alguna. Este modelo explica satisfactoriamente los resultados experimentales obtenidos en este trabajo y en los realizados por otros autores.

Para la hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta, se propone un modelo cinético simplificado de inhibición competitiva por galactosa



considerando que el valor de las constantes K_M y K_I es similar. La velocidad de reacción vendría dada por la expresión:

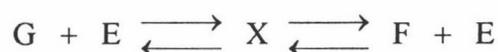
$$r_{HL} = \frac{k e_T L_0 (1-x)}{K_M + L_0 + Ga_0}$$

lo que implica que la lactosa y galactosa ocupan el lugar activo de la enzima con igual probabilidad. Las constantes k e_T y K_M se pueden expresar en función de la temperatura como:

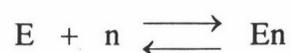
$$k e_T = 2.71 \cdot 10^7 \exp\left(-\frac{5630}{T}\right), \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$K_M = 2.77 \cdot 10^2 \exp\left(-\frac{3200}{T}\right), \text{ M}$$

Para la explicar los datos experimentales obtenidos en la reacción enzimática de isomerización fructosa-glucosa dentro de un reactor discontinuo mezcla perfecta se ha utilizado el modelo



Se ha estudiado esta reacción cinética dentro de un reactor de fibra hueca con recirculación para evitar la presencia de la enzima en el producto final, de forma que ésta pueda ser reutilizada. Los resultados obtenidos en este dispositivo han mostrado una menor conversión que la obtenida para el reactor discontinuo mezcla perfecta. Esta diferencia en el comportamiento de ambos reactores, minimizada a altas concentraciones de sustrato, hace plantear un nuevo modelo que incorpora al equilibrio ya descrito una adsorción reversible de la enzima nativa activa libre sobre la membrana, de la forma



que explica los datos obtenidos satisfactoriamente.

Se ha estudiado la hidrólisis de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación. Al igual que para la reacción de isomerización fructosa-glucosa se obtiene una menor conversión que la producida en un reactor discontinuo mezcla perfecta. Para explicar los resultados experimentales, al igual que en el reactor discontinuo mezcla perfecta, se propone un modelo cinético que considera una inhibición competitiva de la enzima por galactosa en la que este monosacárido y la lactosa poseen igual afinidad por el centro activo de la enzima, planteándose también una adsorción reversible del complejo EGa en la membrana de la forma



La constante de adsorción K_D es función de la temperatura, y para el módulo de fibra hueca utilizado (NT1975) fabricado con membrana de acetato de celulosa regenerada se podría calcular mediante la expresión:

$$K_D = 2.38 \cdot 10^{13} \exp\left(-\frac{9320}{T}\right)$$

Se han comparado los resultados obtenidos tanto para la isomerización fructosa-glucosa como para la hidrólisis de lactosa en diferentes reactores enzimáticos, comprobándose que el reactor de fibra hueca con recirculación puede ser utilizado eficazmente para ambas reacciones. Así para la isomerización fructosa-glucosa se observa que la productividad del sistema se hace mayor a altas concentraciones de sustrato inicial, siendo la efectividad mayor que la obtenida por otros autores en un reactor de lecho fijo con recirculación. Para la hidrólisis de lactosa este dispositivo experimental se hace especialmente idóneo a bajas temperaturas y concentraciones de sustrato.



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Hidrolizados de lactosa.

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche y del lactosuero, líquido que resulta de la separación de la caseína y grasa de la leche en el proceso de elaboración del queso. La composición media del lactosuero es variable dependiendo del proceso de fabricación en el que se origina, bien la coagulación del queso por acidificación (lactosueros ácidos) o por acción del cuajo (lactosueros dulces). En la **Tabla 2.1** y **Figura 2.1** puede observarse la composición media del lactosuero y extracto séco respectivamente.

La hidrólisis de lactosa es un proceso biotecnológico de gran importancia en la industria alimentaria debido a los efectos beneficiosos que puede producir sobre la asimilación de alimentos y a las ventajas tecnológicas y medioambientales que de su aplicación industrial pueden derivarse, entre las que podemos destacar:

Tabla 2.1 – Composición media del lactosuero.

Componente	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Agua	93-94 %	94-95 %
Extracto seco	6-7 %	5-6 %
Lactosa	4.5-5 %	3.8-4.2 %
Ácido láctico	0.1 %	0.8 %
Minerales (cenizas)	0.5-0.7 %	0.7-0.8 %
Grasas	0.3-0.5 %	0.3-0.6 %
Proteínas	0.8-1 %	0.8-1 %
Ácido cítrico	0.1 %	0.1 %
pH	6.45	5

- 1) Una parte importante de la población mundial posee un déficit o baja actividad de la lactasa intestinal que le impide asimilar la lactosa existente en distintos alimentos, entre ellos la leche. Esta deficiencia se puede clasificar en déficit primario (producido en lactantes prematuros, en adultos debido a su procedencia

étnica o por factores hereditarios) o déficit secundario (déficit temporal debido a daños producidos sobre la flora bacteriana del intestino debido a enfermedades gastrointestinales).

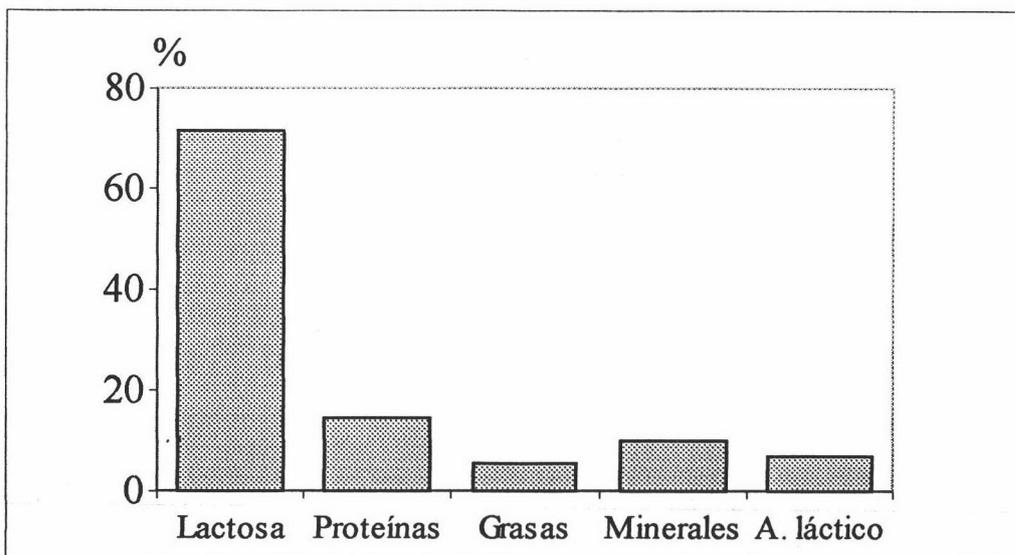


Figura 2.1- Composición media de la materia seca del lactosuero.

Esta patología conlleva una serie de efectos perjudiciales:

- a) Dolor abdominal y producción de diarreas en el individuo intolerante debido a la fermentación anómala de la lactosa en el intestino y al aumento de disacáridos en la luz intestinal.
- b) Incapacidad de utilizar la lactosa como fuente de energía.
- c) Disminución de la absorción del calcio y magnesio.

La población afectada por este tipo de dolencia depende en gran medida del grupo étnico que nos ocupe (Tabla 2.2).

2) La formación de galacto-oligosacáridos durante la hidrólisis de la lactosa

Grupo poblacional	Población con malabsorción
Árabes, griegos, chinos, coreanos, afroamericanos, australianos	60-100 %
Europeos occidentales	2-30 %

confiere a los alimentos propiedades beneficiosas ya que estos compuestos favorecen el cultivo de la microflora bacteriana intestinal humana (Shin y col.(1998), Mahoney (1998b)).

3) Las ventajas que la hidrólisis de lactosa produce sobre el uso del suero lacteo vienen indicadas por gran número de autores (**Ryder (1989), Zadow (1992), González Siso (1996), Gist-Brocades**):

- a) Aumento de la solubilidad, debido a que la glucosa y galactosa tienen mayor solubilidad, evitándose la cristalización de la lactosa en productos concentrados y por tanto una textura arenosa en productos congelados como, por ejemplo, los helados.
- b) Aumento del dulzor debido a que la mezcla glucosa-galactosa producida posee un 72% del poder edulcorante de la sacarosa frente a un 13% de la lactosa. Esto repercute en la necesidad de añadir menor cantidad de agentes edulcorantes a los productos que incluyen en su composición materias primas con lactosa hidrolizada (caramelos, productos de confitería, salsas, bebidas refrescantes).
- c) Al igual que la lactosa, la galactosa es capaz de producir la reacción de Maillard que confiere el característico color marrón a productos de panadería y bollería, necesitándose adicionar menor cantidad de sacarosa que es sustituida por la glucosa proveniente de la hidrólisis.
- d) Correcta asimilación de productos procedentes del suero por personas intolerantes a este disacárido.
- e) Los monosacáridos glucosa y galactosa poseen mayor facilidad de ser fermentados por los microorganismos utilizados para la producción de yoghurt (**Shah y col.(1993)**).

4) Aumento de la biodegradabilidad de los sueros procedentes de queserías. El lactosuero ha sido considerado tradicionalmente como un subproducto de las industrias lácteas de forma que la mayor parte ha sido vertido en los ríos con el consiguiente desequilibrio ecológico que conlleva. Si se tiene en cuenta que 100 Kg de lactosuero necesitan para su depuración el oxígeno disuelto contenido en medio millón de litros de agua, es fácil advertir que estos vertidos pueden convertirse en un problema importante (**Santos y col.(1998)**).

5) Por otra parte, la composición de estos lactosueros revela la existencia de una serie de productos valiosos que es necesario aprovechar de forma que, tras su

desmineralización y concentración, pueden destinarse a distintas aplicaciones tal y como se puede observar en la **Figura 2.2** donde se muestra el uso actual de los lactosueros desmineralizados aprovechados (aproximadamente el 50% de los generados). Dentro de las aplicaciones más importantes se encontrarían la preparación de fórmulas de alimentación infantiles y la alimentación animal (**Batchelder (1988)**), siendo necesario reducir el contenido de lactosa en ambos casos para que sean fácilmente asimilables. En las **Figuras 2.4 y 2.5** se muestran dos procesos industriales para la utilización de estos lactosueros.

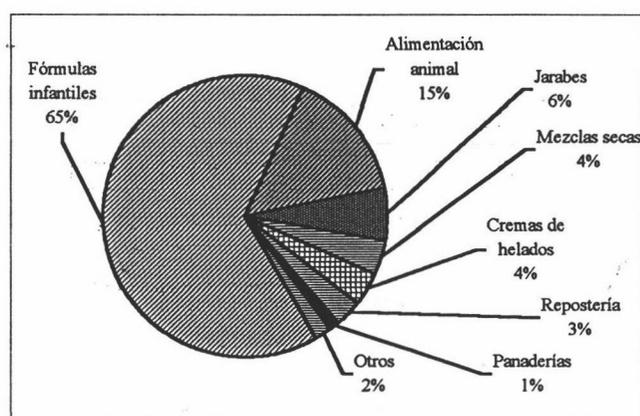


Figura 2.2- Utilización de sueros desmineralizados a nivel mundial.

Todos los problemas anteriormente expuestos pueden ser paliados si se reduce el contenido de lactosa en leche y derivados mediante hidrólisis enzimática, consiguiéndose productos de alto valor añadido que pueden originar grandes beneficios, amén de solucionar los problemas de contaminación que estos lactosueros llevan aparejados.

En la **Figura 2.3** se indica la posible utilización que los productos deslactosados pueden tener.

2.1.1 Procesos tecnológicos industriales para la obtención de hidrolizados de lactosa.

La hidrólisis de la lactosa contenida en productos como suero o leche puede llevarse a cabo mediante el uso de distintos procesos industriales como la hidrogenación, tratamientos térmicos con ácidos o mediante la utilización de enzimas (bien en estado libre o inmovilizadas) que es el método menos agresivo y por tanto más utilizado. En la **Tabla 2.3** se muestran diferentes procesos industriales utilizados.

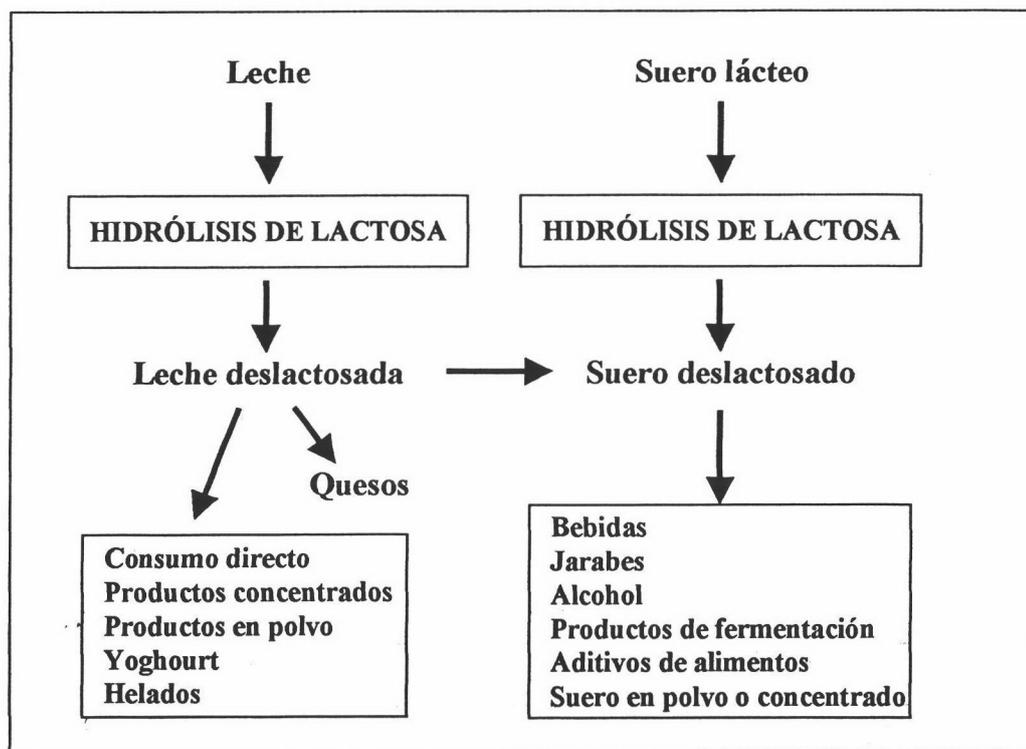


Figura 2.3– Utilización de productos deslactosados.

Se han realizado distintas estimaciones económicas sobre la viabilidad de proyectos en los que se lleve a cabo la hidrólisis de lactosa en leche, suero o concentrados de suero lácteo (Pitcher (1984), Bury (2000)). Las variables de diseño del proyecto (coste del producto final, materias primas y capacidad de producción) determinarán la rentabilidad de uno y otro método. Como es de suponer la utilización de enzima inmovilizada se hace idónea para capacidades de producción altas ya que requiere de costes de mantenimiento y costes fijos mayores a los requeridos en la utilización de enzima soluble.

El proceso de fabricación de leche con lactosa hidrolizada puede resumirse de la siguiente forma. Una vez que la leche ha sido sometida a un tratamiento térmico inicial suave se añade a un tanque junto a la enzima, controlándose la temperatura y pH. El grado de hidrólisis obtenido (generalmente 70-80%) vendrá determinado por la temperatura, el tiempo de reacción y la cantidad de enzima añadida. El control del pH se utilizará para detectar el posible desarrollo bacteriano que pueda sufrir el producto. Transcurrido el período de reacción la leche podrá ser posteriormente pasteurizada aconsejándose procesos de pasteurización y esterilización rápidos que eviten un oscurecimiento del producto.

Tabla 2.3 – Métodos comerciales para la obtención de hidrolizados de lactosa.

Procedimiento	Referencias	Observaciones
Hidrogenación mediante uso de catalizador.	Patente U.S. n° 2.642.462	Catalizador de níquel.
	Patente U.S. n° 2.868.847	Catalizador de rutenio; se obtiene cierta cantidad de polialcoholes
Hidrólisis ácida a 100°C (en fase homogénea y heterogénea)	(Ryder (1989), González Siso (1996))	Se produce reacción de Maillard con pardeamiento de la disolución. Aplicación de calor y pH bajos
Hidrólisis enzimática con enzima libre.	(Ryder (1989), Gist-Brocades)	Simplicidad de operación. Alto consumo de enzima.
Hidrólisis enzimática con enzima inmovilizada.	Método Valio. (Virkkala (1988), Zadow (1992),)	Hidrólisis de lactosa en suero y leche desnatada. Inmovilización de enzima en resina
	Método Snam Progetti (Snam Progetti (1970))	Enzima retenida sobre fibras de acetato de celulosa o poliméricas. Para leche o suero.
	Método Corning (Zadow (1992))	Enzima unida por enlace covalente a partículas de sílice. Para sustratos ácidos. Plantas en Kentucky y Gran Bretaña (350 Tm/año)
	Método Sumitomo (Zadow (1992))	Enzima inmovilizada en resina. Para leche y sueros, en condiciones de pH neutros y temperaturas de 35-40°C
Producción de leche con bajo contenido en lactosa.	(Gist-Brocades)	Obtención de leche parcialmente deslactosada para consumo directo u otros usos (queso).
Producción de jarabes de suero.	(Gist-Brocades)	Suele sufrir procesos de concentración (Figuras 2.4 y 2.5) para ser utilizado en usos diversos (panadería, etc.)

En el caso en el que la calidad microbiológica de la leche sea buena y la enzima haya sido tratada asépticamente, es posible agregar la enzima a la leche después de la pasteurización. En este caso la hidrólisis ocurrirá durante el transporte que precede a la venta.

Con el grado de hidrólisis indicado (70-80%) esta leche puede ser destinada al consumo por parte de personas intolerantes a la lactosa. La leche parcialmente hidrolizada (30-50%) puede ser utilizada en el proceso de fabricación del queso ya que la glucosa y galactosa formada estimulan el crecimiento y el sistema enzimático de las bacterias, siendo utilizados los hidratos de carbono con mayor eficacia.

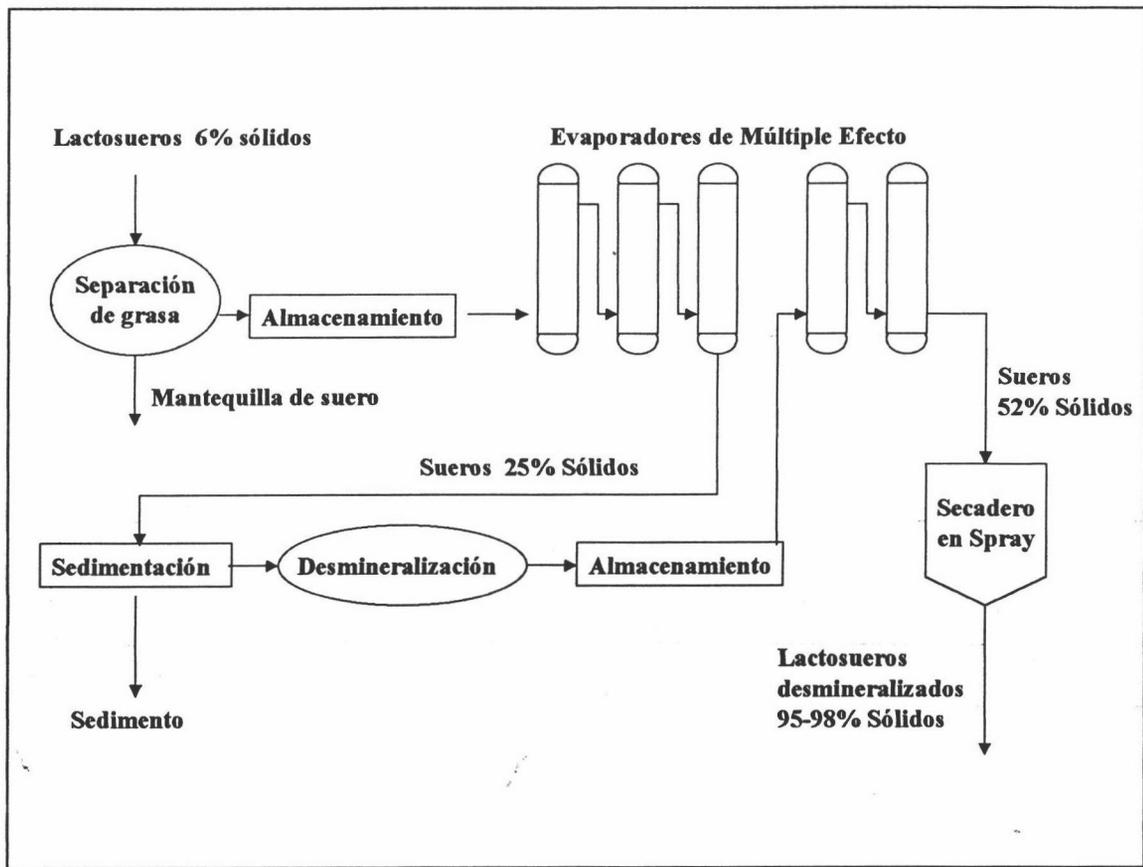


Figura 2.4 – Proceso de obtención de sueros desmineralizados en polvo.

Para la producción de jarabes de suero hidrolizado, una vez pasteurizado el suero se corrige el pH hasta valores óptimos de funcionamiento de la enzima mediante la adición de hidróxido potásico (iones Na^+ y Ca^{+2} son inhibidores de esta enzima). A continuación se añade al tanque donde se va a incubar con la enzima a la temperatura y tiempo óptimos.

Una vez alcanzado el grado de hidrólisis requerido (generalmente 80%) el suero está listo para cualquier proceso adicional, pudiendo ser pasteurizado y concentrado por evaporación a vacío hasta un 70-75% en sólidos en una o dos etapas, debiendo realizar una refrigeración rápida para evitar que el producto se oscurezca debido a la reacción de Maillard. Debido al alto contenido de azúcares existentes en el producto final no es necesario tomar otras medidas preventivas que eviten una alteración microbiológica.

Al final del proceso de fabricación, la enzima se desactiva térmicamente, no pudiéndose reutilizar de nuevo.

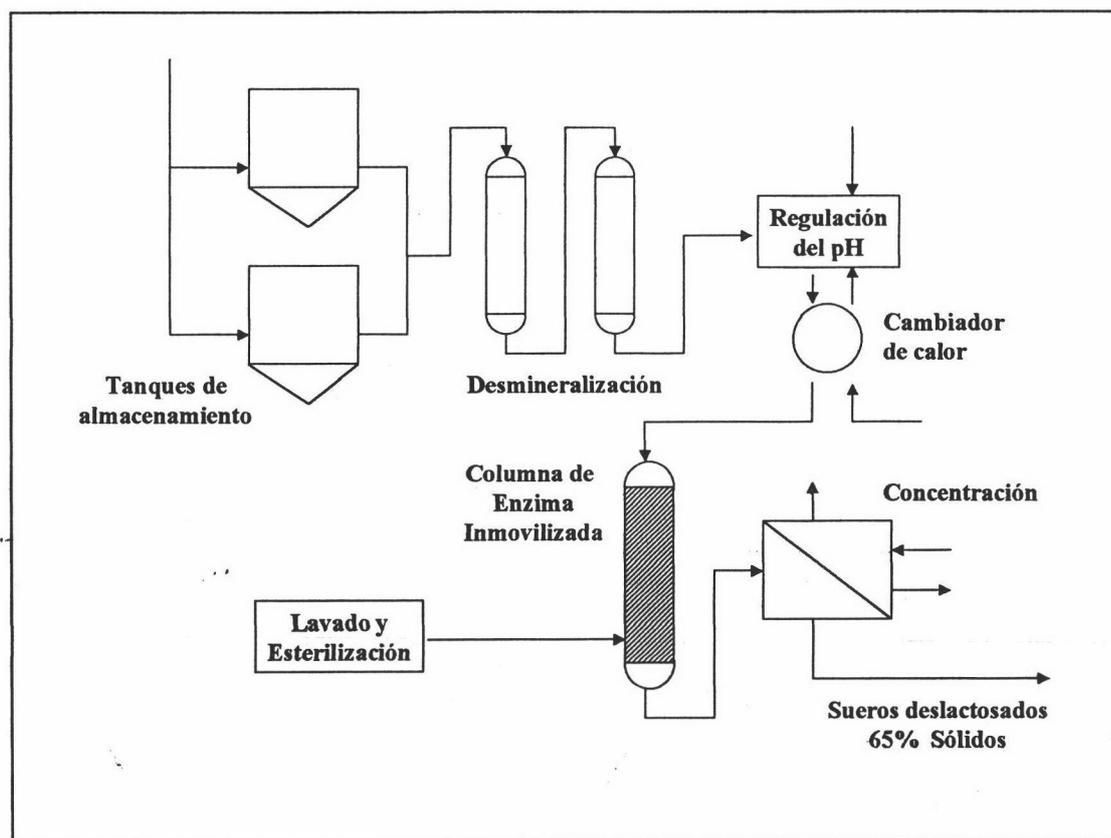


Figura 2.5 – Proceso de obtención de jarabes deslactosados mediante hidrólisis enzimática.

2.1.2 Diferentes métodos de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de lactosa.

La producción y uso industrial de las enzimas extracelulares supone un alto costo asociado a la extracción de las células y a la inestabilidad térmica que presentan. La hidrólisis enzimática de lactosa en fase homogénea (enzima libre en disolución) puede no ser rentable ya que la lactasa no puede ser reutilizada, por lo que es conveniente el uso de enzima en fase heterogénea, inmovilizada a soportes o insolubilizada mediante polimerización (Bódalo y col. (1995), Giancomini y col. (2001)). Estos procesos permiten la utilización de la enzima de forma continua y ofrecen la posibilidad de su reutilización con el consiguiente ahorro económico.

Otros autores han propuesto la utilización de células que contienen lactasa para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de lactosa (González-Siso (1994), Fujikawa y col.

(1997)). En este caso el transporte de lactosa hacia el interior de las células puede convertirse en factor limitante (Joshi y col. (1989)).

El uso de la enzima en forma soluble presenta una gran simplicidad de operación, no requiriendo una fase previa de inmovilización. Por el contrario presenta una serie de desventajas ya que conlleva un alto consumo de enzima que en la mayoría de los casos no será recuperable, con la consiguiente influencia que sobre la calidad del producto final ejerce y el coste económico que esto supone.

La inmovilización de la enzima pretende eliminar las desventajas que posee la hidrólisis enzimática de lactosa en fase homogénea. Este proceso puede realizarse sobre distintos tipos de soportes y el método utilizado puede ir desde una adsorción hasta un atrapamiento o una unión de la enzima al soporte mediante enlace covalente. En la **Tabla 2.4** se indica el método de inmovilización, medio de reacción y origen de enzima utilizado por distintos autores.

De todos los trabajos analizados sobre inmovilización de lactasa en distintos soportes, pocos han sido utilizados comercialmente (apartado 2.1.1). Muchos de estos trabajos sólo han estudiado la actividad inicial del sistema y las condiciones óptimas, mientras que factores comerciales tan importantes como el pH, estabilidad térmica, diseño adecuado del reactor, densidad de enzima inmovilizada y condiciones higiénicas del sistema no han sido analizados.

Algunos sistemas enzima/soporte encontrados en bibliografía se muestran en la **Tabla 2.4**. Los soportes utilizados deberían ser resistentes a la degradación en las condiciones de operación (pH, temperatura, limpieza) debiendo evitarse la contaminación microbiana. Particularmente el tamaño de partícula es un factor muy importante ya que en operaciones en lecho fijo, tamaños de partícula demasiado pequeños conllevará caídas de presión altas y una compactación del lecho, y por tanto un contacto enzima sustrato deficiente. En un reactor de lecho fluidizado un tamaño de partícula demasiado pequeño reduce la velocidad terminal de las partículas dentro del sistema y limita la velocidad media de ascenso de la partícula en el reactor. Por tanto un tamaño de soporte y densidad adecuada son fundamentales para que el sistema utilizado pueda ser utilizado comercialmente.

Tabla 2.4 - Métodos de inmovilización de β -galactosidasas (salvo dispositivos de membrana)

Origen de enzima	Referencia	Soporte / Reactor	Tipo de enlace	Medio de reacción
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Rogalski y col. (1994)	Esferas cristal poroso	Covalente (mediante glutaraldehido)	Disolución lactosa
	Ladero y col. (2000)	Sílice-alúmina	Covalente	Disolución lactosa
	Szczodrak (2000)	Esferas de sílice	Covalente	Suero
	Carrara y col. (1994/1996)	Esferas de quitina	Covalente (mediante glutaraldehido)	Disolución lactosa
	Carrara y col. (1997)	Quitina / Reactor de lecho fijo	Covalente (mediante glutaraldehido)	Disolución lactosa
<i>Aspergillus niger</i>	Carpio y col. (2000)	Polvo de hueso	Adsorción	Disolución ONPG
	Ma y col. (1983)	Sílice	Covalente	Disolución lactosa
	Yang y col. (1989b)	Resina / Reactor flujo pistón	Covalente	Disolución lactosa
<i>Aspergillus oryzae</i>	Papayannakos y col. (1993)		Entrecruzamiento	Disolución lactosa
	Friend y col. (1982)	Reactor lecho fijo	Atrapamiento en gel	Disolución lactosa
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Zhou y col. (2001b)	Grafito	Entrecruzamiento	Disolución lactosa
	González-Siso (1994)	Granos de maíz	Covalente (células)	Suero
	Zhou y col. (2001a)	Grafito	Entrecruzamiento	Leche desnatada
	Giancomini y col. (1998)	Sílice-agarosa	Covalente	Disolución lactosa
	Becerra y col. (2001)		Entrecruzamiento (células)	Suero
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Illanes y col. (1998)	Quitina / Reactor lecho fijo		Disolución lactosa y galactosa
	Illanes y col. (2000) / (2001)	Quitina	Covalente	Disolución lactosa y galactosa
<i>Escherichia coli</i>	Ladero y col. (2001)	Sílice-alúmina	Covalente	Disolución lactosa
	Walsh y col. (1993)	Cristal poroso	Adsorción	Disolución lactosa
	Sungur y col. (1999)	Gelatina-CMC / Reactor lecho fluidizado	Entrecruzamiento	Disolución lactosa
<i>Penicillium notatum</i>	Szczodrak (1999)	Esferas cristal poroso	Covalente	Suero
<i>Escherichia coli</i> / <i>Kluyveromyces lactis</i>	Giancomini y col. (2001)	Glutaraldehido-agarosa	Covalente	Disolución ONPG
<i>Saccharomyces fragilis</i>	Siso y col. (1994)	Granos de maíz	Covalente	Suero
<i>Cicer arietinum</i>	Tu y col. (1999)	Resina	Covalente	Disolución ONPG
	Mohy Eldin y col. (1999)	Partículas porosas	Covalente	Disolución ONPG
	Snam Progetti (1970)	Celulosa y polímero	Covalente	Leche
	Virkkala (1988)	Resina	Atrapamiento	Leche desnatada
	Berrueta-Jiménez y col. (1988)	Alúmina / Reactor lecho fijo	Covalente	Leche

Generalmente se emplean dos tipos de reactores para llevar a cabo la inmovilización de la enzima, los sistemas con lecho fijo y los que poseen lecho fluidizado, pudiéndose encontrar otro sistema de retención de la enzima en sistemas de ultrafiltración bien por encapsulación o por confinamiento que analizamos posteriormente.

Los sistemas de lecho fijo tienen la ventaja de la simplicidad de operación y, en general, el grado de hidrólisis por litro de enzima es mayor que en sistemas de lecho fluidizado. Su mayor desventaja reside en el problema de contaminación microbiana que pueden sufrir durante la hidrólisis, particularmente en la superficie del lecho. Este efecto se acentúa más cuando se utiliza como sustrato la leche y el suero dulce, siendo menor cuando es suero ácido la fuente de lactosa. Además la limpieza del reactor de lecho fijo ofrece dificultades si ésta no se realiza con una fluidización del lecho.

Los sistemas de lecho fluidizado resuelven las dificultades que encontramos en los sistemas de lecho fijo ya que las partículas que poseen están en movimiento. Las desventajas de este tipo de sistemas residen en su mayor complejidad y en el hecho de que el diseño depende en gran manera de las características físicas de la resina utilizada.

La utilización de membranas para llevar a cabo la inmovilización o confinamiento de enzimas en distintos procesos industriales va en aumento ya que, además de la reacción enzimática, la membrana permite la separación de la enzima del producto final. Para el caso que nos ocupa, hidrólisis enzimática de lactosa, podemos observar en la **Tabla 2.5** distintas referencias en las que las membranas son utilizadas para llevar a cabo la inmovilización de lactasas.

En función del trabajo analizado podemos encontrar distintas formas de retener la enzima mediante la membrana, ya sea por enlace químico, encapsulamiento o retención física en disolución debido al tamaño de poro. En el caso de reactores de fibra hueca, la enzima puede quedar en el lumen o interior de la membrana, o en el ECS ("Extra Capilar Space" o espacio extracapilar, que es el espacio existente en el exterior de la fibra) (Cheryan (1998c)).

Las configuraciones más usadas son las de fibra hueca y configuración en espiral ya que estos sistemas son los que presentan una mayor relación área superficial / volumen. En un principio la enzima se ubicaba en la matriz esponjosa de la membrana, descartándose esta disposición debido a que las presiones transmembrana debían ser

Tabla 2.5 - Métodos de inmovilización de β -galactosidasas en dispositivos de membrana.

Origen de enzima	Referencia	Conformación de membrana	Material	Tipo de enlace	Medio de reacción
<i>Bacillus circulans</i>	Bakken y col.(1992)	En espiral	PVC	Covalente	Leche desnatada
	Bakken y col. (1990/1991)	En espiral	PVC	Covalente	Leche desnatada
<i>Aspergillus oryzae</i>	Mohy Eldin y col. (1999/2000)	-----	Teflón	Covalente	Disolución lactosa
	Portaccio y col. (1998) El-Masry y col. (2000a/2000b),	-----	Nylon	Covalente	Disolución lactosa
<i>Aspergillus niger</i>	Huffman y col.(1985)	Fibra hueca	Polisulfona	Enzima en disolución (confinada en lumen o en ECS)	Disolución lactosa
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Korus y col.(1978)	Fibra hueca	PVC y poliacrilonitrilo / Polisulfona	Enzima encapsulada	Disolución lactosa
	Stellato y col.(1997) El-Masry y col. (2000c),	-----	Nylon	Covalente (Celulas inmovilizadas)	Disolución lactosa
<i>Escherichia coli</i>	Heng y col. (1994)	-----	-----	Covalente	Suero

bajas para prevenir la pérdida de enzima. Además la difusión de sustrato y producto a través de la membrana era limitante.

Cuando la enzima se encuentra en el lumen y el alimento se bombea por el ECS, la distribución del tiempo de residencia se aproxima a un modelo de mezcla perfecta [Ec. 2.1] más que a un modelo flujo pistón (Katoaka y col. (1980)), mientras que si la enzima se encuentra en el ECS y el alimento se bombea a través de lumen la distribución del tiempo de residencia se aproxima a un modelo de flujo pistón [Ec. 2.2] (Kohlwey y col. (1981)), siendo éste el mejor sistema para reacciones con inhibición por producto (Kawakami y col. (1980)). En este último caso la enzima tenderá a migrar hacia el final de las fibras en el caso en que la enzima no se encuentre fijada a ellas. Por otro lado, para evitar la pérdida de enzima a través de la membrana el tamaño de poro de ésta debería ser al menos 10 veces inferior al tamaño de la enzima.

Las variables más importantes que es necesario optimizar en cualquier reactor son la concentración de enzima (E), la concentración de sustrato inicial (S_0), el volumen de la zona de reacción (V) y la velocidad de flujo (F) que es el producto del flujo (J) por

el área (A). Considerando un mecanismo de reacción de Michaelis-Menten simple para un único sustrato sin inhibición, y realizando un balance de materia, para un reactor ideal las expresiones que pueden permitir el diseño de este tipo de reactores serían:

- Para sistemas con recirculación:

$$x + \frac{K_M x}{S_0 (1-x)} = k_2 \frac{E V}{F S_0} = k_2 \theta \quad [\text{Ec. 2.1}]$$

- Para sistemas flujo pistón:

$$x - \frac{K_M}{S_0} \ln(1-x) = k_2 \theta \quad [\text{Ec. 2.2}]$$

donde K_M y k_2 son constantes cinéticas, x es la conversión y θ es el tiempo espacial modificado. El modelo propuesto reproduce en cierta forma los datos experimentales obtenidos por (Deeslie y col. (1981)) (hidrólisis enzimática de proteína de soja en sistemas con recirculación) y (Kohlwey y col.(1981)) (hidrólisis enzimática de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) mediante β -galactosidasa).

Dentro de los reactores de membrana, la reacciones producidas sobre oligosacáridos y otros azúcares han sido estudiadas por distintos autores pudiéndose encontrar trabajos donde se estudia la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasa (Kohlwey y col.(1981)) o α -galactosidasa (Korus y col. (1977)), o bien la isomerización fructosa-glucosa mediante glucosa isomerasa. En estos casos mencionados la desactivación que las fibras de polisulfona del reactor de fibra hueca (serie PM de Amicon) provocan sobre la enzima podría ser debido a que estas proteínas adquieren una forma filamentosa más “abierta” o desnaturalizada (observado por (Sheldon y col.(1991)) con BSA). Realizando un preacondicionamiento de las fibras mediante adición de proteína, algunos autores consiguen reducir el efecto de envenenamiento que la membrana produce, argumentando que este efecto podría ser debido a la reducción de la hidrofobicidad de ésta. En membranas fabricadas con acrilonitrilo-cloruro de vinilo (serie XM50 de Amicon) no se detecta efecto alguno sobre las enzimas (Cheryan (1998c)).

Kohlwey y col.(1981) aplican la [Ec. 2.2] a la hidrólisis de ONPG mediante β -galactosidasa en un reactor de fibra hueca señalando la bondad del ajuste y postulando que la pérdida de actividad detectada se debe a una posible pérdida de actividad que la enzima sufre debido al envenenamiento de la membrana de polisulfona.

2.2 Producción de jarabes de fructosa-glucosa.

El incremento del consumo de los jarabes de glucosa y fructosa obtenidos a partir del almidón ha sido continuo en las últimas tres décadas compitiendo con el azúcar obtenida a partir de caña y de remolacha. El mayor poder edulcorante ha hecho que estos jarabes sustituyan al azúcar obtenida por otras vías, fundamentalmente en el ámbito industrial.

El proceso industrial utilizado para la obtención de jarabes de glucosa se esquematiza en la Figura 2.6 (Joglekar y col.(1979), Bucke (1979)).

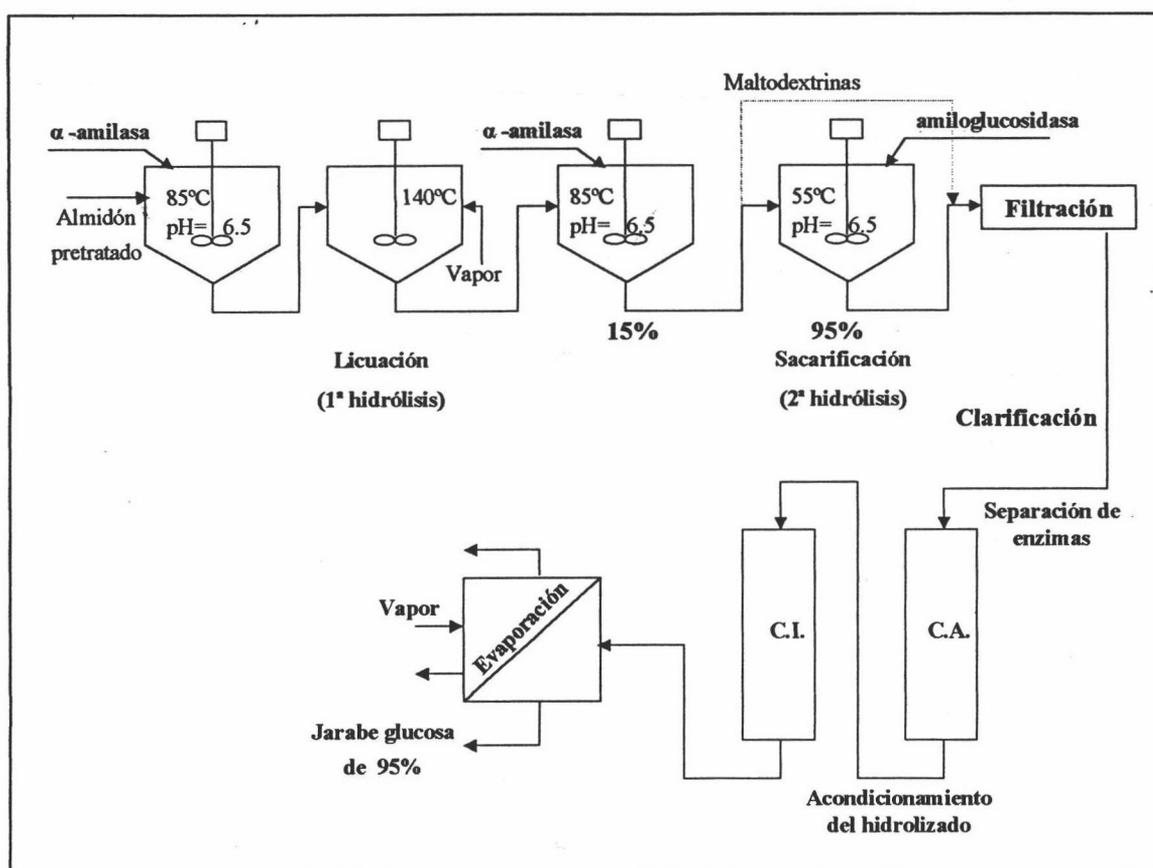


Figura 2.6 – Producción de jarabes de glucosa.

La hidrólisis del almidón se lleva a cabo en dos etapas. En la primera se lleva a cabo la solubilización parcial del almidón por efecto combinado de la temperatura y de la α -amilasa termoestable, que conducen a la formación de maltodextrinas. La segunda

etapa es la llamada de sacarificación, en la que las amiloglucosidasas transforman dextrinas y maltosa en glucosa.

La primera etapa puede realizarse sobre una suspensión de almidón (30 a 45 % en peso) en tanques agitados a pH comprendido entre 6 y 7, combinando el efecto de la temperatura y concentración de enzima. La temperatura necesaria para una gelatinización total depende de la fuente de almidón, aunque se suelen utilizar técnicas de alta temperatura y poco tiempo (HTST, high temperature short time). La viscosidad del almidón gelatinizado es muy alta, por lo que es necesario añadir un agente de aclarado que hidrolice parcialmente el almidón, reduzca la viscosidad y prevenga la precipitación del almidón después del enfriamiento.

La segunda etapa, la sacarificación, se puede realizar en fase homogénea o mediante glucoamilasa inmovilizada, siendo esta técnica la más frecuente, ya que se puede conseguir disminuir las reacciones de reversión de la glucosa a disacáridos y oligosacáridos, tratándose grandes cantidades de sustrato con la misma enzima y disminuyendo el volumen de la instalación (Vallat y col. (1986)).

Una vez obtenidos los jarabes de glucosa, y en función de los procesos a que sean sometidos posteriormente, obtendremos distintos productos utilizados en diferentes usos según podemos observar en la **Tabla 2.6**.

La obtención de jarabes de alto contenido en fructosa, conocidos como HFCS (High Fructose Corn Syrup, debido a su contenido en fructosa y a la utilización del maíz como materia prima), se lleva a cabo fundamentalmente mediante isomerización de glucosa a fructosa en presencia de glucosa isomerasa.

Esta reacción es interesante desde un punto de vista industrial debido a:

- a) La fructosa tiene el doble poder edulcorante que la glucosa, lo que hace que el contenido energético de los productos sea menor al ser necesaria menor cantidad de azúcares para obtener el mismo dulzor. Esta propiedad es aprovechable para la preparación de alimentos dietéticos de bajo contenido calórico.
- b) Otra de las ventajas que poseen se debe a que la fructosa se absorbe en el intestino más lentamente que la glucosa y se metaboliza sin intervención de la insulina, por lo que se utiliza en la preparación de alimentos para diabéticos.

Tabla 2.6 - Procesos a que son sometidos los jarabes de glucosa y usos que de los productos se derivan.

Procesos	Producto obtenido	Usos
Concentración y cristalización	Dextrosa	- Alimentación - Fermentación - Farmacia
Hidrogenación	Sorbitol	- Plastificantes, humectantes - Papelería y textil - Alimentación dietética

c) El elevado poder higroscópico de la mezcla glucosa-fructosa hace que sea útil en panadería y confitería para prevenir posibles procesos no deseados de cristalización o desecación.

d) Los jarabes de glucosa y fructosa son de color claro y de baja viscosidad, utilizándose también en la fabricación de bebidas refrescantes.

La reacción de isomerización de glucosa a fructosa se lleva a cabo en la industria en forma continua, haciendo reaccionar el sustrato líquido (jarabe de glucosa) con la enzima que puede encontrarse inmovilizada sobre un soporte que actúa como relleno de un reactor de lecho fijo.

El proceso de isomerización consta de las etapas que se esquematizan en la **Figura 2.7:**

- Preparación de la alimentación.
- Isomerización.
- Acondicionamiento del producto.
- Filtración para la eliminación de enzima.
- Ablandamiento.
- Concentración.

El jarabe de glucosa obtenido en las etapas de licuación y sacarificación se acondiciona ajustando su pH con Na_2CO_3 entre 7 y 8.5, añadiendo además sulfato de magnesio y bisulfito sódico necesarios para estabilizar la enzima glucosa isomerasa inmovilizada. La reacción de isomerización se realiza a 65°C y el tiempo de residencia es de 30 minutos. El producto obtenido, conocido como HFCS, de composición 42 % en fructosa y 50 % en glucosa se acondiciona mediante filtración y la utilización de dos

columnas, una de carbón activo y otra de intercambio iónico, que eliminan las enzimas y sales indeseables. El jarabe obtenido se concentra hasta el 71 % en sólidos, obteniéndose jarabes con un 42 % en fructosa.

Por otra parte, el jarabe de composición 42 % en fructosa, puede separarse en dos corrientes antes de la evaporación. Una de ellas se hace pasar a través de una columna revestida de gel de ácido bórico, que adsorbe las moléculas de glucosa pero no las de fructosa, obteniéndose una corriente de una composición en fructosa de un 90%. Mezclando la corriente inicial de HFCS del 42 % con la de 90% (conseguida tras derivar la corriente principal sobre la columna revestida de gel y tras llevar a cabo una evaporación) podremos obtener jarabes de distintas concentraciones en fructosa.

Las técnicas de concentración de HFCS son caras, ya que normalmente es una separación por cromatografía. Por ello se han ensayado métodos alternativos para llevar a cabo la isomerización. Entre los más utilizados está elevar la temperatura de reacción a 100°C, con lo que disminuye considerablemente la vida media de la enzima, y la utilización de medios no acuosos como, por ejemplo, etanol (Visuri y col. (1987)).

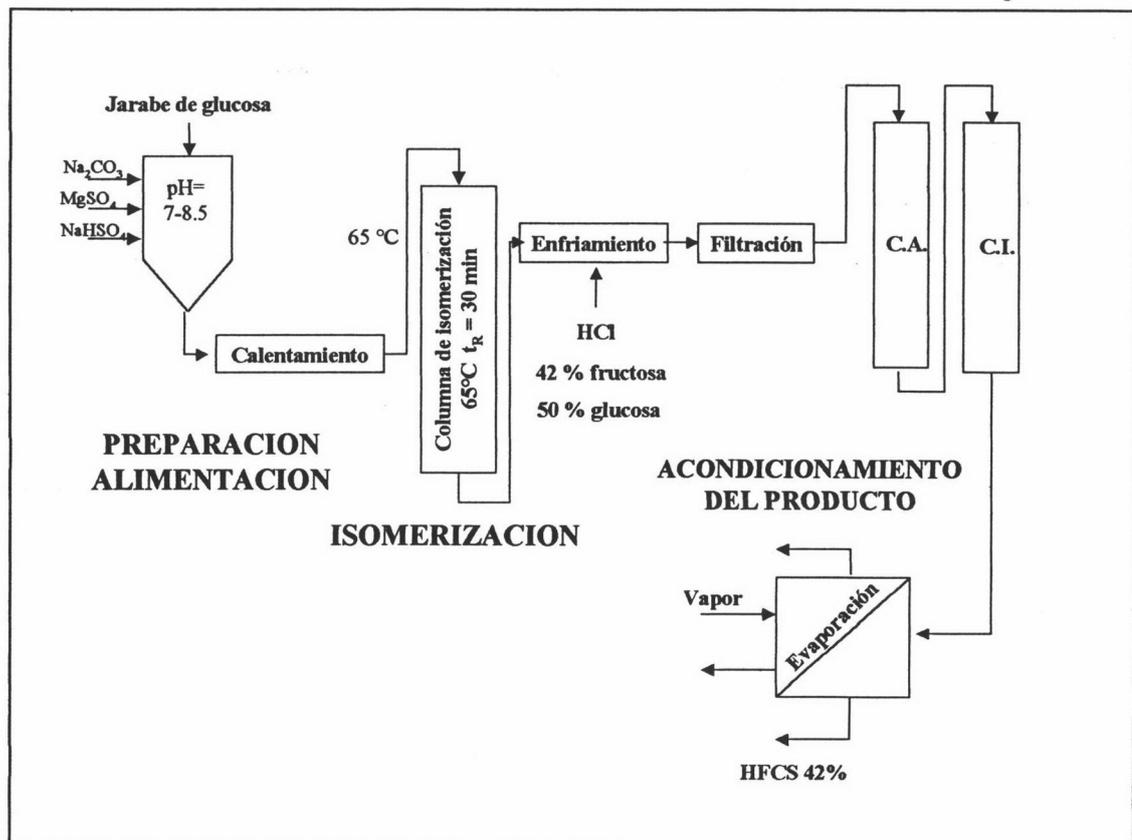


Figura 2.7 – Producción de jarabe de fructosa.

2.3 Bioreactores de membrana.

La Biocatálisis implica la transformación de un sustrato en productos útiles mediante la utilización de enzimas en sistemas homogéneos o heterogéneos. Como en todos los procesos químicos, la separación de reactivos y productos y la recuperación y reutilización del catalizador utilizado en la mezcla de reacción es una etapa importante que supone un coste añadido al proceso. Los reactores de membrana integran la conversión catalítica, la separación de productos y/o concentración y la recuperación del catalizador en una operación única (**Prazeres y col.(1994a)**).

El concepto de reactor de membrana se basa en la separación de la enzima y productos (o sustratos) mediante una membrana semipermeable que crea una barrera selectiva. Los solutos permeables a la membrana pueden ser separados de la mezcla de reacción mediante la acción de una fuerza impulsora (potencial químico, presión, campo eléctrico) presente a ambos lados de la membrana.

Las membranas pueden también ser utilizadas como una matriz de inmovilización de enzimas (**Bakken y col.(1992)**, **Malcata y col. (1992a/1992b/1992c)**) o como un catalizador interfacial que junto a la enzima actúe no sólo como separación entre dos fases líquidas distintas, sino también como área interfacial de contacto (**Matson y col.(1991)**).

La retención completa de la enzima dentro del sistema es uno de los requerimientos principales de los reactores de membrana, pudiéndose encontrar la enzima presente de dos formas, soluble o inmovilizada en la membrana (bien dentro de los poros o en la matriz de la membrana). Si la enzima está en forma soluble, la inmovilización se realiza por confinamiento de la enzima a un lado de la membrana mediante exclusión por tamaño (**Fujii y col.(1991)**, **Ishikawa y col. (1989a/1989b)**), repulsión electrostática (**Kulbe y col. (1984)**) o inmovilización física o química en un soporte intermedio (proteína inerte, geles (**Cantarella y col. (1989)**) o liposomas). La inmovilización de la enzima sobre la membrana puede llevarse a cabo mediante enlace químico (**Nakajima y col.(1989)**), adsorción física (**Prazeres y col.(1994b)**) o atracción electrostática (**Furusaki y col.(1990)**). Los productos resultantes de la reacción catalítica deben ser capaces de permear a través de los poros de la membrana, bien por

difusión, inducida por gradientes de concentración, o por convección, inducida por gradientes de presión.

Las membranas de ultrafiltración suelen ser las más adecuadas para la retención de la mayoría de las enzimas (tamaños comprendidos entre 10.000 y 100.000 Da) debido al tamaño de poro que presentan, comprendido entre 500 y 100.000 Da. La selección de una membrana como reactor enzimático debe realizarse considerando múltiples factores, entre los que cabe señalar el tamaño de la enzima, sustrato y producto, la naturaleza química de las especies en disolución y el tipo de membrana. En la **Tabla 2.7** se muestran alternativas y características que presentan distintos reactores de membrana.

2.3.1 Ventajas y desventajas de la utilización de reactores de membrana.

Los reactores de membrana poseen una serie de ventajas por las que pueden sustituir otros reactores enzimáticos más clásicos como el tipo "batch" o de lecho fluidizado:

- Ofrecen la posibilidad de operar con enzimas en procesos continuos e intensivos que contribuyen a aumentar la productividad y viabilidad económica del sistema.
- Se pueden alcanzar productividades y velocidades mayores que con otros reactores enzimáticos ya que existe la posibilidad de retirar productos inhibidores del medio de reacción.
- Mayor posibilidad de control del proceso.
- Se integran en un dispositivo varias operaciones unitarias.
- Se puede enriquecer y concentrar los productos en las corrientes de proceso.
- En algunos casos es posible controlar el peso molecular de los hidrolizados producidos.
- Así mismo es posible realizar reacciones multifase dentro de estos sistemas.

Por el contrario estos reactores pueden presentar una serie de desventajas que están relacionadas principalmente con la pérdida de catalizador y con la eficiencia en la transferencia de materia. La estabilidad operacional de la enzima en el reactor de

membrana puede verse afectada por varios factores además de la desactivación térmica de la enzima:

Tabla 2.7 - Alternativas y características presentadas por distintos reactores de membrana (Prazeres y col. (1994a))

Función de la membrana	Retención de la enzima	Localización de la enzima	Mecanismo de separación del producto	Configuración de módulos de membrana	Material de membrana de ultrafiltración
Barrera semipermeable	Exclusión por tamaño (Fujii y col.(1991))	En disolución	Tamaño de poro	Plana	Cerámico (Nakajima y col. (1989), Prazeres y col.(1993))
Inmovilización en matriz (Bakken y col.(1992), Malcata y col. (1992a/1992b /1992c)	Repulsión electrostática	En matriz de membrana	Difusión (Ishikawa y col. (1989b))	Tubular (Prazeres y col.(1993))	Celulosa
Separador de fases	Atracción electrostática	En superficie de la membrana	Precipitación	Fibra hueca (Ishikawa y col. (1989b))	Acetato de celulosa
	Adsorción física (Prazeres y col.(1994b))		Carga eléctrica	En espiral (Bakken y col.(1992))	Polisulfona (Huffman y col.(1985), Lee y col. (1993))
	Enlace químico (Nakajima y col. (1989))			Célula de ultrafiltración (Ohlson y col. (1984))	Nylon
					Poliamida (Ohlson y col. (1984))

a) Por una parte puede haber una pérdida de enzima del sistema debido a la forma de la enzima y a la distribución del tamaño de poro incluso a pesos moleculares mayores que el tamaño de corte de la membrana. Así mismo puede haber una pérdida de cofactores o iones que pueden escapar a través de la membrana con la consiguiente reducción de la actividad enzimática del sistema.

b) Cuando se trabaja con enzimas en disolución puede producirse una desfavorable adsorción de la enzima sobre la membrana.

c) En ocasiones puede ocurrir una desactivación de la enzima debido a esfuerzos cortantes y fricciones en la cercanía de la pared que causan la desactivación de la enzima.

d) La inhibición por producto o sustrato puede aumentarse en los reactores de membrana que utilizan enzimas inmovilizadas sobre la superficie de la membrana debido a la acumulación de estos compuestos en la superficie.

e) La pérdida de eficiencia en la transferencia de materia durante los procesos de separación, debido a la polarización por concentración y al ensuciamiento de la membrana, puede también limitar el uso de este tipo de reactores.

2.3.2 Clasificación de los reactores de membrana.

Uno de los criterios utilizados habitualmente para la clasificación de los reactores de membrana es el tipo de configuración hidrodinámica del sistema, diferenciándose entre reactores continuos tipo tanque agitado, aquellos donde el sustrato y la enzima se encuentran en contacto directo, y reactores flujo pistón donde las moléculas de sustrato tienen que difundir a través de la membrana para alcanzar la enzima.

Sin embargo algunos reactores de membrana con un régimen de flujo particular dentro de unidades de ultrafiltración (módulos de ultrafiltración con geometría cerrada al final) estarían fuera de esta tipificación, por lo que resulta más conveniente realizar la clasificación de los reactores de membrana considerando el mecanismo por el que las enzimas y los sustratos entran en contacto.

2.3.2.1 Reactores de membrana de contacto directo.

En estos reactores el sustrato es introducido por el lado de la membrana que contiene la enzima, de forma que la enzima actúa sobre el sustrato tan pronto como éste entra en el sistema.

La enzima puede estar en forma soluble o inmovilizada, pudiéndose clasificar este tipo de reactores en reactores de recirculación, con geometría cerrada al final (“dead-end”) y reactores de diálisis.

a) Reactor continuo tanque agitado con recirculación.

Este sistema está formado por un tanque agitado acoplado a un módulo de ultrafiltración con una configuración semicerrada (**Figura 2.8-a**). Siempre que la enzima no se adsorba sobre la membrana, el sustrato y la enzima están continuamente recirculándose del tanque a la unidad de ultrafiltración. Los

módulos de membrana habitualmente utilizados en este tipo de reactor son las membranas tubulares y módulos de fibra hueca, considerándose todo el sistema como un reactor continuo tanque agitado ideal (Deeslie y col.(1981), Sims y col. (1992)). Esta configuración es utilizada por gran número de investigadores (Tabla 2.8).

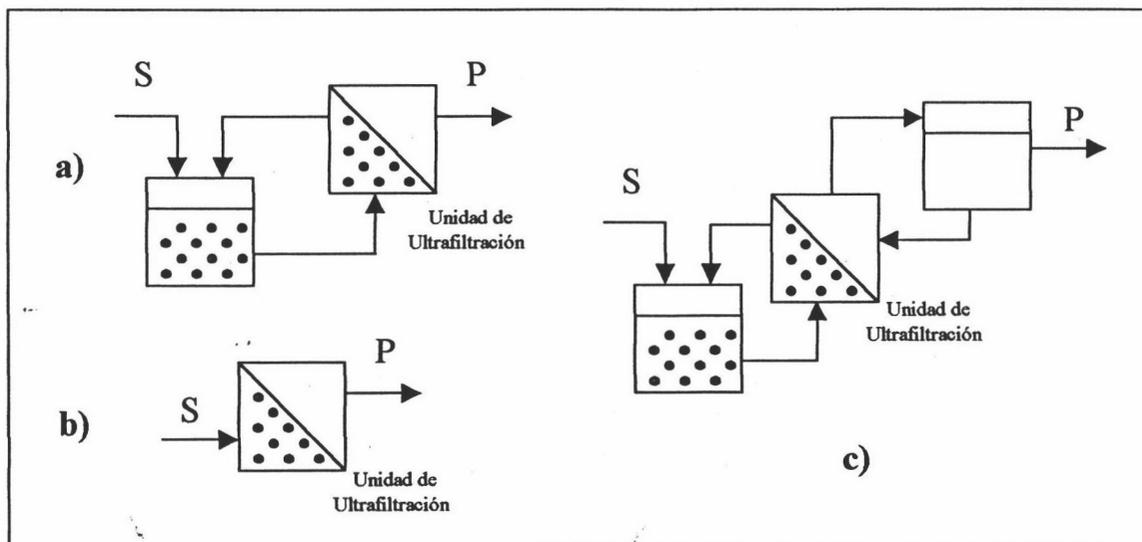


Figura 2.8 – Reactores de membrana de contacto directo: a) Reactor continuo tanque agitado con recirculación, b) Reactores de membrana “dead-end”, c) Reactor de diálisis. (●=enzima), (S=sustrato), (P=producto).

- b) En los reactores de membrana tipo “dead-end” la separación y la reacción se lleva a cabo en el mismo compartimento (Figura 2.8-b). En éstos sistemas el medio de reacción es presionado contra la membrana produciéndose el flujo a través de la unidad, operando las células de ultrafiltración en modo reactor continuo tanque agitado. Debido principalmente a los bajos flujos obtenidos a causa de la polarización por concentración creada en la cercanía de la membrana, esta configuración se utiliza sobre todo a escala laboratorio por su simplicidad de operación para comprobar mecanismos de acción de la enzima (Tabla 2.8).
- c) Los reactores de diálisis operan de forma similar a los dializadores (Figura 2.8-c). El sustrato se introduce en el lado de la membrana donde se tiene la enzima, y los productos formados cruzan la membrana como resultado de un gradiente de concentración y flujo existente a través de la membrana (Tabla 2.8).

Tabla 2.8 – Aplicaciones de reactores de membrana de contacto directo (Prazeres y col. (1994a))

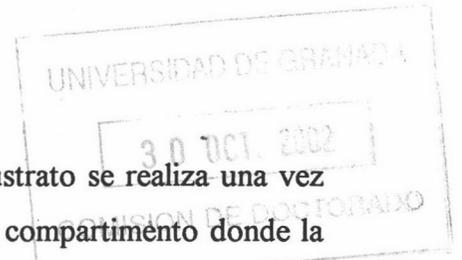
Unidad de ultrafiltración	Reacción enzimática	Referencias
Fibra hueca	Hidrólisis de proteínas de soja catalizada por pronasa	Deeslie y col. (1981)
Configuración plana	Producción de maltosa a partir de jarabes de maíz mediante α -amilasa/ glucoamilasa	Hausser y col. (1990)
Fibra hueca (en planta piloto)	Síntesis de L-metionina y L-fenil-alanina a partir de derivados DL de N-acetil mediante acilasa	Leuchtemberger y col. (1984)
Fibra hueca (en planta piloto)	Síntesis de L-ácido málico mediante fumarasa estereo selectiva	Ohshima y col. (1985)
Fibra hueca	Hidrólisis de lactosa catalizada por β -galactosidasa	Jones y col. (1984)
Fibra hueca	Hidrólisis de proteínas de plasma bovino mediante alcalasa	Bressollier y col. (1988)
Configuración en espiral	Hidrólisis de lactosa en leche desnatada mediante β -galactosidasa	Bakken y col. (1992)

2.3.2.2 Reactores de difusión.

En esta segunda clase de reactor el contacto enzima-sustrato se realiza una vez que las moléculas de sustrato atraviesan la membrana hacia el compartimento donde la enzima está localizada en forma libre o inmovilizada (**Figura 2.9-a**). Estos reactores sólo se utilizan con sustratos de bajo peso molecular, produciéndose tras la reacción productos que difunden hacia la corriente por donde el sustrato circulaba inicialmente. En este modelo de reactor son los módulos de fibra hueca los más utilizados, quedando ubicada la enzima en el espacio extracapilar (ECS) que es el espacio comprendido entre las fibras y la carcasa.

Este tipo de reactor presenta una serie de desventajas debido a que la difusión es el mecanismo de transporte dominante para los sustratos. Esto causa que el flujo del sustrato a través de la membrana sea a menudo la etapa limitante, por lo que la posibilidad de contacto sustrato-enzima en este tipo de reactores es inferior al estado libre.

Esta configuración es utilizada por distintos autores (**Tabla 2.9**), proponiéndose modelos teóricos que explican el comportamiento dentro del reactor por (**Adu-Amankwa y col. (1984)**, **Ishikawa y col. (1989b)**, **Kelsey y col. (1990)**). Para estudios



experimentales y teóricos se ha encontrado mayores grados de conversión cuando se utilizan flujos pulsantes (Kim y col. (1983)).

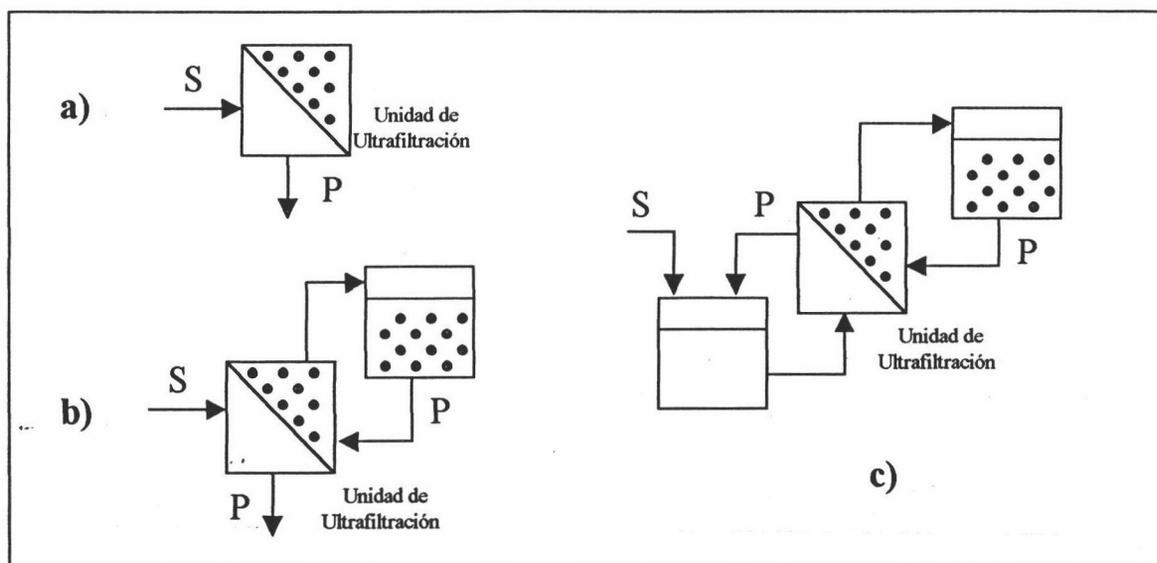


Figura 2.9 - Reactores de membrana de difusión: a) Paso único, b) Paso único con recirculación, c) Con doble recirculación. (●=enzima), (S=sustrato), (P=producto).

Tabla 2.9 - Aplicaciones de reactores de membrana de difusión (Prazeres y col. (1994a))

Unidad de ultrafiltración	Reacción enzimática	Referencias
Fibra hueca	Conversión de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido por β -galactosidasa	Kim y col. (1983)
Fibra hueca	Conversión de lactosa catalizada por β -galactosidasa en un reactor de membrana con flujo pulsátil	Bark y col. (1985)
Fibra hueca	Síntesis de glucosa-6-fosfato por glucoquinasa con regeneración de ATP por acetoquinasa	Ishikawa y col. (1989a/1989b)
Fibra hueca	Proceso de optimización de un reactor de membrana para la conversión de lactosa catalizada por β -galactosidasa	Leuchtemberger y col. (1984)

Considerando la trayectoria de las corrientes de proceso adyacentes a la membrana, se puede discernir entre sistemas donde la corriente que contiene la enzima se haya confinada a un lado de la membrana sin agitación (Figura 2.9-a) (Adu-Amankwa y col. (1984), Fujii y col. (1991)) o sistemas con recirculación (Figura 2.9-b) (Stellato y col. (1997)). La corriente que contiene el sustrato puede fluir a través del módulo de membrana bien en un paso único (Figura 2.9-a,b) (Ishikawa y col. (1989b),

Fujii y col. (1991)) o bien siendo recirculada usando un tanque externo (Figura 2.9-c) (Adu-Amankwa y col. (1984)), configuración utilizada en el presente trabajo.

2.3.2.3 Reactores multifase.

En este tipo de reactores el contacto enzima-sustrato se realiza en la matriz de la membrana (Figura 2.10). Los sustratos y productos pueden estar localizados en ambas fases siendo la difusión el mecanismo de transporte dominante junto con el transporte interfacial.

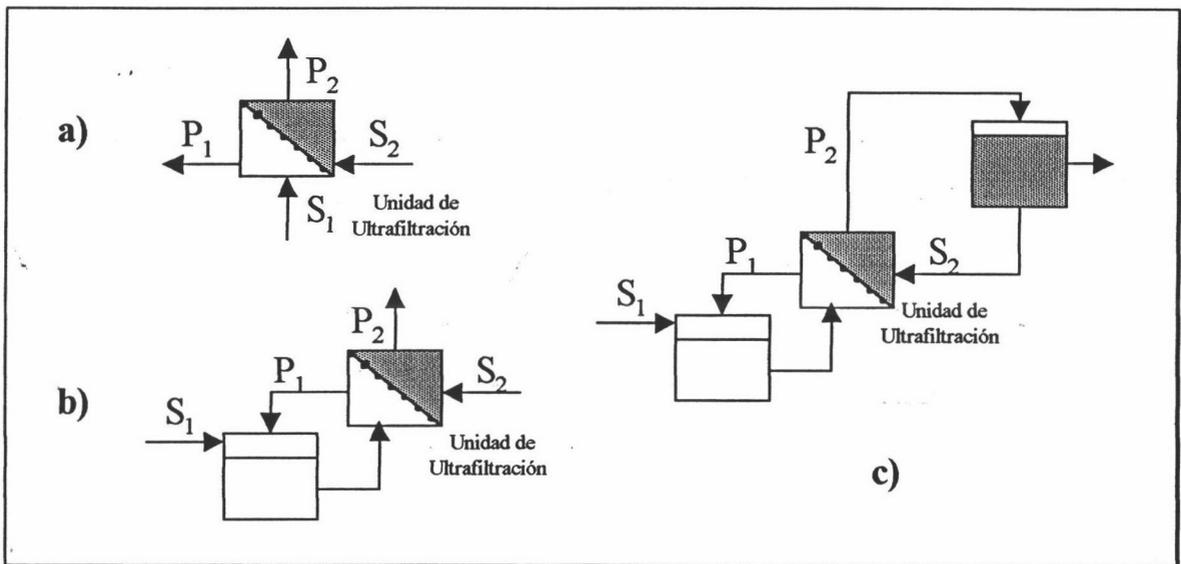


Figura 2.10 - Reactores de membrana multifase: a) Doble paso único, b) Paso único con recirculación, c) Con doble recirculación. (●=enzima), (S₁ y S₂=sustratos), (P₁ y P₂=productos).

En estos casos la membrana suele actuar como interfase de dos fases líquidas distintas (polar y apolar) que contienen los sustratos y productos. La presión hidráulica causada por la circulación de ambas fases resulta suficiente, en principio, para mantener una buena separación de fases en la membrana. En la Figura 2.10 se representa tres configuraciones teóricas distintas en reactor multifase con dos sustratos y dos productos de reacción.

La membrana no sólo separa dos fases inmiscibles sino que también aporta un área de contacto interfacial y, junto con la enzima, actúa como catalizador interfacial. Estos modelos están especialmente indicados cuando se necesita una activación

interfacial para la acción de las enzimas como, por ejemplo, lipasas y fosfolipasas. En la **Tabla 2.10** se indica distintas aplicaciones encontradas en bibliografía.

**Tabla 2.10 - Aplicaciones de reactores de membrana multifase
(Prazeres y col. (1994a))**

Unidad de ultrafiltración	Reacción enzimática	Referencias
Fibra hueca	Producción de glicerol y ácidos grasos mediante hidrólisis de lípidos catalizados por lipasas	Hoq y col. (1985)
Fibra hueca	Esterificación de sorbitol y ácidos grasos catalizados por lipasa	Janssen y col. (1991)
Fibra hueca	Síntesis de mono-, di- y triglicéridos catalizados por lipasa	Van der Padt y col. (1992)
Fibra hueca	Síntesis de <i>n</i> -butil-oleico catalizado por lipasa	Habulin y col. (1991)

Las aplicaciones de los reactores de membrana propuestas por diferentes autores se pueden observar en la **Tabla 2.11**.

Tabla 2.11 – Aplicación de los reactores enzimáticos de membrana.

Aplicación	Ejemplo	Referencias
Hidrólisis de macromoléculas	Proteínas	Deeslie y col. (1981/1982)
	Almidón	Prazeres y col. (1993)
	Celulosa	Lee y col. (1993)
Reacciones de regeneración de cofactores	ATP	Ishikawa y col. (1989b)
	NAD ⁺	
	NADP ⁺	
Hidrólisis y síntesis catalizadas por lipasas	Glicerol	Prazeres y col. (1993)
	Síntesis de esteres	Sanz y col. (2001)
	Producción de ácidos grasos	
Diversas reacciones	Síntesis de aminoácidos	Leuchtemberger y col. (1984)
	Hidrólisis de lactosa	Huffman y col. (1985)

2.3.3 Módulos de filtración de fibra hueca: características generales.

Los módulos utilizados para la filtración pueden tener diferentes configuraciones (Tabla 2.12), utilizándose cada una de ellas según el producto que se desee filtrar (Tabla 2.13).

Tabla 2.12 - Módulos de filtración y principales procesos de separación donde se utilizan

Configuración	Proceso de separación	Observaciones
Plana	UF, RO	Estructura similar a intercambiador de calor de placas. Habitualmente membranas poliméricas.
Tubular (polimérica)	UF, RO	Estructura similar a intercambiador de calor de carcasa y tubos. Alimento circula por interior de tubos y permeado se recoge por el exterior.
Tubular (cerámica)	MF, UF	Estructura similar a intercambiador de calor de carcasa y tubos. Alimento circula por interior de tubos y permeado se recoge por el exterior.
Espiral	RO, NF, UF	Membrana filtrante se encuentra arrollada sobre tubo perforado por donde se recoge el permeado. Habitualmente membranas poliméricas.
Fibra hueca	MF, UF	Carcasa cilíndrica con fibras huecas en su interior unidas a ambos extremos del módulo.

RO = ósmosis inversa, NF = nanofiltración, UF = ultrafiltración, MF = microfiltración.

Varias son las diferencias existentes entre la filtración convencional y por membranas. Mientras en la filtración convencional los filtros tienen un espesor considerablemente alto, en la filtración por membranas las paredes son delgadas, de tamaño de poro controlado y fabricadas con materiales cerámicos o poliméricos. Así mismo, en la filtración con membranas se utiliza un flujo cruzado o tangencial donde la solución que sirve de alimento fluye paralela a la superficie de la membrana y el permeado fluye perpendicular a ésta, utilizándose sistemas cerrados.

El espectro de aplicación de membranas para los procesos de separación dentro de la industria láctea se puede observar en la **Figura 2.11**. Estas técnicas de separación por membrana son utilizadas para diferentes propósitos según se recoge en la **Tabla 2.14**.

Tabla 2.13-Módulos de filtración comerciales utilizados en industria láctea (PTI Advanced Filtration Inc)

Tipo filtración / Material / Propiedades	Área, m ²	Presión máxima, bar	Flujo máximo recomendado, m ³ h ⁻¹	Aplicaciones
UF / Polietersulfona / Baja adsorción de proteínas en membrana	7.4 – 74.0	1.2-1.7	6.8-95.3	Producción de WPC. Clarificación de salmueras. Concentración de leche entera y desnatada. Producción de queso fresco.
UF / PVDF / Baja adsorción de bacterias y grasa a membrana	7.4 – 54.3	1.3	6.8-45.3	Eliminación de bacterias en leche. Eliminación de componentes grasos en leche.
NF / Polietersulfona / Alto rechazo de lactosa por membrana	7.4 – 37.0	1	6.8-18.2	Concentración de minerales en suero y desmineralización. Concentración de sueros dulces y ácidos y desmineralización. Concentración de lactosa.
RO				Concentración de lactosa. Depuración de permeados de UF
MF				Eliminación de componentes grasos.

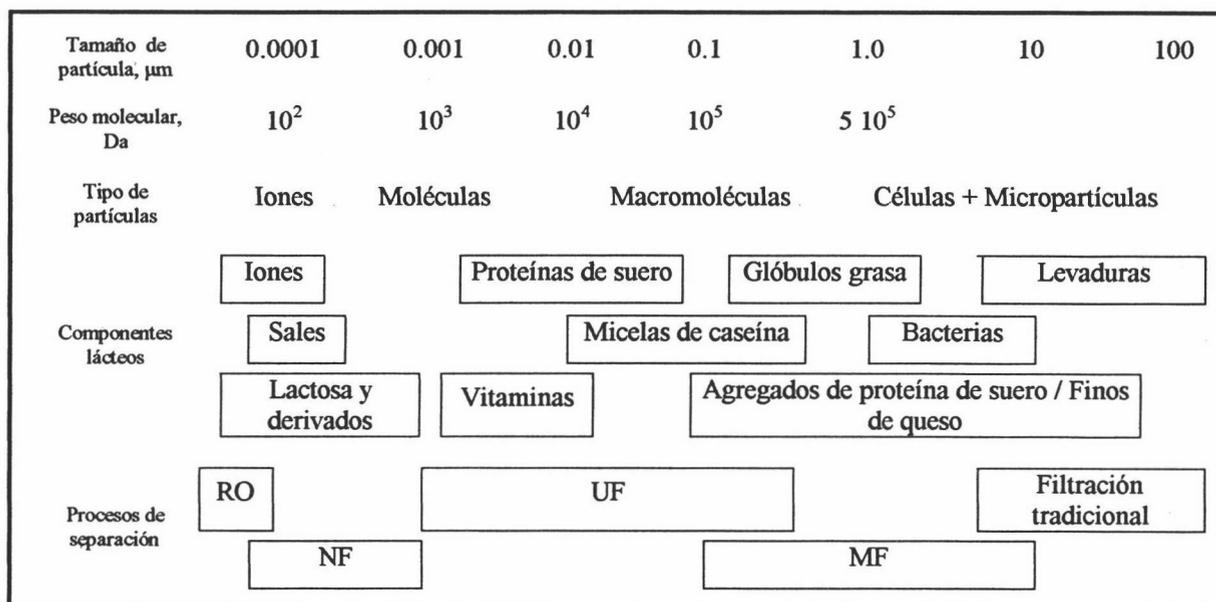


Figura 2.11 – Espectro de aplicación de los procesos de separación por membranas en la industria láctea (Gösta Bylund (1995)).

Tabla 2.14 - Tecnologías de membrana utilizadas en la industria láctea.

Técnica	P, bar	Usos en la industria láctea
RO	30-60	Eliminación de agua en suero (Pepper y col.(1988), Sandfort y col. (1988))
NF	20-40	Desmineralización parcial del suero.
UF	1-10	Concentrar proteínas lácteas en leche y suero. Estandarización de las proteínas de la leche utilizada para la fabricación de queso, yogurt y otros productos.
MF	<1	Reducir el contenido bacteriano de leche desnatada, suero y salmuera. Eliminar la grasa de sueros que van a concentrarse (WPC).

Los módulos de fibra hueca constan de carcassas cilíndricas en cuyo interior se distribuyen una serie de fibras unidas a los extremos del cilindro. Habitualmente el alimento fluye por el interior de las fibras (lumen) recogiendo el permeado en el espacio comprendido entre la carcasa y las fibras (espacio extracapilar o ECS). En la **Tabla 2.15** se señalan módulos de fibra hueca suministrados por distintas casas comerciales. Esta configuración de fibra hueca es la utilizada en este trabajo de investigación.

La configuración de las membranas de fibra hueca es generalmente tubular, oscilando el diámetro de las fibras entre 0.2 y 3 mm y el espesor de la pared entre 7 y 400 μ m. Estas fibras son similares unas a otras y están unidas a ambos extremos del módulo. La carcasa exterior suele estar fabricada en poliestireno, PVC o acero inoxidable.

Habitualmente estos módulos suelen ser utilizados en ultra- y microfiltración de forma que el alimento se bombea por el interior del tubo, recogiendo el permeado por el ECS.

Tabla 2.15 - Módulos de fibra hueca comerciales.

Casas comerciales	Proceso de separación
Akzo Nobel Faser AG Membrana	DL
AquaSource	MF
Asahi Glass Kasei	UF, MF, DL
Celgard LLC (Hoechst)	UF, MF
DuPont	RO
Innovative Membrane Systems, Inc	Gas
Millenniumpore Limited	UF, MF
Pall Corporation	UF, MF
US Filter	MF
WorldWide Water Systems Inc.	UF

MF=microfiltración, UF=ultrafiltración, RO=ósmosis inversa, Gas=separación de gases, DL=diálisis

Las condiciones en la que se opera habitualmente en módulos de fibra hueca son las siguientes:

1. La velocidad de flujo recomendada suele oscilar entre 0.5 y 2.5 m s^{-1} , alcanzándose un número de Reynolds comprendido entre 500 y 3.000 , operando muchos de ellos en flujo laminar con unas caídas de presión comprendidas ente 0.3 y 1.4 bares aproximadamente. Estas caídas de presión hacen que estos módulos sean de los más económicos en términos de consumo energético.
2. Las velocidades rasantes son muy altas en los módulos de fibra hueca debido a que las fibras tienen un diámetro muy pequeño y una alta velocidad.
3. Muchos módulos tienen una alta relación área superficial/volumen con valores comprendidos entre 100 y $2.000 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$.
4. Los módulos de fibra hueca tienen habitualmente unas caídas de presión transmembrana pequeñas (máximo 1.8 bares) que pueden oscilar en función de la temperatura de trabajo y longitud de las fibras.
5. Debido al pequeño diámetro de las fibras éstas pueden obturarse, por lo que es conveniente realizar un prefiltrado antes de su utilización.
6. Otra ventaja de los módulos de fibra hueca es su capacidad de autolavado que aumenta la limpieza de la membrana.
7. El coste de reemplazar la membrana es caro ya que si se estropea cualquier fibra es necesario desechar el módulo entero, debiendo ser reemplazado.
8. Una gran planta que utilice módulos de fibra hueca para realizar ultra- o microfiltración necesita, aproximadamente, una inversión (incluyendo costes de

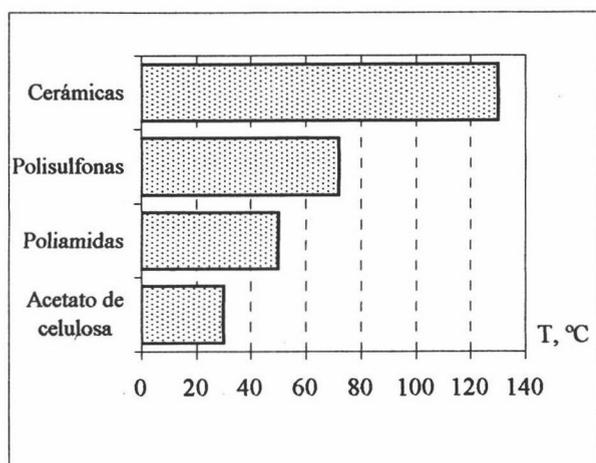


Figura 2.12 – Estabilidad térmica de las membranas (Fig.2.17-Cheryan (1998a))

bombas, control y limpieza) de $1.000-1.500\$(1998)/\text{m}^2$. La sustitución de módulos puede suponer un coste de aproximadamente $600 \$(1998)/\text{m}^2$.

Las membranas se fabrican a partir de distintos materiales, siendo el acetato de celulosa el que puede ser utilizado en un mayor rango de

presiones transmembranas. En las Figuras 2.12 y 2.13 se muestra el comportamiento que ofrecen distintos materiales a distintas temperaturas y pH de trabajo, respectivamente. Estos factores interactúan entre sí junto a otros como, por ejemplo, la presencia de cloro y el ensuciamiento o “fouling”.

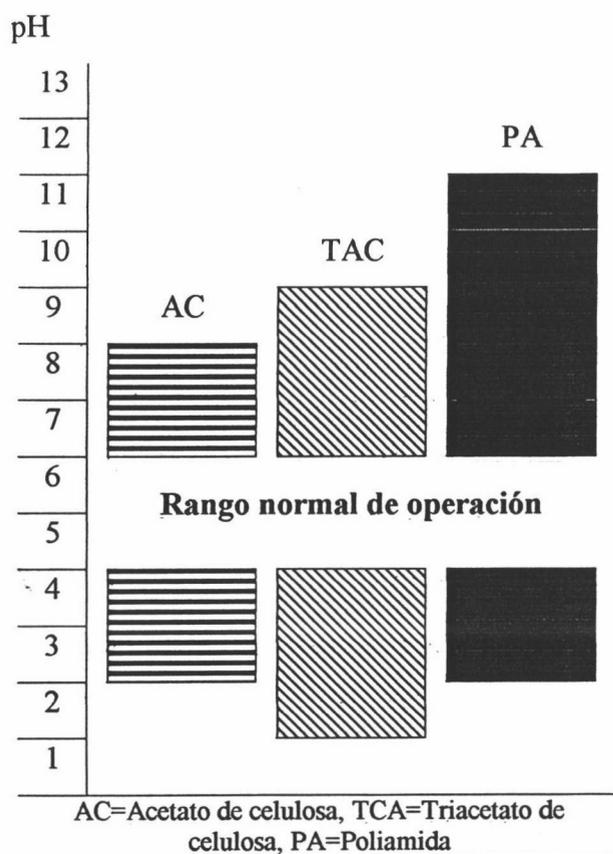


Figura 2.13 – Estabilidad de membranas frente a pH. (Fig.2.13-Cheryan (1998a))

El acetato de celulosa es el material que más ha sido utilizado para la fabricación de membranas ya que posee una serie de ventajas que la hacen idónea en muchos casos:

a) El acetato de celulosa es hidrofílico, de forma que se minimiza el efecto de ensuciamiento de la membrana.

b) Pueden fabricarse membranas con unos rangos de tamaño de poro amplios y flujos razonablemente altos.

c) Es un material barato con el que se puede trabajar fácilmente.

Por el contrario posee una serie de inconvenientes en su uso industrial:

- a) Un rango de temperaturas estrecho, recomendando los fabricantes no superar los 30°C (temperaturas mayores conllevarían difusividades mayores y viscosidades menores). Por otro lado es a estas temperaturas cuando se produce un mayor desarrollo de la contaminación bacteriana.
- b) Un rango de pH estrecho, comprendido entre 2 y 8, pudiéndose perder la integridad estructural a pH fuera de este rango.
- c) Escasa resistencia al cloro, principal agente desinfectante en las industrias.
- d) Bajo altas presiones la membrana puede compactarse.
- e) Debido a la naturaleza orgánica de la celulosa ésta es biodegradable, siendo susceptible al ataque microbiano.

De todas formas estas variables limitantes (pH, temperatura y presión) interaccionan fuertemente entre sí, dependiendo el efecto del pH sobre la membrana de la temperatura y presión de trabajo.

Las membranas fabricadas con poliamidas mejoran algunos de los problemas asociados a las membranas fabricadas con acetato de celulosa, ya que este material tolera valores de pH comprendidos entre 3 y 11, aunque tiene menor tolerancia al cloro y mayor tendencia a obturarse.

Las membranas de la familia de las polisulfonas son ampliamente usadas en microfiltración y ultrafiltración. Los grupos $-SO_2$ en las sulfonas poliméricas son bastante estables y la inclusión de grupos fenilo dentro de la estructura confiere a la estructura una mayor rigidez, resistencia a la compactación y a la temperatura. Los grupos fenil-éter y fenil-sulfona tienen alta estabilidad térmica y oxidativa, obteniéndose membranas estables a temperaturas mayores durante mayor tiempo de uso.

Las membranas fabricadas con polisulfona (PS) y polietersulfona (PES) son muy utilizadas en MF y UF debido a las ventajas que poseen:

- a) Límites de temperatura amplios, pudiéndose alcanzar temperaturas superiores a $75^{\circ}C$, muy útil en distintos procesos biotecnológicos donde es necesario esterilizar a temperaturas altas y en algunos procesos donde la viscosidad de los fluidos es mucho menor a altas temperaturas.
- b) Amplio rango de tolerancia frente a pH (1 a 13) que permite utilizar métodos de limpieza tradicionales.
- c) Buena resistencia al cloro que permite una buena limpieza (exposiciones prologadas pueden no obstante dañar la membrana).
- d) Fácil fabricación y amplia variedad de configuraciones y módulos.
- e) Amplio rango de tamaño de poros (10Å a $0.2\mu\text{m}$).
- f) Buena resistencia a hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos halogenados, alcoholes y ácidos. Sin embargo no ofrece mucha resistencia a hidrocarburos aromáticos éteres y esterres.

Los principales inconvenientes que tienen este tipo de membranas son:

- a) Bajos límites de presión transmembrana (1.7 bares para membranas polisulfónicas utilizadas en módulos de fibra hueca).
- b) Carácter hidrófobo que conlleva una tendencia a interactuar de forma importante con gran variedad de solutos, haciéndola más proclive al “fouling” en comparación con polímeros más hidrofílicos como la celulosa y celulosa regenerada.

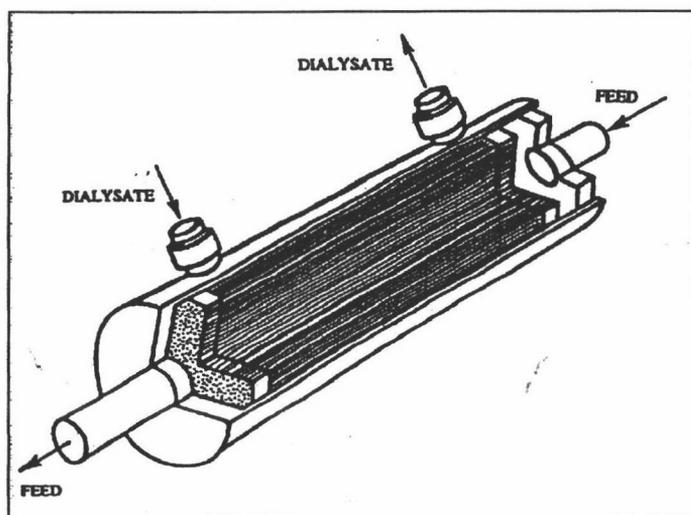


Figura 2.14 – Módulo de fibra hueca con geometría “opened-end”.

Existen otros materiales poliméricos utilizados para la fabricación de membranas utilizadas en UF y MF. Entre ellos podemos destacar la celulosa regenerada (RC) que tiene un carácter hidrofílico alto y baja tendencia a adsorber proteínas. Posee una buena resistencia a disolventes comunes como butanol y etanol y puede tolerar temperaturas superiores a

75°C (Cheryan (1998a)).

Así mismo los fabricantes incluyen distintos grupos funcionales dentro de la estructura del material que constituye la membrana de forma que pueden modificar de alguna manera las características originales de los materiales.

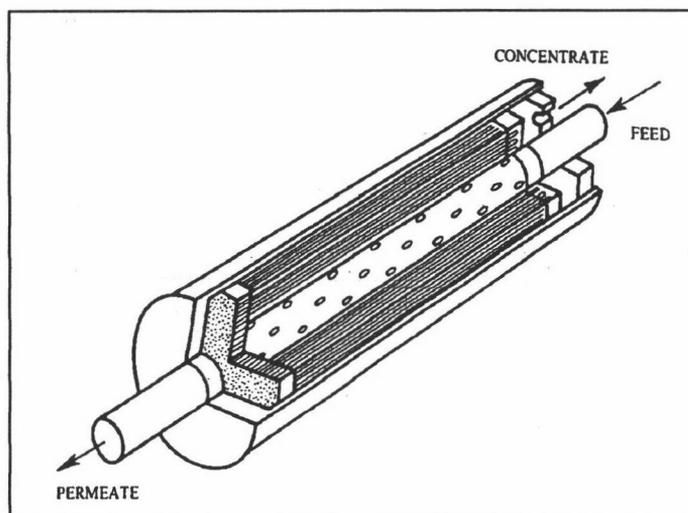


Figura 2.15 Módulo de fibra hueca con geometría “closed-end”.

Se pueden distinguir dos geometrías básicas para los modelos de fibra hueca en función del flujo que tiene lugar por el interior de las fibras:

geometría “closed-end” o cerrada al final y “opened-end”, abierta al final o de recirculación (Figura 2.14 y 2.15, respectivamente).

En los módulos de fibra hueca con geometría cerrada al final la alimentación se realiza por un tubo perforado colocado de forma longitudinal en el centro del módulo. La disolución que ha podido atravesar la membrana pasando al interior de las fibras, circula hasta el final del módulo donde se recoge. La parte del alimento que no ha podido pasar al interior de la membrana se recoge por otra salida que posee el módulo. El control de la polarización por concentración es muy pobre, siendo utilizado este tipo de módulos para la separación de gases, en procesos de ósmosis inversa y como reactores de membrana (Bressollier y col. (1988), Nakajima y col. (1988/1990), Sims y col. (1992)) entre otras aplicaciones.

En los módulos de fibra hueca con geometría abierta al final o reactores de recirculación existen dos flujos paralelos: uno circula por el interior de las fibras (lumen) mientras que el otro flujo se sitúa por el exterior de estas, en el espacio comprendido entre la carcasa y fibras (ECS). Este tipo de geometrías es el utilizado en procesos de diálisis y en reactores de membrana, por ejemplo, en hidrólisis de proteínas (Deeslie y col. (1981/1982), Fink y col. (1975)).

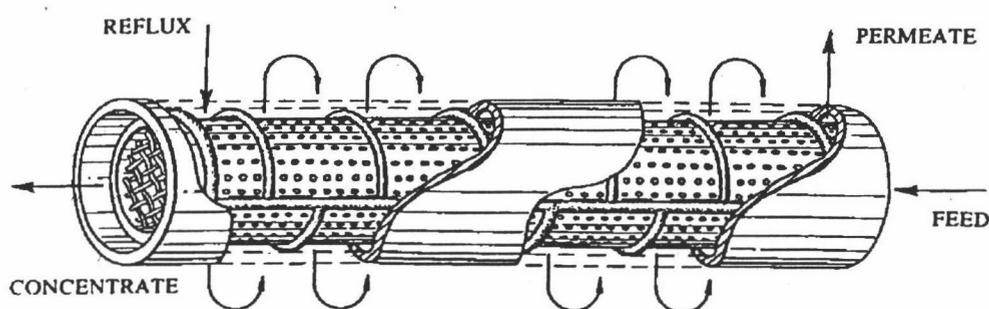


Figura 2.16 – Módulo de fibra hueca con flujo transversal (Futselaar (1993))

Existen otros modelos menos utilizados como el de membrana con flujo transversal cuya estructura se asemeja a los intercambiadores de calor de flujo cruzado. Con esta estructura se pretende minimizar la polarización que puedan sufrir las membranas.

2.3.4 Factores a considerar en la selección de la membrana.

Tamaño de la molécula.

Este es el factor principal a tener en cuenta a la hora de elegir un tipo de membrana. Cuando lo que se pretende es la separación de sustancias de muy distinto peso molecular (por ejemplo, proteínas y sales) el peso molecular de corte de la membrana, fracción de soluto retenida por la membrana cuando a través de ellas se hace circular una disolución bajo presión, será el principal parámetro a tener en cuenta.

Este parámetro es una medida relativa del tamaño de poro de la membrana, ya que la fracción que queda retenida dependerá además de otros factores como las condiciones de operación, la caída de presión a través de las fibras, la velocidad de flujo y la concentración de soluto.

La permeabilidad hidráulica de las membranas en un proceso de UF o MF llevado a cabo en un módulo de fibra hueca tiene gran importancia debido a que el transporte de soluto que se produce a través de la membrana, es mucho más rápido que el que correspondería exclusivamente a una difusión molecular a través de ella y de las películas líquidas formadas, debido a la existencia de una presión diferencial a ambos lados de la membrana. Esta caída de presión en los reactores de fibra hueca se debe a aquellos factores que crean una diferencia de presión a ambos lados de la membrana (entre el espacio extracapilar (ECS) y el interior de las fibras (lumen)): caída de presión debido a la circulación del fluido a través de la membrana y diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana entre otros.

Cuando la meta es el fraccionamiento (por ejemplo, separación de proteínas de tamaños moleculares distintos) la separación de fracciones similares no se realizará tan sólo sobre la base del tamaño, sino que habrá que contar con otra serie de factores.

La selección final de la membrana se debe realizar teniendo en cuenta pruebas experimentales realizadas en el medio de operación utilizado.

Forma de la molécula.

La forma y conformación de las macromoléculas viene afectado por la fuerza iónica, temperatura e interacciones con otros componentes. Las diferencias en la forma, especialmente bajo condiciones de esfuerzos cortantes elevados, podrían ser la razón

por la que el peso molecular de corte puede ser distinto para compuestos de masa similar.

Material de la membrana.

La naturaleza química de la membrana puede afectar a las interacciones soluto-membrana (por ejemplo, en el ensuciamiento de éstas) de manera que, de forma general, cuando se trabaja con disoluciones acuosas en membranas construidas con materiales hidrofílicos, se observan flujos mayores y efectos de adsorción menores que cuando se utilizan membranas fabricadas con materiales hidrófobos.

Presencia de otros solutos.

De forma general los solutos cuyo tamaño molecular es mucho más pequeño que los poros de la membrana (azúcares, sales) atravesarán la membrana libremente siempre que no interactúen o se unan a compuestos impermeables a la membrana.

Si el tamaño de poro es mucho más pequeño que el tamaño del mayor de los solutos (por ejemplo, membranas de UF de poro pequeño con proteínas de gran tamaño) los solutos serán completamente rechazados por la membrana. Sin embargo si los componentes más pequeños del alimento son del mismo orden de magnitud del tamaño de poro, el flujo de estos componentes por la membrana puede modificarse ya que las moléculas de mayor tamaño forman una segunda membrana dinámica que impide el paso de moléculas más pequeñas.

Parámetros operacionales.

Las cuatro variables operacionales que más inciden sobre el funcionamiento de la membrana son la presión transmembrana, la turbulencia cerca de la superficie de la membrana, la temperatura y la concentración de soluto. Otros factores adicionales son el pH y la fuerza iónica, ya que inciden sobre la conformación de los solutos y por tanto sobre el posible rechazo de solutos por parte de la membrana.

Configuración de la membrana.

Configuraciones distintas que utilizan una membrana de características similares arrojan resultados distintos.

Variabilidad de los distintos lotes de producción.

Efecto de adsorción y ensuciamiento o “fouling”.

El efecto de ensuciamiento o “fouling” es el resultado de interacciones específicas entre la membrana y solutos que contiene el alimento, o bien entre los solutos adsorbidos y otros solutos de la disolución. Es difícil establecer reglas generales o teorías de aplicación general ya que cada componente del alimento reacciona de forma diferente con la membrana debido a aspectos diversos.

Así algunas propiedades de la membrana afectan directamente a su ensuciamiento de forma que:

- a) Para disoluciones acuosas se deberían utilizar membranas hidrofílicas ya que en caso de estar fabricadas en materiales hidrofóbicos adsorberían moléculas hidrofóbicas (o con fracciones hidrofóbicas) que el medio contiene, potenciándose el ensuciamiento de la membrana.
- b) La modificación química de la membrana mediante la introducción de grupos hidrofílicos o hidrofóbicos en la estructura pueden favorecer o reducir este efecto.
- c) La superficie rugosa de la membrana favorece este efecto de “fouling”, justificándose así que, por ejemplo, las membranas de poliamida (de superficie más rugosa) sufren este efecto más que las de acetato de celulosa de superficies más lisas y uniformes.
- d) El tamaño relativo de los poros y solutos es un factor muy importante también ya que estos orificios pueden obturarse reduciéndose el flujo a través de la membrana.

De igual manera las propiedades químicas de los solutos contenidos en el alimento afectan en gran manera a este efecto. Así, mientras que los azúcares de bajo peso molecular no parecen ejercer efecto alguno sobre el flujo y las propiedades de separación de las membranas de MF y UF, las proteínas tienen una gran capacidad para “ensuciar” las membranas debido a su estructura y al gran número de grupos funcionales que poseen, causando efectos muy importantes que dependerán del medio

de reacción (pH, fuerza iónica) y de los parámetros de operación pudiendo obturar las membranas a pH próximos a su punto isoeléctrico (momento en el que las proteínas se hacen inestables), obteniéndose flujos menores. Por otro lado las grasas y aceites tendrían de forma general flujos mayores en membranas hidrofílicas. También el pH y las sales disueltas en el alimento pueden provocar la precipitación de distintos componentes sobre la superficie de la membrana.

Los parámetros de proceso que influyen en mayor manera sobre el ensuciamiento de la membrana son:

- a) La velocidad de flujo del alimento y la turbulencia del medio. Valores altos de estos parámetros disminuyen de forma general la deposición de materiales sobre la membrana y reducen la resistencia hidráulica de la capa límite que adquiere un espesor menor. No obstante una mayor velocidad de flujo provoca unos esfuerzos cortantes mayores que puede provocar la deposición de las partículas de tamaño más pequeño sobre la superficie de la membrana.
- b) El efecto de la temperatura no es muy claro ya que, si bien un aumento favorece el flujo a través de la membrana debido a la disminución de la viscosidad del alimento o la disolución de compuestos del alimento más o menos insolubles, temperaturas demasiado altas pueden provocar la desnaturalización de las proteínas u otros daños sobre la membrana. Además, en el rango de temperaturas de mayor interés en los procesos de ultrafiltración (30-60°C) la adsorción de la proteína sobre la membrana aumenta generalmente con la temperatura (**Cheryan (1998b)**).
- c) De igual forma un aumento de presión puede favorecer el flujo a través de la membrana. Sin embargo altas presiones pueden provocar una compresión de la capa límite que provoca una reducción en la velocidad de flujo.

El efecto de la adsorción de solutos sobre la membrana es estudiado por distintos autores que plantean distintos modelos de adsorción y de polarización por concentración (**Wojciechowski y col. (1990)**, **Gekas y col. (1993)**) algunos de los cuales son corroborados mediante datos experimentales (**Aimar y col. (1986)**, **Robertson y col. (1990)**).

Estas interacciones membrana-proteína pueden causar cambios en la estructura de la molécula adsorbida. Así cuando moléculas de BSA se adsorben sobre una superficie de acetato de celulosa regenerada (hidrófila) adquieren una estructura globular mayor que cuando se encuentran en estado libre. Sin embargo, al entrar en contacto con membranas fabricadas con polisulfona, la proteína aparece filamentosa, más “abierta” o desnaturalizada. De forma similar, la actividad de las enzimas que hidrolizan carbohidratos (α -galactosidasa, β -galactosidasa y glucosa isomerasa) se ve seriamente afectada por las membranas de polisulfona (apartado 2.1.2).

De forma general las membranas fabricadas con celulosa o celulosa regenerada tienen menor capacidad para adsorber proteínas que las membranas fabricadas con polisulfona o nylon aunque es difícil dar una regla general ya que dependerá de las características específicas del material utilizado por cada fabricante y del tipo de proteína que nos ocupe.

Polarización por concentración.

Uno de los efectos más importantes producidos durante el funcionamiento de la membrana es la polarización por concentración. Este efecto consiste en la acumulación de soluto rechazado en las inmediaciones de la membrana con formación de un perfil de concentración en la interfase membrana-disolución que provoca una reducción drástica del flujo de permeado. La restricción que esta capa ofrece a la movilidad de las moléculas acumuladas en la capa límite hace que se encuentren en una configuración de empaquetamiento más o menos compacto que podría llegar a formar una capa de gel.

La formación de la capa límite que se forma en cualquier proceso de filtración es un proceso rápido y reversible, desapareciendo cuando cesa la causa que la produce (diferencia de presión) (Álvarez y col. (1989c), Andrés y col. (1991)). Sin embargo la formación de la capa de gel es más lenta y habitualmente permanente.

Algunos autores han descrito el proceso de ultrafiltración en tres etapas de duración diferente: la primera consiste en la formación de la capa límite de concentración en estado pseudoestacionario y se alcanza en menos de cinco segundos; en una segunda etapa se adsorbe el soluto sobre la membrana y dura entre uno y diez

minutos; la última comprende la formación de la capa de gel sobre la membrana, requiriendo para su formación una duración superior a diez minutos.

De todas formas la polarización por concentración no justifica por sí misma la disminución de flujo de permeado que se observa experimentalmente. Para explicar este efecto es necesario considerar fenómenos relacionados y/o provocados por la polarización por concentración. Entre los principales se encuentra la adsorción de soluto sobre la membrana, el ensuciamiento de la misma ("fouling") y en algunos casos el aumento de la presión osmótica debido a la capa límite de concentración.

El aumento de la concentración de soluto en la superficie de la membrana causa un aumento de la presión osmótica que puede provocar una disminución en la fuerza impulsora que quedaría definida ahora por la diferencia entre la presión transmembrana total y la presión osmótica. Este efecto puede tener un orden de magnitud importante en procesos de ósmosis inversa (RO) con moléculas pequeñas en disolución, pero durante la UF y MF este efecto tendrá generalmente un orden de magnitud pequeño ya que el peso molecular de las especies rechazadas por la membrana suele ser alto. De todas formas este efecto podría llegar a ser importante si la concentración local de soluto en la capa límite fuera alta tal y como indica **Taylor y col. (1994)** y **Patkar y col. (1995)**.

Los efectos que causa la polarización por concentración se pueden minimizar mediante la elección de unas condiciones de operación óptimas y realizando adecuadamente la elección del módulo de filtración. Algunas estrategias básicas para disminuir la polarización por concentración en diseños comerciales serían:

- a) Aumentar el flujo de circulación en régimen turbulento.
- b) Elevar la temperatura de operación dentro de los límites posibles, de forma que disminuya la viscosidad de la capa límite y la pérdida de carga a través del módulo.
- c) Aumentar el esfuerzo cortante sobre la superficie de la membrana para reducir la capa de polarización y cambiar el sentido de flujo durante el proceso de filtración (**Piret y col. (1990)**, **Taylor y col. (1994)**, **Patkar y col. (1995)**, **Taylor y col. (1995)**)
- d) Favorecer la mezcla por convección, evitando largos recorridos rectos y lisos por medio de codos.

- e) Así mismo algunos autores (Taylor y col. (1994), Patkar y col. (1995), Taylor y col. (1995)), para eliminar la capa de polarización de algún soluto de interés (por ejemplo, compuestos que inciden en el crecimiento de los microorganismos que se encuentran a un lado de la membrana) proponen aumentar la concentración de otras especies que también sean rechazadas por la membrana de forma que retiren de la membrana aquellas que sean de interés para el proceso.

En función de la geometría del sistema y de distintas simplificaciones realizadas, diversos autores han propuesto modelos matemáticos más o menos complejos que recogen alguno o varios de los efectos que causa la polarización por concentración (Gekas y col. (1993), Taylor y col. (1994), Patkar y col. (1995)) verificando la bondad de los modelos a partir de los datos experimentales recogidos en sus publicaciones. Otros autores proponen modelos matemáticos y expresiones analíticas sin corroboración experimental alguna que incorporan la configuración de la membrana y los procesos que pueden ocurrir en la proximidad de la membrana (Álvarez y col. (1989a/1989b), Kelsey y col. (1990)).

2.4 Antecedentes sobre el mecanismo cinético de la hidrólisis enzimática de lactosa.

El mecanismo de hidrólisis enzimática de lactosa presente en distintos sustratos (disoluciones de lactosa, suero y leche desnatada) mediante β -galactosidasa ha sido estudiado por muchos autores, recogiéndose en la **Tabla 2.16** los modelos cinéticos recopilados en bibliografía. En ella se puede observar que en la mayoría de los artículos recopilados se propone un modelo cinético de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa. Sin embargo, existe gran dispersión de los valores de las constantes cinéticas propuestas por estos autores (**Tabla 5.9**).

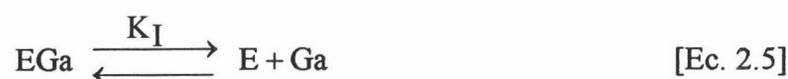
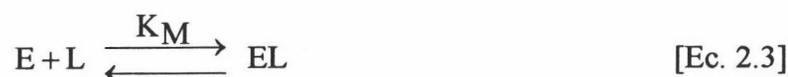
Muchos autores (Kim y col. (1983), Bódalo y col. (1995), Flores y col. (1996)) estudian el comportamiento cinético de estas enzimas (tanto la cinética de desactivación como la de hidrólisis) utilizando como sustrato ONPG (orto-nitro-fenilgalactopiranosido). Si bien el mecanismo de reacción es similar al de la lactosa, los valores de las constantes cinéticas y energías de activación obtenidos no son extrapolables al comportamiento que la enzima presenta en presencia de lactosa.

Tabla 2.16 - Modelos cinéticos propuestos por diferentes autores para la hidrólisis enzimática de lactosa

Modelo cinético propuesto	Referencia
Michaelis-Menten de primer orden	Santos y col. (1996)
Michaelis-Menten sin inhibición por galactosa (con formación de complejo enzimático enzima-lactosa)	Berrueta-Jiménez y col. (1988)
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto (galactosa total)	Korus y col. (1978), Friend y col. (1982), Ho Kim y col. (1983), Kim y col. (1983), Ma y col. (1983), Huffman y col. (1985), Berrueta-Jiménez y col. (1988), Yang y col. (1989a/1989b), Bakken y col. (1990/1991/1992), Papayannakos y col. (1993), Heng y col. (1994), Cavaille y col. (1995), Carrara y col. (1996/1997), Portaccio y col. (1998), Santos y col. (1998), Illanes y col. (1998/2000/2001), Ladero y col. (2001)
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto (α - y β -galactosa)	Flaschel y col. (1982), Peterson y col. (1989)
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto (glucosa)	Cavaille y col. (1995)
Con formación de di-, tri- y tetrasacáridos	Iwasaki y col. (1996)

2.4.1 Modelo cinético.

El mecanismo de inhibición competitiva por galactosa es el más empleado para la interpretación de los resultados (Tabla 2.16). Viene dado por las ecuaciones siguientes:



donde L, Ga y G son lactosa, galactosa y glucosa respectivamente; E, la enzima lactasa empleada; y EL y EGa los complejos enzima-lactosa y enzima-galactosa, respectivamente.

Si consideramos despreciables las concentraciones de los complejos enzimáticos EL y EGa, las concentraciones de lactosa, galactosa y glucosa se definen en función de la conversión como:

$$L = L_0 (1 - x) \quad [\text{Ec. 2.6}]$$

$$Ga = Ga_0 + L_0 x \quad [\text{Ec. 2.7}]$$

$$G = G_0 + L_0 x \quad [\text{Ec. 2.8}]$$

y como la concentración de glucosa inicial es 0, la conversión del sistema, x, se evalúa como G/L_0 , a partir de la concentración de glucosa medida en cada momento

El modelo cinético propuesto implica dos etapas en equilibrio, [Ec. 2.3] y [Ec. 2.5], y otra etapa, [Ec. 2.4], controlante de la reacción, donde el complejo enzima-lactosa se descompone en un complejo enzima-galactosa liberando glucosa.

Las constantes de equilibrio de la ecuaciones [Ec. 2.3] y [Ec. 2.5] se definen por la ecuaciones:

$$K_M = \frac{E L}{EL} \quad [\text{Ec. 2.9}]$$

$$K_I = \frac{E Ga}{EGa} \quad [\text{Ec. 2.10}]$$

La velocidad de reacción viene expresada por:

$$r = k EL = \frac{dG}{dt} \quad [\text{Ec. 2.11}]$$

Realizando un balance de enzima al sistema obtenemos:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{L}{K_M} + \frac{Ga}{K_I}} \quad [\text{Ec. 2.12}]$$

donde E es la concentración de enzima libre activa presente en el medio de reacción, e_T representa los moles totales de enzima activa por gramo de complejo enzimático utilizado y C_E los gramos de complejo enzimático por litro.

Sustituyendo dentro de la ecuación [Ec. 2.11] la concentración del complejo enzimático EL [Ec. 2.9], e incluyendo dentro de la expresión la conversión, x, y la concentración de enzima libre, E [Ec. 2.12], la velocidad de reacción vendrá definida como:

$$L_0 \frac{dx}{dt} = \frac{k e_T C_E L_0 (1-x)}{K_M + L_0 (1-x) + \frac{K_M}{K_I} (Ga_0 + L_0 x)} \quad [\text{Ec. 2.13}]$$

Separando variables, integrando, considerando que para $t=0$ el valor de x es 0, y definiendo S_0 como:

$$S_0 = L_0 + Ga_0 \quad [\text{Ec. 2.14}]$$

concluimos que:

$$K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I}\right) [-\ln(1-x)] + L_0 x \left(1 - \frac{K_M}{K_I}\right) = k e_T \int_0^t C_E dt \quad [\text{Ec. 2.15}]$$

En caso de no producirse desactivación enzimática alguna, tenemos que $C_E = C_{E0} = \text{constante}$; y por tanto:

$$K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I}\right) [-\ln(1-x)] + L_0 x \left(1 - \frac{K_M}{K_I}\right) = k e_T C_{E0} t \quad [\text{Ec. 2.16}]$$

que puede linealizarse de la forma:

$$\frac{C_{E0} t}{x} = \frac{K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I}\right)}{k e_T} \frac{[-\ln(1-x)]}{x} + \frac{L_0 \left(1 - \frac{K_M}{K_I}\right)}{k e_T} \quad [\text{Ec. 2.17}]$$

de modo que si el modelo propuesto es válido, la representación de $(C_{E0} t/x)$ frente a $[-\ln(1-x)]/x$ debe ajustar los datos experimentales a una recta de cuya pendiente y ordenada en el origen puede obtenerse el valor de k , K_M y K_I .

2.4.2 Caracterización de la enzima β -galactosidasa.

Las enzimas utilizadas para la hidrólisis de lactosa son fundamentalmente β -galactosidasas [EC.3.2.1.23] de distinto origen siendo las enzimas provenientes de levaduras y hongos las que poseen mayor interés comercial ya que son consideradas seguras para el consumo humano. Se han realizado muchos estudios con β -galactosidasas obtenidas a partir de *Escherichia coli* y, aunque su uso no es viable para productos destinados a consumo humano (Kim y col. (1983), Walsh y col. (1993), Heng y col. (1994), González Siso (1996), Fujikawa y col. (1997), Sungur y col.(1999)) si es utilizada para fines analíticos.

El peso molecular de las lactasas varía en función del origen que posea, observándose en la **Tabla 2.17** que, al menos en los trabajos consultados, el valor es superior a 100.000.

Figura 2.17 – Peso molecular de lactasas procedentes de distintos orígenes.

Fuente	Peso molecular	Número de subunidades	Peso molecular de subunidades
Hígado de rata (Dixon y col. (1979))	127.000		
<i>Escherichia coli</i> (Dixon y col. (1979))	135.000 ó 320.000	4	34.000 ó 75.000
<i>Escherichia coli</i> (Nichtl y col. (1998))	116.000	4	
<i>Escherichia coli</i> (Jacobson y col. (1994))		4	
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (Rose (1980))	215.000		
<i>Arthrobacter sp.</i> (Rose (1980))	500.000 (a pH=6.3-6.4)		

Las condiciones de operación óptimas utilizadas habitualmente se indican en la **Tabla 2.18**, siendo las enzimas de origen fúngico las mayormente utilizadas para la hidrólisis de lactosa en productos con pH ácidos como el suero procedente de la fabricación del queso. Las enzimas procedentes de levaduras suelen utilizarse habitualmente para el tratamiento de productos con pH próximos a la neutralidad como leche y suero dulce (Harju (1987)).

Tabla 2.18 - Condiciones experimentales de las enzimas más utilizadas.

Origen	Fuente	pH (óptimo)	T, °C (óptima)	Cofactores
Fúngico	<i>Aspergillus niger</i>	3.0 – 4.0	55 – 60	
Fúngico	<i>Aspergillus oryzae</i>	5.0	50 – 55	
Levaduras	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6.6	37	Mn ⁺² , Mg ⁺² , K ⁺
Levaduras	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.9 – 7.3	35	Mn ⁺² , Na ⁺

En el mercado se pueden encontrar distintas marcas comerciales de β -galactosidasas utilizadas en la hidrólisis de lactosa (**Tabla 2.19**).

Tabla 2.19 - Lactasas comerciales utilizadas para la hidrólisis de lactosa.

Nombre comercial	Origen	Compañía	pH	T óptima, °C	Actividad	Formato
Biolactase ^R	<i>Aspergillus Oryzae</i>	Quest International Bioproduct Group				Polvo
Lactase F "Amano"	<i>Aspergillus Oryzae</i>	Amano Enzyme Inc.	4.5	60	≥9000u/g	Polvo
Lactozym 3000L	<i>Kluyveromyces Fragilis</i>	Novo Nordisk	6-7	25-40	3000 LAU ¹ /mL	Líquida
Maxilact-L/2000	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gist Brocades	6-7	30-40	2000 NLU ²	Líquida

¹LAU = Unidad de Lactasa Novo (unidad de medida de actividad normalizada (Novo Nordisk (1990))

²NLU = Unidad de Lactasa Neutra (unidad de medida de actividad normalizada (Gist Brocades)).

2.4.3 Actividad y desactivación enzimática.

El estudio de la estabilidad de las enzimas es un aspecto importante a considerar en los procesos biotecnológicos ya que puede facilitar un diseño económico de los procesos continuos llevados a cabo en bioreactores.

La actividad y estabilidad térmica de las lactasas, como la de cualquier enzima, viene determinada por diversos factores ambientales (temperatura, pH, composición del medio, esfuerzos cortantes) que pueden afectar de manera importante a la estructura tridimensional o conformación especial de la proteína (Zale y col. (1983), Henley y col. (1984), Sadana y col. (1986), Klibanov y col. (1987), Volkin y col. (1989)). La combinación de diferentes factores que pueden simultáneamente desactivar la enzima complican la interpretación de los datos de actividad.

Uno de los factores más estudiados que afectan a la actividad y estabilidad de la enzima β-galactosidasa es la influencia que los iones Ca⁺², Mg⁺², Na⁺, NH₄⁺ y K⁺ ejercen. Independientemente del origen de la enzima, en todos los trabajos consultados se indica que la presencia de iones Ca⁺² inhibe el funcionamiento de la enzima (Garman y col. (1996)). Por el contrario, el efecto que los iones Na⁺, NH₄⁺ y K⁺ ejercen sobre la actividad y estabilidad de la enzima varía en función del autor y especie analizada (Zale y col. (1983), Flores y col. (1996)). El efecto causado por estos iones parece estar relacionado con el radio de los iones monovalentes. Así los iones más pequeños (como el Na⁺) pueden entrar en la estructura de la proteína induciendo

cambios conformacionales en la estructura de la enzima que pueden reducir o eliminar su actividad. Por el contrario, la presencia de iones NH_4^+ y K^+ , que poseen un radio iónico similar, aumentan la actividad de las lactasas. Independientemente de la influencia que estos iones pueden ejercer sobre la actividad de la enzima, pueden también aumentar la resistencia de la proteína a la desactivación térmica debido a la reducción de la flexibilidad de la estructura polipeptídica.

Por otra parte la concentración de sales en el medio de reacción puede producir un apantallamiento electrostático que evita las interacciones producidas entre moléculas de proteína, por lo que a concentraciones salinas bajas (Yang y col. (1994) con enzima procedente de *Aspergillus Oryzae* operando a $\text{pH}=6$, concentraciones salinas de 0.05 M en KCl o 0.1 M en NaCl) la enzima se desactiva debido a la agregación que sufren las moléculas.

Entre los modelos más utilizados para explicar la desactivación térmica de la enzima β -galactosidasa se encuentra el modelo de desactivación de primer orden:



donde E es la concentración de enzima nativa en el medio de reacción, E_d la concentración de enzima desactivada y k_d la constante cinética de la desactivación. Este modelo reproduce los resultados experimentales especialmente para enzimas inmovilizadas (Yang y col. (1989b), Bakken y col. (1992), González-siso y col. (1994), Carrara y col. (1997), Papayannakos y col. (1993)) (Tabla 5.2). La cinética de desactivación de primer orden podría ser atribuida principalmente a la ruptura de un enlace de la estructura sensible o a la aparición de un proceso individual que produzca la desactivación de la enzima (Henley y col. (1984)).

Para explicar la desactivación enzimática de β -galactosidasas también se ha utilizado un modelo de desactivación en serie:



que indica la existencia de dos etapas irreversibles de primer orden y la presencia de enzima nativa (E) y especies modificadas (E_1 y E_2) que poseen actividades específicas diferentes a la de la enzima nativa. En el modelo, α_1 y α_2 son, respectivamente, las

actividades relativas de las especies E_1 y E_2 con respecto a la actividad específica de la enzima nativa E (Henley y col. (1984)). Este modelo ha sido aplicado por (Giancomini y col. (1998)) para determinar k_1 , k_2 , α_1 y α_2 de enzimas inmovilizadas provenientes de *Escherichia coli* y *Kluyveromyces lactis* en presencia de distintos disolventes pero a una sola temperatura de ensayo, por lo que no ha sido posible verificar el ajuste de las constantes a la ecuación de Arrhenius.

En el modelo anterior, si $k_2 = 0$:



modelo utilizado por (Giancomini y col. (1998)) para explicar la desactivación enzimática de una lactasa inmovilizada en glutaraldehido-agarosa en presencia de distintos medios de reacción.

Otro modelo habitualmente aceptado para explicar el proceso de desnaturalización de las proteínas es el modelo de Lumry y col. (1954) ([Ec. 2.21]) aplicado por diversos autores (Zale y col. (1983), Henley y col. (1986), Klivanov y col. (1987), Volkin y col. (1989), Yang y col. (1994)). Según este modelo la proteína puede transformarse de un estado nativo con actividad (N) a una forma no activa (D), siendo esta transformación reversible. La forma enzimática D puede transformarse también en otra forma enzimática (I) no activa, siendo este paso irreversible.



Para una enzima procedente de *Aspergillus Oryzae* operando a pH=6, (Yang y col. (1994)) postula que tras la desactivación de la enzima se produce una agregación de moléculas de la misma, indicando que el tamaño de la partícula agregada es función del tiempo según la ecuación:

$$d = d_0^{k_v t} \quad [\text{Ec. 2.22}]$$

donde d_0 es el diámetro inicial de la partícula, d es el diámetro de la partícula a tiempo t medida mediante la técnica DLS (Dynamic Light Scattering) y k_v la constante de velocidad.

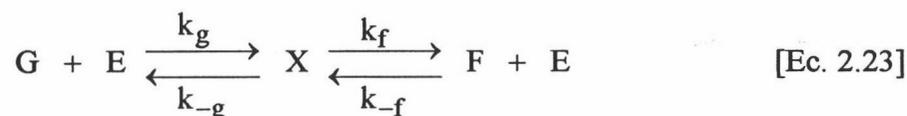
Por último, **Nichtl y col. (1998)** analiza a partir de medidas de actividad, fluorescencia, DLS y cromatografía el mecanismo de desdoblamiento, inactivación y disociación de la enzima β -galactosidasa, planteando un modelo cinético que consta de tres etapas: la formación de elementos de estructura secundaria, el colapso de la enzima a subdominios y monómeros estructurados y la asociación de la estructura cuaternaria nativa a partir de los dímeros formados, proponiendo valores de las constantes cinéticas de las semireacciones obtenidas a la temperatura de 20 °C.

Si bien la mayor parte de los autores consultados realizan ensayos puntuales de actividad o incluso miden la estabilidad térmica de la enzima, son pocos los que analizan la cinética de desactivación y muchos menos aún los que la incorporan al modelo cinético de hidrólisis. Sólo algunos autores incluyen la desactivación enzimática dentro del modelo cinético que plantean para ajustar los datos de hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasa (**Yang y col. (1989b)**, **Papayannakos y col. (1993)**, **Carrara y col (1997)**). Esto puede ser debido a que la enzima es estabilizada por el sustrato (lactosa) o el producto (galactosa) como varios autores sugieren (**Yang y col. (1994)**, **Illanes y col. (1998)**, **Mahoney y col. (1988a)**). Esto implica que la desactivación enzimática no ocurre durante la reacción de hidrólisis.

2.5 Antecedentes sobre el proceso cinético de isomerización enzimática fructosa-glucosa.

2.5.1 Modelo cinético.

La reacción de isomerización glucosa-fructosa, de acuerdo con los conocimientos actuales, transcurre según el mecanismo siguiente:



Debido a que los estudios cinéticos se realizan frecuentemente en ambos sentidos, para unificar la nomenclatura se han designado las constantes cinéticas con un subíndice que indica la hexosa que se une a la enzima para formar el complejo intermedio, y con el mismo subíndice precedido del signo menos para la etapa inversa. De esta manera la nomenclatura es independiente del sentido en que se escriba la reacción de isomerización.

Aplicando la aproximación de estado estacionario al complejo intermedio X nos queda que:

$$X = \left(\frac{F}{K_{mf}} + \frac{G}{K_{mg}} \right) E \quad [\text{Ec. 2.24}]$$

donde E es la concentración de enzima activa presente, y K_{mf} y K_{mg} representan las constantes de Michaelis-Menten para la transformación fructosa→glucosa y glucosa→fructosa respectivamente, cuyas expresiones son:

$$K_{mf} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f}, \text{ M} \quad [\text{Ec. 2.25}]$$

$$K_{mg} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_g}, \text{ M} \quad [\text{Ec. 2.26}]$$

Realizando un balance de enzima al sistema y despejando la concentración de enzima libre obtenemos que:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{F}{K_{mf}} + \frac{G}{K_{mg}}} \quad [\text{Ec. 2.27}]$$

donde e_T representa los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo utilizado, y C_E los gramos de complejo enzimático activo por litro.

De acuerdo con el mecanismo indicado en la [Ec. 2.23] y considerando las ecuaciones [Ec. 2.24] a [Ec. 2.27], la velocidad neta para la transformación fructosa-glucosa vendrá dada por:

$$r_{FG} = \frac{V_{mf}/K_{mf} \left(F - K_e G \right)}{1 + \frac{F}{K_{mf}} + \frac{G}{K_{mg}}}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 2.28}]$$

donde la velocidad máxima V_{mf} viene definida como:

$$V_{mf} = k_{-g} e_T, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 2.29}]$$

y teniendo en cuenta la expresión de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para una reacción reversible, la constante de equilibrio que aparece en la ecuación [Ec. 2.28] se define como:

$$K_e = \frac{k_{-f} k_g}{k_f k_{-g}} = \left(\frac{F}{G} \right)_{\text{en el equilibrio}} \quad [\text{Ec. 2.30}]$$

Introduciendo la conversión, x , y definiendo la concentración total de hexosas, S_0 :

$$x = \frac{G}{S_0} \quad [\text{Ec. 2.31}]$$

$$S_0 = F + G \quad [\text{Ec. 2.32}]$$

la expresión cinética correspondiente al proceso de isomerización será:

$$r_{FG} = \frac{\frac{V_{mf}}{K_{mf}} \left(1 - \frac{x}{x_e} \right)}{\left(\frac{1}{S_0} + \frac{1}{K_{mf}} \right) + \left(\frac{1}{K_{mg}} - \frac{1}{K_{mf}} \right) x}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 2.33}]$$

donde:

$$x_e = \frac{1}{1 + K_e} \quad [\text{Ec. 2.34}]$$

La ecuación [Ec. 2.33] puede transformarse en:

$$r_{FG} = \frac{k_r e_T (x_e - x)}{K_0 \left(K_1 + \frac{1}{S_0} \right) + (x_e - x)}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 2.35}]$$

donde los parámetros cinéticos k_r , K_0 y K_1 vienen definidos por las ecuaciones:

$$k_r = \frac{k_f k_{-g} + k_{-f} k_g}{k_f - k_g} \quad [\text{Ec. 2.36}]$$

$$K_0 = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f - k_g} \quad [\text{Ec. 2.37}]$$

$$K_1 = \frac{k_f k_g}{k_f k_{-g} + k_{-f} k_g} \quad [\text{Ec. 2.38}]$$

Para dar mayor generalidad al tratamiento se utiliza una variable intensiva, y , que incluye los factores que determinan el progreso de la reacción, definiéndose como:

$$y = \sum_i m_i \frac{\Delta t_i}{V_i} \quad [\text{Ec. 2.39}]$$

donde m es la masa de complejo enzimático; V , el volumen total de fase líquida en el sistema; y Δt_i , la diferencia de tiempo entre dos tomas de muestra consecutivas. Con la introducción de esta variable se puede tener en cuenta la variación de volumen total de la fase líquida y la masa de enzima retirada por la extracción de muestra.

Se introduce en la ecuación [Ec. 2.35] la variable intensiva de tratamiento, y , y partiendo de una concentración inicial de glucosa igual a cero, obtenemos la expresión:

$$r_{FG} = S_0 \frac{dx}{dy} = \frac{S_0 k'_a (x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} \quad [\text{Ec. 2.40}]$$

donde:

$$k'_a = \frac{k_r e_T}{K_0 (K_1 S_0 + 1)} \quad [\text{Ec. 2.41}]$$

$$K_b = \frac{S_0}{K_0 (K_1 S_0 + 1)} \quad [\text{Ec. 2.42}]$$

En trabajos previos **Jurado-A. y col. (1994)** y **Camacho-Rubio y col. (1996)** comprobaron que la constante $K_b \approx 0$, por lo que la cinética de la reacción de isomerización se aproximaría a una cinética de pseudoprimer orden, y por tanto:

$$K_{mf} \approx K_{mg} = K_M \quad [\text{Ec. 2.43}]$$

Esto significa que $k_f = k_g$ lo que implicaría que la afinidad de ambos isómeros por la enzima es muy similar, quedando la ecuación cinética de la forma:

$$\frac{dx}{dy} = k_a (x_e - x) \quad [\text{Ec. 2.44}]$$

Separando variables e integrando, la ecuación cinética correspondiente al proceso de isomerización vendría definida de la forma:

$$y = \frac{1}{k_a} \ln\left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x}\right) \quad [\text{Ec. 2.45}]$$

quedando reducida la constante cinética de pseudoprimer orden, k_a , a:

$$k_a = \frac{k_f e_T}{K_1 S_0 + 1} \quad [\text{Ec. 2.46}]$$

modelo cinético aplicable en diferentes reactores enzimáticos.

2.5.2 Caracterización de la enzima glucosa isomerasa

El proceso de isomerización se lleva a cabo mediante la enzima glucosa isomerasa, [EC 5.3.1.5], denominada D-xylosa ketol-isomerasa o xylosa isomerasa, pudiéndose obtener a partir de distintos microorganismos. Así, glucosa-isomerasa procedente de especies *Streptomyces* se haya formada por 4 cadenas polipeptídicas, cada una de ellas de peso molecular similar y próximo a 40.000 (Rose (1980)). Cuando se obtiene a partir del *Actinoplanes missouriensis*, la enzima nativa es un tetrámero de 4 subunidades idénticas de peso molecular 45.000 (Quax y col (1991)).

Muchos autores han puesto de manifiesto que la enzima glucosa isomerasa requiere la presencia de iones Mn^{+2} , Mg^{+2} y Co^{+2} para su actuación y estabilización. Así, Lee y col. (1993) analizan la influencia de la concentración de estos iones sobre la actividad de la enzima inmovilizada en vidrio poroso, encontrando que el ión Mg^{+2} causa un incremento de la actividad de la enzima, siendo su concentración óptima 0.1 M. La influencia del ión Co^{+2} a pH mayor a 6 es despreciable (pH óptimo para la enzima es 7).

La enzima es inhibida en presencia de xilitol y metales pesados como Ag^+ , Hg^{+2} y Cu^{+2} y la temperatura óptima de reacción encontrada por Takasaki y col.(1969) para la enzima en forma soluble, es de 80°C para un valor de pH comprendido entre 8 y 8.5.

Volkin y col. (1989) estudiaron la estabilidad de la enzima glucosa isomerasa libre e inmovilizada a un pH de 8 y distintas condiciones de operación. Demostraron que la inmovilización de la enzima aumentaba la estabilidad de forma considerable con respecto a la enzima libre. La temperatura de reacción óptima para la enzima inmovilizada era de 88°C aproximadamente, siendo la velocidad de reacción nula a 100°C.

2.5.3 Modelos cinéticos propuestos para la isomerización fructosa-glucosa mediante la enzima glucosa isomerasa.

Las investigaciones realizadas por distintos autores estudian aspectos relacionados con la desnaturalización de la enzima en las condiciones de operación: desactivación térmica, cambios de pH, envenenamiento de la enzima o cambios producidos en el soporte utilizado (en el caso de enzimas inmovilizadas), limitándose muchos de ellos a obtener los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales, lo que proporciona un conocimiento limitado de la reacción.

Sproull y col.(1976) estudian el equilibrio de isomerización utilizando células sin inmovilizar en un reactor tipo tanque agitado en un rango de temperaturas comprendido entre 30 y 80°C. También realizan estudios de desactivación a pH = 7 en ausencia de sustrato a las temperaturas de 40, 60 y 80°C proponiendo un modelo para la desnaturalización de la enzima en el que ésta se desactiva de forma irreversible por desnaturalización y por la acción de las proteasas presentes en el conjunto de células.

Estos autores no tienen en cuenta los posibles efectos de transferencia de materia y suponen que el mecanismo de reacción sigue la cinética reversible de Michaelis-Menten, permitiéndoles calcular las constantes cinéticas elementales y energías de activación.

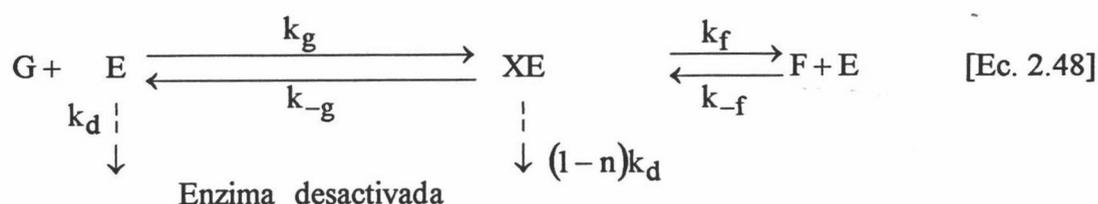
Kikkert y col. (1981) y Van Keulen y col. (1981) utilizan un reactor tanque agitado para sus experimentos, dos catalizadores industriales, ICI y RJR, y células de *Arthrobacter* libres e inmovilizadas. Eliminan los efectos de transferencia de materia interna utilizando partículas de catalizador de diámetro inferior a 140µm, pudiendo de esta forma estimar los parámetros cinéticos de la reacción a partir de las velocidades iniciales. Calculan la constante de equilibrio de la reacción de isomerización, según indica la ecuación [Ec. 2.30], comprobando que la velocidad de reacción se ajusta a una cinética de primer orden de la forma:

$$r_{FG} = k_s E (G - G_e) = k_s E \left(G - \frac{G_0}{K_e + 1} \right) \quad [\text{Ec. 2.47}]$$

donde G_0 , G_e y G , son, respectivamente, las concentraciones de glucosa inicial, en el equilibrio y en función del tiempo; k_s la constante de velocidad y K_e la constante de equilibrio de la isomerización fructosa-glucosa.

Havewala y col. (1974) utilizan glucosa isomerasa de *Streptomyces* libre e inmovilizada en vidrio de poro controlado. La conversión de glucosa a fructosa se llevaba a cabo a distintas temperaturas y una concentración de glucosa 2 M en reactor de lecho fijo y discontinuo tanque agitado. Consideran cinética de pseudoprimer orden y determinan las energías de activación para las enzimas libre e inmovilizada, resultando ser 14.5 y 15.7 Kcal/mol respectivamente. Cuando utilizan enzima inmovilizada, no obtienen diferencias en las velocidades de reacción calculadas.

Chen y col. (1987) proponen el mecanismo reversible de Briggs-Haldane para la reacción de isomerización fructosa-glucosa:



Cuando $0 < n < 1$ la desactivación del complejo enzima-sustrato es más pequeña que la de la enzima libre, por tanto la enzima está protegida por el sustrato. Cuando $n < 0$, la enzima está envenenada por el sustrato; si $n = 0$ no existe ni protección ni desactivación y si $n > 1$ la actividad de la enzima aumenta con el tiempo.

Estos autores emplean una enzima comercial, Sweetasa, con un tamaño de partícula inferior a 100 μm para eliminar los efectos de difusión interna, dentro de un reactor tipo tanque agitado, determinando los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales de reacción obtenidas en el rango de temperaturas comprendidas entre 60 y 80°C a un pH=8.25.

También estudiaron la desactivación de la enzima a las temperaturas de 70, 75 y 80°C con diferentes concentraciones de sustrato a pH=7. Según el modelo anteriormente expuesto, y considerando que la desactivación de la enzima viene dada por la expresión:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d \left(E + (1-n) XE \right) \quad [\text{Ec. 2.49}]$$

donde E y XE son las concentraciones de enzima activa libre y del complejo enzima-sustrato respectivamente, obtienen que un valor de $n=0.5$ ajusta los experimentos de desactivación, lo que indica que el sustrato protege a la enzima.

Camacho-Rubio y col. (1994) utilizan un reactor tanque agitado con enzima soluble para llevar a cabo los experimentos de isomerización. Estudian la cinética de la reacción entre 40 y 60°C a $\text{pH} = 7.5$, en unos rangos de concentración de sustrato y enzima comprendidos entre 0.5-2.0 M y 0.2-6.0 g/L respectivamente. Suponen una cinética de pseudoprimer orden y comprueban que la conversión alcanzada depende del factor intensivo $e_0 \cdot t$ (producto de concentración inicial de enzima por el tiempo), determinando las constantes cinéticas elementales de la reacción de isomerización y proponiendo ecuaciones para calcular las constantes cinéticas en función de la temperatura.

Entre los trabajos que consideran el efecto de la transferencia de materia interna o externa sobre la velocidad de isomerización se pueden citar los propuestos por **Lee y col. (1976)**, **Chen y col. (1980)**, **Straatsma y col. (1983)**, **Nakamura y col. (1984)** y **Camacho-Rubio y col. (1995)**.

Así **Lee y col. (1976)** utilizan un reactor de lecho fijo con recirculación donde se introduce la enzima inmovilizada por enlace covalente con glutaraldehído. Analizan la influencia de la transferencia de materia interna y externa modificando el tamaño de partícula del catalizador (entre 20 y 120 μm), la velocidad de flujo en el reactor y la temperatura (50 a 75°C). Determinan que para velocidades de flujo superiores a 0.1 cm/s la influencia de la transferencia de materia externa sobre la velocidad de reacción puede despreciarse. Los efectos de difusión interna se eliminan para tamaño de partículas de 20 μm y por debajo de 60°C, siendo apreciables para temperaturas superiores.

Estudian la cinética de la reacción a 50°C y $\text{pH} = 7$, determinando los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales de reacción y el valor de la constante de equilibrio a esta temperatura, igual a 1.03, considerando una cinética reversible de Michaelis-Menten.

Chen y col. (1980) desarrollan un modelo que considera para un reactor diferencial de lecho fijo, la influencia del espesor de la película formada sobre el catalizador y la resistencia difusional del poro sobre la velocidad global de isomerización de glucosa, incluyendo también la desactivación de las células inmovilizadas. Las células de *Streptomyces phaeochromogenes* fueron inmovilizadas por agregación en queratina, los diámetros de partícula estaban comprendidos entre 0.018 y 0.125 cm, el pH=8.3, las concentraciones de sustrato comprendidas entre 0.5 y 5.1 M de glucosa y las temperaturas entre 60 y 80°C.

Consideran cinética reversible de Michaelis-Menten con desactivación enzimática de primer orden, y realizan un tratamiento teórico en el que evalúan dos factores de efectividad, uno que tiene en cuenta los efectos de difusión en los poros y la desactivación y otro que además incluye los efectos de transferencia de materia en la película. Obtienen los parámetros cinéticos a partir de velocidades iniciales de reacción.

Straatsma y col. (1983) analizan en un primer artículo la estabilidad de un conjunto de células de *Arthrobacter* inmovilizadas estudiando posibles causas de desactivación enzimática (pH, temperatura y presencia de oxígeno) en los experimentos de isomerización glucosa a fructosa. Posteriormente utilizan un reactor continuo sólido-líquido con lecho catalítico demostrando que la velocidad de reacción es de pseudoprimer orden, y evalúan la constante cinética para esta reacción corrigiéndola con los efectos de transferencia de materia interna apreciados. Desarrollan una expresión que determina la estabilidad de la enzima en función del tiempo, pH y temperatura.

Nakamura y col. (1984) utiliza glucosa isomerasa de *Streptomyces phaeochromogenes* inmovilizada por atrapamiento en un reactor de lecho fluidizado para el estudio cinético de la isomerización glucosa-fructosa. Desarrollan un modelo de dispersión axial que considera la geometría de las partículas y el efecto de la difusión interna, siendo una cinética de pseudoprimer orden la que reproduce los resultados experimentales para una velocidad de flujo de 0.5cm/min.

Son más numerosos sin embargo, los estudios realizados sobre los factores que afectan al diseño óptimo de distintos reactores donde poder llevar a cabo la reacción de

isomerización fructosa-glucosa con enzimas inmovilizadas. En este sentido, **Park y col. (1981)** realizaron un estudio sobre la optimización de la temperatura de operación para un sistema de reactores de lecho fijo en funcionamiento continuo. La optimización la realizan para obtener la máxima productividad de fructosa, consiguiendo un incremento del 8% de conversión si lo comparan con el reactor de funcionamiento a temperatura constante. En estos estudios consideran una cinética reversible de Michaelis-Menten con desactivación enzimática de primer orden sin influencia de la concentración del sustrato según la expresión:

$$r_{FG} = \frac{V_m (G_0 - G_e) e^{-k_d t}}{K_m + (G_0 - G_e)} \quad [\text{Ec. 2.50}]$$

dónde G_0 y G_e son las concentraciones de sustrato inicial y de equilibrio; k_d , la constante de desactivación enzimática; y K_m y V_m la constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima de reacción modificadas, respectivamente. Estos dos parámetros cinéticos, así como la constante de equilibrio son evaluados experimentalmente en función de la temperatura. Además encuentran que la velocidad de desactivación enzimática decrece con la concentración de sustrato, lo que parece indicar que estabiliza la enzima.

Gram y col. (1990) desarrollan un sistema de reactores de lecho fijo en continuo con la enzima glucosa isomerasa (Sweetzyme Q) inmovilizada. Los autores no observan transferencia de materia externa, determinando que la isomerización es un proceso reversible de pseudoprimer orden y que la enzima sufre una desactivación de primer orden. La transferencia de materia interna no puede despreciarse para este tipo de catalizador.

Chen y col. (1983) emplean glucosa isomerasa inmovilizada en queratina con glutaraldehído en distintos tipos de reactores para estudiar la isomerización de glucosa, determinando experimentalmente las constantes cinéticas a partir de las velocidades iniciales de reacción y la difusividad efectiva de glucosa en la enzima inmovilizada. Utilizan los valores obtenidos para la aplicación de un modelo teórico de flujo de dispersión axial. Las conversiones obtenidas con distintos tipos de reactores (flujo radial, lecho fluidizado, lecho fijo) son prácticamente coincidentes y al compararlos con

el modelo teórico desarrollado concluyen que los reactores de flujo radial y lecho fluidizado pueden ser útiles para llevar a cabo esta reacción.

Vasic-Racki y col. (1991) utilizan células de *Streptomyces bambergiensis* inmovilizadas en un reactor de lecho fijo. No encuentran resistencia a la transferencia de materia interna y el coeficiente de difusión efectiva determinado experimentalmente era igual a la difusividad molecular. Simulan modelos de reactor considerando una cinética reversible de Michaelis-Menten y tienen en cuenta el efecto de transferencia de materia externa para tres reactores: flujo en pistón, tanque agitado continuo y modelo de dispersión axial, siendo este último el que reproduce mejor sus resultados experimentales.

Ching y col. (1984) emplean dos tipos de enzima inmovilizada, Sweetase y el complejo PG-GI determinando los parámetros cinéticos de las reacciones directa e inversa a 60 y 70°C. Eligen condiciones experimentales que eliminan los efectos de transferencia de materia, considerando una cinética de pseudoprimer orden y proponiendo un modelo de flujo pistón con dispersión axial que reproduce los resultados experimentales obtenidos sólo cuando las partículas empleadas eran regulares.

El reactor de lecho fluidizado ha sido estudiado por **Vos y col. (1990)**. Desarrollando un modelo teórico de reactor con transporte continuo del biocatalizador en contracorriente con la solución de sustrato. Utilizan glucosa isomerasa inmovilizada (Maxazyme) obtenida a partir de *Actinoplanes missouriensis*, considerando la cinética de la reacción como de pseudoprimer orden y desactivación de la enzima de primer orden. El flujo del fluido sigue un modelo de dispersión axial y transferencia de materia interna y externa.

Camacho-Rubio y col. (1995) utilizan un reactor de lecho fijo y de recirculación con una enzima comercial inmovilizada, Sweetzyme T, comprobando que no existe influencia de la transferencia de materia y que el reactor se comporta como diferencial en función de la temperatura. Proponen la siguiente ecuación para el cálculo

de la constante de equilibrio (K_e) en función de la temperatura basada en datos propios y encontrados en la bibliografía:

$$K_e = 24.3 \exp \left(-\frac{1022}{T} \right) \quad [\text{Ec. 2.51}]$$

Realizan el estudio cinético de la reacción estudiando la influencia de la concentración de enzima en el lecho fijo y modificando la concentración de fructosa inicial entre 0.5 y 2.0 M. Encuentra que las constantes de Michaelis-Menten para la reacción directa e inversa, K_{mf} y K_{mg} , son iguales, por lo que proponen una cinética de pseudoprimer orden. Con el fin de corroborar esta hipótesis presentan un estudio de los valores que proponen otros autores para estas constantes, calculan un factor de efectividad que les permite eliminar la influencia del transporte interno, determinar las constantes cinéticas elementales y proponer ecuaciones tipo Arrhenius para expresar su variación con la temperatura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y productos empleados.

3.1.1 Hidrólisis de lactosa.

Los productos químicos utilizados (calidad PRS) han sido glucosa, ácido cítrico, K_2HPO_4 , KCl, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, ácido tricloroacético, formaldehído (suministrados por Panreac), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Prolabo), lactosa monohidratada (Scharlau) y galactosa (Across).

Enzimas.

Se han utilizado dos β -galactosidasas comerciales:

- a) **Lactozym 3000 L Tipo HP-G** [EC.3.2.1.23] (concentración de proteína de 35 g L^{-1} , $\rho=1.2$ g mL^{-1}) suministrada por la empresa Novo Nordisk, obtenida a partir de una cepa seleccionada de la levadura *Kluyveromyces fragilis*. Posee una actividad declarada de 3000 LAU mL^{-1} (1 LAU = cantidad de enzima comercial que puede producir 1 μ mol de glucosa min^{-1} en condiciones normalizadas - concentración de lactosa de 4.7%, pH=6.5, 30°C, 30 minutos, tampón lácteo suministrado por Novo Nordisk) (Novo Nordisk (1990)).

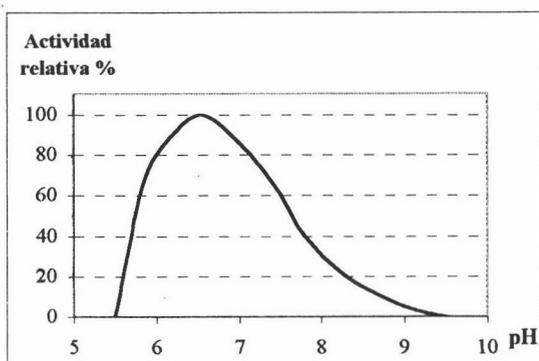


Figura 3.1—Influencia de pH sobre la actividad relativa de la enzima Lactozym en condiciones normalizadas-(Novo Nordisk (1990)).

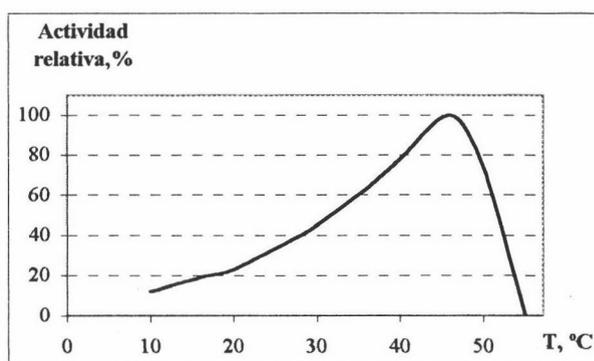


Figura 3.2 - Influencia de la temperatura sobre la actividad relativa de la enzima Lactozym en condiciones normalizadas (Novo Nordisk (1990)).

- b) **Maxilact-L/2000** [EC.3.2.1.23] suministrada por la empresa Gist-Brocades, obtenida a partir de una cepa seleccionada de la levadura *Kluyveromyces lactis*, con una actividad declarada de 2000 NLU (1 NLU = masa de enzima comercial capaz de producir 1 μ mol de ONP (*o*-nitrofenol) a partir de una disolución de

ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) en condiciones normalizadas (**Gist-Brocades**).

Tampones utilizados.

Se ha estudiado el comportamiento de ambas lactasas en dos tampones, un tampón que contiene iones de sodio (denominado Tampón Na⁺) y otro tampón que contiene iones de potasio y magnesio (denominado Tampón K⁺ y Mg⁺²).

El Tampón Na⁺ tiene una composición de 0.07 M en Na₂HPO₄·12 H₂O ajustándose el pH a 6.5 mediante la adición de ácido cítrico.

El Tampón K⁺ y Mg⁺² tiene una composición de 0.01 M en K₂HPO₄, 0.015 M en KCl y 0.012 M en MgCl₂·6H₂O, con pH = 6.75 ajustado con ácido cítrico.

3.1.2 Isomerización fructosa-glucosa.

Los productos químicos utilizados han sido Na₂CO₃ (Merck); D-(-)-fructosa (Across); MgSO₄·7H₂O y aldehído fórmico (40%) (Carlo Erba); D-(+)-glucosa anhidra (Panreac) y ácido acético glacial (Panreac) y ácido sulfúrico (95-97%) (Probus).

Enzima.

La enzima utilizada ha sido una glucosa isomerasa (D-xilosa-ketol-isomerasa [EC.5.3.1.5]) en forma soluble de nombre comercial **Spezyme GI** ($\rho=1.26$ g mL⁻¹) suministrada por la empresa Genencor International. Es un concentrado de color marrón oscuro obtenido a partir de una cepa seleccionada de *Streptomyces rubiginosus* de actividad media declarada 3500 GIU g⁻¹ (1 GIU = cantidad de enzima que es capaz de convertir glucosa a fructosa a una velocidad inicial de 1 μ mol min⁻¹ en condiciones estándar: 2.0 M en glucosa, pH=7 y 60°C). Su máxima estabilidad se encuentra a pH comprendidos entre 6.0 y 7.5.

Tampón utilizado.

La isomerización fructosa-glucosa mediante la enzima glucosa isomerasa ha sido estudiada en una disolución de iones magnesio (denominada Tampón Mg⁺²) de composición 0.55 g L⁻¹ en MgSO₄·7H₂O preparada sobre agua destilada, ajustándose el pH a 7.5 mediante adición de una disolución de Na₂CO₃ 0.1 M.

3.2 Dispositivos experimentales utilizados en las reacciones enzimáticas.

3.2.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

El dispositivo utilizado (**Figura 3.3**) consta de un tanque encamisado de vidrio de 250 mL donde la disolución objeto de estudio se mantiene en agitación continua mediante un agitador magnético. En la parte superior del tanque existen 5 bocas esmeriladas que permiten la introducción de la sonda de temperatura y pH, así como la toma de muestras del sistema.

3.2.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

El dispositivo experimental (**Figura 3.4**) consta de un tanque encamisado de vidrio de 250 mL de capacidad con agitador (donde se realiza el control de pH y temperatura), un rotámetro, un módulo de fibra hueca (FH), dos bombas peristálticas, un baño que termostatiza el sistema y un dispositivo inyector que permite tanto la extracción de muestras como la inyección de enzima.

La primera bomba peristáltica impulsa la disolución proveniente del tanque a través del rotámetro y por el interior de las fibras (lumen) del módulo de fibra hueca retornando finalmente el líquido hacia el tanque encamisado. El caudal que fluye por este primer circuito es de 40 L h^{-1} .

La segunda bomba hace recircular la disolución en contracorriente por el espacio extracapilar o ECS (espacio comprendido entre la pared exterior de las fibras y la

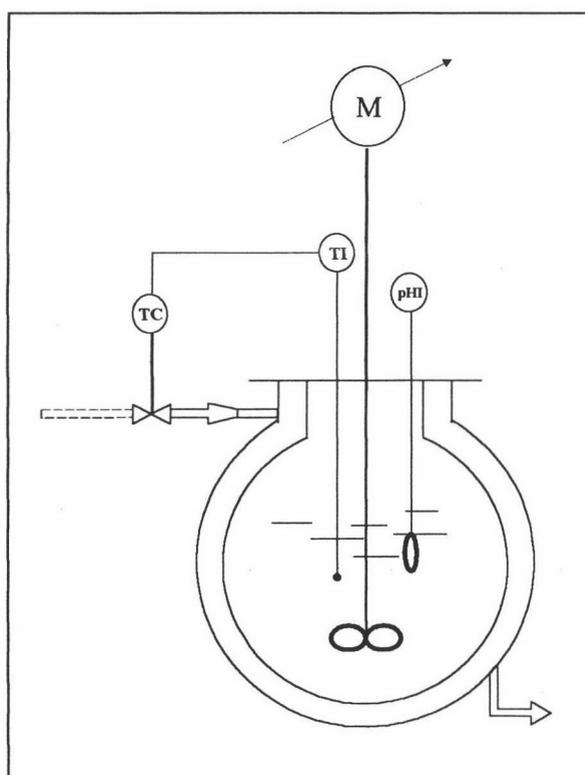


Figura 3.3 – Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

carcasa) que es donde se produce la reacción enzimática. El caudal que fluye por este segundo circuito es de 53 L h^{-1} .

El tamaño de poro de las fibras permite que el intercambio de fluidos a través de la membrana sea un proceso continuo, pudiendo ser atravesada ésta tanto por el agua de la disolución como por aquellos solutos de menor tamaño que los orificios. Por el contrario aquellos solutos que tienen un peso molecular alto no podrán atravesar esta membrana, quedando confinados a un lado de ésta.

Para verificar la homogeneidad de la temperatura dentro del sistema experimental se hizo un experimento donde, una vez termostatzado el sistema, se mide la temperatura tanto en el tanque como en el inyector de enzima, observando que la temperatura permanece constante en ambos puntos, existiendo diferencias máximas de 0.1°C .

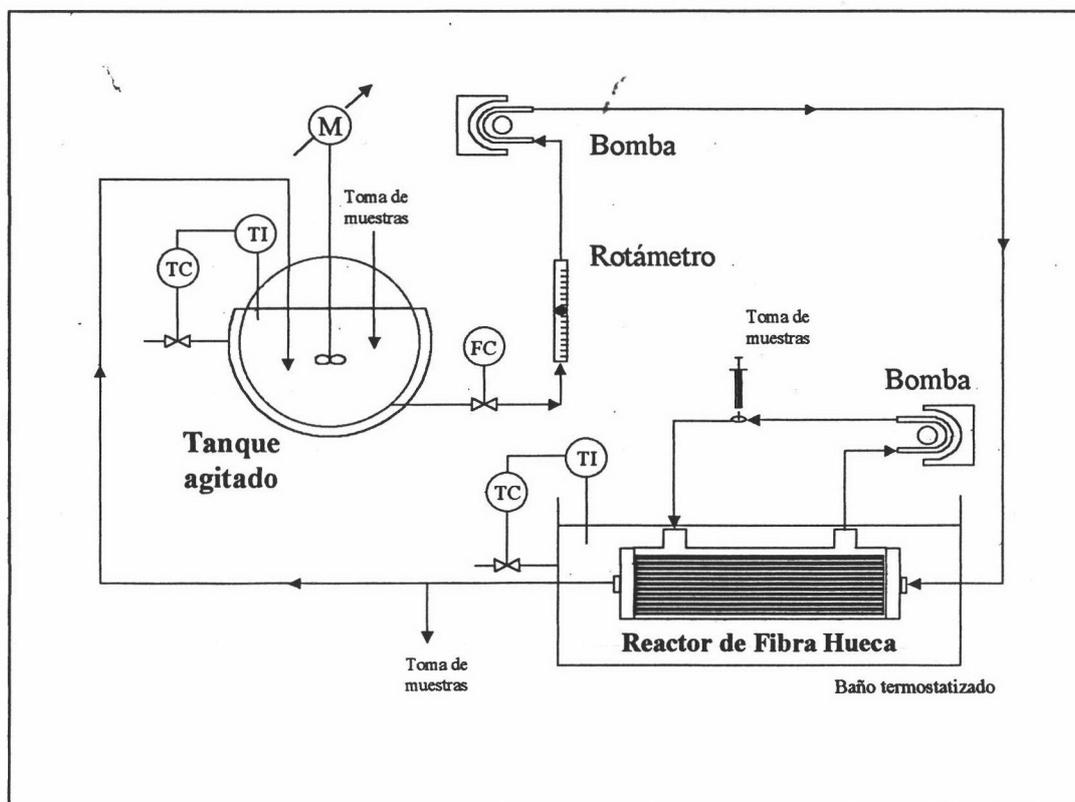


Figura 3.4 – Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

En la **Tabla 3.1** se indican los diferentes módulos de fibra hueca ensayados en el presente trabajo así como las características principales de éstos. Los módulos son dializadores utilizados habitualmente para llevar a cabo la diálisis en pacientes con

insuficiencia renal aguda, siendo suministrados por la casa comercial Bellco-Sorin Biomédica.

3.2.2.1 Mantenimiento y limpieza del RFHR.

Tras finalizar cada experimento se recircula agua destilada por todo el dispositivo experimental, tanto por el interior de la carcasa como por el interior de las fibras, con el objeto de eliminar cualquier residuo de enzima o azúcares que pudiera quedar. Para evitar el crecimiento de cualquier microorganismo dentro del módulo de reacción, tras lavar el RFHR después de cada experimento, se procede al llenado del circuito con aldehído fórmico al 1% hasta su utilización en futuros experimentos.

Antes de iniciar cada experimento será necesario lavar todo el sistema con agua destilada hasta eliminar cualquier resto de formaldehído.

3.2.2.2 Medida del volumen del ECS y del lumen.

Para determinar el volumen contenido en el interior de las fibras del módulo de fibra hueca (lumen), se hace circular agua destilada a caudales bajos por el interior de las fibras y, una vez llenas éstas, se pesa el módulo. Conociendo el peso inicial del módulo se determina el volumen de líquido contenido en el interior de las fibras (**Tabla 3.1**).

Para determinar el volumen existente entre el exterior de las fibras y la carcasa, se llena de agua destilada el circuito del lumen y del ECS y se procede a conectar las bombas de ambos circuitos. Una vez eliminadas todas las burbujas de aire del sistema, se pesa el módulo de fibra hueca. Restando el peso del líquido contenido en el lumen y el peso del módulo, se determina el volumen de líquido contenido entre el exterior de las fibras y la carcasa (**Tabla 3.1**).

El volumen contenido en las gomas que unen las dos salidas de la carcasa (donde se haya ubicado el inyector de la enzima) se calcula midiendo el volumen de agua destilada necesaria para llenarlas, obteniéndose un volumen de 51.0 mL.

El volumen del circuito del ECS será la suma del líquido contenido en las gomas y el líquido que contiene el espacio comprendido entre el exterior de las fibras y la carcasa (**Tabla 3.1**).

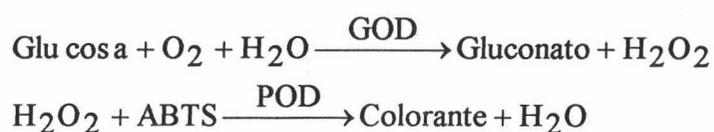
Tabla 3.1 - Dializadores de fibra hueca utilizados.

Material	Nombre comercial	Corte de membrana (KDa)	Área superficial, m ²	Volumen del circuito del ECS, mL	Peso, g	Diámetro interno, µm	Espesor pared, µm	Volumen Hemático (interior de fibras), mL	Volumen de diálisis (carcasa), mL
CUPROPHAN ^R (acetato de celulosa modificado)	NT1175	5	1.08	152.2	152.7	200	7.5	117.7	101.2
	NT1375		1.35	175.5	161.9	200	7.5	82.0	124.5
	NT1808S		1.80	155.0	165.0	200	8	99.0	86.0
	NT1975		1.95	166.2	177.1	200	7.5	117.7	115.2
POLYSULFONE ^R (polisulfona)	BLS632	17	1.89	222.6	198.9	200	40	215.1	171.6

3.3 Métodos.

3.3.1 Método de análisis de glucosa (método GOD-POD).

Para determinar la concentración de glucosa se ha utilizado un reactivo comercial suministrado por Boehringer Mannheim GmbH que aplica el método GOD-POD (método de la glucosa oxidasa-peroxidasa) propuesto por Werner y col. (1970) basado en las reacciones:



donde GOD es la enzima glucosa-oxidasa, POD es la enzima peroxidasa y ABTS (2,2'-azimodi-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)-sal diamónica]) un compuesto incoloro cuya forma oxidada produce el color verde.

Para ello en un tubo de ensayo que contiene 5 mL de reactivo se añade 0.1 mL de muestra, manteniendo el sistema a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro.

Se analizó si la presencia de fructosa, galactosa y lactosa en el medio influía en la determinación de glucosa por parte del reactivo comercial utilizado, no observándose interferencia alguna. En la **Figura 3.5** se muestra a título de ejemplo una de las rectas patrones utilizadas en la determinación de glucosa. En la misma figura se puede observar la recta de calibración obtenida en presencia de lactosa y galactosa, verificándose que ninguno de los azúcares señalados interfieren en la determinación de la concentración de glucosa.

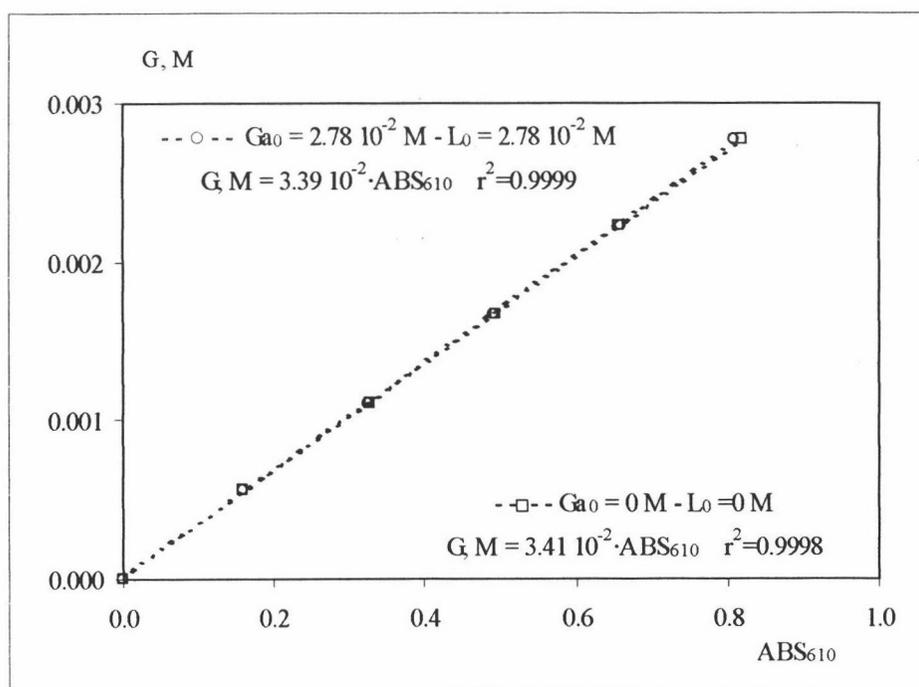


Figura 3.5 – Recta de calibrado del reactivo de glucosa. Influencia de la presencia de galactosa y lactosa sobre el análisis de glucosa.

3.3.2 Ensayo de actividad de β-galactosidasas.

Para determinar la actividad de las β-galactosidasas (Lactozym y Maxilact) se introduce en tubos de ensayo 1 mL de disolución de lactosa monohidratada 0.139 M que se encuentra a una temperatura de 30°C y se añade 1 mL de disolución de enzima de

concentración 10 g L^{-1} a temperatura ambiente. Tanto la disolución de enzima como la de lactosa se prepararon en Tampón K^+ y Mg^{+2} o en Tampón Na^+ (apartado 3.1.1) según el caso estudiado.

Cada tubo se mantiene incubado a 30°C durante 10 minutos y transcurrido este tiempo se extrae 1 mL, que se vierte sobre 1 mL de disolución de ácido tricloroacético 0.1 N para detener la reacción. Posteriormente se determina la concentración de glucosa mediante el método GOD-POD. Cada ensayo de actividad se realizó por duplicado.

El control de las enzimas ha demostrado que, siempre que éstas se conserven a 4°C , mantienen su actividad constante. La actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact en Tampón K^+ y Mg^{+2} se mantuvo constante e igual a 74.4 y 77.3 mmol glucosa $\text{g}_{\text{enzima}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente, durante el tiempo de experimentación. La actividad que presentan las enzimas Lactozym y Maxilact en Tampón Na^+ se mantuvo constante durante todo el tiempo de experimentación, obteniéndose unos valores de actividad de 3.06 y 3.98 mmol glucosa $\text{g}_{\text{enzima}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Como puede observarse ambas enzimas presentan similar actividad en iguales condiciones experimentales, siendo mayor en Tampón K^+ y Mg^{+2} que en Tampón Na^+ .

3.3.3 Ensayo de actividad de glucosa isomerasa.

Para determinar la actividad de la enzima glucosa-isomerasa se vierten en tubos de ensayo 5 mL de disolución de fructosa 1.00 M a 50°C , y se adicionan 0.2 mL de disolución de enzima de concentraciones 2.5, 5.0, 7.5 ó 10 g L^{-1} . Las disoluciones de enzima se encuentran a temperatura ambiente. Tanto las disoluciones de enzima como la disolución de fructosa se prepararon en Tampón Mg^{+2} (apartado 3.1.2).

La mezcla se mantiene incubada a 50°C durante 10 minutos y transcurrido este tiempo se extrae 1 mL de disolución, vertiéndose sobre 1 mL de ácido acético 0.1 N para detener la reacción. Posteriormente se determina la concentración de glucosa mediante el método GOD-POD. Cada ensayo de actividad fue realizado por duplicado.

Los datos obtenidos muestran que la concentración de glucosa generada es proporcional a la concentración de enzima, determinándose la actividad a partir de la pendiente de la recta obtenida (**Figura 3.6**), expresándose como el número de moles de glucosa producidos por gramo de preparado enzimático utilizado y hora de reacción (mol glucosa $\text{g}_{\text{enzima}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

El control periódico de la enzima ha demostrado que, almacenándose a 4°C, ésta ha mantenido su actividad constante durante todo el tiempo de experimentación.

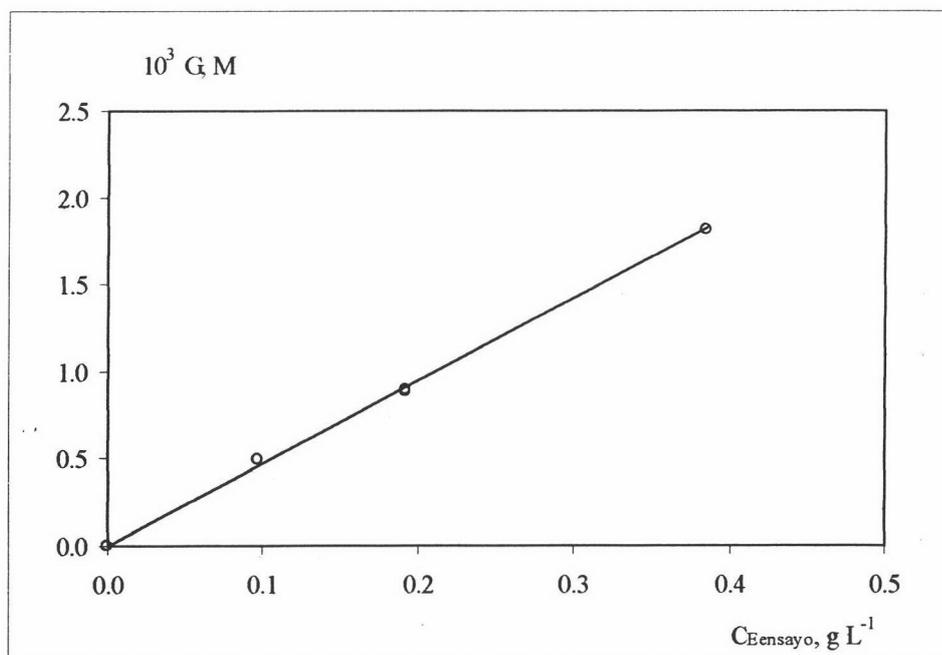


Figura 3.6 – Medida de actividad de la enzima glucosa isomerasa.

3.3.4 Estabilidad térmica de las enzimas.

3.3.4.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

Para analizar la estabilidad térmica de las enzimas en un reactor discontinuo mezcla perfecta se introducen 200 mL de tampón dentro del reactor. Alcanzada la temperatura de ensayo se adiciona la masa de enzima necesaria para obtener la concentración deseada (10 g L^{-1}), manteniéndose la agitación mediante un agitador magnético. A intervalos de tiempo regulares y durante un tiempo máximo de 3 horas se extraen muestras del reactor.

En el caso de que la enzima estudiada sea una β -galactosidasa las muestras extraídas del RDMP se someten al ensayo de actividad definido en el apartado 3.3.2.

Para el caso en que la enzima estudiada sea la glucosa isomerasa, el ensayo de actividad se realiza de la forma siguiente: sobre 5 mL de disolución 1.0 M de fructosa en Tampón Mg^{+2} , se adicionan 0.2 mL de disolución de enzima. Se incuba la mezcla a

50°C durante 10 minutos y transcurrido ese tiempo se extrae 1 mL de disolución que se vierte sobre 1 mL de ácido acético 0.1 N. Posteriormente se determina la concentración de glucosa mediante el método GOD-POD.

3.3.4.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

Se llena el dispositivo con 600 mL (700 mL cuando se utiliza el módulo de fibra hueca BLS632) de tampón y se ponen en funcionamiento las bombas en las condiciones fijadas (apartado 3.2.2). Una vez alcanzada la temperatura de ensayo se introduce mediante el inyector la masa de enzima necesaria para alcanzar una concentración de 10 g L⁻¹ en el espacio extracapilar (ECS) manteniéndose la agitación mediante la recirculación de la bomba.

En este dispositivo la enzima no pasa al lumen ya que el tamaño de poro de la fibra tiene, aproximadamente, un corte 10 veces inferior al tamaño de la enzima, quedando ésta confinada en el ECS. A intervalos de tiempo regulares y durante un tiempo máximo de 3 horas se extraen muestras de disolución de enzima del ECS. Las muestras extraídas se someten a un ensayo de actividad (apartado 3.3.2).

3.4 Procedimiento operativo para los ensayos cinéticos.

3.4.1 Reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

Para llevar a cabo los ensayos cinéticos en el RDMP se introducen en el reactor 200 mL de la disolución tampón con el sustrato utilizado (lactosa en Tampón K⁺ y Mg⁺² para el estudio de la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasas y fructosa en Tampón Mg⁺² para el estudio de la reacción de isomerización fructosa-glucosa mediante glucosa-isomerasa). Una vez que en la disolución se ha alcanzado la temperatura deseada y se ajusta el pH, se añade la enzima, extrayendo cada cierto tiempo (hasta 3 horas para la reacción de isomerización fructosa-glucosa y 2 horas en la reacción de hidrólisis de lactosa) 0.5 mL de muestra del reactor. La enzima de la muestra es desnaturalizada con ácido tricloroacético 0.1 N (en el caso de lactasas) o ácido acético 0.1 N (para glucosa-isomerasa), procediéndose posteriormente a medir la concentración de glucosa mediante el método GOD-POD.

3.4.2 Reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

La cinética de la reacción de hidrólisis de lactosa y de la reacción de isomerización fructosa-glucosa en el RFHR se estudia a partir de la concentración de glucosa medida en el tanque encamisado del dispositivo experimental.

Para llevar a cabo los ensayos cinéticos en el RFHR se llena el dispositivo experimental con 600 mL (700 mL cuando se utiliza el módulo de fibra hueca BLS632) de la disolución de sustrato (lactosa en Tampón K^+ y Mg^{+2} para la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasas y fructosa en Tampón Mg^{+2} para la isomerización fructosa-glucosa mediante glucosa-isomerasa). Una vez que se fija el caudal de las bombas y se verifica que la disolución ha alcanzado la temperatura y pH deseados se inyecta la masa de enzima necesaria en el ECS. Periódicamente se extraen 0.5 mL del tanque agitado y sólo resta proceder a medir la concentración de glucosa mediante el método GOD-POD.

Para verificar el buen estado de las fibras y detectar cualquier posible pérdida de enzima debido a una rotura de las fibras, tras finalizar cada experimento se vuelven a analizar las muestras extraídas del RFHR a tiempos iniciales (15-20 minutos). Si las muestras extraídas del tanque contuvieran enzima, la glucosa medida 3 horas después debería ser mayor a la analizada a los 15-20 minutos. En ningún experimento de los recogidos en el presente trabajo se detectó pérdida de enzima.

3.5. Puesta a punto del dispositivo experimental de fibra hueca (RFHR).

3.5.1 Determinación del transporte de glucosa a través de la membrana.

Para comprobar la resistencia a la transferencia de materia que opone la membrana del módulo de fibra hueca, se han realizado experimentos de circulación de glucosa a través de la membrana.

Para ello, una vez lleno con agua destilada el dispositivo experimental (RFHR) se introduce glucosa en el tanque encamisado manteniéndose la agitación dentro de éste mientras las bombas peristálticas se mantienen paradas. Una vez disuelta la glucosa, las bombas peristálticas se ponen en funcionamiento (en las condiciones indicadas en el apartado 3.2.2). A intervalos regulares de tiempo se toman muestras de disolución en la

carcasa (G_{carcasa}) y en el tanque encamisado (G_{tanque}), determinándose el contenido en glucosa por el método GOD-POD.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.2** y **Figura 3.7**. Se observa que a los 3 minutos, la mezcla era prácticamente perfecta, indicándonos que la resistencia a la transferencia de glucosa a través de la membrana y las películas líquidas es casi nula en las condiciones experimentales ensayadas, circulación en contracorriente y caudales de 40 L h^{-1} por el circuito del lumen y 53 L h^{-1} por el circuito del ECS.

Tabla 3.2 – Resistencia a la transferencia de glucosa a través de la membrana de un módulo de fibra hueca 40°C

t, min	$G_{\text{tanque}}, \text{M}$	$G_{\text{carcasa}}, \text{M}$
0.00	0.302	0.000
0.75	0.113	0.078
1.50	0.103	0.095
2.50	0.103	0.102
3.50	0.102	0.104
4.50	0.103	0.103

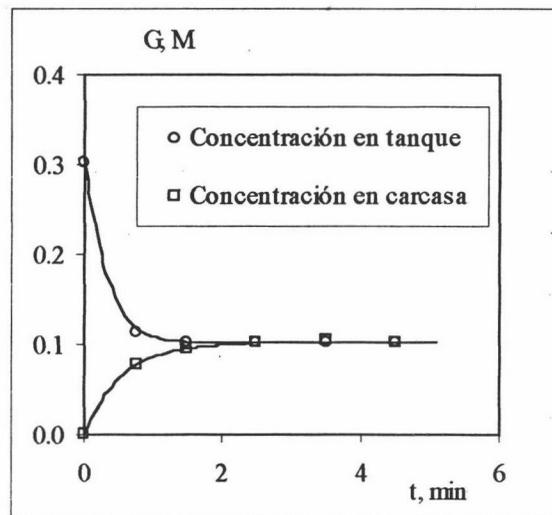


Figura 3.7 - Resistencia a la transferencia de glucosa a través de membrana de un RFHR 40°C

3.5.2 Influencia del caudal del circuito del ECS sobre el comportamiento del RFHR.

El módulo de fibra hueca utilizado ha sido el NT1975. Para determinar si el caudal por el interior de las fibras o lumen (q_{lumen}) del módulo de fibra hueca afecta al comportamiento del sistema, se realizaron experimentos de hidrólisis de lactosa en

RFHR en las siguientes condiciones: se modifica el caudal en el circuito del lumen entre 30 y 50 L h⁻¹, 30°C, 600 mL de disolución de lactosa monohidratada 0.0694 M preparada en Tampón K⁺ y Mg⁺², 0.1250 gramos de enzima Lactozym, circulación en contracorriente, caudal de circuito de ECS 53 L h⁻¹.

Como se observa en los experimentos realizados (**Tablas 3.3 y 3.4 y Figura 3.8**) no se observa diferencia alguna entre los datos obtenidos con caudales de 30 y 50 L h⁻¹ en el lumen. Por ello en el circuito del lumen utilizaremos un caudal de 40 L h⁻¹ ya que permite una mejor regulación.

Tabla 3.3 - Influencia del caudal del circuito del lumen en el RFHR $q_{\text{lumen}} = 30 \text{ L h}^{-1}$

t, h	G, M
0.00	0.0000
0.08	0.0024
0.17	0.0053
0.25	0.0095
0.33	0.0115
0.50	0.0160
0.67	0.0214
0.83	0.0252
1.00	0.0297
1.25	0.0345
1.50	0.0374
1.75	0.0416
2.00	0.0449
3.00	0.0569

Tabla 3.4 - Influencia del caudal del circuito del lumen en el RFHR $q_{\text{lumen}} = 50 \text{ L h}^{-1}$

t, h	G, M
0.00	0.0000
0.05	0.0013
0.09	0.0026
0.12	0.0037
0.17	0.0056
0.25	0.0087
0.33	0.0128
0.50	0.0176
0.67	0.0233
0.83	0.0262
1.00	0.0298
1.25	0.0346
1.51	0.0383
1.75	0.0437
2.00	0.0468
2.25	0.0438
2.50	0.0476
2.75	0.0536
3.00	0.0592

3.5.3 Influencia de esfuerzos cortantes del ECS sobre la actividad de la enzima.

La influencia que los esfuerzos cortantes pueden provocar sobre la conformación estructural de las proteínas, y por tanto sobre la actividad de las enzimas, es un hecho indicado por diferentes autores (**Volkin y col. (1989)**). Para determinar la influencia que este efecto puede producir sobre la enzima que circula a través de la bomba situada en el

ECS se realizaron dos experimentos de hidrólisis de lactosa en un RDMP con la enzima Lactozym en Tampón K^+ y Mg^{+2} . Las condiciones experimentales de partida son concentración de enzima 0.50 g L^{-1} y 0.0278 M en lactosa monohidratada a 40°C .

En el primer experimento realizado (**Tabla 3.5**) la agitación del sistema se llevó a cabo por recirculación de la disolución mediante una bomba, que desplaza un caudal 53 L h^{-1} . En el segundo experimento (**Tabla 3.6**) la agitación de la disolución se produjo mediante un agitador magnético. Ambas condiciones de agitación ensayadas son las que se utilizan posteriormente en los experimentos de hidrólisis de lactosa e isomerización fructosa-glucosa llevadas a cabo en el RFHR y RDMP, respectivamente.

Como puede observarse en la **Figura 3.9**, los resultados obtenidos en ambos casos pueden considerarse semejantes, lo que nos lleva a descartar que los esfuerzos cortantes producidos en las condiciones experimentales ensayadas, puedan provocar una desactivación de la enzima utilizada.

Tabla 3.5 - Influencia de los esfuerzos cortantes sobre la actividad de la enzima Lactozym (agitación mediante bombeo)

t, h	G, M
0.00	0.0000
0.02	0.0026
0.04	0.0046
0.08	0.0078
0.12	0.0106
0.17	0.0131
0.22	0.0152
0.28	0.0181
0.35	0.0201
0.42	0.0207
0.59	0.0235
0.67	0.0240
0.75	0.0241

Tabla 3.6 - Influencia de los esfuerzos cortantes sobre la actividad de la enzima Lactozym (agitación mediante agitador magnético)

t, h	G, M
0.00	0.0000
0.03	0.0034
0.05	0.0053
0.07	0.0071
0.08	0.0085
0.12	0.0106
0.15	0.0129
0.18	0.0151
0.22	0.0167
0.25	0.0183
0.30	0.0192
0.35	0.0204
0.42	0.0227
0.49	0.0239
0.55	0.0239
0.64	0.0242
0.72	0.0256
0.80	0.0260

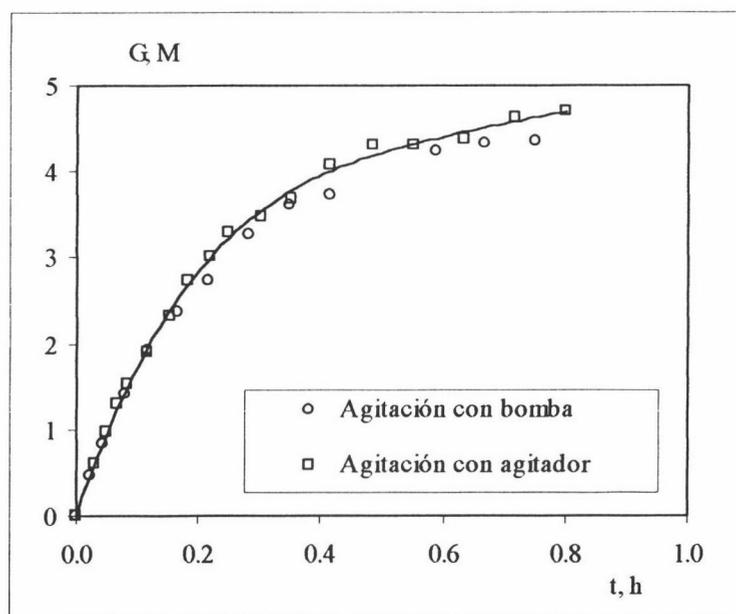


Figura 3.9 – Influencia de los esfuerzos cortantes sobre la actividad de la enzima Lactozym.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este apartado se indican los resultados experimentales primarios obtenidos. En primer lugar los correspondientes a la actividad enzimática de las enzimas utilizadas para posteriormente mostrar los resultados experimentales obtenidos tanto para la reacción de isomerización fructosa-glucosa como para la hidrólisis de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta y en un reactor de fibra hueca con recirculación, utilizando distintos módulos de fibra hueca.

4.1 Actividad enzimática.

Para optimizar las condiciones experimentales bajo las que han de actuar las lactasas, se analizó el comportamiento de Lactozym y Maxilact modificando el pH y la concentración de distintos iones del medio de reacción hasta maximizar la actividad, considerando las indicaciones realizadas por Yang y col. (1994), Garman y col. (1996) y Flores y col. (1996). Así mismo se estudia la influencia que la temperatura ejerce sobre la actividad de la glucosa isomerasa (Spezyme GI) y de las lactasas (Lactozym y Maxilact con Tampón K^+ y Mg^{+2} y Tampón Na^+ , en RDMP y RFHR).

4.1.1 Influencia de la presencia de iones sobre la actividad de las lactasas.

Para analizar la influencia de la concentración de iones sobre las lactasas se determinó la actividad en las condiciones experimentales indicadas en la **Tabla 4.1** según el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2.

Tabla 4.1 - Variables ensayadas para la optimización del Tampón de K^+ y Mg^{+2} utilizado para el estudio de la hidrólisis de lactosa.

Enzima	pH	[KCl], M	[K_2HPO_4], M	[$MgCl_2 \cdot 6H_2O$], M	[$MnCl_2 \cdot 4H_2O$], M
Lactozym	6.00	0.015			
	6.50	0.050		0	
Maxilact	6.75	0.080	0.01	0.012	0
	7.00	0.180	0.1	0.048	$2 \cdot 10^{-4}$
	7.30	0.280			

a) Análisis de la influencia de la concentración de ión K^+ (aportado mediante adición de K_2HPO_4 y KCl).

La actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact obtenida con diferentes valores de pH y concentraciones de ión K^+ se muestran en las **Tablas 4.2 y 4.3** respectivamente, representándose en las **Figuras 4.1 y Figura 4.2**.

Tabla 4.2 –Influencia del pH y de concentración de ión K^+ sobre la actividad de la enzima Lactozym.

pH	$[K^+]$, M				
	0.035	0.070	0.100	0.200	0.300
6.00	0.005				
6.50	0.055	0.055	0.057	0.053	
6.75	0.065	0.065		0.067	
7.00	0.065		0.061		
7.30	0.057				

Unidades de actividad (a): (mol glucosa gramo enzima⁻¹ h⁻¹)

Condiciones normalizadas: $[PO_4^{3-}] = 0.01$ M (adicionado como K_2HPO_4) con ajuste de la concentración de ión K^+ mediante adición de KCl . Ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico, $[Mg^{+2}] = 0$ M, $[MnCl_2 \cdot 4H_2O] = 0$ M.

Tabla 4.3 –Influencia del pH y de concentración de ión K^+ sobre la actividad de la enzima Maxilact.

pH	$[K^+]$, M				
	0.035	0.070	0.100	0.200	0.300
6.00	0.012				
6.50	0.063	0.063	0.065	0.062	
6.75	0.070	0.070		0.067	
7.00	0.069		0.062		
7.30	0.060				

Unidades de actividad (a): (mol glucosa gramo enzima⁻¹ h⁻¹)

Condiciones normalizadas: $[PO_4^{3-}] = 0.01$ M (adicionado como K_2HPO_4) con ajuste de la concentración de ión K^+ mediante adición de KCl . Ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico, $[Mg^{+2}] = 0$ M, $[MnCl_2 \cdot 4H_2O] = 0$ M.

De las concentraciones de ión K^+ ensayadas se considera óptima, tanto para la enzima Lactozym como Maxilact, una concentración de ión K^+ igual a 0.035 M. Como se puede observar en las **Tablas 4.2 y 4.3** y en las **Figuras 4.1 y 4.2**, dentro del rango experimental estudiado, la adición de ión K^+ no altera significativamente la actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact.

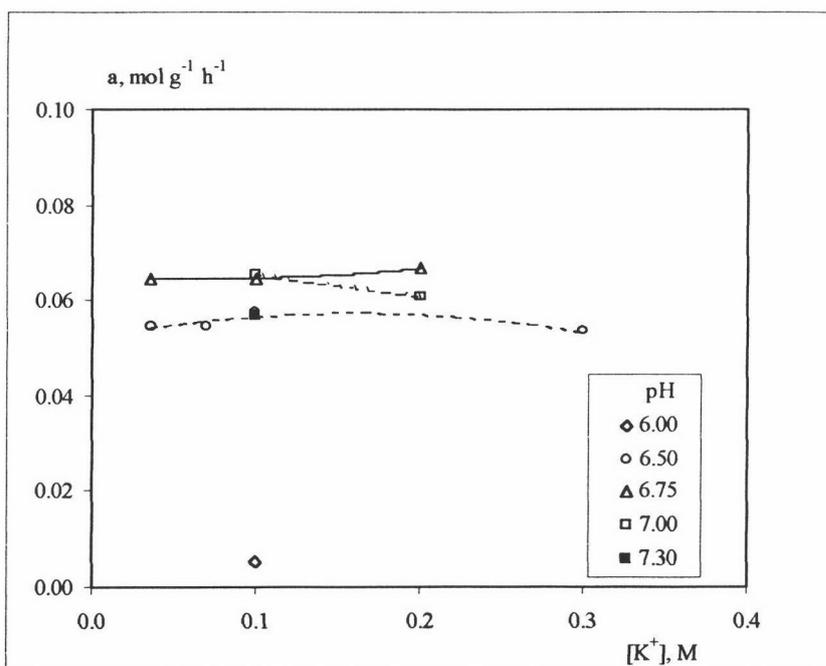


Figura 4.1 - Influencia de pH y [K⁺] sobre la actividad de la enzima Lactozym. Condiciones normalizadas: [PO₄⁻³]=0.01 M (adicionado como K₂HPO₄), ajuste de [K⁺] mediante adición de KCl, ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico, [Mg⁺²] = 0 M, [MnCl₂·4H₂O] = 0 M.

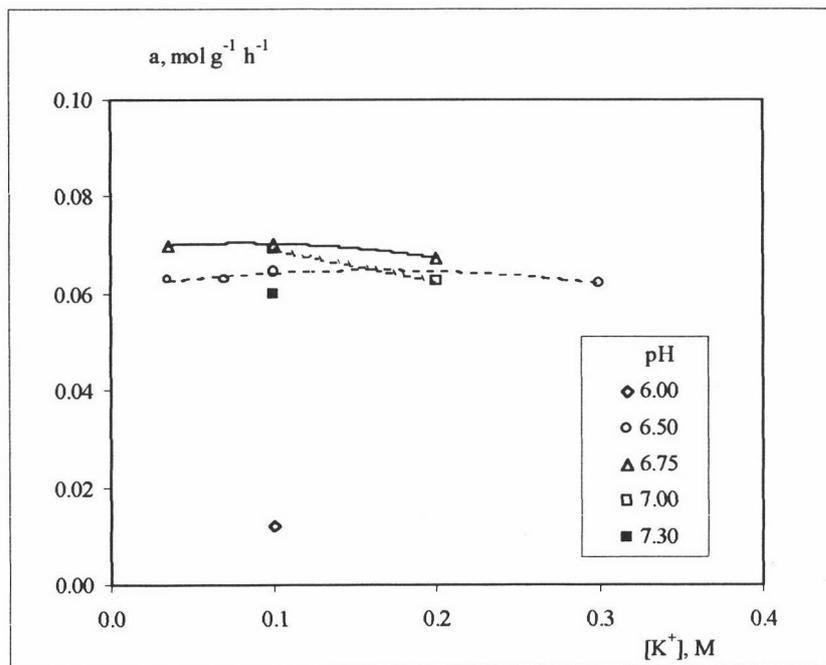


Figura 4.2 - Influencia de pH y [K⁺] sobre la actividad de la enzima Maxilact. Condiciones normalizadas: [PO₄⁻³]=0.01 M (adicionado como K₂HPO₄), ajuste de [K⁺] mediante adición de KCl, ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico, [Mg⁺²] = 0 M, [MnCl₂·4H₂O] = 0 M.

b) Análisis de la influencia de la concentración inicial de ión PO_4^{3-} (aportado mediante adición de K_2HPO_4).

La actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact obtenida para diferentes concentraciones de ión PO_4^{3-} ensayadas se muestran en la **Tabla 4.4** y en la **Figura 4.3**. En esta figura se observa que la concentración de ión PO_4^{3-} ejerce una gran influencia sobre la actividad de la enzima, considerándose óptima para ambas enzimas una concentración 0.01 M en ión PO_4^{3-} .

Tabla 4.4 –Influencia de la concentración del ión PO_4^{3-} sobre la actividad de la enzima Lactozym y Maxilact.

Enzima	$[\text{PO}_4^{3-}]$, M	
	0.01	0.1
Lactozym	0.067	0.022
Maxilact	0.067	0.030

Unidades de actividad (a) = $(\text{mol glucosa } \text{gramo enzima}^{-1} \text{ h}^{-1})$

Condiciones normalizadas: $[\text{PO}_4^{3-}]$ aportado mediante adición de K_2HPO_4 con ajuste de la concentración de ión K^+ a 0.2 M mediante adición de KCl. Ajuste de pH a 6.75 mediante adición de ácido cítrico, $[\text{Mg}^{+2}] = 0 \text{ M}$, $[\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 0 \text{ M}$.

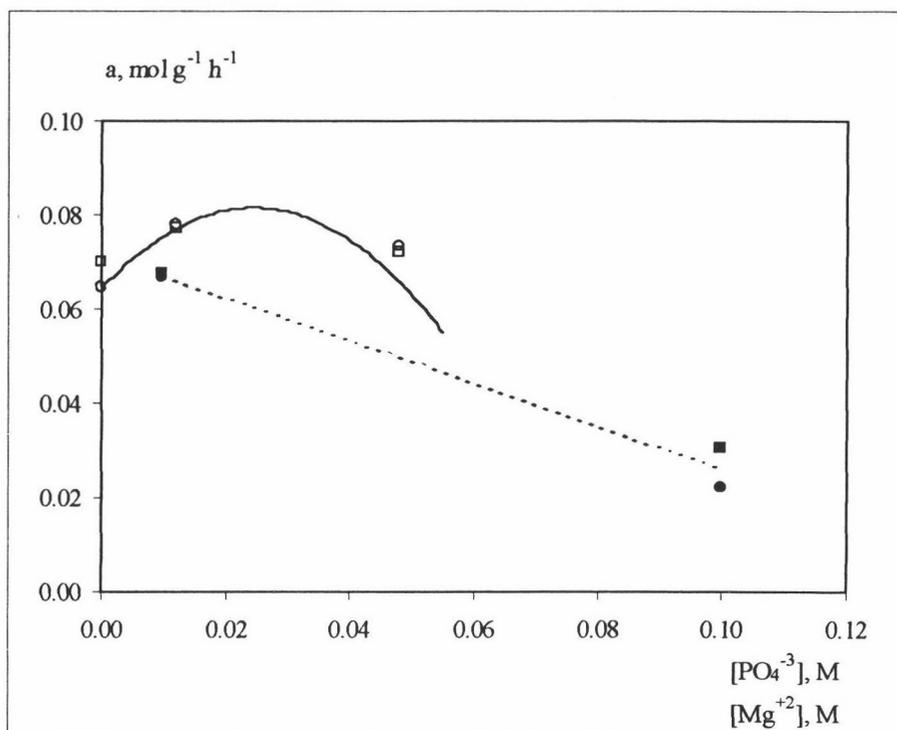


Figura 4.3 - Influencia de la concentración de iones PO_4^{3-} y Mg^{+2} sobre la actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact. Ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico.

- Influencia de $[\text{PO}_4^{3-}]$: ● Lactozym, ■ Maxilact (Condiciones normalizadas: pH=6.75, $[\text{K}^+] = 0.2 \text{ M}$, $[\text{Mg}^{+2}] = 0 \text{ M}$, $[\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 0 \text{ M}$).
- Influencia de $[\text{Mg}^{+2}]$: ○ Lactozym, □ Maxilact (Condiciones normalizadas: pH=6.75, $[\text{PO}_4^{3-}] = 0.01 \text{ M}$, $[\text{K}^+] = 0.035 \text{ M}$, $[\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 0 \text{ M}$).

c) Análisis de la influencia de la concentración inicial de ión Mg^{+2} .

La actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact obtenida en presencia de distintas concentraciones de ión Mg^{+2} ensayadas (aportado mediante adición de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) se muestran en la **Tabla 4.5** y en la **Figura 4.3**. Dentro del rango de estudio se observa que la mayor actividad de las enzimas se obtiene a una concentración 0.012 M en ión Mg^{+2} .

Tabla 4.5 –Influencia de la concentración del ión Mg^{+2} sobre la actividad de la enzima Lactozym y Maxilact.

Enzima	$[Mg^{+2}]$, M		
	0	0.012	0.048
Lactozym	0.065	0.078	0.073
Maxilact	0.070	0.077	0.072

Unidades de actividad (a) = \cdot (mol glucosa gramo enzima⁻¹ h⁻¹)

Condiciones normalizadas: $[PO_4^{-3}] = 0.01$ M (adicionado como K_2HPO_4) con ajuste de la concentración de ión K^+ a 0.035 M mediante adición de KCl. Ajuste de pH a 6.75 mediante adición de ácido cítrico, $[MnCl_2 \cdot 4H_2O] = 0$ M.

d) Análisis de la influencia de la concentración inicial de ión Mn^{+2} .

Se ha observado que la presencia de pequeñas cantidades del ión Mn^{+2} (0.0002 M adicionado como $MnCl_2 \cdot 4H_2O$) provoca la formación de flóculos en la disolución, por lo que el uso de este ión se descarta en este trabajo.

Las concentración de iones ensayados que optimizan la actividad de ambas enzimas es de 0.035 M en ión K^+ , 0.01 M en ión PO_4^{-3} y 0.012 M en ión Mg^{+2} .

4.1.2 Influencia del pH sobre la actividad de las lactasas.

En la **Tabla 4.2 y 4.3** y en las **Figuras 4.1 y 4.2** se muestra la actividad que las enzimas Lactozym y Maxilact presentan a distintos valores de pH, observándose que ambas enzimas muestran un valor máximo de actividad a pH=6.75 aproximadamente.

Podemos concluir por tanto que, tanto la enzima Lactozym como Maxilact, poseen un comportamiento similar dentro del rango experimental estudiado. El tampón que maximiza la actividad de las enzimas es aquel de composición 0.01 M en K_2HPO_4 , 0.015 M en KCl y 0.012 M en $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, con un pH = 6.75 ajustado mediante ácido cítrico. Este tampón, denominado Tampón K^+ y Mg^{+2} (indicado en el apartado 3.1.1), es el utilizado en los experimentos de hidrólisis de lactosa realizados posteriormente.

4.1.3 Influencia de la temperatura sobre la actividad de las enzimas.

a) Enzimas β -galactosidasas en RDMP.

Para determinar la dependencia de la actividad de las lactasas (Lactozym y Maxilact) frente a la temperatura en el RDMP se han analizado una serie de variables (Tabla 4.6) según el método definido en el apartado 3.3.4.1. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.7 a 4.20.

Tabla 4.6 – Influencia de la temperatura sobre la actividad de las β -galactosidasas en RDMP y RFHR.

Enzima	Medio de reacción	Dispositivo experimental / Módulo de fibra hueca utilizado	T, °C
Lactozym	Tampón K^+ y Mg^{+2}	RDMP	30,35,40,42.5,45,50
		RHFR / NT1975	30,40,45
		RHFR / NT1175	30,40
		RHFR / BLS632	30,40
	Tampón Na^+	RDMP	25,30,40
Maxilact	Tampón K^+ y Mg^{+2}	RDMP	30,40,50
	Tampón Na^+	RDMP	30,40

En las Figuras 4.4 a 4.6 se muestra para las enzimas Lactozym y Maxilact en Tampón K^+ y Mg^{+2} y Tampón Na^+ , la actividad normalizada (a_{norm}) frente al tiempo de reacción en RDMP, definida como:

$$a_{norm} = \frac{a}{a_0} \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

donde a es la actividad de la enzima a tiempo t y a_0 es la actividad de la enzima a tiempo cero. Se observa que en este dispositivo experimental ambas enzimas presentan un comportamiento similar ambos tampones.

En Tampón K^+ y Mg^{+2} (Figuras 4.4 y 4.5), la actividad de ambas enzimas a 30 y 35°C no disminuye al menos durante 3 horas. A 40°C se aprecia cierta desactivación, mientras que a 50°C la disminución de la actividad con la temperatura es prácticamente total al cabo de 1 hora.

Los experimentos realizados en Tampón Na^+ (Figura 4.6) demuestran que este ión produce una desactivación importante a todas las temperaturas ensayadas, observándose un comportamiento similar tanto para Lactozym como Maxilact.



Tabla 4.7 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	74.4	1.00
0.03	74.2	1.00
0.08	75.2	1.01
0.13	74.5	1.00
0.18	74.4	1.00
0.23	74.4	1.00
0.33	73.7	0.99
0.47	74.8	1.01
0.65	73.9	0.99
1.02	73.7	0.99
1.22	73.9	0.99
1.42	72.7	0.98
1.67	72.6	0.98
1.92	73.2	0.98
2.17	73.4	0.99
2.42	72.2	0.97
2.67	72.4	0.97
2.92	73.1	0.98
3.00	68.8	0.93
3.07	71.3	0.96

Tabla 4.8 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 35°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	73.8	1.00
0.09	76.1	1.03
0.13	77.2	1.05
0.18	69.7	0.94
0.27	72.8	0.99
0.33	76.1	1.03
0.47	75.4	1.02
0.61	75.0	1.02
0.69	76.8	1.04
0.83	74.3	1.01
1.01	75.1	1.02
1.25	75.1	1.02
1.50	75.9	1.03
1.75	74.5	1.01
2.01	74.8	1.01
2.25	75.3	1.02
2.51	74.3	1.01
2.75	76.1	1.03
3.00	75.1	1.02
3.08	74.6	1.01

Tabla 4.9 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	72.7	1.00
0.07	74.0	1.02
0.10	74.0	1.02
0.13	71.9	0.99
0.18	71.0	0.98
0.24	72.7	1.00
0.28	70.6	0.97
0.33	71.5	0.98
0.47	69.9	0.96
0.65	71.5	0.98
0.83	69.6	0.96
1.18	69.2	0.95
1.45	67.9	0.93
1.64	66.5	0.91
1.83	66.8	0.92
2.08	65.3	0.90
2.33	63.7	0.88
2.59	65.3	0.90
2.84	63.7	0.88
3.02	63.5	0.87

Tabla 4.10 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 42.5°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	73.5	1.00
0.07	73.2	1.00
0.10	73.5	1.00
0.13	69.9	0.95
0.19	66.1	0.90
0.25	68.3	0.93
0.32	65.3	0.89
0.40	65.8	0.90
0.50	65.5	0.89
0.62	62.9	0.86
0.75	62.6	0.85
0.88	60.3	0.82
1.00	58.8	0.80
1.25	57.0	0.78
1.50	55.5	0.76
1.92	53.4	0.73
2.00	52.1	0.71
2.25	49.3	0.67
2.51	48.5	0.66
2.75	47.8	0.65
3.08	46.7	0.64

Tabla 4.11 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 45°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	70.4	1.00
0.05	70.2	1.00
0.07	66.6	0.95
0.10	67.1	0.95
0.15	63.2	0.90
0.19	61.1	0.87
0.30	54.9	0.78
0.40	50.2	0.71
0.50	47.0	0.67
0.74	40.2	0.57
0.87	36.5	0.52
1.01	33.5	0.48
1.25	29.0	0.41
1.50	25.7	0.37
1.75	22.9	0.32
2.01	20.5	0.29
2.25	18.6	0.26
2.51	17.4	0.25
2.75	16.2	0.23
3.01	15.2	0.22
3.10	14.9	0.21

Tabla 4.12 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 50°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	76.3	1.00
0.01	77.1	1.01
0.02	76.0	1.00
0.02	72.6	0.95
0.05	67.5	0.88
0.07	55.8	0.73
0.08	46.1	0.60
0.12	28.0	0.37
0.14	19.7	0.26
0.16	17.4	0.23
0.19	12.2	0.16
0.23	10.4	0.14
0.26	8.92	0.12
0.29	7.93	0.10
0.34	6.86	0.09
0.38	6.12	0.08
0.44	5.53	0.07
0.50	4.60	0.06
0.57	4.16	0.05
0.63	3.53	0.05
0.75	4.48	0.06
0.97	2.14	0.03
1.07	1.89	0.02

Tabla 4.13 - Estabilidad térmica en RDMP - Maxilact - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.06	75.6	0.98
0.15	77.1	1.00
0.30	75.6	0.98
0.49	76.6	0.99
0.68	75.9	0.98
0.97	77.7	1.01
1.23	74.9	0.97
1.61	77.4	1.00
1.84	75.8	0.98
2.26	75.8	0.98
2.70	78.2	1.01
3.20	77.1	1.00
3.21	74.6	0.97

Tabla 4.14 - Estabilidad térmica en RDMP - Maxilact - Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.05	76.6	0.99
0.20	76.9	1.00
0.34	75.6	0.98
0.53	76.1	0.98
0.68	74.6	0.97
0.86	73.0	0.94
1.24	71.3	0.92
1.59	71.0	0.92
1.87	68.4	0.88
2.51	67.5	0.87
2.87	66.2	0.86
3.18	65.4	0.85
3.33	66.1	0.86
3.51	64.4	0.83

Tabla 4.15 - Estabilidad térmica en RDMP - Maxilact - Tampón K⁺ y Mg⁺² 50°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.03	76.1	0.98
0.07	71.0	0.92
0.14	38.1	0.49
0.25	16.7	0.22
0.34	12.1	0.16
0.49	8.36	0.11
0.68	4.42	0.06
1.19	1.79	0.02
1.58	1.13	0.01

Tabla 4.16 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón Na⁺ 25°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	3.27	1.00
0.25	2.88	0.88
0.50	2.72	0.83
0.77	2.50	0.77
1.00	2.39	0.73
1.23	2.34	0.72
1.59	2.16	0.66
1.79	2.16	0.66
2.00	2.13	0.65
2.26	2.03	0.62
2.50	1.97	0.60
2.68	2.01	0.62
2.83	1.95	0.60
3.00	1.93	0.59

Tabla 4.17 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón Na⁺ 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	3.06	1.00
0.33	1.97	0.64
1.00	1.37	0.45
1.35	1.27	0.42
1.75	1.19	0.39
2.02	1.10	0.36
2.36	1.10	0.36
2.70	1.00	0.33
3.00	1.03	0.34

Tabla 4.18 - Estabilidad térmica en RDMP - Lactozym - Tampón Na⁺ 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	2.37	1.00
0.08	0.527	0.22
0.17	0.252	0.11
0.23	0.163	0.07
0.32	0.114	0.05
0.46	0.114	0.05
0.67	0.106	0.04
0.92	0.090	0.04
1.15	0.066	0.03
1.52	0.074	0.03

Tabla 4.19 - Estabilidad térmica en RDMP - Maxilact - Tampón Na⁺ 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	3.98	1.00
0.33	2.68	0.67
0.67	2.12	0.53
1.00	1.95	0.49
1.35	1.82	0.46
1.75	1.67	0.42
2.02	1.70	0.43
2.36	1.53	0.39
2.70	1.49	0.37
3.00	1.42	0.36

Tabla 4.20 - Estabilidad térmica en RDMP - Maxilact - Tampón Na⁺ 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	3.12	1.00
0.08	0.714	0.23
0.17	0.252	0.08
0.23	0.171	0.05
0.32	0.106	0.03
0.46	0.090	0.03
0.67	0.082	0.03
1.15	0.049	0.02
1.52	0.065	0.02

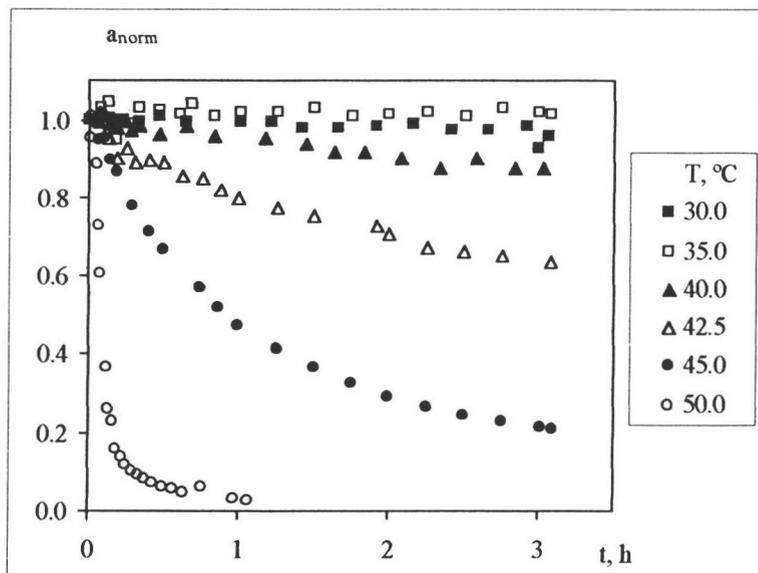


Figura 4.4 – Actividad de la enzima Lactozym en RDMP – Tampón K^+ y Mg^{+2}

Figura 4.5 – Actividad de la enzima Maxilact en RDMP – Tampón K^+ y Mg^{+2}

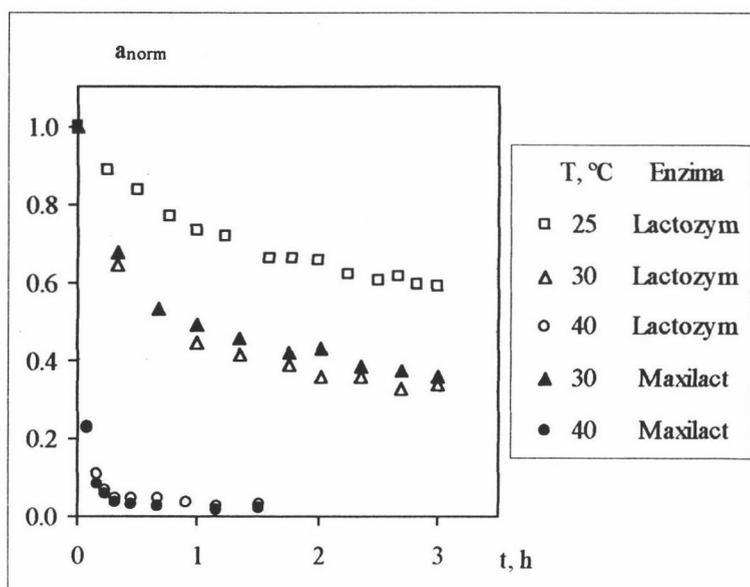
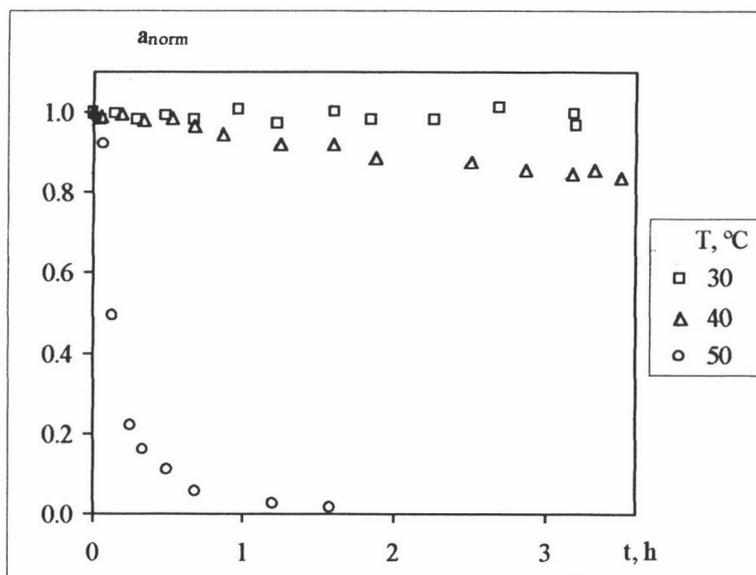


Figura 4.6 – Actividad de la enzima Maxilact y Lactozym en RDMP – Tampón Na^+

b) Enzimas β -galactosidasas en RFHR.

En las **Tablas 4.21 a 4.28** se presentan los resultados experimentales obtenidos para la enzima Lactozym en los experimentos de estabilidad térmica realizados en el RFHR (con distintos módulos de fibra hueca) según el procedimiento experimental definido en el apartado 3.3.4.2, ensayándose las variables indicadas en la **Tabla 4.6**.

En la **Figura 4.7** se presenta la actividad normalizada (a_{norm}) obtenida por la enzima Lactozym en Tampón K^+ y Mg^{+2} en función del tiempo de reacción, tanto en RDMP como en RFHR (con distintos módulos de fibra hueca).

En el RFHR se aprecia, independientemente del módulo de fibra hueca utilizado, una pérdida de actividad a 30°C (**Figura 4.7**) no detectada en un RDMP. A 40 y 45°C se observa que la actividad del RFHR es menor a la observada en el RDMP en similares condiciones experimentales (**Figura 4.8**) pareciendo indicar que junto a la desactivación existe una retirada de enzima de la disolución que podría adsorberse sobre la membrana.

Tabla 4.21 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo NT1975 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.06	76.9	1.00
0.11	74.7	0.97
0.17	75.4	0.98
0.26	72.5	0.94
0.45	74.7	0.97
0.65	70.5	0.91
0.86	71.2	0.92
1.09	70.5	0.91
1.64	68.8	0.89
2.01	63.1	0.82
2.34	65.1	0.84
2.67	62.2	0.81
3.00	60.7	0.79

Tabla 4.22 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo NT1175 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.10	72.6	0.94
0.17	69.6	0.90
0.26	66.8	0.86
0.36	70.6	0.91
0.45	70.3	0.91
0.59	67.1	0.87
0.84	60.1	0.78
1.09	63.0	0.82
1.34	64.4	0.83
1.67	64.0	0.83
2.02	58.5	0.76
2.37	62.1	0.80
2.68	59.2	0.77
3.01	60.4	0.78

Tabla 4.23 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo BLS632 (Experimento 1) - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.09	61.6	0.80
0.17	60.6	0.78
0.28	58.4	0.76
0.36	61.9	0.80
0.42	58.0	0.75
0.61	57.7	0.75
0.84	59.5	0.77
1.09	63.0	0.82
1.34	47.4	0.61
1.68	44.2	0.57
2.01	54.4	0.70
2.34	56.5	0.73
2.67	57.6	0.75
3.01	53.9	0.70

Tabla 4.24 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo BLS632 (Experimento 2) - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.09	59.1	0.76
0.17	56.9	0.74
0.25	54.8	0.71
0.36	61.4	0.80
0.44	56.7	0.73
0.59	47.3	0.61
0.84	55.1	0.71
1.09	58.2	0.75
1.34	58.5	0.76
1.68	61.8	0.80
2.01	59.5	0.77
2.35	56.2	0.73
2.68	54.4	0.70
3.01	56.2	0.73

Tabla 4.25 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo NT1975 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.08	66.5	0.86
0.12	65.8	0.85
0.18	58.7	0.76
0.27	54.7	0.71
0.46	50.0	0.65
0.65	50.7	0.66
0.84	42.0	0.54
1.08	44.0	0.57
1.33	39.6	0.51
1.67	38.1	0.49
2.00	36.4	0.47
2.34	34.4	0.45
2.66	31.1	0.40
3.01	31.0	0.40

Tabla 4.26 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo NT1175 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.11	65.4	0.85
0.17	62.1	0.80
0.36	55.5	0.72
0.46	59.2	0.77
0.59	48.8	0.63
0.84	50.2	0.65
1.09	47.4	0.61
1.34	46.7	0.60
1.67	37.2	0.48
2.02	37.1	0.48
2.35	38.7	0.50
2.83	32.0	0.41
3.02	29.5	0.38

Tabla 4.27 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo BLS632 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.09	61.8	0.80
0.17	57.2	0.74
0.28	54.1	0.70
0.36	52.9	0.68
0.42	51.4	0.67
0.61	47.4	0.61
0.85	44.0	0.57
1.09	41.7	0.54
1.34	40.8	0.53
1.67	37.2	0.48
2.03	33.5	0.43
2.34	33.6	0.44
2.68	32.1	0.41
3.00	30.0	0.39

Tabla 4.28 - Estabilidad térmica en RFHR - Módulo NT1975 - Lactozym - Tampón K⁺ y Mg⁺² 45°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	77.3	1.00
0.07	61.1	0.79
0.11	50.8	0.66
0.17	41.7	0.54
0.25	31.3	0.40
0.46	19.9	0.26
0.66	13.1	0.17
0.87	8.77	0.11
1.08	6.30	0.08
1.34	5.09	0.07
1.67	3.44	0.04
2.00	2.69	0.03
2.33	2.42	0.03
2.76	1.70	0.02
3.00	1.49	0.02

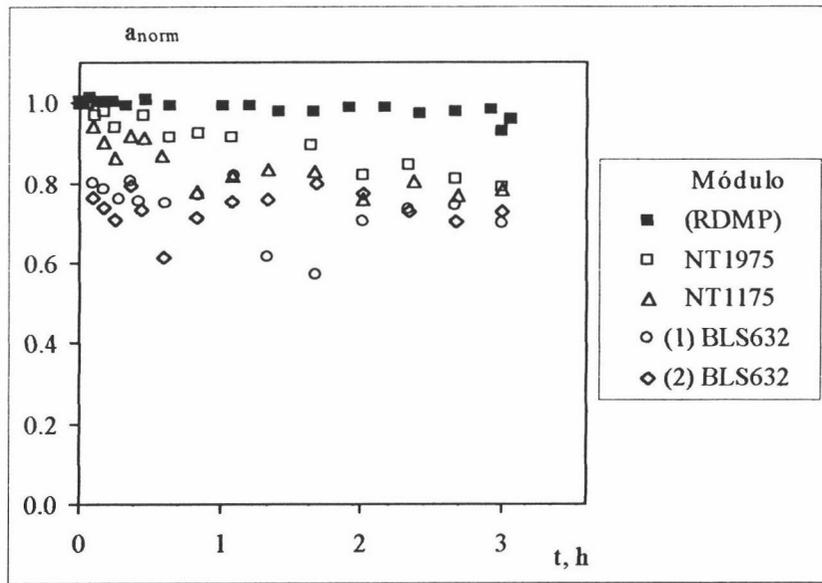


Figura 4.7 – Comparación de la actividad de Lactozym en RDMP y RFHR. Comportamiento de la enzima en distintos módulos de fibra hueca. Tampón K^+ y Mg^{+2} 30°C

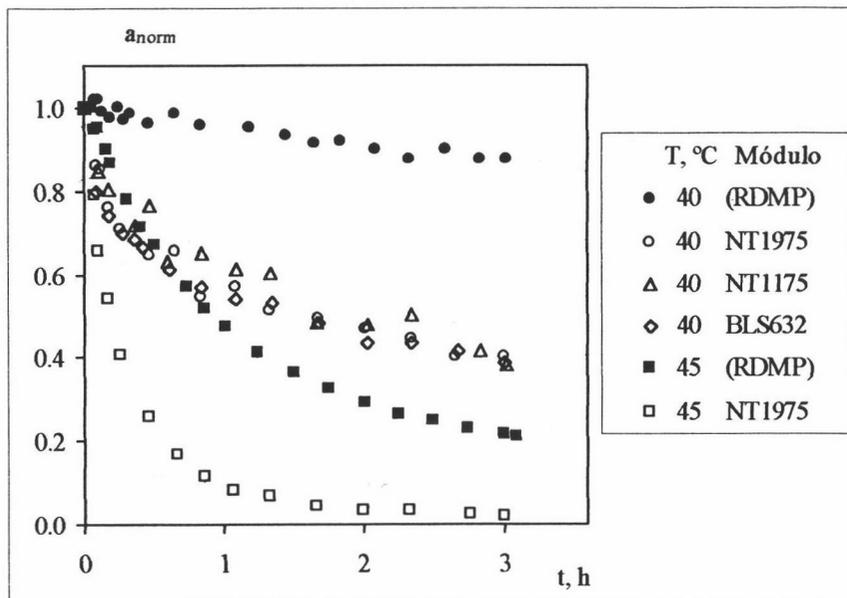


Figura 4.8 – Comparación de la actividad de Lactozym en RDMP y RFHR. Comportamiento de la enzima en distintos módulos de fibra hueca. Tampón K^+ y Mg^{+2} 40 y 45°C

c) Enzima glucosa isomerasa en RDMP y RFHR.

Para determinar la influencia que la temperatura ejerce sobre la actividad de la enzima glucosa isomerasa en RDMP, se realizaron ensayos de estabilidad térmica en Tampón Mg^{+2} a 40, 50 y 60°C, como se define en el apartado 3.3.4.1. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 4.29 a 4.33**.

En la **Figura 4.9** se muestra para la enzima Spezyme GI en RDMP, la actividad normalizada (a_{norm}) definida en [Ec. 4.1] frente al tiempo de reacción. Durante el tiempo de experimentación y temperaturas consideradas no se aprecia desactivación enzimática alguna.

En el RFHR, a 60°C y con un módulo NT1808S, **Luzón González (1993)** observó (**Figura 4.10**) que el sistema sufría una pérdida de actividad con el tiempo, si bien la enzima no sufre desactivación alguna a esa temperatura en un RDMP como se ha indicado anteriormente.

Tabla 4.29 - Estabilidad térmica en RDMP – Spezyme GI - Tampón Mg⁺² 40°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	4.94	1.00
0.25	5.02	1.02
0.53	5.00	1.01
1.10	4.92	1.00
1.50	4.95	1.00
1.97	4.79	0.97
1.97	4.84	0.98
2.52	4.75	0.96
2.75	4.95	1.00
2.75	4.91	0.99
2.98	4.60	0.93
3.23	4.85	0.98
3.23	4.98	1.01

Tabla 4.30 - Estabilidad térmica en RDMP – Spezyme GI - Tampón Mg⁺² 50°C (Experimento 1)

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	5.13	1.00
0.25	4.81	0.94
0.50	4.80	0.94
1.00	5.13	1.00
1.50	5.00	0.98
2.00	4.90	0.95
2.50	5.13	1.00
2.75	5.28	1.03
3.00	5.24	1.02

Tabla 4.31 - Estabilidad térmica en RDMP – Spezyme GI - Tampón Mg⁺² 50°C (Experimento 2)

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	4.89	1.00
0.25	4.79	0.98
0.50	4.66	0.95
1.00	4.60	0.94
1.50	4.47	0.91
2.00	4.79	0.98
2.50	4.89	1.00
2.75	4.92	1.01
3.00	4.98	1.02

Tabla 4.32 - Estabilidad térmica en RDMP – Spezyme GI - Tampón Mg⁺² 50°C (Experimento 3)

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	5.22	1.00
0.25	4.80	0.92
0.50	4.82	0.92
1.00	4.65	0.89
1.50	4.74	0.91
2.00	4.61	0.88
2.50	4.81	0.92
2.75	5.00	0.96
3.00	5.17	0.99

Tabla 4.33 - Estabilidad térmica en RDMP – Spezyme GI - Tampón Mg⁺² 60°C

t, h	a, mmol g ⁻¹ h ⁻¹	a _{norm}
0.00	5.04	1.00
0.28	5.06	1.00
0.33	4.98	0.99
1.02	4.94	0.98
1.50	4.70	0.93
1.50	4.66	0.92
2.00	4.88	0.97
2.00	4.59	0.91
2.50	4.97	0.99
2.78	4.75	0.94
3.02	4.73	0.94
3.38	4.95	0.98

Figura 4.9 – Actividad de la enzima glucosa-isomerasa Spezyme GI en RDMP - Tampón Mg^{+2}

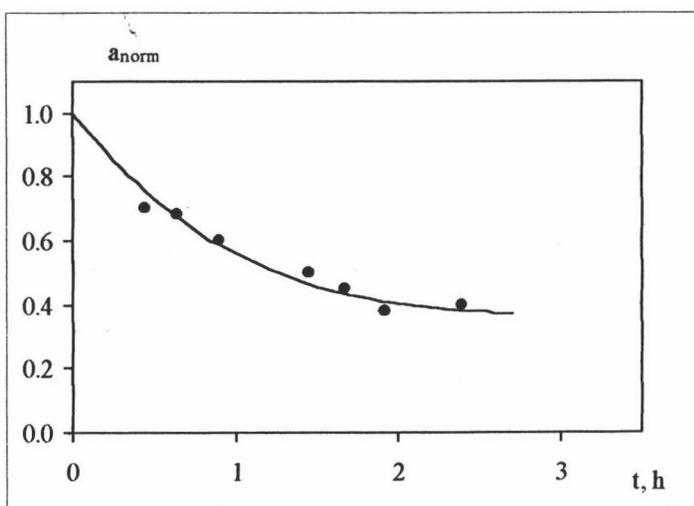
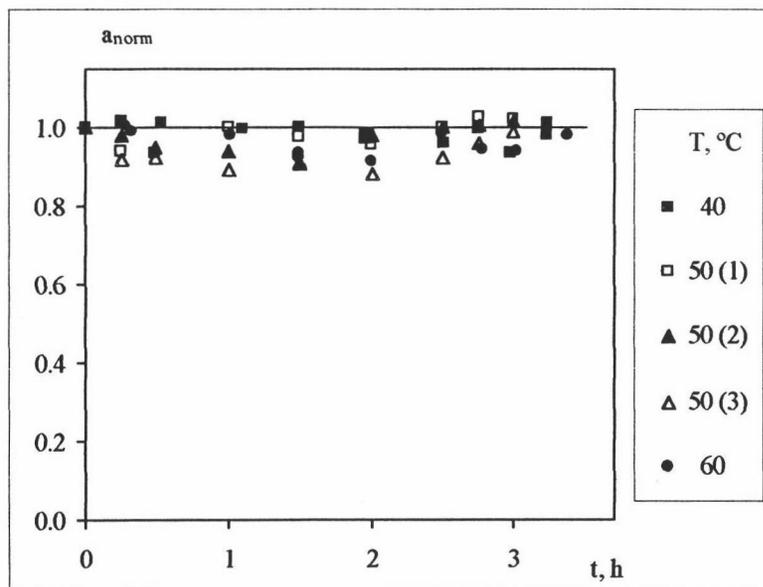


Figura 4.10– Actividad de la enzima glucosa-isomerasa Spezyme GI en RFHR $60^\circ C$

4.2 Isomerización fructosa-glucosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

La reacción de isomerización fructosa-glucosa se ha realizado en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP) utilizando como medio de reacción disoluciones de fructosa preparadas en Tampón Mg^{+2} (composición definida en apartado 3.1.2). En ausencia de glucosa inicial, la reacción se estudió a $40^{\circ}C$ modificándose la concentración de fructosa entre 0.05 y 1.50 M y la concentración de enzima entre 2.50 y 7.50 $g L^{-1}$ (Tabla 4.34)

Tabla 4.34 – Variables ensayadas para la isomerización fructosa-glucosa en reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP), $40^{\circ}C$, Tampón Mg^{+2}

S_0, M	$C_{E0}, g L^{-1}$
0.05	5.00
0.10	2.50, 5.00, 7.50
0.50	2.50, 5.00, 7.50
1.10	2.50, 5.00, 7.50
1.50	2.50, 5.00, 7.50

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las **Tablas 4.35 a 4.50**, donde se presentan los valores de conversión (x) obtenidos durante el tiempo de reacción frente al valor de la variable intensiva de tratamiento (y) ([Ec. 2.39]).

En las **Figuras 4.11 a 4.17** se muestra para los experimentos realizados a la temperatura de ensayo ($40^{\circ}C$), el valor de la conversión (x) alcanzado frente a la variable intensiva de tratamiento (y), analizándose en estos gráficos la influencia que la concentración de sustrato y enzima ejerce sobre la conversión.

Para experimentos realizados a una misma concentración de enzima (**Figuras 4.15 a 4.17**) la conversión obtenida aumenta con el tiempo de reacción y es mayor al disminuir la concentración total de fructosa empleada como cabría esperar. En experimentos realizados a la misma concentración de sustrato y diferentes concentraciones de enzima (**Figuras 4.11 a 4.14**), se advierte cómo los datos experimentales obtenidos se ajustan a una misma línea, lo que confirma que dentro del rango experimental analizado, la enzima no sufre desactivación alguna.

Tabla 4.35 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , $40^{\circ}C$, $S_0 = 0.05 M$, $C_{E0} = 5.00 g L^{-1}$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.100	0.50	0.018
0.168	0.84	0.030
0.250	1.25	0.044
0.333	1.67	0.058
0.500	2.50	0.084
0.665	3.33	0.108
0.858	4.29	0.135
1.003	5.02	0.154
1.218	6.09	0.181
1.523	7.62	0.215
1.775	8.88	0.241
2.023	10.1	0.264
2.273	11.4	0.286
2.472	12.4	0.302
2.708	13.5	0.319
2.850	14.3	0.328
2.965	14.8	0.336
3.070	15.4	0.343

Tabla 4.36 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , $40^{\circ}C$, $S_0 = 0.10 M$, $C_{E0} = 2.50 g L^{-1}$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.083	0.21	0.007
0.167	0.42	0.014
0.270	0.68	0.022
0.333	0.83	0.028
0.510	1.28	0.042
0.708	1.77	0.057
0.838	2.10	0.067
1.022	2.55	0.080
1.250	3.13	0.096
1.577	3.94	0.118
1.752	4.38	0.130
2.005	5.01	0.145
2.277	5.69	0.162
2.500	6.25	0.175
2.668	6.67	0.184
2.815	7.04	0.192
3.057	7.64	0.205
3.150	7.88	0.209

Tabla 4.37 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , $40^{\circ}C$, $S_0 = 0.10 M$, $C_{E0} = 5.00 g L^{-1}$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.087	0.43	0.012
0.197	0.98	0.028
0.257	1.28	0.036
0.333	1.67	0.046
0.502	2.51	0.068
0.672	3.36	0.089
0.875	4.38	0.112
1.007	5.03	0.127
1.233	6.17	0.151
1.473	7.37	0.175
1.747	8.73	0.200
2.022	10.1	0.224
2.267	11.3	0.243
2.530	12.7	0.263
2.800	14.0	0.281
2.930	14.7	0.290

Tabla 4.38 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , $40^{\circ}C$, $S_0 = 0.10 M$, $C_{E0} = 7.50 g L^{-1}$ (Experimento 1)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.095	0.71	0.021
0.175	1.31	0.039
0.258	1.94	0.056
0.335	2.51	0.072
0.497	3.73	0.103
0.685	5.14	0.136
0.862	6.46	0.165
1.060	7.95	0.195
1.278	9.59	0.225
1.613	12.1	0.266
1.750	13.1	0.281
2.008	15.1	0.307
2.267	17.0	0.330
2.508	18.8	0.349
2.718	20.4	0.364
2.847	21.4	0.373
2.918	21.9	0.377
3.012	22.6	0.383

Tabla 4.39 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 0.10$ M, $C_{E0} = 7.50$ g L⁻¹ (Experimento 2)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.093	0.70	0.022
0.168	1.26	0.039
0.297	2.23	0.067
0.367	2.75	0.082
0.500	3.75	0.108
0.670	5.03	0.139
0.865	6.49	0.172
1.000	7.50	0.193
1.258	9.44	0.230
1.522	11.4	0.264
1.755	13.2	0.290
2.015	15.1	0.316
2.267	17.0	0.338
2.503	18.8	0.357
2.752	20.6	0.375
2.938	22.0	0.387
3.102	23.3	0.397
3.183	23.9	0.401

Tabla 4.40 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 0.50$ M, $C_{E0} = 2.50$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.083	0.21	0.004
0.167	0.42	0.008
0.250	0.63	0.011
0.350	0.88	0.015
0.527	1.32	0.026
0.670	1.68	0.033
0.745	1.86	0.037
0.983	2.46	0.048
1.232	3.08	0.060
1.492	3.73	0.071
1.752	4.38	0.084
1.967	4.92	0.093
2.253	5.63	0.102
2.508	6.27	0.112
2.753	6.88	0.126
2.935	7.34	0.132
3.008	7.52	0.140
3.070	7.68	0.140

Tabla 4.41 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 0.50$ M, $C_{E0} = 5.00$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.097	0.48	0.008
0.167	0.83	0.014
0.253	1.27	0.021
0.337	1.68	0.028
0.505	2.53	0.042
0.672	3.36	0.055
0.825	4.13	0.067
1.000	5.00	0.080
1.287	6.43	0.100
1.507	7.53	0.115
1.817	9.08	0.135
2.000	10.0	0.147
2.250	11.3	0.162
2.492	12.5	0.176
2.750	13.8	0.191
2.842	14.2	0.195
3.005	15.0	0.204

Tabla 4.42 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 0.50$ M, $C_{E0} = 7.50$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.092	0.69	0.010
0.168	1.26	0.018
0.258	1.94	0.027
0.333	2.50	0.035
0.503	3.78	0.052
0.670	5.03	0.068
0.842	6.31	0.084
1.007	7.55	0.098
1.330	9.98	0.126
1.515	11.4	0.141
1.758	13.2	0.159
2.000	15.0	0.177
2.250	16.9	0.194
2.500	18.8	0.211
2.667	20.0	0.221
2.938	22.0	0.238

Tabla 4.43 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.10 M$, $C_{E0} = 2.50 g L^{-1}$ (Experimento 1)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.103	0.26	0.003
0.202	0.50	0.006
0.277	0.69	0.008
0.333	0.83	0.010
0.500	1.25	0.015
0.667	1.67	0.019
0.877	2.19	0.025
1.000	2.50	0.026
1.307	3.27	0.035
1.517	3.79	0.043
1.822	4.55	0.052
2.022	5.05	0.058
2.250	5.63	0.063
2.530	6.33	0.070
2.757	6.89	0.076
2.933	7.33	0.077
3.000	7.50	0.084

Tabla 4.44 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.10 M$, $C_{E0} = 2.50 g L^{-1}$ (Experimento 2)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.095	0.24	0.003
0.167	0.42	0.005
0.268	0.67	0.007
0.345	0.86	0.010
0.517	1.29	0.014
0.680	1.70	0.019
0.833	2.08	0.023
1.000	2.50	0.028
1.323	3.31	0.037
1.503	3.76	0.043
1.762	4.40	0.049
2.002	5.00	0.055
2.217	5.54	0.060
2.588	6.47	0.072
2.827	7.07	0.075
2.963	7.41	0.078
3.068	7.67	0.082
3.167	7.92	0.086

Tabla 4.45 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.10 M$, $C_{E0} = 5.00 g L^{-1}$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.083	0.42	0.004
0.167	0.83	0.008
0.257	1.28	0.013
0.337	1.68	0.016
0.513	2.57	0.024
0.672	3.36	0.031
0.837	4.18	0.039
1.010	5.05	0.047
1.255	6.28	0.058
1.502	7.51	0.069
1.752	8.76	0.079
2.000	10.0	0.086
2.513	12.6	0.108
2.750	13.8	0.119
2.937	14.7	0.125
3.000	15.0	0.124

Tabla 4.46 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.10 M$, $C_{E0} = 7.50 g L^{-1}$ (Experimento 1)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.098	0.74	0.002
0.167	1.25	0.011
0.265	1.99	0.016
0.348	2.61	0.023
0.500	3.75	0.032
0.698	5.24	0.043
0.843	6.33	0.059
1.003	7.53	0.067
1.263	9.48	0.077
2.208	16.6	0.131
2.533	19.0	0.158
2.838	21.3	0.166
2.927	22.0	0.160
3.047	22.9	0.179
3.207	24.1	0.167

Tabla 4.47 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.10$ M, $C_{E0} = 7.50$ g L⁻¹ (Experimento 2)

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.090	0.68	0.005
0.183	1.38	0.012
0.285	2.14	0.011
0.342	2.56	0.022
0.513	3.85	0.033
0.687	5.15	0.044
0.837	6.28	0.053
1.027	7.70	0.066
1.268	9.51	0.079
1.562	11.7	0.095
1.770	13.3	0.109
2.005	15.0	0.124
2.265	17.0	0.137
2.510	18.8	0.151
2.992	22.4	0.166
3.063	23.0	0.172

Tabla 4.48 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.50$ M, $C_{E0} = 2.50$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.087	0.22	0.002
0.182	0.45	0.004
0.253	0.63	0.006
0.333	0.83	0.007
0.500	1.25	0.011
0.673	1.68	0.016
0.838	2.10	0.019
1.003	2.51	0.022
1.265	3.16	0.028
1.500	3.75	0.033
1.752	4.38	0.039
2.002	5.00	0.044
2.250	5.63	0.048
2.585	6.46	0.055
2.748	6.87	0.059
2.923	7.31	0.067
3.005	7.51	0.062
3.077	7.69	0.065

Tabla 4.49 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.50$ M, $C_{E0} = 5.00$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.100	0.50	0.001
0.185	0.93	0.007
0.260	1.30	0.009
0.337	1.68	0.013
0.502	2.51	0.018
0.670	3.35	0.024
0.840	4.20	0.032
0.995	4.98	0.036
1.167	5.83	0.042
1.428	7.14	0.050
1.783	8.92	0.062
1.997	9.98	0.070
2.248	11.2	0.075
2.525	12.6	0.080
2.717	13.6	0.094
2.825	14.1	0.098
2.917	14.6	0.098
3.000	15.0	0.099

Tabla 4.50 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP, Tampón Mg^{+2} , 40°C, $S_0 = 1.50$ M, $C_{E0} = 7.50$ g L⁻¹

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.097	0.73	0.003
0.172	1.29	0.009
0.262	1.96	0.014
0.340	2.55	0.018
0.500	3.75	0.026
0.690	5.18	0.035
0.835	6.26	0.042
0.998	7.49	0.050
1.250	9.38	0.062
1.505	11.3	0.074
1.783	13.4	0.084
1.995	15.0	0.095
2.263	17.0	0.107
2.560	19.2	0.117
2.760	20.7	0.121
2.933	22.0	0.132
2.997	22.5	0.136
3.078	23.1	0.138

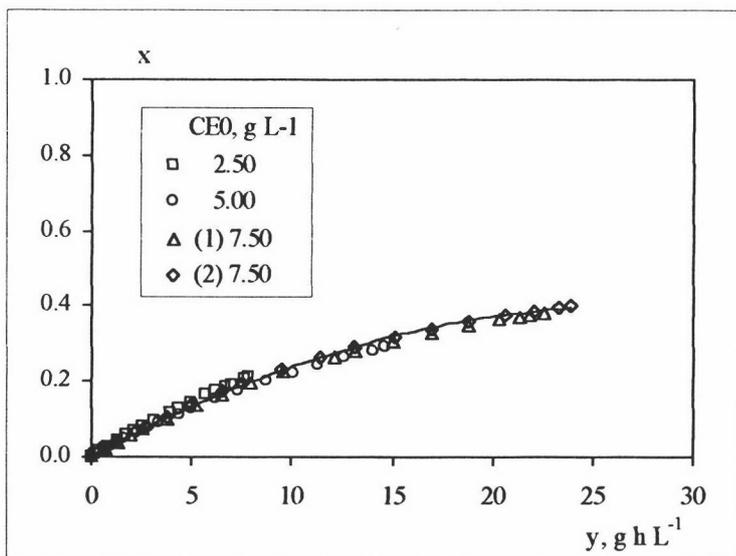


Figura 4.11 - Isomerización fructosa-glucosa en RDMP - Influencia de la concentración de enzima 40°C, S₀ = 0.10 M, Tampón Mg⁺²

Figura 4.12 - Isomerización fructosa-glucosa en RDMP - Influencia de la concentración de enzima 40°C, S₀ = 0.50 M, Tampón Mg⁺²

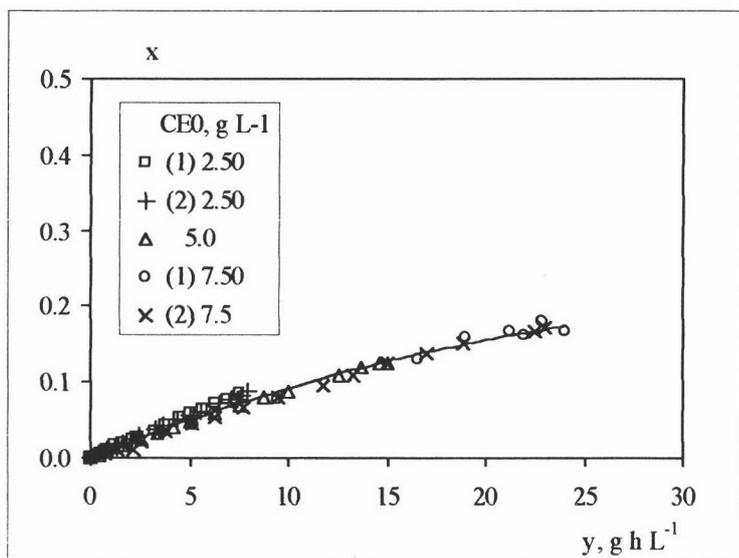
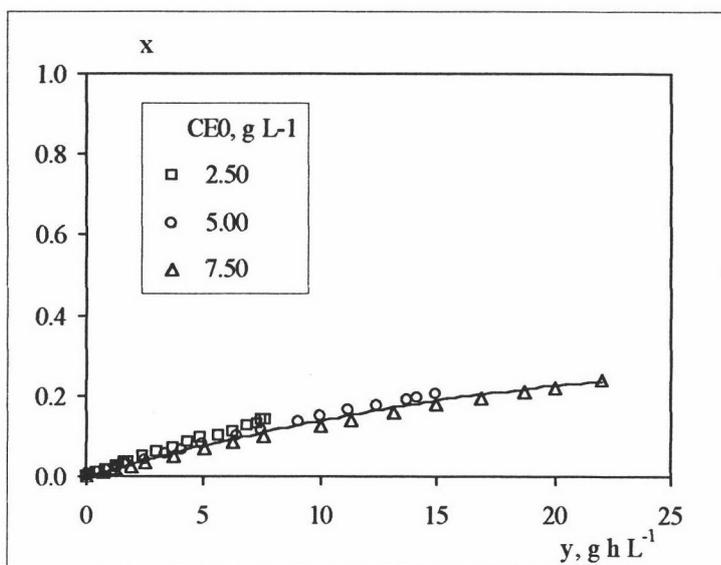


Figura 4.13 - Isomerización fructosa-glucosa en RDMP - Influencia de la concentración de enzima 40°C, S₀ = 1.10 M, Tampón Mg⁺²

Figura 4.14 -
Isomerización fructosa-
glucosa en RDMP -
Influencia de la
concentración de enzima
40°C, $S_0 = 1.50$ M,
Tampón Mg^{+2}

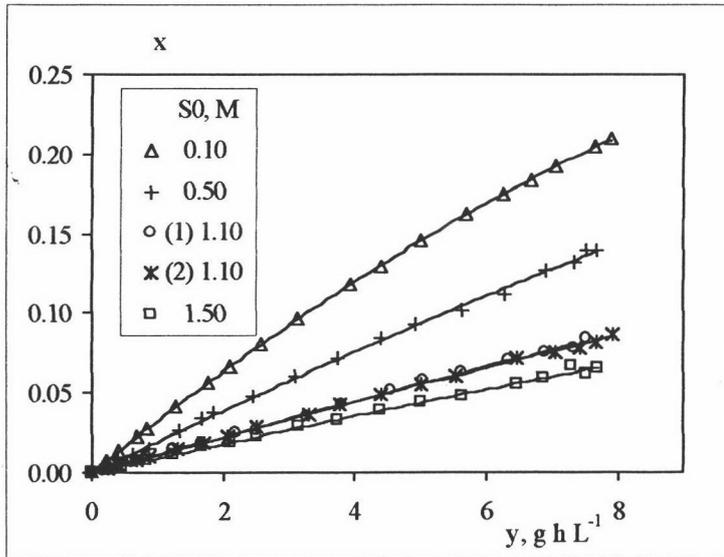
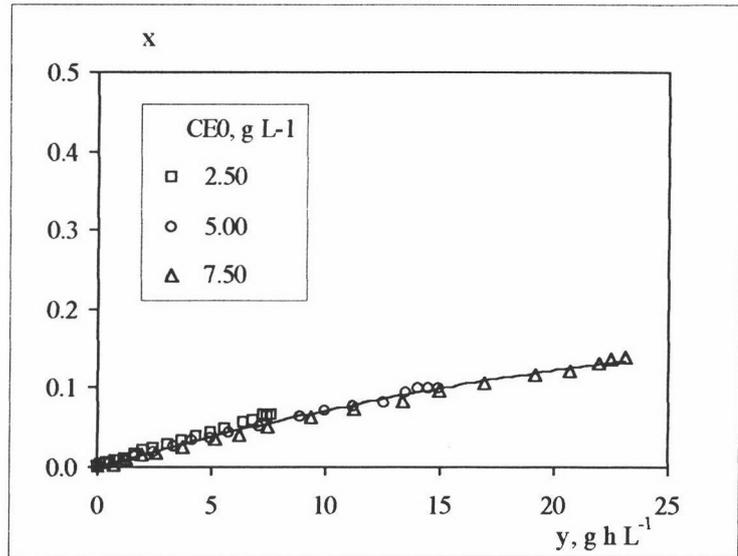
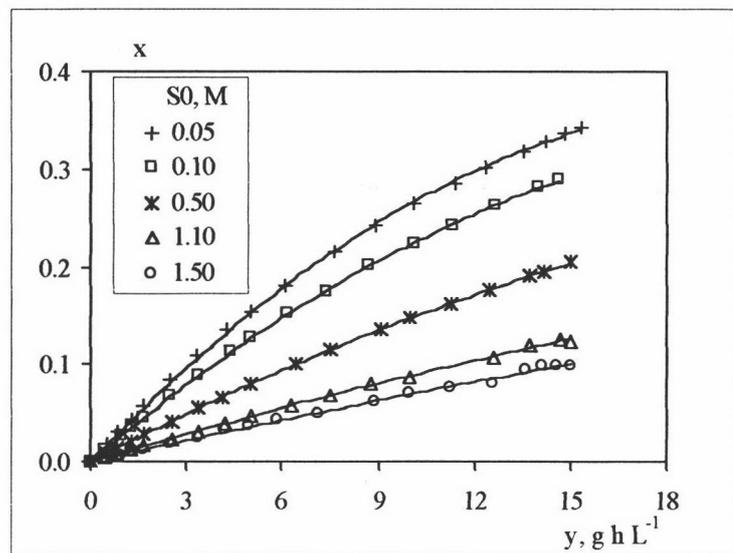


Figura 4.15 -
Isomerización fructosa-
glucosa en RDMP -
Influencia de la
concentración de sustrato
40°C, $C_{E0} = 2.50$ g L⁻¹,
Tampón Mg^{+2}

Figura 4.16 -
Isomerización fructosa-
glucosa en RDMP -
Influencia de la
concentración de sustrato
40°C, $C_{E0} = 5.00$ g L⁻¹,
Tampón Mg^{+2}



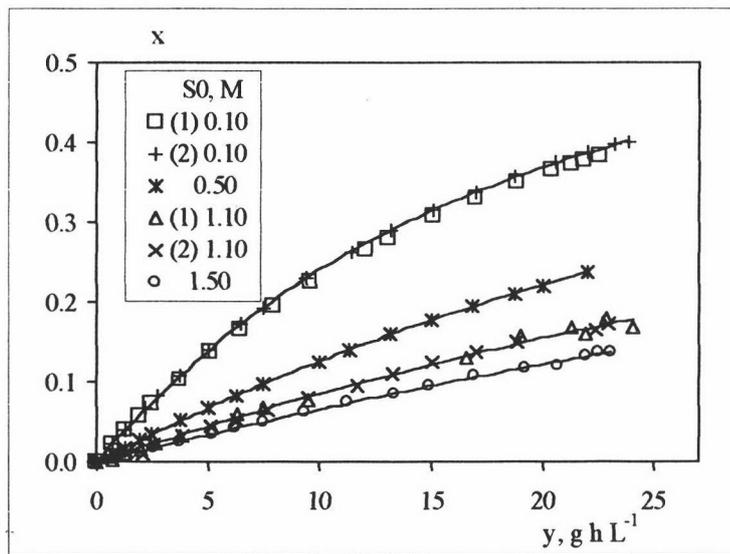


Figura 4.17 - Isomerización fructosa-glucosa en RDMP - Influencia de la concentración de sustrato 40°C, $C_{E0} = 7.50 \text{ g L}^{-1}$, Tampón Mg^{+2}

4.3 Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

La hidrólisis enzimática de lactosa se ha llevado a cabo en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP) con la enzima Lactozym, utilizando como medio de reacción disoluciones de lactosa preparadas en el Tampón K⁺ y Mg⁺² (composición definida en apartado 3.1.1). La reacción se estudió en un rango de temperaturas comprendido entre 25 y 40°C, modificándose la concentración de lactosa monohidratada (L₀) entre 0.0278 y 0.208 M y la concentración de enzima (C_{E0}) entre 0.10 y 3.00 g L⁻¹ (Tabla 4.51)

Tabla 4.51 – Variables ensayadas para la hidrólisis enzimática de lactosa en reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP)

T, °C	L ₀ , M	Lactozym L ₀ , g L ⁻¹	Tampón K ⁺ y Mg ⁺² C _{E0} , g L ⁻¹
25	0.0278	10	0.50
	0.0694	25	0.10, 0.50, 1.00, 3.00
	0.139	50	0.10, 0.50, 1.00, 3.00
	0.208	75	0.50
30	0.0278	10	0.10, 0.50, 1.00
	0.0694	25	0.10, 0.50, 1.00
	0.139	50	0.10, 0.50, 1.00
	0.208	75	0.10, 0.50, 1.00
40	0.0278	10	0.50
	0.0694	25	0.10, 0.50, 1.00, 3.00
	0.139	50	0.10, 0.50, 1.00, 3.00
	0.208	75	3.00

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las **Tablas 4.52 a 4.83**, donde se presentan los valores de conversión (x) obtenidos durante el tiempo de reacción (t) y el valor de la variable intensiva de tratamiento (y), definida de forma similar a como se definió para la isomerización fructosa glucosa como:

$$y = \sum_i m_i \frac{\Delta t_i}{V_i} \quad [\text{Ec. 4.2}]$$

En las **Figuras 4.18 a 4.20** se muestra, para experimentos realizados a una misma temperatura de ensayo, el valor de la conversión (x) alcanzado frente a la

variable intensiva de tratamiento (y), analizándose en estos gráficos la influencia que la concentración de sustrato y enzima ejerce sobre la conversión.

En experimentos realizados a una misma temperatura y concentración de enzima se observa que la conversión aumenta al disminuir la concentración de sustrato tal y como cabría esperar. En experimentos realizados a una misma temperatura y concentración de sustrato, se advierte cómo los datos experimentales obtenidos a distintas concentraciones de enzima se ajustan a una misma línea, lo que confirma que dentro del rango de temperatura, concentración de sustrato y concentración de enzima ensayado, la enzima no sufre desactivación alguna.

Tabla 4.52 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.0278 M$, $C_{E0} = 0.50 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.035	1.65	0.066
0.068	3.23	0.125
0.123	5.83	0.220
0.172	8.11	0.293
0.217	10.2	0.321
0.270	12.8	0.406
0.333	15.8	0.473
0.422	19.9	0.575
0.507	23.9	0.648
0.665	31.4	0.721
0.840	39.7	0.792
1.023	48.4	0.903
1.170	55.3	0.928
1.417	66.9	0.913
1.667	78.8	0.938
1.918	90.6	0.964
2.003	94.7	0.984

Tabla 4.53 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.0694 M$, $C_{E0} = 0.10 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.000	0.000
0.042	0.418	0.008
0.083	0.828	0.018
0.125	1.25	0.027
0.168	1.68	0.038
0.252	2.52	0.050
0.333	3.33	0.071
0.423	4.23	0.103
0.500	5.00	0.129
0.605	6.05	0.147
0.700	7.00	0.176
0.877	8.77	0.205
1.000	10.0	0.206
1.217	12.2	0.230
1.408	14.1	0.274
1.600	16.0	0.295
1.800	18.0	0.349
2.000	20.0	0.310

Tabla 4.54 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.0694 M$, $C_{E0} = 0.50 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.042	2.08	0.045
0.083	4.17	0.092
0.125	6.25	0.118
0.167	8.33	0.168
0.250	12.5	0.236
0.333	16.7	0.328
0.417	20.8	0.340
0.500	25.0	0.440
0.670	33.5	0.543
0.840	42.0	0.601
1.007	50.3	0.694
1.183	59.2	0.714
1.388	69.4	0.809
1.547	77.3	0.809
1.760	88.0	0.880
2.000	100	0.884

Tabla 4.55 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.0694 M$, $C_{E0} = 1.00 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.030	3.02	0.062
0.055	5.51	0.119
0.075	7.50	0.152
0.100	10.0	0.204
0.135	13.5	0.253
0.167	16.7	0.310
0.208	20.8	0.356
0.255	25.5	0.452
0.313	31.3	0.504
0.367	36.7	0.581
0.433	43.3	0.623
0.517	51.7	0.714
0.603	60.3	0.749
0.722	72.2	0.814
0.855	85.5	0.850
0.997	99.7	0.904
1.167	117	0.925
1.328	133	0.961

Tabla 4.56 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.0694 M$, $C_{E0} = 3.00 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.030	9.02	0.186
0.050	15.0	0.290
0.072	21.5	0.380
0.097	29.0	0.489
0.133	40.0	0.577
0.167	50.0	0.672
0.200	60.0	0.714
0.233	70.0	0.791
0.267	80.0	0.813
0.300	90.0	0.864
0.333	100	0.870
0.375	113	0.906
0.417	125	0.945

Tabla 4.57 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.139 M$, $C_{E0} = 0.10 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.000	0.000
0.050	0.501	0.005
0.083	0.832	0.009
0.125	1.25	0.012
0.167	1.67	0.019
0.340	3.40	0.037
0.418	4.18	0.042
0.502	5.02	0.053
0.670	6.70	0.068
0.833	8.33	0.086
1.003	10.0	0.100
1.167	11.7	0.123
1.417	14.2	0.140
1.583	15.8	0.161
1.990	19.9	0.186
2.042	20.4	0.202

Tabla 4.58 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.139 M$, $C_{E0} = 0.50 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.042	2.08	0.023
0.083	4.17	0.048
0.125	6.25	0.065
0.167	8.33	0.096
0.250	12.5	0.120
0.333	16.7	0.176
0.417	20.8	0.200
0.500	25.0	0.256
0.833	41.7	0.389
1.002	50.1	0.410
1.217	60.8	0.489
1.440	72.0	0.560
1.667	83.3	0.611
1.890	94.5	0.644

Tabla 4.59 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.139 M$, $C_{E0} = 1.00 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.042	4.21	0.045
0.085	8.53	0.096
0.125	12.5	0.130
0.167	16.7	0.183
0.212	21.2	0.209
0.252	25.2	0.261
0.337	33.7	0.314
0.420	42.0	0.384
0.500	50.0	0.421
0.672	67.2	0.556
0.752	75.2	0.563
0.837	83.7	0.627
1.005	101	0.668
1.267	127	0.778
1.535	154	0.805
1.790	179	0.869
2.000	200	0.844

Tabla 4.60 - Hidrólisis de lactosa en RDMP — Lactozym - Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.139 M$, $C_{E0} = 3.00 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.033	10.0	0.111
0.057	17.0	0.192
0.113	34.0	0.326
0.133	40.0	0.393
0.158	47.5	0.413
0.187	56.0	0.501
0.227	68.0	0.531
0.273	82.0	0.632
0.315	94.5	0.647
0.358	108	0.731
0.405	122	0.751
0.462	139	0.810
0.635	191	0.892

Tabla 4.61 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 25°C, $L_0 = 0.208 M$, $C_{E0} = 0.50 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.047	2.23	0.017
0.083	3.95	0.030
0.167	7.95	0.058
0.217	10.2	0.077
0.272	12.8	0.097
0.333	15.8	0.112
0.417	19.7	0.140
0.500	23.6	0.153
0.587	27.7	0.199
0.668	31.6	0.222
0.833	39.4	0.258
1.000	47.3	0.298
1.168	55.2	0.349
1.705	80.6	0.458
1.842	87.0	0.472
2.002	94.6	0.489

Tabla 4.62 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 30°C, $L_0 = 0.0278 M$, $C_{E0} = 0.10 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.000	0.000
0.042	0.418	0.025
0.085	0.852	0.052
0.167	1.67	0.097
0.250	2.50	0.142
0.333	3.33	0.184
0.418	4.18	0.224
0.513	5.13	0.263
0.585	5.85	0.308
0.670	6.70	0.339
0.835	8.35	0.404
1.000	10.0	0.458
1.177	11.8	0.529
1.342	13.4	0.581
1.587	15.9	0.649
1.833	18.3	0.702
2.005	20.1	0.735

Tabla 4.63 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 30°C, $L_0 = 0.0278 M$, $C_{E0} = 0.50 g L^{-1}$

t, h	$10^2 y, g h L^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.048	2.41	0.138
0.088	4.42	0.241
0.130	6.50	0.338
0.175	8.82	0.427
0.253	12.7	0.538
0.333	16.7	0.656
0.498	24.9	0.804
0.585	29.3	0.872
0.675	33.8	0.915
0.752	37.6	0.939

Tabla 4.64 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.0278 M, C_{E0} = 1.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	4.50	0.243
0.095	9.51	0.443
0.128	12.8	0.551
0.173	17.3	0.664
0.228	22.8	0.765
0.303	30.3	0.853
0.372	37.2	0.933
0.435	43.5	0.970

Tabla 4.65 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 0.10 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.000
0.042	0.420	0.012
0.083	0.829	0.024
0.127	1.27	0.037
0.167	1.67	0.049
0.260	2.60	0.074
0.350	3.50	0.098
0.418	4.18	0.125
0.503	5.03	0.146
0.598	5.98	0.170
0.685	6.85	0.189
0.847	8.47	0.231
1.017	10.2	0.268
1.182	11.8	0.307
1.368	13.7	0.346
1.587	15.9	0.393
1.847	18.5	0.434
2.062	20.6	0.475

Tabla 4.66 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 0.50 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	2.38	0.066
0.087	4.33	0.124
0.122	6.10	0.168
0.167	8.34	0.225
0.250	12.5	0.319
0.337	16.8	0.400
0.417	20.8	0.490
0.510	25.5	0.566
0.638	31.9	0.645
0.740	37.0	0.725
0.887	44.3	0.792
1.000	50.0	0.853
1.217	60.8	0.899
1.368	68.4	0.932
1.585	79.3	0.978
2.000	100	0.992

Tabla 4.67 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 1.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.035	3.50	0.100
0.067	6.71	0.182
0.117	11.7	0.300
0.173	17.3	0.408
0.217	21.7	0.466
0.265	26.5	0.565
0.338	33.8	0.600
0.425	42.5	0.741
0.512	51.2	0.862
0.605	60.5	0.891
0.667	66.7	0.937
0.783	78.3	0.959
1.090	109	0.986
1.283	128	0.994

Tabla 4.68 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.139 M, C_{E0} = 0.10 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.000
0.042	0.421	0.006
0.083	0.829	0.013
0.125	1.25	0.019
0.167	1.67	0.026
0.255	2.55	0.038
0.333	3.33	0.050
0.417	4.17	0.060
0.500	5.00	0.070
0.672	6.72	0.096
0.833	8.33	0.124
1.007	10.1	0.141
1.167	11.7	0.165
1.333	13.3	0.185
1.583	15.8	0.219
1.842	18.4	0.252
2.002	20.0	0.267

Tabla 4.69 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.139 M, C_{E0} = 0.50 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	2.02	0.031
0.083	4.15	0.064
0.125	6.26	0.095
0.168	8.40	0.125
0.250	12.5	0.179
0.335	16.8	0.238
0.418	20.9	0.279
0.502	25.1	0.339
0.583	29.2	0.380
0.675	33.8	0.427
0.833	41.7	0.486
1.000	50.0	0.556
1.178	58.9	0.617
1.362	68.1	0.660
1.555	77.8	0.709
1.833	91.7	0.767
2.045	102	0.787

Tabla 4.70 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.139 M, C_{E0} = 1.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.037	3.70	0.056
0.067	6.69	0.111
0.113	11.3	0.165
0.192	19.2	0.280
0.242	24.2	0.318
0.300	30.0	0.393
0.372	37.2	0.446
0.450	45.0	0.543
0.535	53.5	0.592
0.633	63.3	0.636
0.717	71.7	0.707
0.807	80.7	0.724
0.885	88.5	0.793
1.000	100	0.805
1.253	125	0.888
1.522	152	0.930
1.753	175	0.954
2.000	200	0.967

Tabla 4.71 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.208 M, C_{E0} = 0.10 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.000
0.042	0.419	0.004
0.083	0.828	0.009
0.137	1.37	0.014
0.170	1.70	0.017
0.255	2.55	0.025
0.333	3.33	0.031
0.427	4.27	0.042
0.507	5.07	0.052
0.673	6.73	0.066
0.853	8.53	0.085
1.072	10.7	0.107
1.300	13.0	0.127
1.557	15.6	0.144
1.805	18.1	0.173
2.028	20.3	0.192

Tabla 4.72 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.208 M, C_{E0} = 0.50 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.042	2.12	0.022
0.090	4.50	0.047
0.138	6.92	0.072
0.168	8.39	0.086
0.208	10.4	0.104
0.250	12.5	0.124
0.333	16.7	0.163
0.417	20.8	0.196
0.500	25.0	0.232
0.585	29.3	0.263
0.667	33.3	0.304
0.883	44.2	0.393
1.057	52.8	0.422
1.343	67.2	0.504
1.590	79.5	0.578
1.842	92.1	0.635
2.000	100	0.661

Tabla 4.73 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 30°C, L₀ = 0.208 M, C_{E0} = 1.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.038	3.79	0.041
0.067	6.72	0.071
0.103	10.3	0.104
0.130	13.0	0.128
0.167	16.7	0.155
0.208	20.8	0.196
0.250	25.0	0.228
0.303	30.3	0.269
0.367	36.7	0.326
0.433	43.3	0.369
0.502	50.2	0.405
0.583	58.3	0.452
0.670	67.0	0.509
0.760	76.0	0.525
0.842	84.2	0.584
1.002	100	0.628
1.167	117	0.700
1.333	133	0.711
1.550	155	0.783
1.750	175	0.799
2.003	200	0.845

Tabla 4.74 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.0278 M, C_{E0} = 0.50 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.030	1.48	0.122
0.050	2.47	0.192
0.067	3.34	0.257
0.083	3.99	0.306
0.115	5.49	0.382
0.152	7.28	0.464
0.183	8.73	0.545
0.218	10.3	0.602
0.250	11.8	0.659
0.302	14.3	0.692
0.352	16.6	0.736
0.417	19.7	0.816
0.487	23.0	0.862
0.552	26.1	0.862
0.635	30.0	0.874
0.717	33.9	0.924
0.802	37.9	0.938

Tabla 4.75 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 0.10 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.000
0.045	0.452	0.021
0.083	0.829	0.040
0.125	1.25	0.057
0.167	1.67	0.082
0.260	2.60	0.114
0.337	3.37	0.159
0.417	4.17	0.189
0.565	5.65	0.228
0.650	6.50	0.271
0.755	7.55	0.301
0.870	8.70	0.352
1.037	10.4	0.388
1.228	12.3	0.463
1.432	14.3	0.482
1.705	17.1	0.577
1.992	19.9	0.609
2.050	20.5	0.644

Tabla 4.76 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 0.50 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.043	2.26	0.101
0.083	4.15	0.191
0.125	6.25	0.273
0.167	8.32	0.354
0.250	12.5	0.470
0.333	16.7	0.593
0.417	20.8	0.650
0.500	25.0	0.755
0.583	29.2	0.765
0.668	33.4	0.832
0.752	37.6	0.850
0.840	42.0	0.888
0.920	46.0	0.896
1.000	50.0	0.899
1.168	58.4	0.937

Tabla 4.77 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 1.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.042	4.22	0.181
0.083	8.31	0.345
0.125	12.5	0.468
0.167	16.7	0.579
0.208	20.8	0.654
0.260	26.0	0.746
0.298	29.8	0.773
0.337	33.7	0.835
0.390	39.0	0.850
0.435	43.5	0.914
0.500	50.0	0.902
0.592	59.2	0.971
0.667	66.7	0.954
0.750	75.0	0.984

Tabla 4.78 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.0694 M, C_{E0} = 3.00 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.070	21.0	0.669
0.117	35.0	0.835
0.188	56.5	0.960
0.250	75.0	0.974
0.302	90.5	0.991
0.503	151	0.979

Tabla 4.79 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K⁺ y Mg⁺², 40°C, L₀ = 0.139 M, C_{E0} = 0.10 g L⁻¹

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.000
0.060	0.601	0.014
0.083	0.829	0.022
0.130	1.30	0.032
0.197	1.97	0.051
0.262	2.62	0.064
0.333	3.33	0.081
0.422	4.22	0.108
0.555	5.55	0.136
0.637	6.37	0.160
0.752	7.52	0.174
0.918	9.18	0.219
1.127	11.3	0.253
1.305	13.1	0.296
1.500	15.0	0.322
1.750	17.5	0.377
2.007	20.1	0.404
2.200	22.0	0.405

Tabla 4.80 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 40°C, $L_0 = 0.139$ M, $C_{E0} = 0.50$ g L^{-1}

t, h	10^2 y, g h L^{-1}	x
0.000	0.00	0.000
0.043	2.16	0.057
0.087	4.36	0.108
0.127	6.34	0.161
0.167	8.36	0.198
0.252	12.6	0.303
0.333	16.7	0.362
0.423	21.2	0.422
0.500	25.0	0.508
0.668	33.4	0.600
0.872	43.6	0.724
1.027	51.3	0.759
1.197	59.8	0.821
1.768	88.4	0.911
2.002	100	0.933
2.193	110	0.956
2.267	113	0.963

Tabla 4.81 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 40°C, $L_0 = 0.139$ M, $C_{E0} = 1.00$ g L^{-1}

t, h	10^2 y, g h L^{-1}	x
0.000	0.00	0.000
0.033	3.31	0.073
0.077	7.67	0.196
0.117	11.7	0.269
0.158	15.8	0.362
0.200	20.0	0.421
0.250	25.0	0.525
0.300	30.0	0.560
0.350	35.0	0.652
0.400	40.0	0.674
0.450	45.0	0.747
0.507	50.7	0.769
0.583	58.3	0.831
0.658	65.8	0.831
0.742	74.2	0.869
0.822	82.2	0.899
0.910	91.0	0.916
1.015	102	0.924
1.147	115	0.976
1.353	135	0.966

Tabla 4.82 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 40°C, $L_0 = 0.139$ M, $C_{E0} = 3.00$ g L^{-1}

t, h	10^2 y, g h L^{-1}	x
0.000	0.0	0.000
0.043	13.0	0.279
0.088	26.5	0.526
0.135	40.5	0.665
0.170	51.0	0.762
0.217	65.0	0.824
0.267	80.0	0.899
0.318	95.5	0.935
0.417	125	0.951
0.478	144	0.955
0.537	161	0.959
0.585	176	0.967
0.653	196	0.999

Tabla 4.83 - Hidrólisis de lactosa en RDMP, Lactozym, Tampón K^+ y Mg^{+2} , 40°C, $L_0 = 0.208$ M, $C_{E0} = 3.00$ g L^{-1}

t, h	10^2 y, g h L^{-1}	x
0.000	0.0	0.000
0.033	10.0	0.159
0.058	17.5	0.283
0.083	25.0	0.366
0.112	33.5	0.478
0.140	42.0	0.551
0.167	50.0	0.617
0.208	62.5	0.679
0.253	76.0	0.757
0.293	88.0	0.813
0.342	103	0.849
0.393	118	0.856
0.453	136	0.896
0.500	150	0.899
0.577	173	0.956
0.642	193	0.906

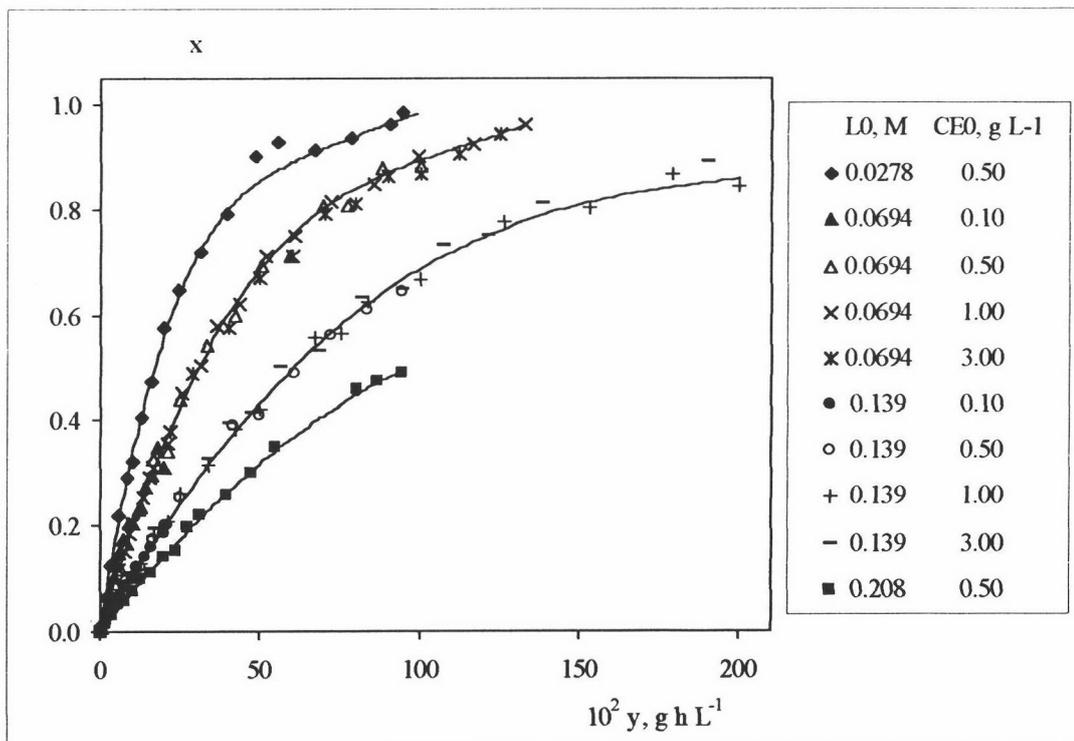


Figura 4.18 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Variación de x frente a y 25°C Tampón K⁺ y Mg⁺²

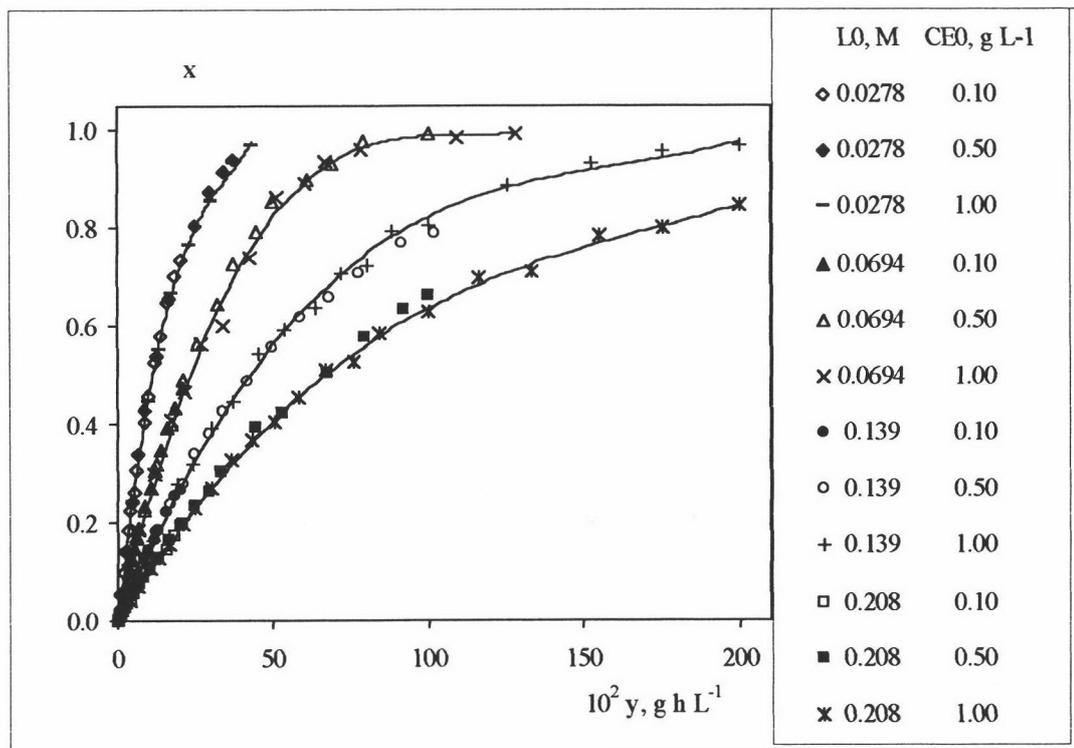


Figura 4.19 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Variación de x frente a y 30°C Tampón K⁺ y Mg⁺²

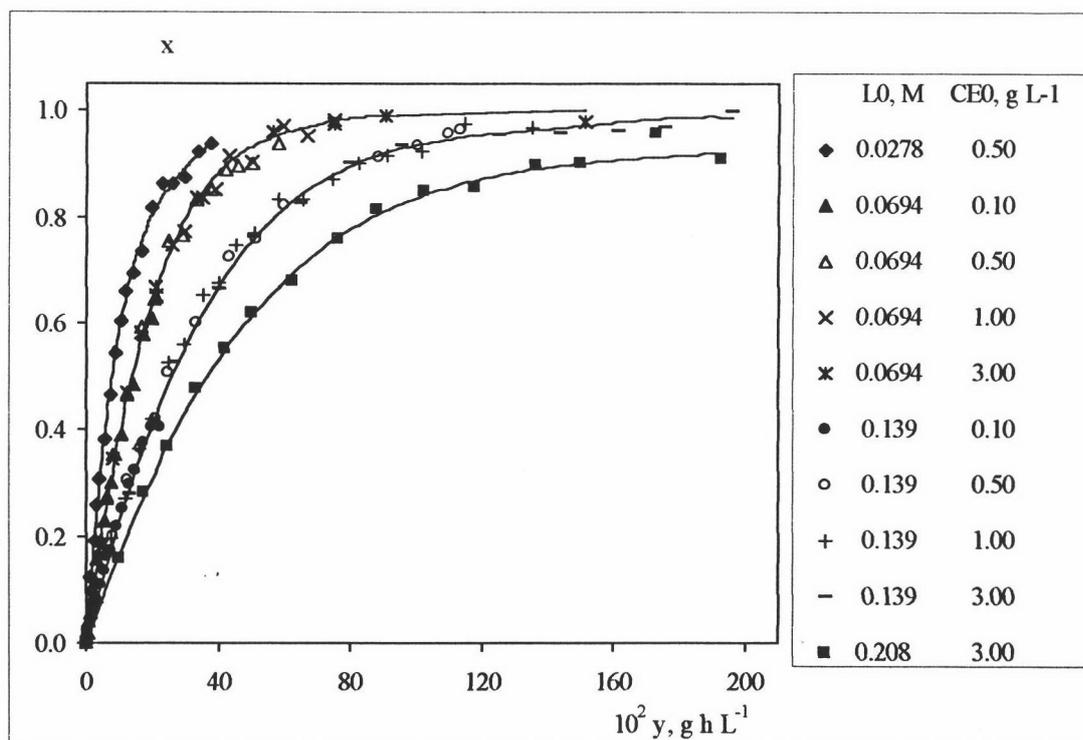


Figura 4.20 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Variación de x frente a y 40°C Tampón K^+ y Mg^{+2}

4.4 Isomerización fructosa-glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

La reacción de isomerización de fructosa-glucosa se llevó a cabo en Tampón Mg^{+2} a $pH=7.5$ (definido en apartado 3.1.2) dentro de un dispositivo experimental con reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR), utilizándose el módulo NT-1808S cuyas características se recogen en la **Tabla 3.1**. La reacción se llevó a cabo a la temperatura de $40^{\circ}C$ en ausencia de glucosa inicial, modificándose la concentración de fructosa entre 0.05 y 1.50 M y la masa de enzima en el circuito del ECS (m) entre 0.50 y 1.50 gramos (**Tabla 4.84**). Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las **Tablas 4.85 a 4.92**, donde se presentan los valores de conversión (x) obtenidos en función del tiempo (t), así como el valor de la variable intensiva de tratamiento (y) definida en la ecuación [Ec. 2.39].

Tabla 4.84 – Variables ensayadas para la isomerización fructosa glucosa en RFHR. Módulo de fibra hueca NT1808S. Spezyme GI $40^{\circ}C$ Tampón Mg^{+2}

S_0, M	m, g	$^1 C_{EC}, g L^{-1}$
0.05	1.00	6.45
0.10	1.00, 1.50	6.45, 9.68
0.50	1.00, 1.50	6.45, 9.68
1.10	1.00	6.45
1.50	0.50, 1.50	3.23, 9.68

¹ C_{EC} = concentración de enzima en el circuito del ECS del RFHR.

En las **Figuras 4.21 a 4.25** se muestra para los experimentos realizados a la temperatura de ensayo ($40^{\circ}C$), el valor de la conversión (x) alcanzado frente a la variable intensiva de tratamiento (y), analizándose la influencia que la concentración de sustrato y enzima ejerce sobre la conversión.

Para experimentos realizados a una misma concentración de enzima (**Figuras 4.24 y 4.25**) la conversión obtenida aumenta con el tiempo de isomerización y disminuye para un mismo tiempo con la concentración total de hexosas empleada como cabría esperar. Para experimentos realizados a concentraciones de sustrato similares (**Figuras 4.21 a 4.23**), los experimentos realizados a distintas concentraciones de enzima se superponen, lo que nos confirma que dentro del rango experimental analizado, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de enzima y que ésta parece no sufrir desactivación alguna.

Tabla 4.85 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg⁺² 40°C S₀ = 0.05 M m = 1.00 g

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.097	0.161	0.0021
0.187	0.311	0.0041
0.250	0.416	0.0055
0.333	0.555	0.0073
0.505	0.842	0.0111
0.698	1.17	0.0152
0.833	1.39	0.0181
1.037	1.73	0.0224
1.353	2.26	0.0290
1.503	2.51	0.0321
1.750	2.93	0.0371
1.998	3.35	0.0421
2.250	3.77	0.0471
2.467	4.13	0.0514
2.677	4.49	0.0555
2.837	4.76	0.0586
2.917	4.89	0.0601
3.000	5.03	0.0617

Tabla 4.86 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg⁺² 40°C S₀ = 0.10 M m = 1.00 g

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.087	0.144	0.0025
0.167	0.278	0.0047
0.275	0.458	0.0071
0.333	0.555	0.0083
0.500	0.834	0.0117
0.667	1.11	0.0150
0.833	1.39	0.0179
1.000	1.67	0.0206
1.250	2.09	0.0257
1.525	2.55	0.0308
1.757	2.94	0.0366
2.017	3.38	0.0409
2.252	3.77	0.0457
2.470	4.14	0.0521
2.667	4.47	0.0526
2.837	4.76	0.0565
2.917	4.89	0.0592
3.002	5.04	0.0610

Tabla 4.87 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg⁺² 40°C S₀ = 0.10 M m = 1.50 g

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.100	0.250	0.0038
0.167	0.416	0.0062
0.270	0.674	0.0095
0.333	0.833	0.0113
0.507	1.27	0.0163
0.667	1.67	0.0206
0.837	2.09	0.0256
1.033	2.59	0.0322
1.250	3.13	0.0396
1.500	3.76	0.0448
1.792	4.49	0.0533
2.183	5.48	0.0652
2.367	5.94	0.0681
2.550	6.40	0.0727
2.767	6.95	0.0784
2.928	7.36	0.0838
2.992	7.52	0.0864
3.060	7.69	0.0875

Tabla 4.88 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg⁺² 40°C S₀ = 0.50 M m = 1.00 g

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.083	0.139	0.0014
0.170	0.283	0.0031
0.257	0.428	0.0048
0.348	0.581	0.0063
0.518	0.864	0.0094
0.760	1.27	0.0132
1.003	1.68	0.0167
1.257	2.10	0.0203
1.568	2.62	0.0253
1.763	2.95	0.0284
2.007	3.36	0.0319
2.252	3.77	0.0356
2.438	4.08	0.0375
2.667	4.47	0.0381
2.838	4.76	0.0427
2.927	4.91	0.0430
3.013	5.05	0.0478

Tabla 4.89 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg^{+2} 40°C $S_0 = 0.50 M$ $m = 1.50 g$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.100	0.250	0.0027
0.172	0.428	0.0047
0.257	0.641	0.0071
0.353	0.883	0.0093
0.502	1.25	0.0125
0.700	1.75	0.0175
0.837	2.09	0.0216
1.000	2.50	0.0242
1.253	3.14	0.0302
1.500	3.76	0.0350
1.757	4.41	0.0414
2.030	5.09	0.0472
2.310	5.80	0.0541
2.460	6.18	0.0574
2.667	6.70	0.0607
2.885	7.25	0.0677
2.943	7.40	0.0687

Tabla 4.90 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg^{+2} 40°C $S_0 = 1.10 M$ $m = 1.00 g$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.083	0.139	0.0009
0.167	0.278	0.0019
0.275	0.458	0.0031
0.352	0.586	0.0039
0.507	0.845	0.0057
0.702	1.17	0.0078
0.840	1.40	0.0093
1.042	1.74	0.0115
1.250	2.09	0.0138
2.000	3.35	0.0218
2.267	3.80	0.0246
2.508	4.20	0.0271
2.760	4.63	0.0298
2.880	4.83	0.0310
2.963	4.97	0.0319
3.038	5.10	0.0326

Tabla 4.91 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg^{+2} 40°C $S_0 = 1.50 M$ $m = 0.50 g$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.083	0.069	0.0004
0.167	0.139	0.0009
0.262	0.218	0.0014
0.333	0.278	0.0017
0.555	0.463	0.0030
0.693	0.579	0.0036
0.837	0.699	0.0043
1.007	0.841	0.0053
1.260	1.05	0.0064
1.527	1.28	0.0075
1.750	1.47	0.0085
2.003	1.68	0.0098
2.233	1.87	0.0106
2.628	2.20	0.0120
2.668	2.24	0.0126
2.755	2.31	0.0136
2.842	2.38	0.0135
2.900	2.43	0.0127

Tabla 4.92 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. Tampón Mg^{+2} 40°C $S_0 = 1.50 M$ $m = 1.50 g$

t, h	y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.000	0.0000
0.090	0.225	0.0012
0.183	0.458	0.0026
0.257	0.641	0.0038
0.333	0.833	0.0050
0.510	1.28	0.0075
0.683	1.71	0.0098
0.917	2.29	0.0124
1.223	3.06	0.0166
1.420	3.56	0.0201
1.585	3.97	0.0222
1.813	4.55	0.0240
2.035	5.11	0.0271
2.270	5.70	0.0294
2.425	6.09	0.0316
2.600	6.53	0.0345
2.797	7.027	0.0354
2.937	7.381	0.0363
3.003	7.550	0.0375

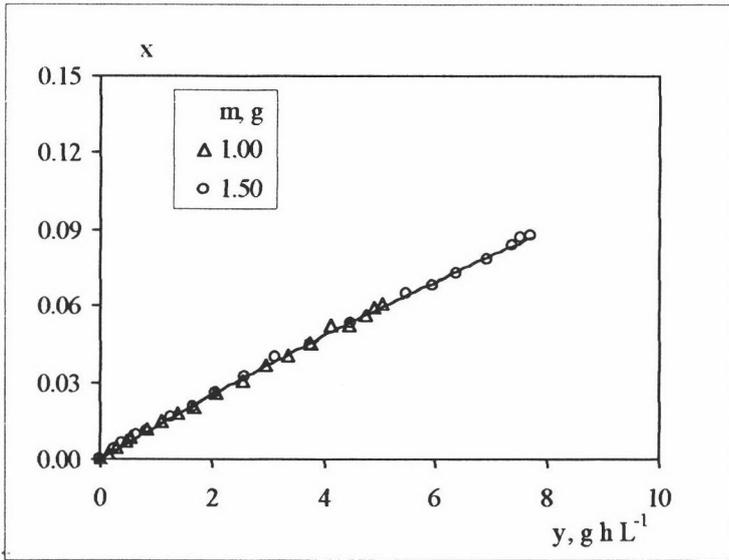


Figura 4.21– Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Influencia de la concentración de enzima. Módulo NT1808S 40°C S₀ = 0.10 M Tampón Mg⁺²

Figura 4.22– Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Influencia de la concentración de enzima. Módulo NT1808S 40°C S₀ = 0.50 M Tampón Mg⁺²

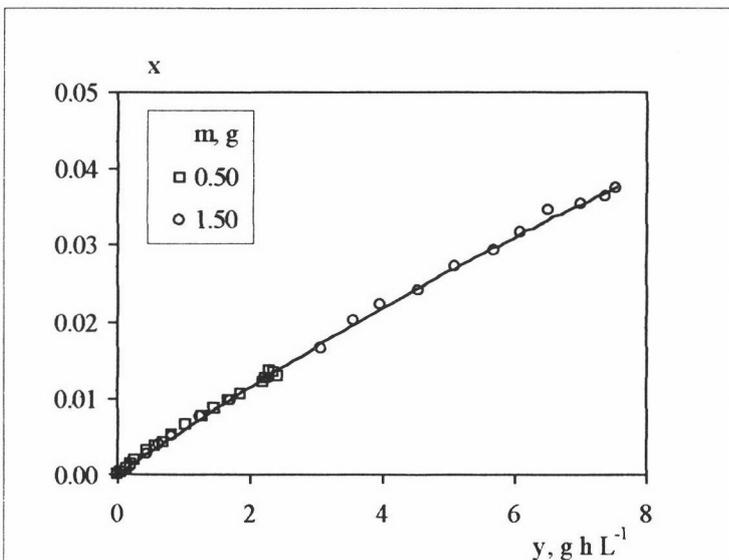
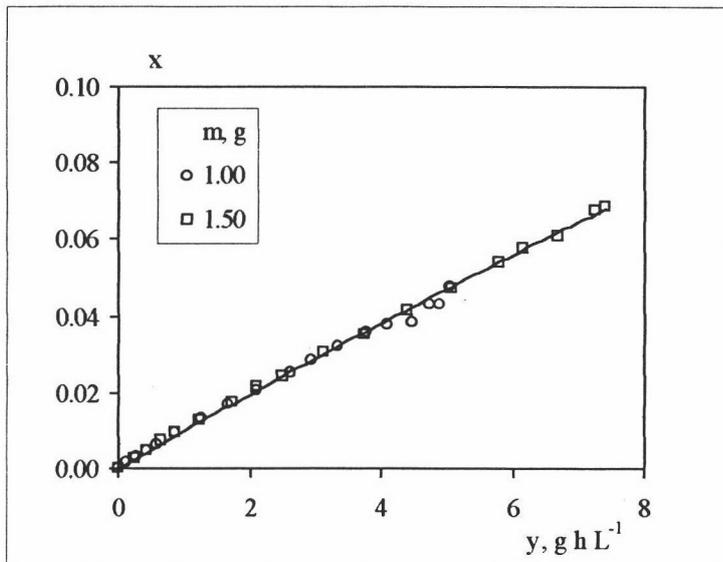


Figura 4.23– Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Influencia de la concentración de enzima. Módulo NT1808S 40°C S₀ = 1.50 M Tampón Mg⁺²

Figura 4.24—Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Influencia de la concentración de sustrato. Módulo NT1808S 40°C m=1.00 g Tampón Mg⁺²

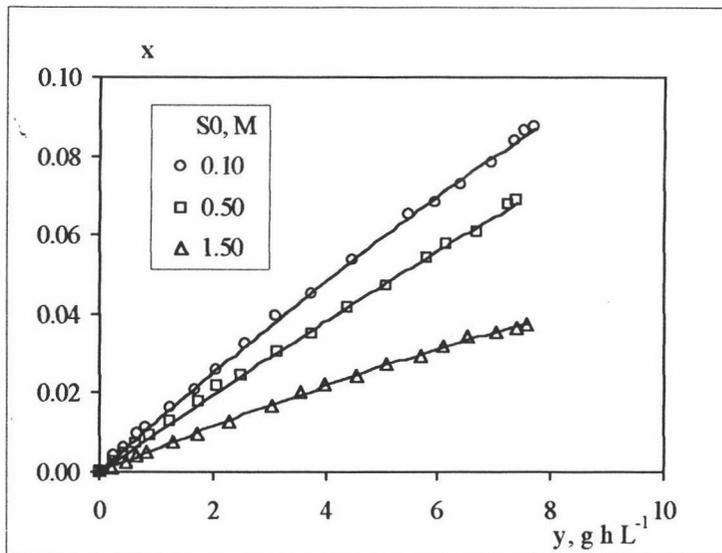
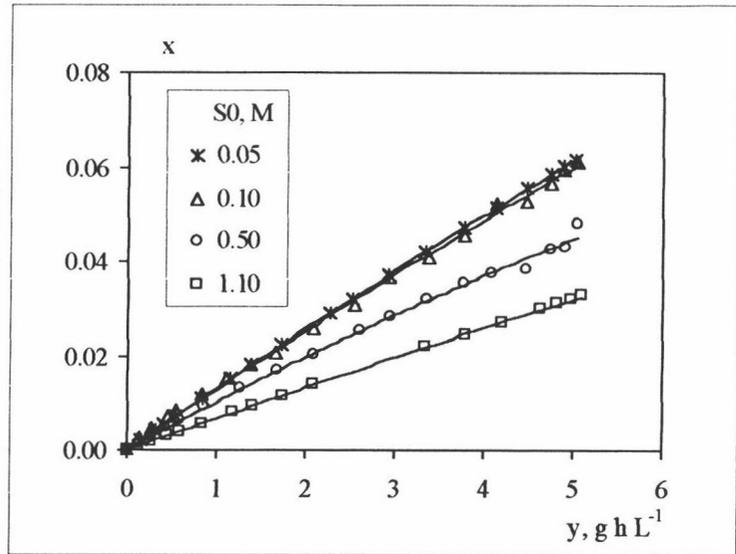


Figura 4.25— Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Influencia de la concentración de sustrato. Módulo NT1808S 40°C m=1.50 g Tampón Mg⁺²

4.5 Hidrólisis de lactosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

La reacción de hidrólisis de lactosa se llevó a cabo en Tampón K^+ y Mg^{+2} de pH=6.75 (definido en apartado 3.1.1) con la enzima Lactozym dentro de un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR) con el módulo NT1975 (definido en **Tabla 3.1**). La reacción se estudió a las temperaturas de 25, 30 y 40°C modificándose la concentración de lactosa (L_0) entre 0.0278 y 0.208 M y la masa de enzima en el circuito del ECS del módulo de fibra hueca (m) entre 0.0166 y 0.7500 gramos de enzima (**Tabla 4.93**).

Tabla 4.93 - Variables ensayadas para la hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR) Módulo NT1975 Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

T, °C	L_0 , M	L_0 , g L ⁻¹	m, g	¹ C _{EC} , g L ⁻¹
25	0.0278	10	0.1250	0.752
	0.0694	25	0.0166, 0.0625, 0.1250, 0.3750	0.100, 0.376, 0.752, 2.26
	0.139	50	0.1250	0.752
	0.208	75	0.1250	0.752
30	0.0278	10	0.1250	0.752
	0.0694	25	0.0625, 0.1250, 0.1662, 0.3750, 0.7500	0.376, 0.752, 1.00, 2.26, 4.51
	0.139	50	0.1250	0.752
	0.208	75	0.1250	0.752
40	0.0278	10	0.1250	0.752
	0.0694	25	0.0625, 0.1250, 0.3750	0.376, 0.752, 2.26
	0.139	50	0.1250	0.752
	0.208	75	0.1250	0.752

¹ C_{EC} = concentración de enzima en el circuito del ECS del RFHR.

Los resultados experimentales se muestran en las **Tablas 4.94 a 4.115**, donde se presentan los valores de conversión (x), obtenidos en función del tiempo (t), así como el valor de la variable intensiva de tratamiento (y) definida en la ecuación [Ec. 4.2].

En las **Figuras 4.26 a 4.28** se muestra, para los experimentos realizados a las temperaturas de ensayo (25, 30 y 40°C), el valor de la conversión (x) alcanzado frente a la variable intensiva de tratamiento (y).

Como puede observarse, para todos los experimentos realizados a una misma temperatura y concentración de sustrato, los datos se ajustan a una misma línea, al menos en la mayor parte del rango experimental. Para experimentos realizados a una

misma temperatura y concentración de enzima la conversión aumenta al disminuir la concentración de sustrato.

**Tabla 4.94 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.038	0.76	0.011
0.070	1.38	0.035
0.117	2.30	0.071
0.172	3.39	0.115
0.250	4.94	0.158
0.333	6.58	0.208
0.417	8.24	0.275
0.583	11.5	0.352
0.767	15.2	0.451
1.000	19.8	0.513
1.253	24.8	0.587
1.500	29.8	0.668
1.750	34.7	0.730
2.000	39.7	0.749
2.250	44.7	0.777
2.500	49.7	0.830
2.750	54.7	0.853
3.000	59.7	0.834

**Tabla 4.95– Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.0166 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	0.10	0.000
0.067	0.17	0.002
0.138	0.36	0.007
0.178	0.47	0.009
0.250	0.66	0.012
0.333	0.87	0.016
0.417	1.09	0.022
0.587	1.54	0.031
0.767	2.02	0.038
1.013	2.67	0.051
1.250	3.29	0.065
1.500	3.95	0.075
1.750	4.61	0.090
2.000	5.27	0.104
2.250	5.93	0.119
2.500	6.60	0.121
2.750	7.26	0.134

**Tabla 4.96 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.0625 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	0.39	0.004
0.065	0.64	0.009
0.120	1.18	0.021
0.165	1.63	0.030
0.248	2.45	0.045
0.333	3.29	0.061
0.415	4.10	0.081
0.583	5.77	0.109
0.767	7.59	0.131
1.000	9.90	0.169
1.250	12.4	0.194
1.500	14.9	0.232
1.750	17.4	0.263
2.005	19.9	0.268
2.250	22.3	0.264
2.500	24.8	0.286
2.752	27.4	0.271
3.000	29.8	0.276

**Tabla 4.97 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	0.79	0.007
0.067	1.31	0.018
0.118	2.33	0.039
0.167	3.29	0.060
0.250	4.94	0.088
0.335	6.62	0.117
0.422	8.33	0.144
0.583	11.5	0.201
0.767	15.2	0.262
1.000	19.8	0.321
1.250	24.8	0.401
1.502	29.8	0.440
1.750	34.7	0.487
2.000	39.7	0.559
2.255	44.8	0.579
2.503	49.7	0.620
2.750	54.7	0.646
3.000	59.7	0.649

**Tabla 4.98 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.3750 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	2.66	0.026
0.067	3.94	0.053
0.117	6.90	0.112
0.168	9.96	0.167
0.250	14.8	0.232
0.333	19.8	0.323
0.417	24.7	0.370
0.583	34.6	0.501
0.767	45.5	0.580
1.000	59.4	0.692
1.250	74.3	0.740
1.500	89.2	0.811
1.750	104	0.831
2.000	119	0.852
2.250	134	0.886
2.500	149	0.869
2.755	164	0.914
3.000	179	0.895

**Tabla 4.99 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.139 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.035	0.69	0.004
0.067	1.31	0.010
0.117	2.30	0.022
0.167	3.29	0.033
0.250	4.94	0.049
0.333	6.58	0.072
0.420	8.30	0.081
0.583	11.5	0.115
0.750	14.8	0.145
1.000	19.8	0.189
1.250	24.8	0.228
1.500	29.8	0.278
1.750	34.7	0.314
2.000	39.7	0.351
2.252	44.7	0.375
2.500	49.7	0.405
2.750	54.7	0.442
3.000	59.7	0.471

**Tabla 4.100 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 25°C
L₀ = 0.208 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.067	1.31	0.008
0.133	2.63	0.018
0.200	3.94	0.029
0.283	5.59	0.042
0.367	7.24	0.055
0.472	9.32	0.069
0.583	11.5	0.087
0.750	14.8	0.109
0.917	18.1	0.128
1.083	21.4	0.147
1.255	24.9	0.175
1.500	29.7	0.202
1.750	34.7	0.222
2.017	40.0	0.247
2.250	44.7	0.304
2.500	49.7	0.293
2.750	54.7	0.304
3.000	59.7	0.298

**Tabla 4.101 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.033	0.66	0.014
0.067	1.31	0.047
0.120	2.37	0.102
0.170	3.35	0.150
0.233	4.61	0.199
0.300	5.93	0.250
0.385	7.61	0.325
0.502	9.92	0.398
0.667	13.2	0.497
0.837	16.6	0.555
1.002	19.9	0.615
1.258	25.0	0.700
1.500	29.8	0.759
1.772	35.2	0.784
2.013	40.0	0.814
2.260	44.9	0.878
2.502	49.7	0.910
2.750	54.7	0.898
3.000	59.6	0.927

Tabla 4.102 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0694 10⁻² M m = 0.0625 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.038	0.38	0.005
0.067	0.66	0.013
0.120	1.18	0.028
0.167	1.64	0.040
0.250	2.47	0.059
0.333	3.29	0.078
0.417	4.12	0.101
0.590	5.84	0.142
0.767	7.59	0.173
1.000	9.90	0.220
1.257	12.5	0.271
1.503	14.9	0.318
1.755	17.4	0.350
2.003	19.9	0.393
2.250	22.3	0.441
2.500	24.8	0.468
2.760	27.4	0.481
3.007	29.9	0.505

Tabla 4.103 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1250 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.055	1.08	0.018
0.075	1.48	0.027
0.117	2.30	0.048
0.167	3.29	0.070
0.250	4.93	0.110
0.333	6.56	0.140
0.417	8.23	0.186
0.583	11.5	0.235
0.767	15.2	0.301
1.000	19.8	0.354
1.250	24.8	0.429
1.500	29.7	0.459
1.752	34.7	0.513
2.000	39.7	0.539
2.250	44.7	0.598
2.500	49.6	0.595
2.750	54.6	0.624
3.005	59.7	0.668

Tabla 4.104 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1662 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.034	0.89	0.010
0.067	1.75	0.032
0.117	3.06	0.067
0.167	4.37	0.101
0.250	6.56	0.151
0.338	8.89	0.195
0.417	11.0	0.248
0.583	15.3	0.322
0.750	19.7	0.399
1.000	26.3	0.508
1.250	32.9	0.588
1.505	39.7	0.633
1.753	46.3	0.694
2.000	52.8	0.734
2.250	59.4	0.791
2.500	66.1	0.824
2.752	72.7	0.828
3.000	79.3	0.831

Tabla 4.105 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.3750 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	2.36	0.027
0.067	3.94	0.070
0.120	7.10	0.149
0.250	14.8	0.306
0.333	19.8	0.388
0.417	24.7	0.457
0.583	34.6	0.584
0.767	45.5	0.698
1.000	59.4	0.737
1.250	74.3	0.730
1.500	89.2	0.850
1.750	104	0.844
2.000	119	0.893
2.252	134	0.901
2.500	149	0.939
2.753	164	0.923
3.000	179	0.930

**Tabla 4.106 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.7500 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.050	5.91	0.084
0.067	7.88	0.128
0.083	9.85	0.192
0.100	11.8	0.226
0.117	13.8	0.258
0.133	15.8	0.317
0.150	17.8	0.351
0.167	19.7	0.369
0.183	21.7	0.397
0.200	23.7	0.458
0.233	27.7	0.501

**Tabla 4.107 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.139 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	0.79	0.007
0.070	1.38	0.016
0.120	2.37	0.030
0.178	3.52	0.048
0.275	5.43	0.071
0.342	6.75	0.089
0.420	8.30	0.115
0.590	11.7	0.157
0.775	15.3	0.201
1.008	20.0	0.247
1.257	24.9	0.299
1.505	29.8	0.349
1.750	34.7	0.398
2.002	39.7	0.424
2.250	44.7	0.457
2.518	50.0	0.499
2.750	54.7	0.546

**Tabla 4.108 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 30°C
L₀ = 0.208 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.067	1.31	0.010
0.133	2.63	0.023
0.210	4.14	0.038
0.300	5.92	0.056
0.423	8.36	0.073
0.550	10.9	0.094
0.700	13.8	0.119
0.833	16.5	0.137
1.000	19.8	0.163
1.250	24.8	0.202
1.500	29.7	0.235
1.750	34.7	0.242
2.000	39.7	0.283
2.250	44.6	0.308
2.500	49.6	0.336
2.750	54.6	0.348
3.000	59.6	0.343

**Tabla 4.109 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	0.89	0.036
0.067	1.31	0.068
0.117	2.30	0.140
0.167	3.29	0.197
0.217	4.28	0.239
0.267	5.27	0.285
0.333	6.59	0.353
0.417	8.24	0.433
0.500	9.89	0.460
0.585	11.6	0.505
0.767	15.2	0.619
1.000	19.8	0.706
1.250	24.8	0.712
1.500	29.8	0.726
1.750	34.8	0.787
2.000	39.8	0.812
2.250	44.8	0.811
2.500	49.8	0.808
2.753	54.8	0.789
3.000	59.8	0.848

Tabla 4.110 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.0625 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.047	0.46	0.013
0.077	0.76	0.025
0.122	1.20	0.044
0.168	1.66	0.063
0.253	2.50	0.088
0.333	3.29	0.117
0.433	4.28	0.153
0.500	4.94	0.175
0.722	7.14	0.217
0.967	9.57	0.257
1.257	12.4	0.216
1.522	15.1	0.281
1.753	17.4	0.245
2.015	20.0	0.361
2.257	22.4	0.387
2.500	24.8	0.454
2.775	27.6	0.357
3.000	29.8	0.439

Tabla 4.111 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1250 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.040	0.79	0.020
0.070	1.38	0.044
0.120	2.37	0.085
0.167	3.29	0.117
0.250	4.94	0.166
0.335	6.62	0.211
0.446	8.81	0.278
0.583	11.5	0.346
0.768	15.2	0.405
1.000	19.8	0.476
1.265	25.1	0.563
1.508	29.9	0.623
1.750	34.7	0.630
2.002	39.7	0.655
2.502	49.7	0.697
2.750	54.7	0.734
3.000	59.7	0.759

Tabla 4.112 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.3750 g

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.038	2.27	0.046
0.067	3.94	0.117
0.117	6.90	0.221
0.167	9.87	0.319
0.218	12.9	0.380
0.267	15.8	0.433
0.417	24.7	0.555
0.500	29.7	0.645
0.597	35.4	0.728
0.767	45.6	0.712
1.002	59.6	0.831
1.252	74.5	0.867
1.503	89.6	0.879
1.750	104	0.879
2.000	119	0.897
2.268	135	0.890
2.503	149	0.952
2.752	164	0.922
3.002	179	0.947

Tabla 4.113 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.139 M m = 0.1250 g
(Experimento 1)

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	0.89	0.014
0.090	1.77	0.036
0.118	2.33	0.049
0.167	3.29	0.072
0.262	5.16	0.117
0.345	6.81	0.152
0.423	8.36	0.177
0.588	11.6	0.232
0.767	15.2	0.300
1.008	20.0	0.384
1.250	24.8	0.414
1.513	30.0	0.475
1.750	34.7	0.548
2.000	39.7	0.572
2.252	44.7	0.579
2.507	49.8	0.597
2.752	54.7	0.663
3.000	59.6	0.647

**Tabla 4.114 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.139 M m = 0.1250 g
(Experimento 2)**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.033	0.66	0.009
0.067	1.31	0.026
0.117	2.30	0.051
0.167	3.29	0.076
0.250	4.94	0.107
0.333	6.59	0.137
0.417	8.24	0.172
0.583	11.5	0.232
0.767	15.2	0.273
1.000	19.8	0.339
1.250	24.8	0.373
1.517	30.1	0.441
1.750	34.7	0.464
2.005	39.8	0.491
2.250	44.7	0.515
2.500	49.7	0.526
2.762	54.9	0.578
3.000	59.7	0.567

**Tabla 4.115 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1975
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.208 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.050	0.99	0.013
0.117	2.30	0.033
0.210	4.14	0.060
0.322	6.35	0.099
0.417	8.23	0.121
0.550	10.9	0.142
0.743	14.7	0.211
0.857	16.9	0.221
1.000	19.8	0.249
1.250	24.8	0.304
1.500	29.7	0.353
1.773	35.2	0.365
2.000	39.7	0.399
2.252	44.7	0.450
2.500	49.6	0.425
2.750	54.6	0.399
3.000	59.6	0.407

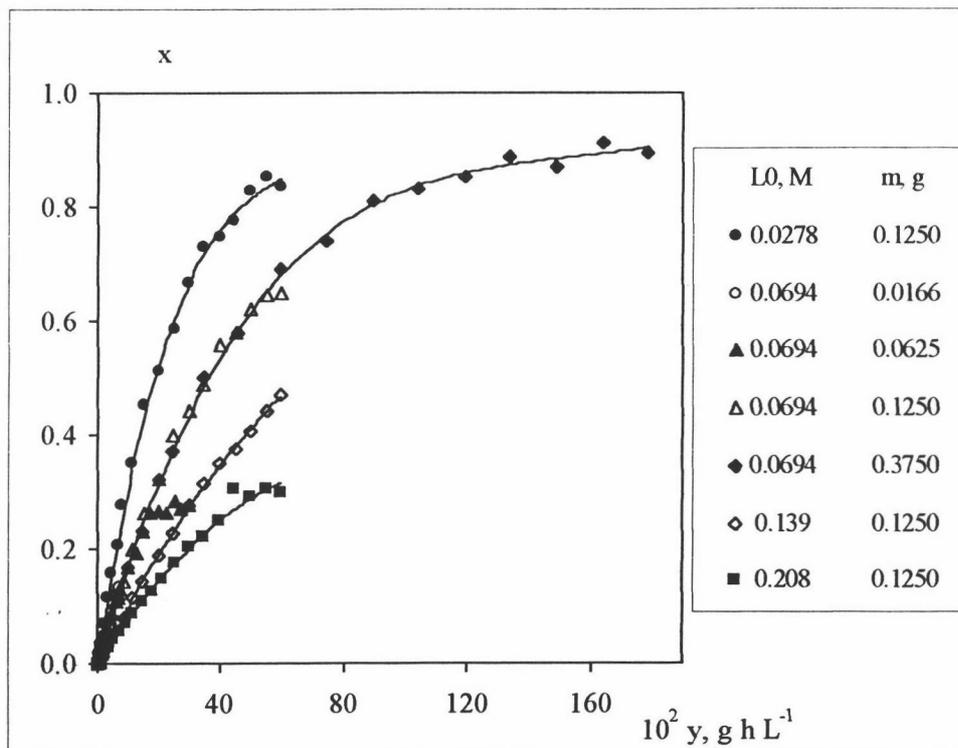


Figura 4.26 - Hidrólisis de lactosa en RHFR (módulo NT1975). Variación de x frente a y. 25°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

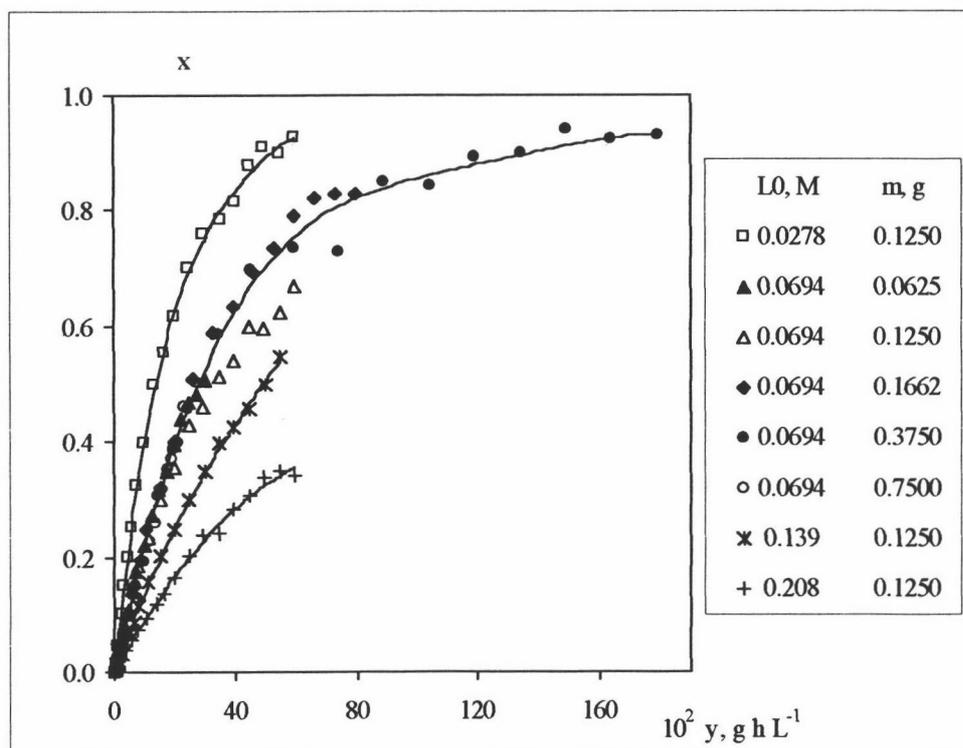


Figura 4.27 - Hidrólisis de lactosa en RHFR (módulo NT1975). Variación de x frente a y. 30°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

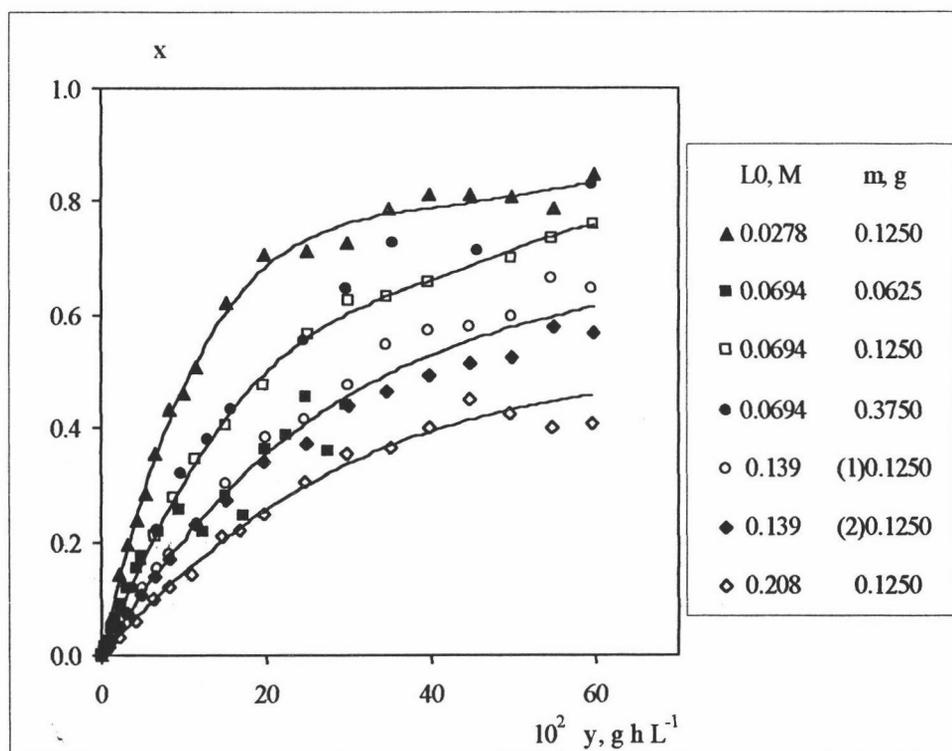


Figura 4.28 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RHFR (módulo NT1975).
 Variación de x frente a y. 40°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

Con objeto de analizar la influencia que el área superficial de las fibras y la composición de la membrana ejerce sobre el comportamiento del RFHR, se programaron una serie de experimentos de hidrólisis de lactosa mediante la enzima Lactozym en Tampón K^+ y Mg^{+2} a $40^\circ C$ y con otros módulos de fibra hueca de fibras de naturaleza y superficie distinta. Las variables analizadas se indican en la **Tabla 4.116**.

Tabla 4.116 - Variables ensayadas para la hidrólisis enzimática de lactosa en un RFHR y distintos módulos de fibra hueca. $40^\circ C$ Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Módulo de fibra hueca / Material de fibra	Área superficial, m^2	L_0 , M	L_0 , $g L^{-1}$	Masa de enzima en ECS, g	$^1 C_{EC}$, $g L^{-1}$																				
NT1175 / CUPROPHAN ^R (acetato de celulosa modificado)	1.08	0.0278	10	0.1250	0.821																				
		0.0694	25			NT1375 / CUPROPHAN ^R (acetato de celulosa modificado)	1.35	0.0278	10	0.1250	0.712	0.0694	25	BLS632 / POLYSULFONE ^R (polisulfona)	1.89	0.0278	10	0.1458	0.655	0.0694	25	0.139	50		
NT1375 / CUPROPHAN ^R (acetato de celulosa modificado)	1.35	0.0278	10	0.1250	0.712																				
		0.0694	25			BLS632 / POLYSULFONE ^R (polisulfona)	1.89	0.0278	10	0.1458	0.655	0.0694	25			0.139	50					0.208	75		
BLS632 / POLYSULFONE ^R (polisulfona)	1.89	0.0278	10	0.1458	0.655																				
		0.0694	25																						
		0.139	50																						
		0.208	75																						

¹ C_{EC} = concentración de enzima en el circuito del ECS del RFHR.

Los resultados experimentales se muestran en las **Tablas 4.117 a 4.124**, donde se presentan los valores de conversión (x) obtenidos en función del tiempo (t), así como el valor de la variable intensiva de tratamiento (y) definida en la ecuación [Ec. 4.2], representándose en las **Figuras 4.29 a 4.31**. Como puede observarse, para experimentos realizados a una misma temperatura y concentración de enzima la conversión aumenta al disminuir la concentración de sustrato, independientemente del módulo de fibra hueca utilizado.

**Tabla 4.117 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1175
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.038	0.75	0.030
0.067	1.31	0.066
0.117	2.30	0.131
0.167	3.29	0.193
0.217	4.27	0.242
0.267	5.26	0.289
0.333	6.58	0.327
0.418	8.26	0.375
0.505	9.98	0.446
0.583	11.5	0.477
0.767	15.2	0.507
1.000	19.8	0.579
1.252	24.8	0.639
1.500	29.8	0.661

**Tabla 4.118 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1175
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.053	1.05	0.029
0.103	2.04	0.069
0.167	3.29	0.120
0.250	4.93	0.171
0.333	6.58	0.200
0.507	10.0	0.284
0.750	14.8	0.370
1.000	19.8	0.441
1.250	24.7	0.487
1.502	29.7	0.512
1.750	34.7	0.559
2.003	39.7	0.556
2.258	44.8	0.578
2.502	49.6	0.594
2.750	54.6	0.620
3.000	59.6	0.620

**Tabla 4.119 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1375
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.053	1.05	0.051
0.100	1.97	0.111
0.167	3.29	0.190
0.252	4.97	0.264
0.335	6.61	0.321
0.512	10.1	0.417
0.750	14.8	0.504
1.000	19.8	0.579
1.085	21.5	0.631
1.503	29.8	0.642
1.755	34.8	0.675
2.005	39.7	0.712
2.258	44.8	0.709
2.500	49.6	0.702
2.752	54.6	0.735
3.000	59.6	0.742

**Tabla 4.120 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1375
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1250 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.055	1.08	0.031
0.105	2.07	0.069
0.167	3.29	0.116
0.250	4.93	0.164
0.333	6.58	0.198
0.507	10.0	0.269
0.750	14.8	0.350
1.000	19.8	0.405
1.250	24.7	0.452
1.500	29.7	0.480
1.750	34.7	0.486
2.002	39.7	0.545
2.250	44.6	0.560
2.502	49.6	0.550
2.750	54.6	0.567
3.000	59.6	0.597

**Tabla 4.121 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo BLS632
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0278 M m = 0.1458 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.00	0.00	0.000
0.01	0.13	0.041
0.07	1.41	0.089
0.12	2.37	0.163
0.17	3.32	0.221
0.22	4.27	0.268
0.27	5.26	0.316
0.33	6.58	0.389
0.42	8.23	0.451
0.50	9.88	0.491
0.59	11.6	0.554
0.77	15.2	0.638
1.00	19.8	0.705
1.25	24.8	0.781
1.50	29.7	0.793
1.75	34.7	0.828
2.01	39.8	0.882
2.26	44.8	0.889
2.50	49.7	0.870
2.77	54.9	0.881
3.00	59.6	0.858

**Tabla 4.122 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo BLS632
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.0694 M m = 0.1458 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.033	0.66	0.019
0.067	1.31	0.050
0.117	2.30	0.093
0.167	3.29	0.130
0.252	4.97	0.182
0.333	6.58	0.233
0.417	8.23	0.273
0.585	11.6	0.374
0.767	15.2	0.486
1.005	19.9	0.427
1.252	24.8	0.553
1.503	29.8	0.619
2.000	39.6	0.620
2.250	44.6	0.729
2.538	50.4	0.805
2.762	54.8	0.708
3.000	59.6	0.740

**Tabla 4.123 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo BLS632
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.139 M m = 0.1458 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.045	0.89	0.015
0.072	1.41	0.028
0.118	2.33	0.052
0.192	3.78	0.085
0.257	5.06	0.109
0.337	6.65	0.140
0.417	8.23	0.176
0.588	11.6	0.212
0.762	15.1	0.265
1.000	19.8	0.282
1.503	29.8	0.425
1.772	35.1	0.445
2.003	39.7	0.548
2.252	44.7	0.560
2.500	49.6	0.529
2.778	55.1	0.539
3.000	59.6	0.620

**Tabla 4.124 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo BLS632
Tampón K⁺ y Mg⁺² 40°C
L₀ = 0.208 M m = 0.1458 g**

t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
0.000	0.00	0.000
0.052	1.02	0.014
0.122	2.40	0.038
0.203	4.01	0.064
0.300	5.91	0.098
0.435	8.58	0.135
0.562	11.1	0.164
0.700	13.8	0.179
0.837	16.5	0.223
1.003	19.8	0.262
1.252	24.7	0.309
1.500	29.7	0.295
1.753	34.7	0.372
2.002	39.6	0.407
2.252	44.6	0.445
2.508	49.7	0.487
2.757	54.6	0.494
3.008	59.6	0.534

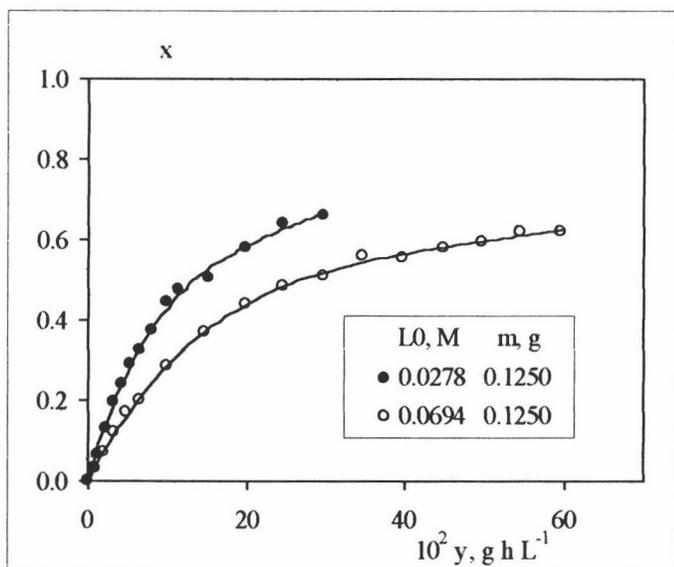


Figura 4.29 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1175). Variación de x frente a y . 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Figura 4.30 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1375). Variación de x frente a y . 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

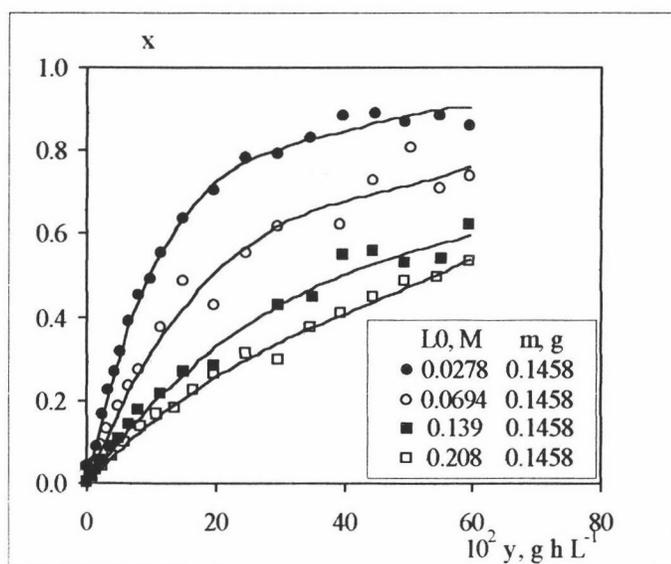
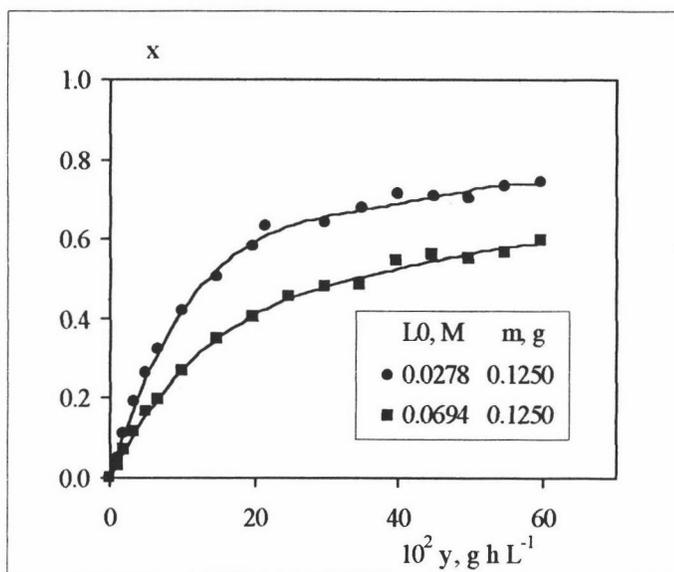


Figura 4.31 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo BLS632). Variación de x frente a y . 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se procede a realizar la discusión de los resultados experimentales en el mismo orden mostrado en el apartado 4, desarrollando los modelos teóricos utilizados para la interpretación de los mismos.

5.1 Actividad enzimática.

5.1.1 Influencia de pH sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa.

La influencia que el pH ejerce sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa procedente de distintas fuentes es un factor generalmente analizado por distintos autores para determinar el rango óptimo de operación. Sin embargo no se han encontrado en bibliografía modelos cinéticos que expliquen la dependencia de la actividad de las lactasas en función del pH.

Un modelo utilizado frecuentemente para explicar la actividad enzimática en función del pH es aquél que supone la pérdida y captura de un protón:



Las constantes de equilibrio de estas reacciones, K_2 y K_3 respectivamente, se definen como:

$$K_2 = \frac{E [H^+]}{[EH^+]} \quad K_3 = \frac{[E^-] [H^+]}{E} \quad [\text{Ec. 5.3}]$$

de forma que el balance a la enzima conduciría a la expresión:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{K_3}{[H^+]}} \quad [\text{Ec. 5.4}]$$

donde e_T son los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo, C_E es la concentración de complejo enzimático activo total y E la concentración de enzima

nativa activa libre presente en el medio de reacción. Si sólo la forma enzimática E es activa, la actividad depende del pH, en condiciones de saturación de sustrato, de la forma:

$$a = \frac{k_c e_T C_E}{1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{K_3}{[H^+]}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{K_3}{[H^+]}} = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{pK_2 - pH} + 10^{pH - pK_3}}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.5}]$$

donde k_c es la constante de velocidad y V_{\max} la velocidad máxima de la reacción.

El ajuste de los datos a esta ecuación se ha realizado mediante regresión no lineal. Para estimar unos parámetros iniciales que permitan iniciar el cálculo se aplica la ecuación [Ec. 5.6] a los datos de actividad frente a pH obtenidos con la enzima Lactozym y Maxilact en tampón cítrico-fosfato y $[K^+] = 0.100 \text{ M}$, estimándose unos valores para pK_2 , pK_3 y V_{\max} mediante regresión múltiple:

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}K_2} [H^+] + \frac{K_3}{V_{\max}} \frac{1}{[H^+]} \quad [\text{Ec. 5.6}]$$

También puede explicarse la dependencia de la actividad en función del pH con modelos que impliquen la pérdida o captura de 1 ó 2 protones, obteniéndose el mejor ajuste para ambas enzimas con el modelo:



donde las constantes de equilibrio de estas reacciones, K_4 y K_5 , vienen definidas como:

$$K_4 = \frac{E [H^+]^2}{[EH_2^{+2}]} \quad K_5 = \frac{[E^-] [H^+]}{E} \quad [\text{Ec. 5.9}]$$

El balance a la enzima conduciría a la expresión:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_4} + \frac{K_5}{[H^+]}} \quad [\text{Ec. 5.10}]$$

y si sólo la forma enzimática E es activa, la actividad depende del pH, en condiciones de saturación de sustrato, de la forma:

$$a = \frac{k_c e_T C_E}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_4} + \frac{K_5}{[H^+]}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_4} + \frac{K_5}{[H^+]}} = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{pK_4 - 2pH} + 10^{pH - pK_5}} \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.11}]$$

De igual forma que para el caso anterior, el ajuste de los datos experimentales a esta ecuación se ha realizado mediante regresión no lineal, utilizando la ecuación [Ec. 5.12] para determinar mediante regresión múltiple unos valores iniciales con los que comenzar la iteración.

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}K_4}[H^+]^2 + \frac{K_5}{V_{\max}} \frac{1}{[H^+]} \quad [\text{Ec. 5.12}]$$

Aplicando los dos modelos desarrollados a los datos de actividad obtenidos para las enzimas Lactozym y Maxilact en un tampón cítrico-fosfato (Tabla 4.2 y 4.3) se obtienen los parámetros cinéticos indicados en la Tabla 5.1. Como puede observarse en la Figura 5.1, el modelo que mejor ajusta los resultados experimentales obtenidos es el que asume el intercambio de dos protones. No obstante sería recomendable aumentar el número de ensayos experimentales para verificar el resultado obtenido.

Como puede observarse a partir de los valores de actividad y los parámetros cinéticos alcanzados, el comportamiento de ambas enzimas con respecto al pH es prácticamente equivalente.

El modelo de disociación de dos protones ha sido aplicado a datos experimentales de actividad frente a pH propuestos por distintos investigadores. Estos datos fueron obtenidos por β -galactosidasas que se hallaban en estado libre e inmovilizado. Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 5.1, mostrándose el ajuste a los datos experimentales en las Figuras 5.2 y 5.3.

Como puede observarse en la Tabla 5.1, los parámetros cinéticos pK_2 , pK_3 , pK_4 y pK_5 obtenidos al aplicar el modelo cinético propuesto a los datos ofrecidos por otros autores, mantienen cierta similitud con los estimados para la misma enzima en el presente trabajo.

Tabla 5.1 – Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de datos de actividad frente pH obtenidos en este trabajo y recopilados en bibliografía.

Autor	Enzima / Medio de reacción	Modelo de [Ec. 5.1] y [Ec. 5.2]			Modelo de [Ec. 5.7] y [Ec. 5.8]		
		pK ₂	pK ₃	V _{max}	pK ₄	pK ₅	V _{max}
Este trabajo	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (sol.) (Lactozym) / Tampón K ⁺ y Mg ⁺²	7.40	6.46	¹ 0.486	12.8	7.47	¹ 0.0942
	<i>Kluyveromyces lactis</i> (sol.) (Maxilact) / Tampón K ⁺ y Mg ⁺²	7.07	6.74	¹ 0.293	12.7	7.49	¹ 0.0972
Santos y col. (1998)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (sol.) / Tampón fosfato con iones K ⁺ y Mg ⁺² y disolución de ONPG	5.87	7.64	² 20.5 10 ⁻⁵	11.6	7.77	² 17.0 10 ⁻⁵
Szczodrak (2000)	Células de <i>Kluyveromyces fragilis</i> (inm.) / Tampón fosfato con iones K ⁺ y Mn ⁺² y disolución de lactosa	6.46	6.99	³ 2.28	12.0	7.38	³ 1.30

¹ (mol_{glucosa} g_{enzima}⁻¹ h⁻¹)

² (mol_{ONPG} L⁻¹ min⁻¹)

³ (adimensional)

(sol.)=enzima soluble, (inm.)=enzima inmovilizada.

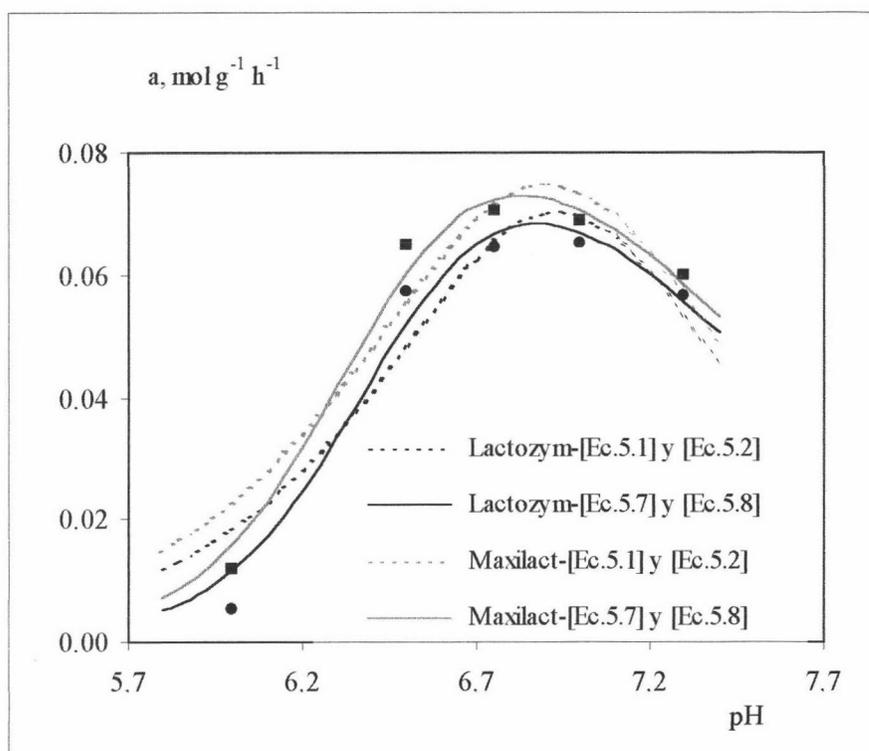


Figura 5.1 – Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas Lactozym y Maxilact. Tampón cítrico-fosfato, [PO₄⁻³]=0.01 M, [K⁺]= 0.1 M, [Mg⁺²]= 0 M, [Mn⁺²]= 0 M, ajuste de pH mediante adición de ácido cítrico. (●=Lactozym, ■=Maxilact)

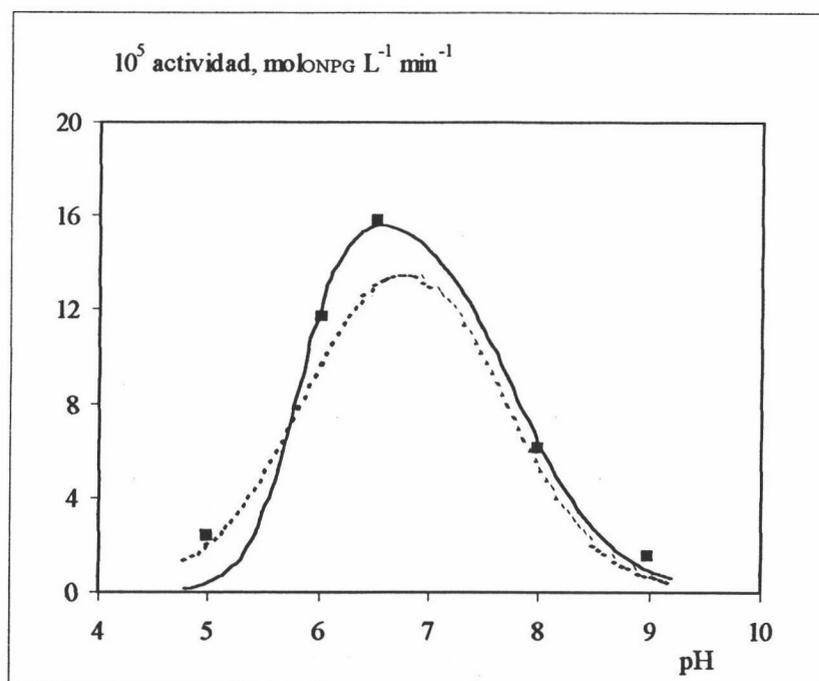


Figura 5.2 - Influencia de pH sobre la actividad enzimática (*Kluyveromyces fragilis* - Santos y col. (1998)) (--- Modelo [Ec. 5.1] y [Ec. 5.2] — Modelo [Ec. 5.7] y [Ec. 5.8])

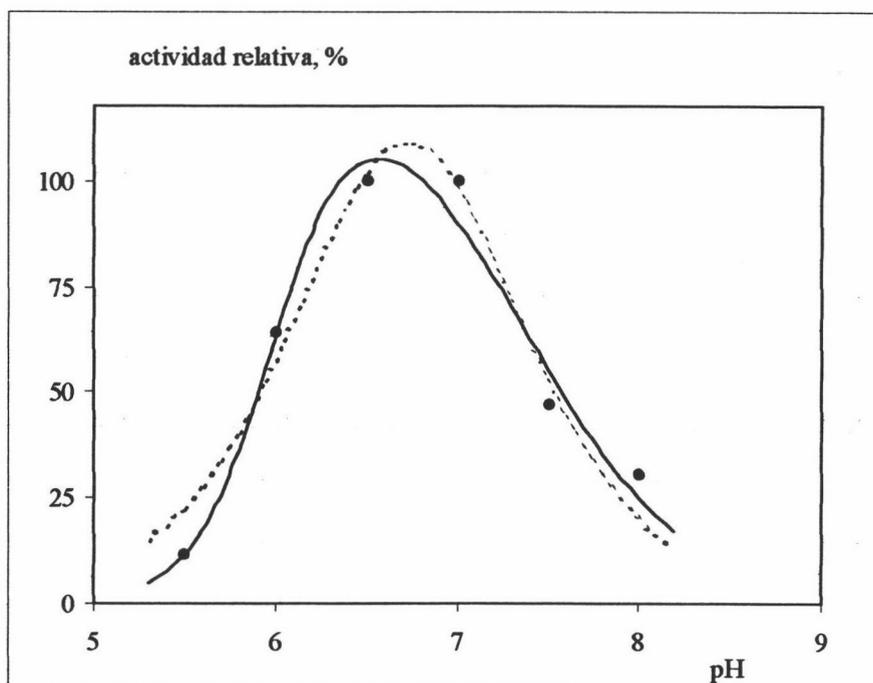


Figura 5.3 - Influencia de pH sobre la actividad enzimática (*Kluyveromyces fragilis* - Szczodrak (2000)) (--- Modelo [Ec. 5.1] y [Ec. 5.2] — Modelo [Ec. 5.7] y [Ec. 5.8]))

5.1.2 Desactivación térmica de la enzima β -galactosidasa.

En las Figuras 5.4 y 5.5 se muestra como varía la actividad normalizada (a_{norm}) de las enzimas Lactozym y Maxilact con el tiempo de reacción en un RDMP, tanto en presencia del Tampón K^+ y Mg^{+2} como en presencia de Tampón Na^+ (datos en Tablas 4.7 a 4.20).

Como ya se comentó en el apartado 4.1.3, las enzimas Lactozym y Maxilact conservan prácticamente toda su actividad (en presencia de Tampón K^+ y Mg^{+2}) a 30 y 35°C después 3 horas, mientras que a temperaturas mayores sufren una desactivación considerable. Sin embargo, en Tampón Na^+ la actividad de ambas enzimas disminuye rápidamente con la temperatura y el tiempo de reacción, siendo prácticamente igual a cero tras 1 hora a 40°C.

Para explicar el comportamiento de las lactasas en función de la temperatura se han aplicado diferentes modelos de desactivación recopilados en bibliografía (Tabla 5.2 y apartado 2.4.3) a los datos experimentales obtenidos: modelo de desactivación de primer orden, modelo de desactivación de segundo orden y diferentes modelos de

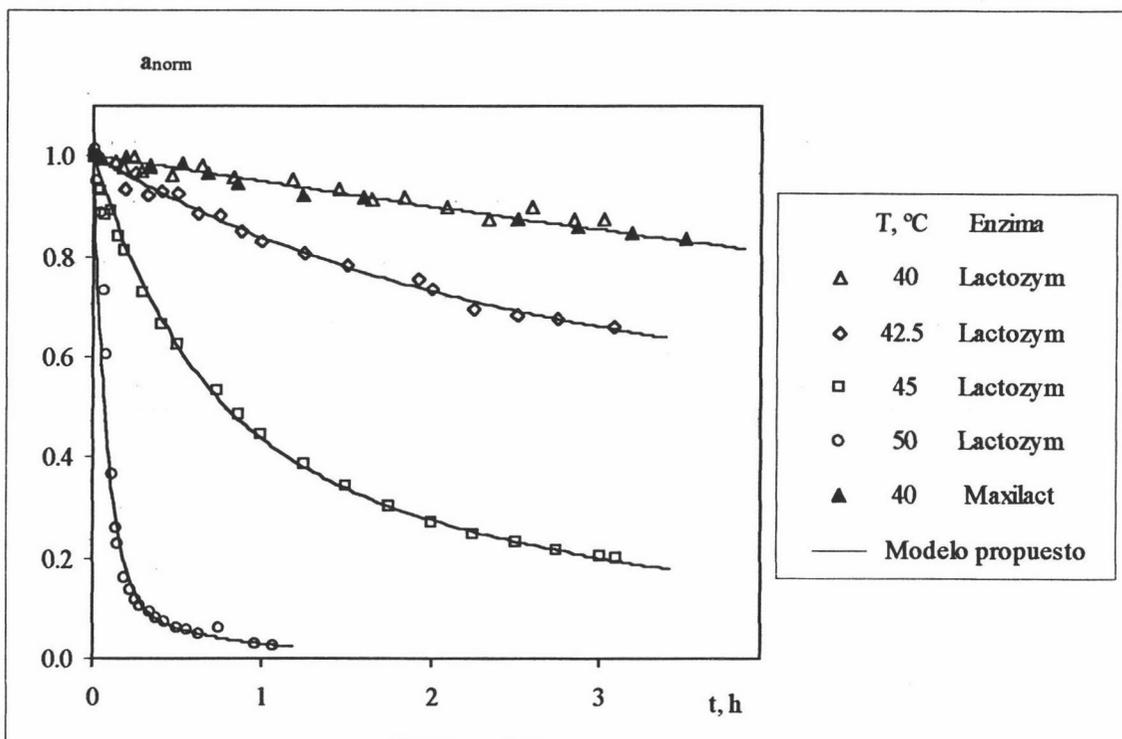


Figura 5.4 – Influencia de la temperatura sobre la actividad de Lactozym y Maxilact. RDMP Tampón K^+ y Mg^{+2}

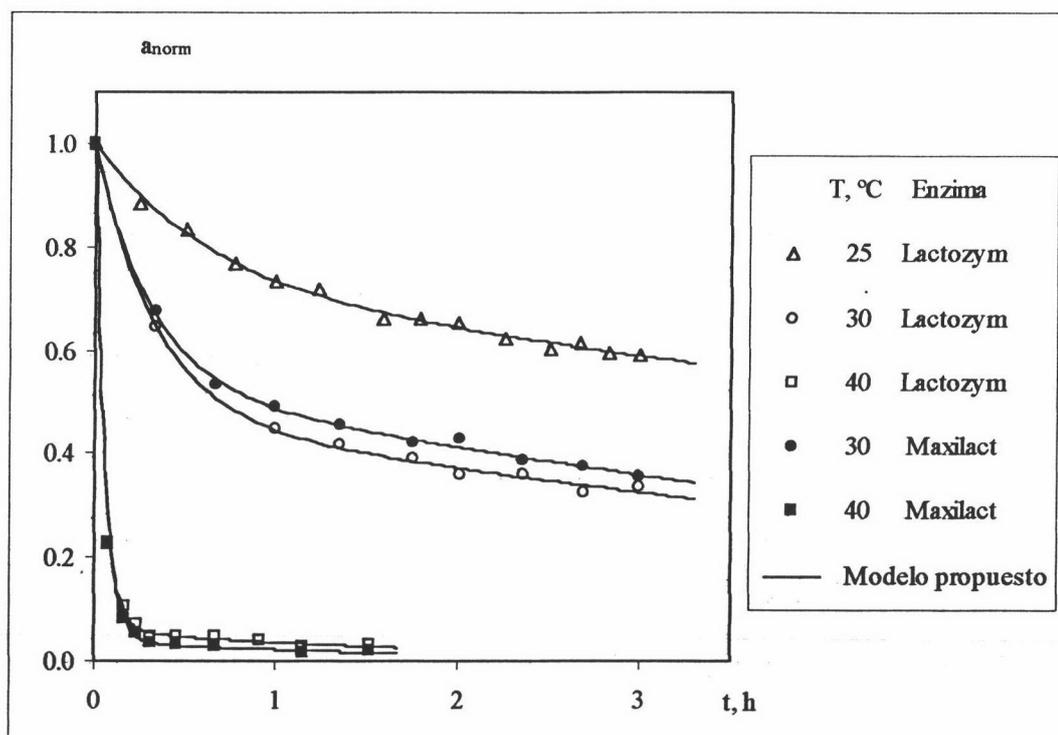
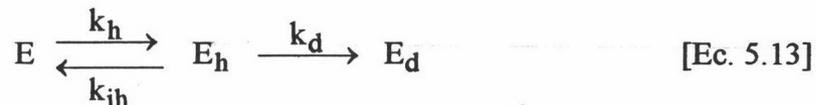


Figura 5.5 – Influencia de la temperatura sobre la actividad de Lactozym y Maxilact. RDMP Tampón Na⁺

desactivación que suponen la existencia de reacciones reversibles e irreversibles en las que las especies enzimáticas formadas podrían tener actividad catalítica específica diferente a la de la enzima nativa (Henley y col. (1986)). Sin embargo los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de estos modelos a los datos cinéticos experimentales no se consideran satisfactorios.

En el presente trabajo se propone el modelo de desactivación siguiente:



donde k_h , k_{ih} y k_d son las constantes cinéticas individuales de la reacción. Este modelo implica que la enzima nativa (E) se transforma a una forma no activa o de menor actividad (E_h) susceptible de transformarse de nuevo en la enzima activa (E). La especie enzimática (E_h) puede sufrir una desnaturalización de carácter irreversible hacia la especie E_d que no posee actividad alguna.

Tabla 5.2 – Modelos de desactivación y energía de activación (E_a) propuestas por diferentes autores para β -galactosidasas.

Autor	Origen de enzima	Medio de reacción	Modelo de desactivación	T, °C	E_a , Kcal mol ⁻¹ (sol.)	E_a , Kcal mol ⁻¹ (inm)
González-Siso y col. (1994)	Células <i>Kluyveromyces lactis</i>	Tampón fosfato	[Ec. 2.18]			7.78
Papayannakos y col. (1993)	<i>Aspergillus niger</i>	Tampón lactosa	[Ec. 2.18]	55-60	82.3	92.5
Carrara y col. (1997)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		[Ec. 2.18]	43		
Fujikawa y col. (1997)	<i>Escherichia coli</i>		[Ec. 2.18]	58-64	184 (in vivo) 108 (in vitro)	
Bakken y col. (1992)	<i>Bacillus circulans</i>		[Ec. 2.18]	52-68		43.3
Yang y col. (1989a)	<i>Aspergillus niger</i>		[Ec. 2.18]	25-60		55.7
Zhou y col. (2001a)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Tampón con PO ₄ ⁻³ , K ⁺ y Mg ⁺²	[Ec. 2.18]	35-55		47.8
Giancomini y col. (2001)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Tampón con PO ₄ ⁻³ , K ⁺ y Mg ⁺²	[Ec. 2.19]	45-53		
Santos y col. (1998)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Tampón con PO ₄ ⁻³ , K ⁺ y Mg ⁺²	¹ [Ec. 5.13]	40-50	77.8	
Este trabajo	<i>Kluyveromyces fragilis</i> / <i>Kluyveromyces lactis</i>	² Tampón K ⁺ y Mg ⁺²	¹ [Ec. 5.13]	30-50	108	
Este trabajo	<i>Kluyveromyces fragilis</i> / <i>Kluyveromyces lactis</i>	² Tampón Na ⁺	¹ [Ec. 5.13]	25-40	44.7	

¹ Modelo propuesto en este trabajo.

² Medio de reacción definido en este trabajo.

(sol.) = enzima soluble, (inm.) = enzima inmovilizada.

De acuerdo con el modelo de desactivación propugnado en la ecuación [Ec. 5.13], la cinética de desactivación podrá expresarse de la forma:

$$\frac{d E}{d t} = -k_h E + k_{ih} E_h \quad [\text{Ec. 5.14}]$$

$$\frac{d E_h}{d t} = k_h E - (k_{ih} + k_d) E_h \quad [\text{Ec. 5.15}]$$

$$t = 0 \quad E = E_0 \quad E_h = 0 \quad [\text{Ec. 5.16}]$$

Definiendo las variables adimensionales:

$$b = \frac{E}{E_0} \quad c = \frac{E_h}{E_0} \quad \tau = k_h t \quad [\text{Ec. 5.17}]$$

el sistema queda de la forma:

$$\frac{d b}{d \tau} = -b + K_h c \quad [\text{Ec. 5.18}]$$

$$\frac{d c}{d \tau} = b - (K_h + K_d) c \quad [\text{Ec. 5.19}]$$

$$\tau = 0 \quad b = 1 \quad c = 0 \quad [\text{Ec. 5.20}]$$

donde:

$$K_h = \frac{k_{ih}}{k_h} \quad K_d = \frac{k_d}{k_h} \quad [\text{Ec. 5.21}]$$

Si sólo la forma enzimática E es activa, la actividad normalizada (a_{norm}) a cada tiempo será igual a (b), mientras que si la especie enzimática E_h conserva una actividad residual (α) la actividad normalizada vendrá definida de la forma:

$$a_{\text{norm}} = b + \alpha c \quad [\text{Ec. 5.22}]$$

El ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales puede llevarse a cabo mediante integración numérica del sistema que lo representa ([Ec. 5.18] a [Ec. 5.20]). Los mejores resultados se obtuvieron considerando que la especie E_h no mantenía actividad alguna, por lo que $\alpha = 0$.

Como la desactivación que ambas enzimas (Lactozym y Maxilact) sufren en Tampón K^+ y Mg^{+2} es similar, el tratamiento cinético de los datos obtenidos a cada temperatura en este tampón puede realizarse de forma conjunta. En la **Tabla 5.3** se muestran los parámetros k_h , K_h y K_d , calculados al aplicar el modelo cinético propuesto a los datos obtenidos en presencia de ambos tampones. En las **Figuras 5.4** y **5.5** se puede observar la bondad del ajuste para ambas enzimas en los dos tampones indicados. La observación visual parece demostrar que el modelo propuesto justifica la dependencia experimental observada. Así mismo los residuales obtenidos se distribuyen aleatoriamente a un lado y otro del cero, comprobándose que más del 90% de los puntos experimentales considerados presentan un error inferior al 5% con respecto a los calculados a partir del modelo planteado.

En la **Figura 5.6** se presenta la dependencia que las constantes k_h , K_h y K_d tienen con la temperatura. Estas constantes se obtuvieron para ambas enzimas en un RDMP en

presencia de Tampón K^+ y Mg^{+2} . En las ecuaciones [Ec. 5.23] a [Ec. 5.25] se proponen expresiones que permiten calcular los parámetros de ajuste:

$$k_h = 7.8 \cdot 10^{73} \exp\left(-\frac{54200}{T}\right), \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.994 \quad [\text{Ec. 5.23}]$$

$$K_h = 4.09 \cdot 10^{-44} \exp\left(\frac{31600}{T}\right) \quad r^2 = 0.967 \quad [\text{Ec. 5.24}]$$

$$K_d = 5.06 \cdot 10^{-41} \exp\left(\frac{29300}{T}\right) \quad r^2 = 0.948 \quad [\text{Ec. 5.25}]$$

Tabla 5.3 – Parámetros k_h , K_h y K_d calculados a partir de la aplicación del modelo propuesto, [Ec. 5.13], a los datos de actividad de β -galactosidasas.

Autor	Medio de reacción	Fuente de enzima	T, °C	k_h , h ⁻¹	K_h	K_d
Este trabajo	¹ Tampón K^+ y Mg^{+2}	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (sol.) (Lactozym)	40	0.0507	2.00	3.27
			42.5	0.200	1.35	0.787
			45	1.08	0.680	0.613
			50	10.3	0.0952	0.147
	¹ Tampón Na^+	<i>Kluyveromyces lactis</i> (sol.) (Maxilact)	40	0.0507	2.00	3.27
			25	0.490	1.99	0.513
			30	1.66	0.784	0.144
			40	18.0	0.0599	0.0308
			30	1.62	0.990	0.177
			40	17.3	0.0359	0.0331
Papayannakos y col. (1993)	Tampón fosfato	<i>Aspergillus niger</i> (inm.)	55	0.0364	2.77	0.711
Santos y col. (1998)	Tampón con iones K^+ , Mg^{+2} , Na^+ y Ca^{+2}	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (sol.) (Lactozym)	40	$1.09 \cdot 10^{-5}$	11.1	0.634
			45	$5.77 \cdot 10^{-5}$	0.571	0.206
			50	$5.14 \cdot 10^{-4}$	0.109	0.130
Giancomini y col. (1998)		<i>Kluyveromyces lactis</i> (sol.) (Maxilact)	45	1.37	0.964	0.0534
			<i>Kluyveromyces lactis</i> (inm.) (Maxilact)	45	0.875	1.02

¹ Tampón definido en este trabajo.

(sol.) = enzima soluble, (inm.) = enzima inmovilizada.

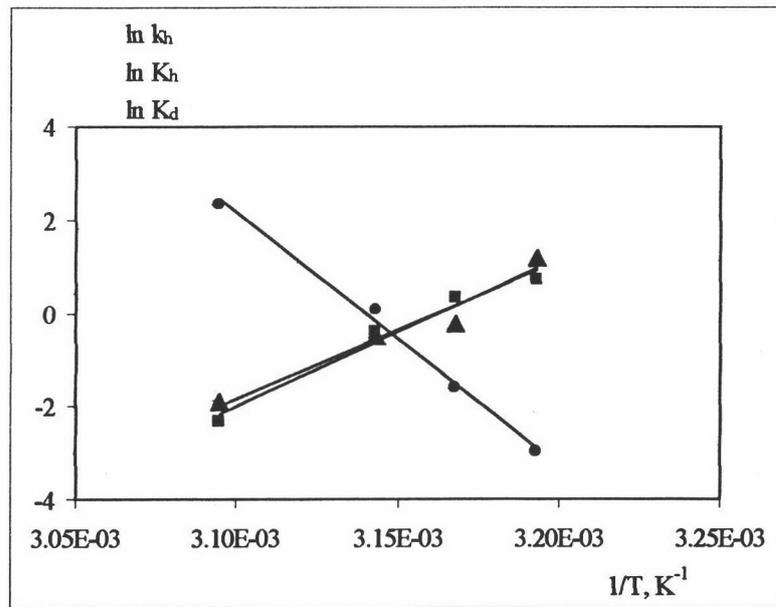


Figura 5.6 – Dependencia de los parámetros k_h , K_h y K_d con la temperatura. RDMP, Tampón K^+ y Mg^{+2} , Lactozym y Maxilact (● = k_h , ■ = K_h y ▲ = K_d)

En la Figura 5.7 se presenta la dependencia que las constantes k_h , K_h y K_d tienen con la temperatura. Estas constantes se obtuvieron para ambas enzimas en un RDMP en presencia de Tampón Na^+ . En las ecuaciones [Ec. 5.26] a [Ec. 5.28] se proponen expresiones que permiten calcular los parámetros de ajuste:

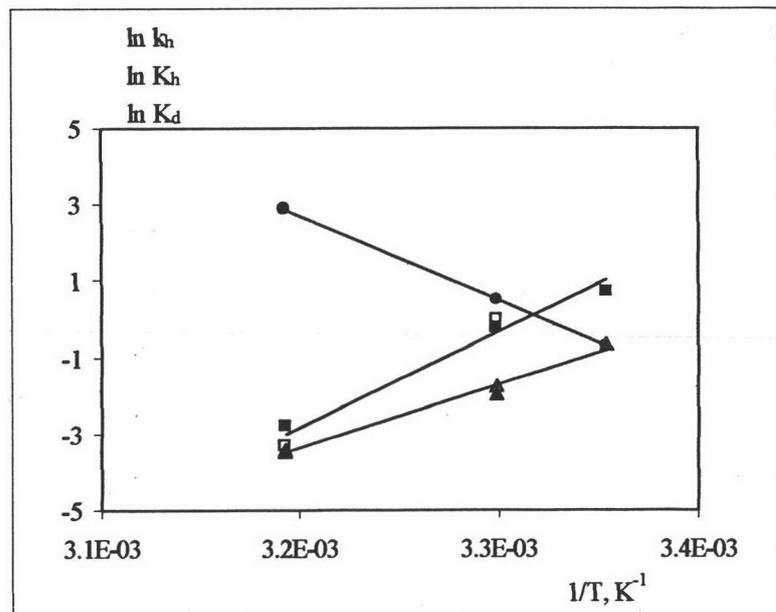


Figura 5.7 – Dependencia de los parámetros k_h , K_h y K_d con la temperatura. RDMP, Tampón Na^+ , Lactozym (● = k_h , ■ = K_h y ▲ = K_d) y Maxilact (○ = k_h , □ = K_h y Δ = K_d)

$$k_h = 1.92 \cdot 10^{32} \exp\left(-\frac{22400}{T}\right), \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.999 \quad [\text{Ec. 5.26}]$$

$$K_h = 1.65 \cdot 10^{-36} \exp\left(\frac{24900}{T}\right) \quad r^2 = 0.970 \quad [\text{Ec. 5.27}]$$

$$K_d = 2.66 \cdot 10^{-25} \exp\left(\frac{16600}{T}\right) \quad r^2 = 0.989 \quad [\text{Ec. 5.28}]$$

Para verificar el modelo de desactivación propuesto para las β -galactosidasas estudiadas, se aplicó éste a datos experimentales propuestos por diferentes autores **Papayannakos y col. (1993)**, **Santos y col. (1998)** (que utiliza un tampón con iones K^+ y Mg^{+2}) y **Giancomini y col. (1998)**. Los parámetros de ajuste calculados se indican en la **Tabla 5.3**. El ajuste del modelo a datos de actividad de β -galactosidasas, tanto en estado libre como inmovilizado, se muestra en la **Figura 5.8**. La observación visual parece demostrar que el modelo propuesto justifica la dependencia experimental observada. Así mismo los residuales obtenidos se distribuyen aleatoriamente a un lado y otro del cero, comprobándose que más del 85% de los puntos que proponen estos autores presentan un error inferior al 5% con respecto a los calculados a partir del modelo de ajuste.

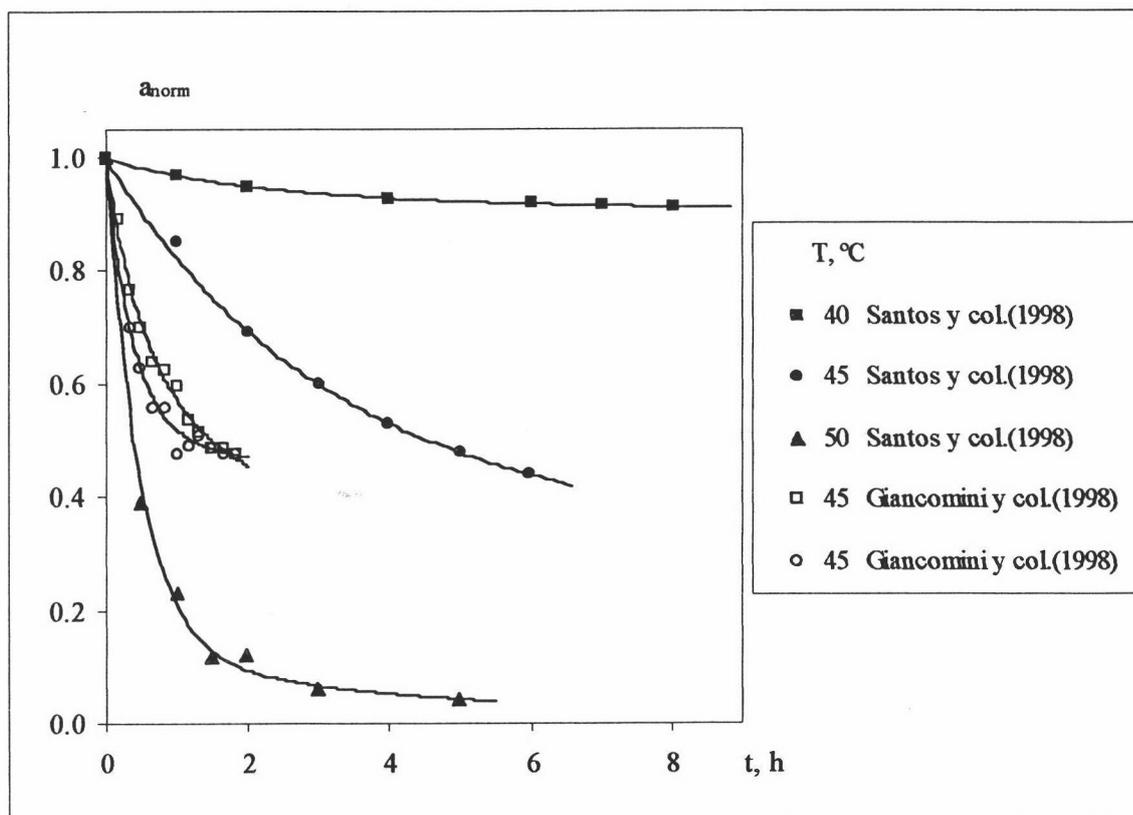


Figura 5.8 – Ajuste de datos de actividad propuestos por distintos autores a modelo de desactivación. Enzima soluble (■ ● ▲ □), enzima inmovilizada (○)

Para los datos de actividad propuestos por Santos y col. (1998), se presenta en la **Figura 5.9** la dependencia que las constantes k_h , K_h y K_d obtenidas tienen con la temperatura proponiéndose en las ecuaciones [Ec. 5.29] a [Ec. 5.31] expresiones que permiten calcular los parámetros de ajuste:

$$k_h = 1.09 \cdot 10^{49} \exp\left(-\frac{39000}{T}\right), \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.993 \quad [\text{Ec. 5.29}]$$

$$K_h = 8.92 \cdot 10^{-65} \exp\left(\frac{46900}{T}\right) \quad r^2 = 0.977 \quad [\text{Ec. 5.30}]$$

$$K_d = 2.68 \cdot 10^{-23} \exp\left(\frac{16100}{T}\right) \quad r^2 = 0.950 \quad [\text{Ec. 5.31}]$$

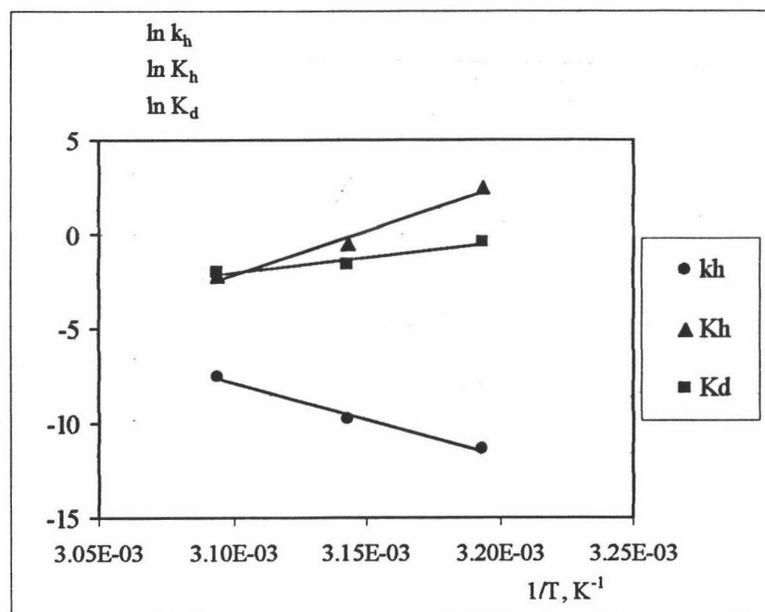


Figura 5.9 – Dependencia de los parámetros k_h , K_h y K_d con la temperatura (Santos y col. (1998))

Los ensayos de actividad realizados a 30°C para la enzima Lactozym en RFHR (con distintos módulos) muestran, como ya se indicó en el apartado 4.1.3, que dentro del circuito del ECS del RFHR, o bien la enzima ha perdido actividad (hecho improbable ya que a 30°C no se advertía pérdida de actividad en RDMP) o bien es retirada del seno de la disolución (**Figura 4.7**). De igual forma, al comparar la actividad mostrada por esta enzima en el RDMP y RFHR a 40 y 45°C (**Figura 4.8**) se observa que dentro del RFHR existe una mayor disminución de la actividad detectada.

5.1.3 Estabilización de β -galactosidasa en presencia de lactosa.

La influencia que la lactosa ejerce sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa difiere según los autores. Así, mientras que Mahoney y col. (1988a) indica que la lactosa es capaz de estabilizar la enzima, Yang y col. (1994) observa que, si bien este disacárido reduce la agregación de ésta no es capaz de estabilizarla por completo. Por otro lado Illanes y col. (1998) indica que la presencia de lactosa disminuye la actividad residual de una enzima procedente de una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, mientras que la galactosa la estabiliza.

Con el objetivo de verificar si la lactosa estabiliza de alguna forma la actividad de la enzima se programaron una serie de experimentos de hidrólisis de lactosa con la enzima Lactozym. Los experimentos se llevaron a cabo en RDMP a 40°C, con disoluciones de lactosa de concentración 0.0694 M preparadas en Tampón K⁺ y Mg⁺² y concentraciones de enzima comprendidas entre 0.10 y 3.00 g L⁻¹ (Tablas 4.75 a 4.78).

La Figura 5.10 muestra la conversión (x) (definida como la cantidad de lactosa hidrolizada dividida por la cantidad de lactosa inicial) en función del producto de la concentración de enzima inicial por el tiempo (C_{E0} t). Todos los resultados experimentales se ajustaron a una misma línea, lo que indica que dentro del rango experimental ensayado la enzima no sufre desactivación alguna. Si lo comparamos con los ensayos de actividad realizados en los que se advertía que a 40 °C la enzima sufría desactivación en ausencia de lactosa (Figura 5.4), podemos concluir diciendo que, dentro del rango experimental utilizado, la lactosa ejerce un efecto estabilizador sobre la lactasa.

5.1.4 Actividad de la enzima glucosa isomerasa.

Como ya se pudo comprobar en el apartado 4.1.3 la enzima glucosa isomerasa no sufría desactivación alguna en un RDMP en las condiciones ensayadas.

Cuando se estudió su comportamiento en un RFHR se indicó que dentro de este sistema experimental había una pérdida de actividad posiblemente debido a una retirada de enzima del seno de la disolución y a una acumulación de la misma sobre la

membrana. La justificación de este efecto será estudiada con mayor profundidad en el apartado 5.4.

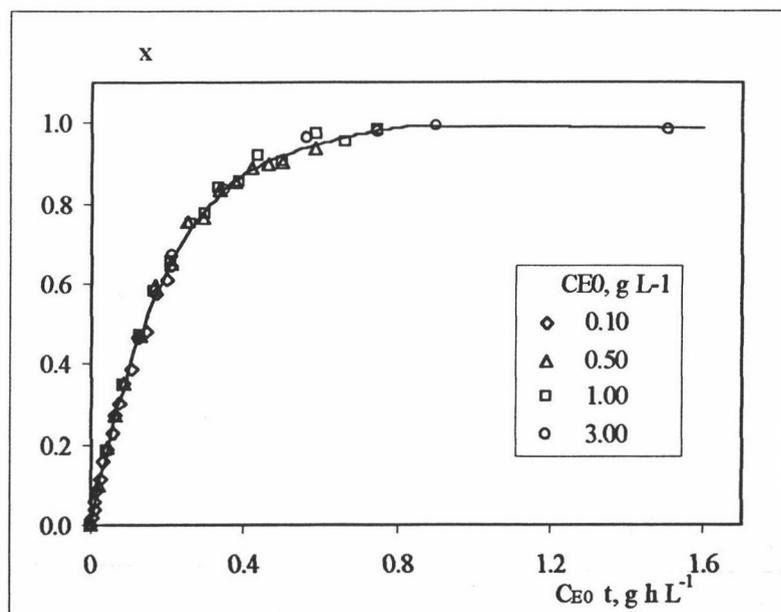


Figura 5.10 – Influencia de la concentración de lactosa sobre la actividad de la enzima Lactozym. RDMP, 40°C, Tampón K⁺ y Mg⁺², L₀=0.0694 M

5.2 Isomerización fructosa-glucosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

Dado que la reacción enzimática de isomerización fructosa-glucosa es reversible, para la interpretación cinética de dicha reacción es necesario el conocimiento de las condiciones de equilibrio alcanzadas.

La constante de equilibrio K_e , definida en la ecuación [Ec. 2.30], ha sido determinada experimentalmente por Luzón González (1993), mostrándose en la Tabla 5.4 la conversión de equilibrio, x_e , y la constante del equilibrio de isomerización, K_e , que obtuvo a distintas temperaturas. Los resultados conseguidos para K_e se ajustan a la ecuación de Van't Hoff [Ec. 2.51].

Tabla 5.4 – Constantes y conversiones de equilibrio para la reacción de isomerización fructosa-glucosa (Luzón González (1993))

T, °C	K_e	x_e
30	0.8342	0.5452
40	0.9290	0.5184
50	1.0278	0.4931
60	1.1302	0.4694

Aplicando el modelo cinético desarrollado [Ec. 2.45], los datos experimentales se ajustan a una línea recta que pasa por el origen, como se puede observar en las Figuras 5.11 a 5.17.

En las Figuras 5.15 a 5.17 se observa para experimentos realizados a una misma concentración de enzima, cómo al aumentar la concentración de sustrato aumenta la pendiente ya que ésta es directamente proporcional a la concentración total de hexosas. Para experimentos realizados a una misma concentración de sustrato y concentraciones de enzima diferentes (Figuras 5.11 a 5.14) se observa que los datos se ajustan a una misma recta ya que, con la inclusión de la variable intensiva de tratamiento, y , la pendiente de la recta es independiente de la concentración de enzima siempre que no haya desactivación alguna como previamente se constató.

De la pendiente de estas rectas se puede obtener un valor medio de la constante cinética en el RDMP, $(\bar{k}_a)_{MP}$, para cada concentración de sustrato S_0 ensayada (Tabla 5.5).

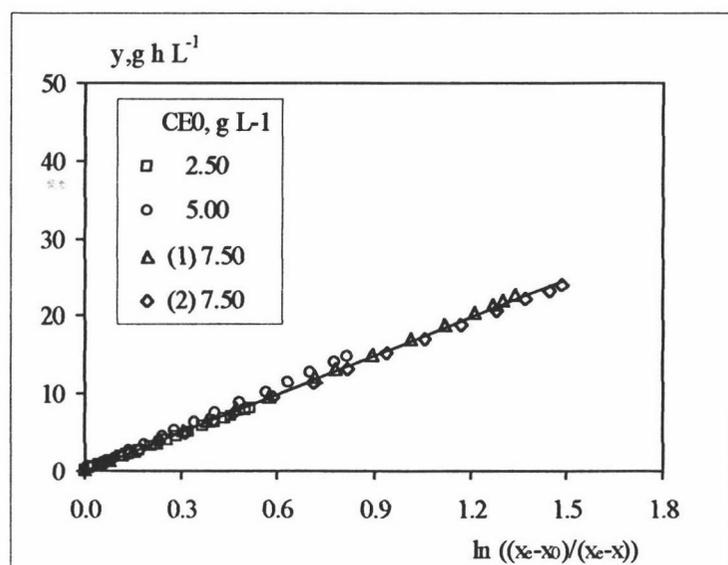


Figura 5.11 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de enzima 40°C, $S_0 = 0.10$ M, Tampón Mg^{+2}

Figura 5.12 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de enzima 40°C, $S_0 = 0.50$ M, Tampón Mg^{+2}

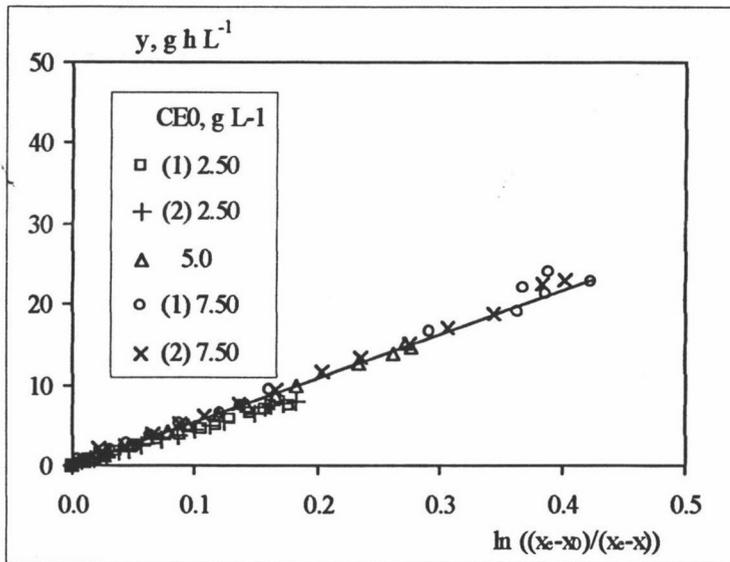
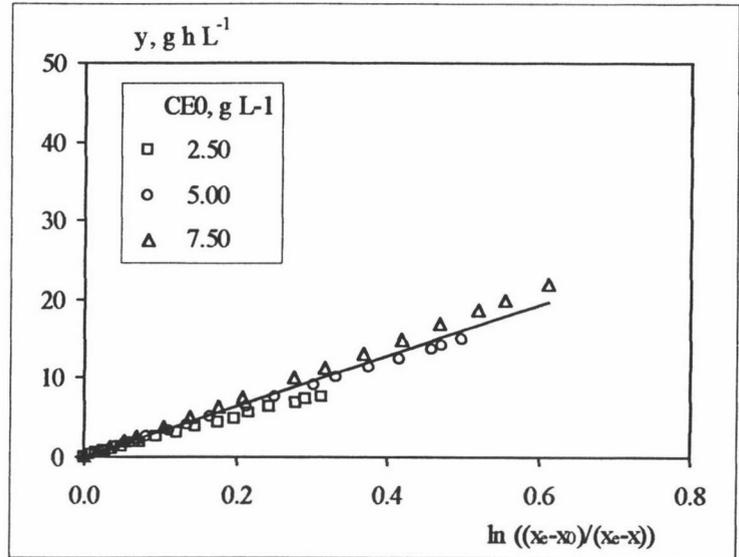
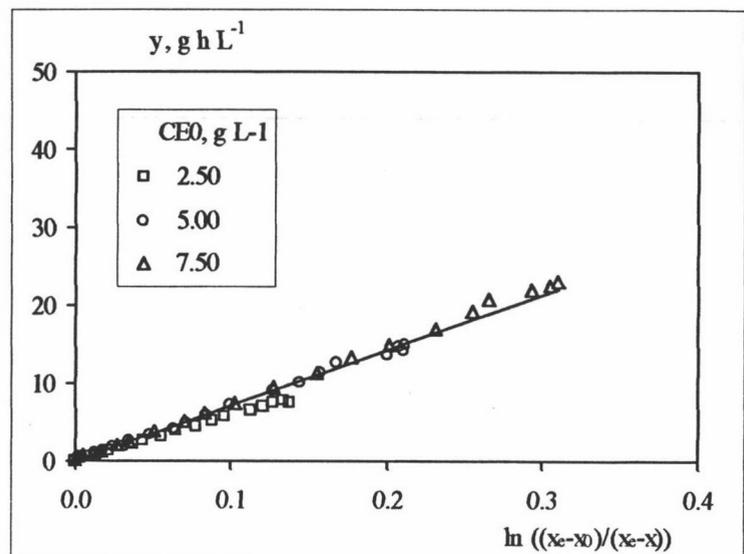


Figura 5.13 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de enzima 40°C, $S_0 = 1.10$ M, Tampón Mg^{+2}

Figura 5.14 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de enzima 40°C, $S_0 = 1.50$ M, Tampón Mg^{+2}



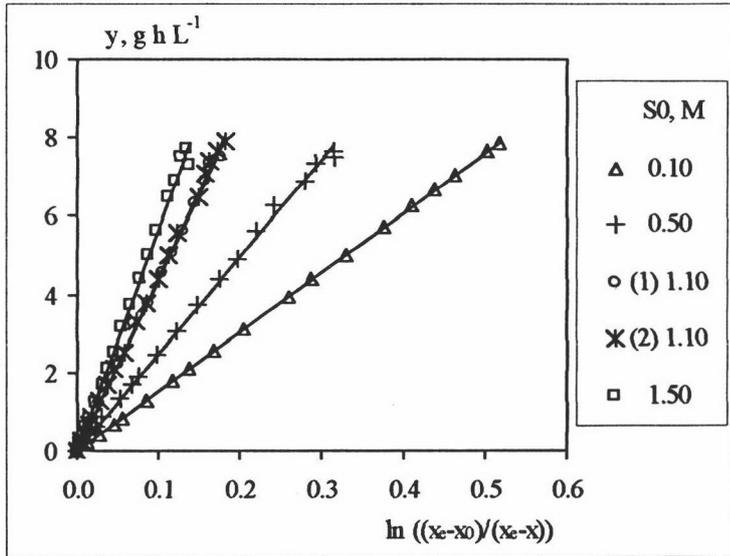


Figura 5.15 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de sustrato 40°C, $C_{E0} = 2.50 \text{ g L}^{-1}$, Tampón Mg^{+2}

Figura 5.16 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de sustrato 40°C, $C_{E0} = 5.00 \text{ g L}^{-1}$, Tampón Mg^{+2}

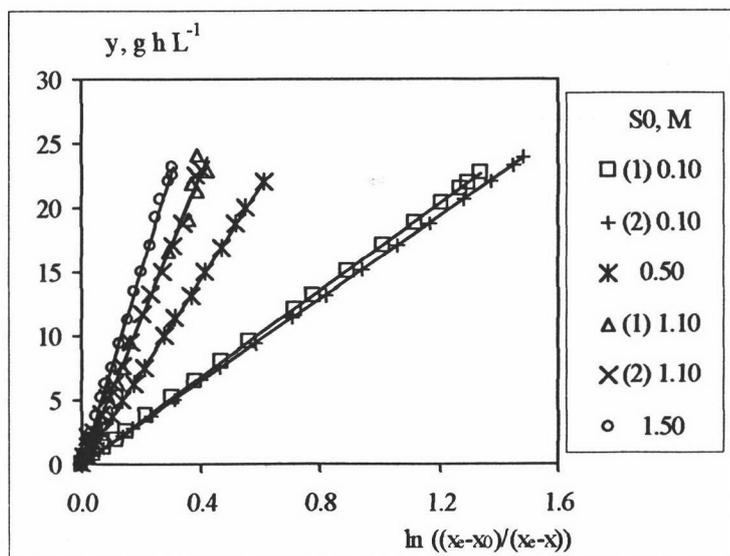
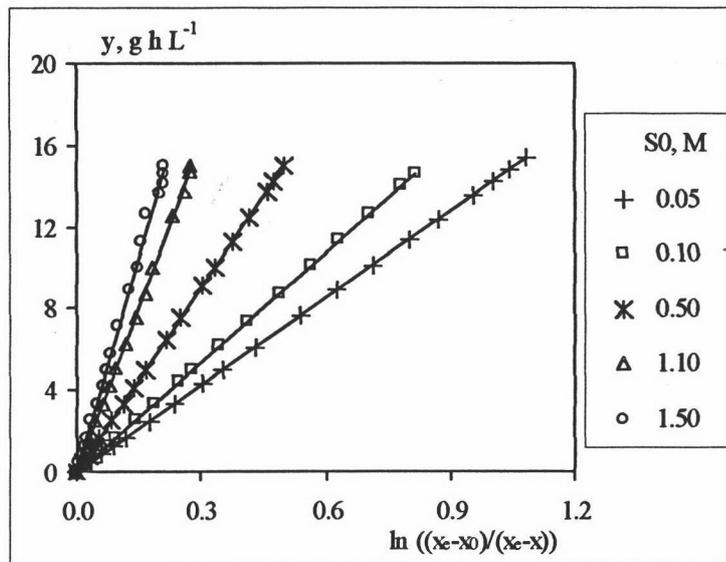


Figura 5.17 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP – Representación [Ec. 2.45] Influencia de la concentración de sustrato 40°C, $C_{E0} = 7.50 \text{ g L}^{-1}$, Tampón Mg^{+2}

Tabla 5.5 - Constantes cinéticas de pseudoprimer orden $(k_a)_{MP}$ obtenidas para la isomerización fructosa-glucosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP) 40°C Tampón Mg^{+2}

S_0, M	$C_{E0}, g L^{-1}$	$(\bar{k}_a)_{MP}, L g^{-1} h^{-1}$
0.05	5.00	0.0705
0.10	2.50, 5.00, 7.00	0.0608
0.50	2.50, 5.00, 7.00	0.0338
1.10	2.50, 5.00, 7.00	0.0199
1.50	2.50, 5.00, 7.00	0.0151

En la **Figura 5.18** se observa el ajuste de $1/\bar{k}_a$ frente a S_0 según la ecuación [Ec. 2.46] postula, pudiéndose obtener el valor de $k_f e_T$ y K_1 a la temperatura de 40°C a partir de la pendiente y ordenada en el origen de la recta de ajuste ($r^2=0.999$):

$$k_f e_T = 0.0792 L g^{-1} h^{-1}$$

$$K_1 = 2.76 M^{-1}$$

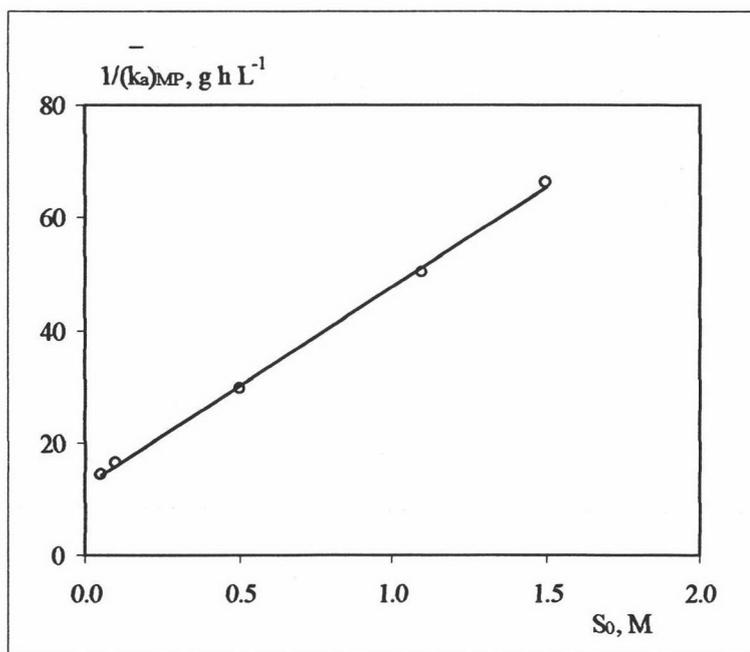


Figura 5.18 – Isomerización fructosa-glucosa en RDMP. Representación de $1/(\bar{k}_a)_{MP}$ frente a S_0 40°C

Determinado el valor numérico de $k_f e_T$ y K_1 ; conocido el valor numérico de la constante de equilibrio de isomerización, K_e , y su expresión en función de las constantes

cinéticas individuales [Ec. 2.30]; teniendo en cuenta [Ec. 2.38] que relaciona la constante K_1 con las constantes cinéticas elementales del modelo cinético propuesto; y bajo la consideración previamente realizada de que la reacción de isomerización se aproxima a una cinética de pseudoprimer orden (por lo que $K_{mf} \approx K_{mg} = K_M$) pueden determinarse las constantes cinéticas elementales de la reacción de isomerización (Tabla 5.6) y la constante de Michaelis-Menten, K_M (Tabla 5.7) a la temperatura de 40 °C.

La comparación de las constantes obtenidas con distintas enzimas mostradas en la Tabla 5.6 no es posible ya que incluyen la concentración de enzima activa del complejo enzimático utilizado, aunque puede observarse en general una mayor actividad por gramo de enzima en el complejo enzimático utilizado en esta investigación, Spezyme GI.

Tabla 5.6 –Valores propuestos para las constantes cinéticas elementales de la reacción de isomerización fructosa-glucosa llevada a cabo en RDMP 40°C

$k_g e_T, L h^{-1} g^{-1}$	$k_f e_T, L h^{-1} g^{-1}$	$k_g e_T, mol h^{-1} g^{-1}$	$k_f e_T, mol h^{-1} g^{-1}$	Enzima	Referencia
0.00402	0.00458	0.00096	0.00100	Células	Sproull y col. (1976)
0.0672	0.0786	7.50	9.48	† ICI	Kikkert y col. (1981)
0.0116	0.00152	0.00443		† Sweetase	Chen y col. (1987)
0.0465	0.0465	0.00539	0.00500	Sweetzyme	Luzón González (1993)
0.0792	0.0792	0.0149	0.0138	Spezyme GI	Este trabajo

† Datos estimados a partir de datos experimentales obtenidos a otras temperaturas.

En la Tabla 5.7 se puede observar que los valores propuestos por distintos autores para K_{mf} y K_{mg} a 40°C, obtenidos en distintas condiciones experimentales, son prácticamente coincidentes, siendo unas veces mayor K_{mf} y otra K_{mg} . Por este motivo se ha calculado un valor medio de ambas constantes, K_M , observándose que el encontrado en esta investigación es del mismo orden de magnitud que los calculados para otros complejos enzimáticos.

Tabla 5.7 - Valores propuestos para la constante cinética de Michaelis-Menten de la reacción de isomerización fructosa-glucosa en RDMP 40°C

K_{mf} , M	K_{mg} , M	K_M , M	Enzima	Referencia
0.054	0.090	0.072	† Enzima libre	Takasaki y col. (1969)
0.691	0.572	0.632	Células	Sproull y col. (1976)
2.32	2.30	2.31	† Células inmovilizadas en queratina	Chen y col. (1980)
1.94	1.92	1.93	† ICI	Kikkert y col. (1981)
0.47	0.11	0.29	† Sweetase	Chen y col. (1987)
0.223	0.223	0.223	Sweetzyme	Luzón González (1993)
0.363	0.363	0.363	Spezyme GI	Este trabajo

† Datos estimados a partir de datos experimentales obtenidos a otras temperaturas.

La comparación de las constantes obtenidas con las postuladas por otros autores, confirman las suposiciones realizadas. Así mismo la observación visual de los datos experimentales y del ajuste planteado parece justificar la dependencia experimental observada. A modo de ejemplo se muestra en las Figuras 5.19 a 5.21 el ajuste del modelo cinético planteado a los datos experimentales obtenidos en el RDMP.

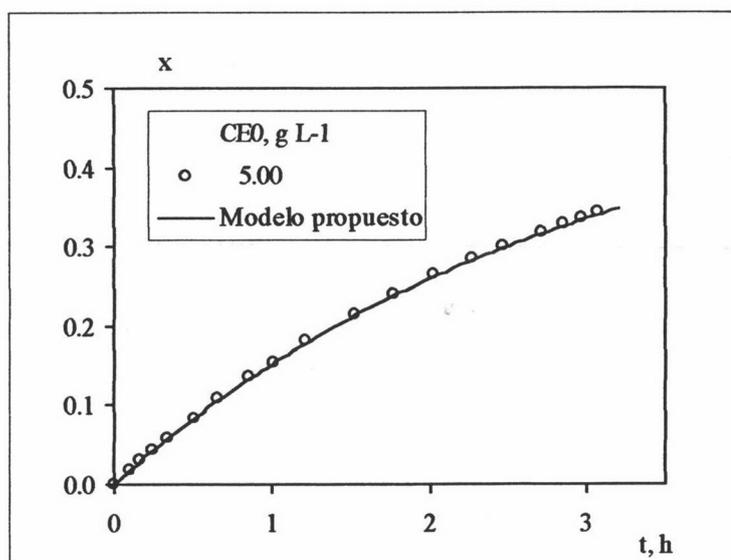


Figura 5.19 - Isomerización fructosa-glucosa en RDMP - Ajuste de modelo propuesto 40°C, $S_0 = 0.05$ M, Tampón Mg^{+2}

Figura 5.20 –
Isomerización fructosa-
glucosa en RDMP –
Ajuste de modelo
propuesto 40°C, $S_0 = 0.10$
M, Tampón Mg^{+2}

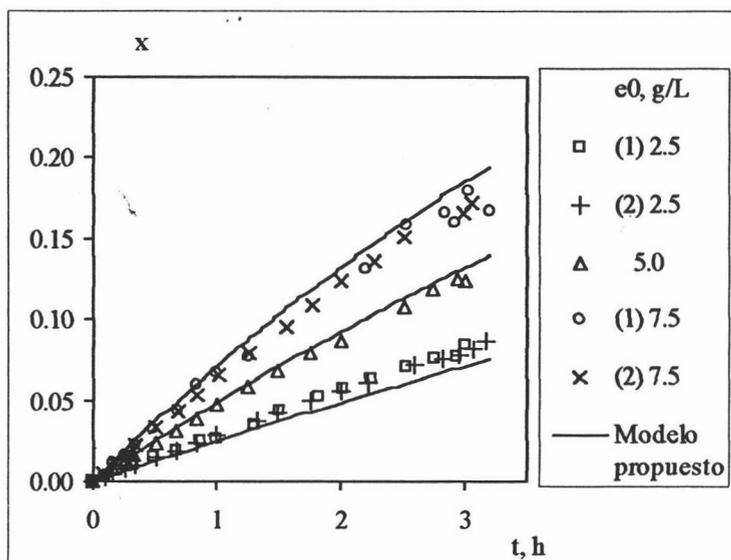
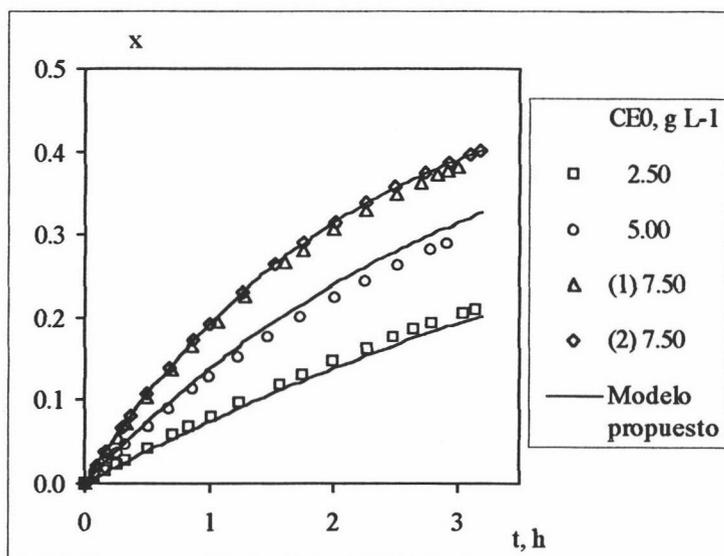


Figura 5.21 –
Isomerización fructosa-
glucosa en RDMP –
Ajuste de modelo
propuesto 40°C, $S_0 = 1.10$
M, Tampón Mg^{+2}

5.3 Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP).

5.3.1 Modelo cinético de hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP considerando desactivación enzimática de primer orden.

En los ensayos de actividad realizados con Tampón K^+ y Mg^{+2} se observa que la enzima Lactozym sufre una ligera desactivación a 40°C. Considerando que diferentes autores (Yang y col. (1989b), Papayannakos y col. (1993), Carrara y col. (1997))

interpretan sus resultados incorporando la desactivación enzimática al modelo cinético que plantean, se desarrolla un modelo cinético de hidrólisis de lactosa con inhibición competitiva de producto donde se incluye una desactivación enzimática de primer orden con la temperatura. Integrando la ecuación [Ec. 2.15], se obtiene:

$$K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I} \right) [-\ln(1-x)] + L_0 x \left(1 - \frac{K_M}{K_I} \right) = \frac{k e_T C_{E0}}{k_d} [1 - \exp(-k_d t)] \quad [\text{Ec. 5.32}]$$

donde k_d es la constante de desactivación de la enzima.

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación [Ec. 5.32] no resulta satisfactorio, indicándonos que el modelo propuesto no es coherente con los resultados experimentales obtenidos. De hecho, a 40°C se observa que la presencia de lactosa parece estabilizar la enzima, hecho indicado en bibliografía por diferentes autores (Mahoney col. (1988a), Yang y col. (1994), Illanes y col. (1998)). Como se indicaba en el apartado 5.1.3 no se aprecia desactivación enzimática alguna en las condiciones experimentales ensayadas.

5.3.2 Modelo cinético de hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP sin existencia de desactivación enzimática alguna.

El modelo más empleado para la interpretación cinética de la hidrólisis de lactosa (Tabla 2.16) es un modelo de inhibición competitiva por galactosa ([Ec. 2.3] a [Ec. 2.5]). Incluyendo la variable intensiva de tratamiento (y) (definida en [Ec. 4.2]) en la ecuación [Ec. 2.17] obtenida a partir del modelo de inhibición por galactosa, nos quedaría la expresión:

$$\frac{y}{x} = \frac{K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I} \right) [-\ln(1-x)]}{k e_T} + \frac{L_0 \left(1 - \frac{K_M}{K_I} \right)}{k e_T} \quad [\text{Ec. 5.33}]$$

ecuación que debería permitir calcular las constantes cinéticas del modelo.

Al aplicar la ecuación [Ec. 5.33] a los resultados experimentales obtenidos para la hidrólisis enzimática de lactosa en un RDMP (Tablas 4.52 a 4.83), se obtienen las linealizaciones recogidas en las Figuras 5.22 a 5.24.

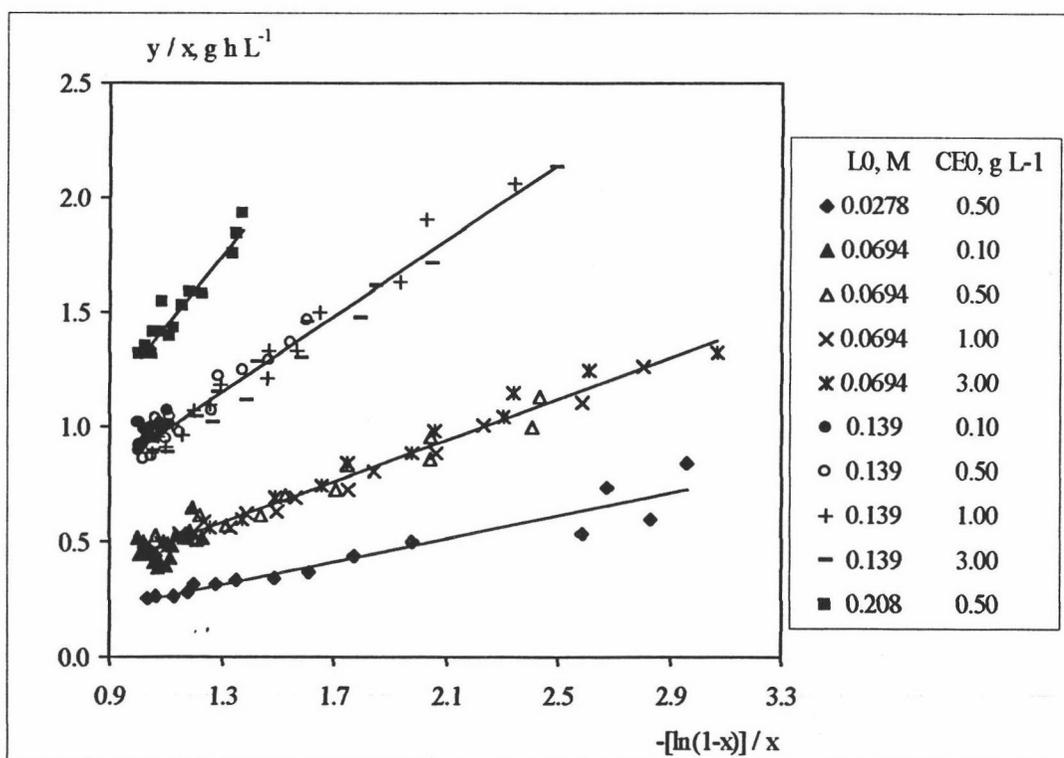


Figura 5.22 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Linealización propuesta en [Ec. 5.33] 25°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

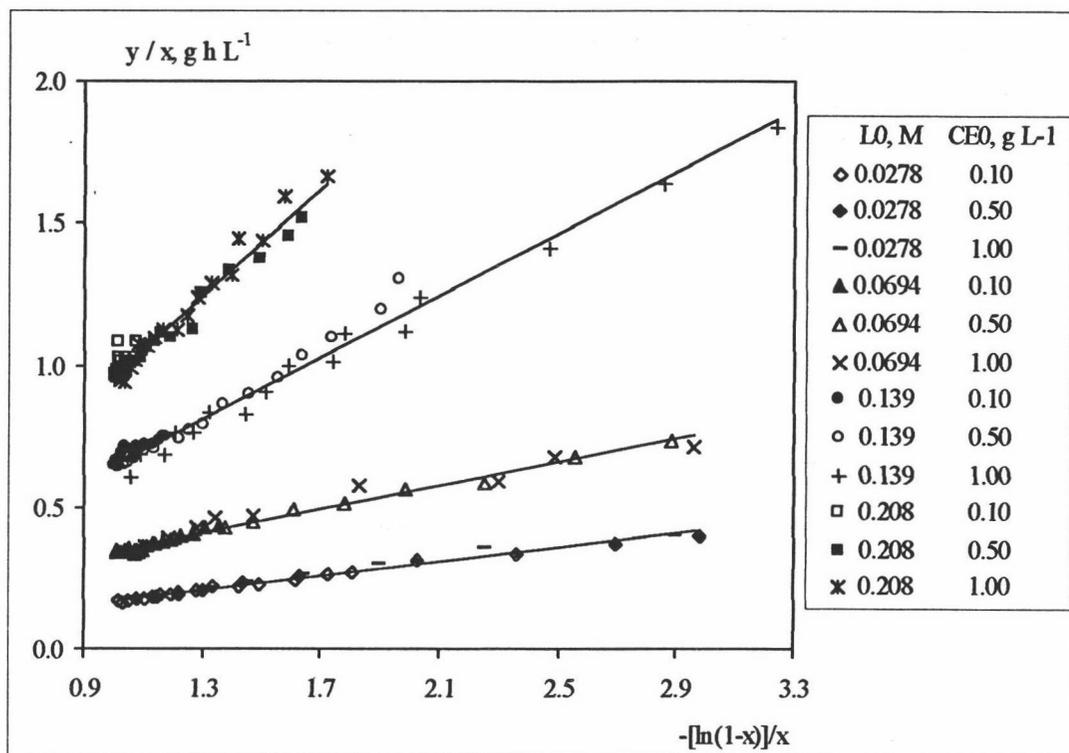


Figura 5.23 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Linealización propuesta en [Ec. 5.33] 30°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

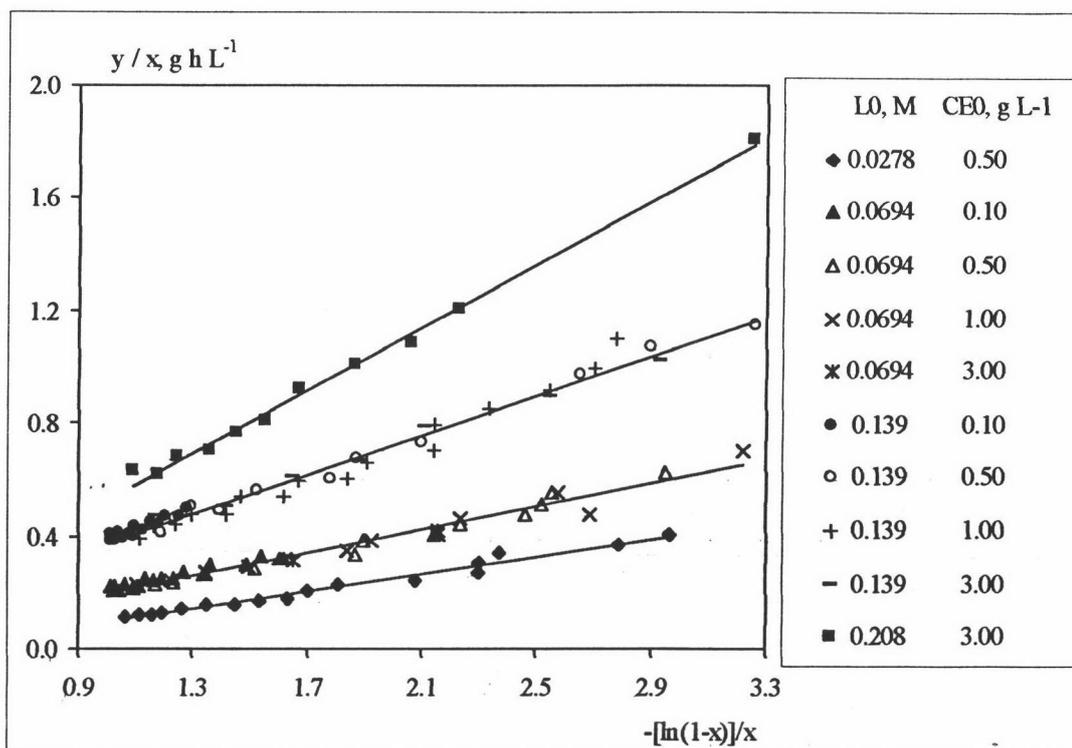


Figura 5.24 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Linealización propuesta en [Ec. 5.33] 40°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

En la **Tabla 5.8** se recogen las pendientes y ordenadas en el origen calculadas a partir de la ecuación [Ec. 5.33]. La representación de las pendientes obtenidas frente a S_0 debería ajustarse a una línea recta, hecho que como puede observarse en la **Figura 5.25** no se produce. Por otro lado, al representar $(1-K_M/K_I) / k_f e_T$ frente a la temperatura (**Figura 5.26**) se obtiene una dispersión de puntos alrededor del cero sin tendencia aparente. Esto puede ser debido a que las constantes K_M y K_I tengan valores muy próximos entre si, por lo que la linealización utilizada en la que se realiza una división por un número muy pequeño (x), hace aumentar el error.

En la **Tabla 5.9** se recogen las constantes cinéticas K_M y K_I obtenidas por distintos autores bajo diferentes condiciones experimentales y aplicando distintos modelos cinéticos para la interpretación de sus resultados. Se observa que, como postulaban **Ryder (1989)** y **Zadow (1992)**, la inhibición por galactosa se da en mayor medida en las enzimas de origen fúngico que en las procedentes de levaduras (**Figura**

5.27) donde el valor de K_M y K_I es más próximo entre si. Así Santos y col.(1998), que calculan el valor de las constantes por regresión no lineal, propone unos valores de K_M y K_I de un mismo orden de magnitud.

En las Figuras 5.28 y 5.29 se representa K_M y K_I propuestos por distintos autores en la forma que sugiere la ecuación de Van't Hoff. Como puede observarse en la Figura 5.28, correspondiente a K_M , la pendiente de las líneas es diferente según el autor analizado, haciéndose positiva incluso en algún caso (Yang y col. (1989b)). De igual forma los valores de K_I propuestos por algún autor (Ma y col. (1983)) no se ajustan a la ecuación de Van't Hoff (Figura 5.29). Podemos observar en ambas figuras que la variación de K_M y K_I con la temperatura es prácticamente la misma para los valores propuestos por Santos y col. (1998).

Teniendo en cuenta estos hechos y los resultados experimentales obtenidos se ha considerado un modelo cinético simplificado considerando que $K_M = K_I$.

Tabla 5.8 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Parámetros obtenidos a partir del ajuste de datos experimentales a la ecuación [Ec. 5.33]
Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

T, °C	S_0, M	$K_M(1+S_0/K_I)/k \text{ e}_T, \text{ g h L}^{-1}$	$L_0(1-K_M/K_I)/k \text{ e}_T, \text{ g h L}^{-1}$	r^2
25	0.0278	0.251	-0.0125	0.913
	0.0694	0.451	-0.00700	0.967
	0.139	0.826	0.0778	0.959
	0.208	1.54	-0.248	0.929
30	0.0278	0.124	0.0466	0.983
	0.0694	0.208	0.139	0.975
	0.139	0.545	0.102	0.983
	0.208	0.943	0.0157	0.958
40	0.0278	0.152	-0.0537	0.976
	0.0694	0.203	-0.00450	0.971
	0.139	0.348	0.0262	0.982
	0.208	0.557	-0.0311	0.994

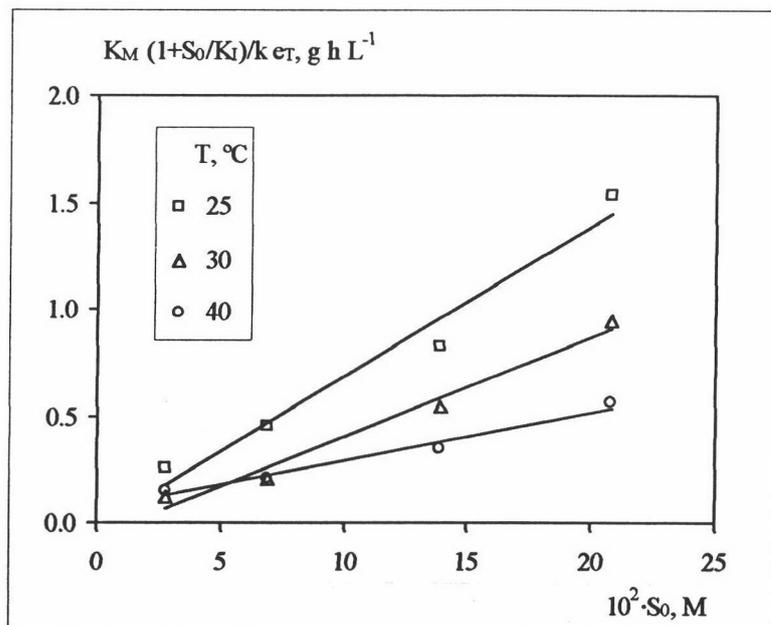


Figura 5.25 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Representación de $K_M (1+S_0/K_I) / k e_T$ frente a S_0 . Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

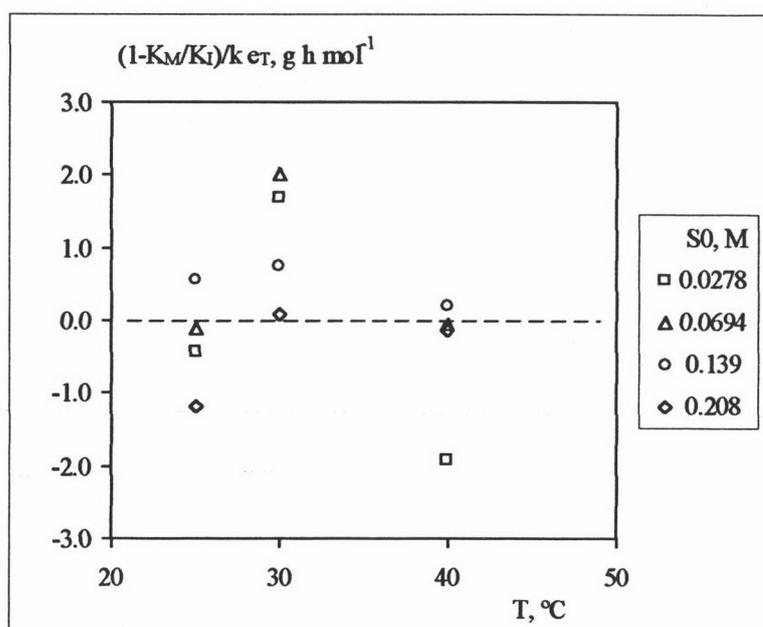


Figura 5.26 – Hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP. Representación de $(1-K_M/K_I) / k e_T$ frente a la temperatura. Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Tabla 5.9 – Constantes cinéticas propuestas por diferentes autores para la hidrólisis enzimática de lactosa mediante β -galactosidasas.

Referencia	Origen de enzima	pH	T, °C	k, mol g ⁻¹ h ⁻¹	K _M , M	K _I , M
Friend y col. (1982)	<i>Aspergillus Oryzae</i> (sol.)	4.5	50		0.112	0.0095
	<i>Aspergillus Oryzae</i> (inm.)	4.5	50		0.122	0.0105
	<i>Aspergillus Oryzae</i> (sol.)	6.5	50		0.178	0.0025
	<i>Aspergillus Oryzae</i> (inm.)	6.5	50		0.160	0.0045
Reichenbach (1979)	<i>Aspergillus Oryzae</i> (sol.)	4.5	50		0.0357	0.0201
Flaschel y col. (1982)	<i>Aspergillus Niger</i> (sol.)		50		0.0539	0.00092 (α) 0.0118 (β) 0.0109 (complejo)
Heng y col. (1994)	<i>Escherichia coli</i> ₁ (inm.)	7.0	21		0.00298	0.035
	<i>Escherichia coli</i> ₂ (inm.)			0.00346	0.034	
	<i>Escherichia coli</i> ₃ (inm.)			0.00434	0.082	
	<i>Escherichia coli</i> ₄ (inm.)			0.00332	0.039	
	<i>Escherichia coli</i> ₅ (inm.)			0.00373	0.034	
Huffman y col. (1985)	<i>Aspergillus Oryzae</i> (sol.)	4.5	50		0.0469	0.0200
	<i>Aspergillus Oryzae</i> (inm.)			0.0490	0.0200	
Ma y col. (1983)	<i>Aspergillus Niger</i> (inm.)	4.5	30		0.0536	0.0321
			40		0.0519	0.0055
			50		0.0533	0.0946
Carrara y col. (1996)	<i>Kluyveromyces Fragilis</i> (sol.)	6.9	43		0.0436	0.0519
	<i>Kluyveromyces Fragilis</i> (inm.)			0.1370	0.2340	
Yang y col.(1989b)	<i>Aspergillus Niger</i> (inm.)	4.0	25		0.0797	0.0000613
			30		0.0764	0.0000620
			35		0.0733	0.0000627
			40		0.0705	0.0000633
			45		0.0679	0.0000640
			50		0.0656	0.0000646
			55		0.0635	0.0000652
			60		0.0615	0.0000658
Korus y col. (1978)	<i>Kluyveromyces Fragilis</i> (inm.)	5.2	23		0.006	0.012
	<i>Aspergillus Niger</i> (inm.)		37		0.0286	0.0024
Peterson y col. (1989)	<i>Aspergillus Oryzae</i> (inm.)	4.5	30		0.052	0.00022 (α) 0.042(β)

Tabla 5.9(Cont.)– Constantes cinéticas propuestas por diferentes autores para la hidrólisis enzimática de lactosa mediante β -galactosidasas.

Referencia	Origen de enzima	pH	T, °C	k, mol g ⁻¹ h ⁻¹	K _M , M	K _I , M
Yang y col. (1989a)	<i>Aspergillus Niger</i> (sol.) (Modelo 1)	4.0	8	0.0000663	0.0833	0.000472
			30	0.000262	0.0809	0.000528
			40	0.000457	0.0799	0.000553
			45	0.000597	0.0795	0.000565
			50	0.000772	0.079	0.000578
			55	0.000992	0.0786	0.00059
			60	0.00126	0.0782	0.000601
	<i>Aspergillus Niger</i> (sol.) (Modelo 2)	4.0	8	0.0000722	0.1019	0.000527
			30	0.000288	0.0995	0.000584
			40	0.000508	0.0986	0.000609
			45	0.000665	0.0982	0.000622
			50	0.000863	0.0977	0.000634
			55	0.00111	0.0973	0.000646
			60	0.00142	0.0969	0.000658
Illanes y col. (1998)	<i>Kluyveromyces Marxianus</i> (sol.)	6.6	28		0.021	0.0292
			35		0.0278	0.0316
	<i>Kluyveromyces Marxianus</i> (inm.)	6.6	28		0.0544	0.0869
			35		0.0365	0.0114
Santos y col. (1998)	<i>Kluyveromyces Fragilis</i> (sol.)	6.5-7.2	5	0.000900	0.0004	0.00041
			25	0.00375	0.0046	0.0036
			40	0.00967	0.023	0.0153
Illanes y col. (2001)	<i>Kluyveromyces Marxianus</i> (inm.)	6.6	10		0.0154	0.0247
			15		0.0183	0.0370
			20		0.0219	0.0561
			22.5		0.0239	0.0695
			25		0.0248	0.0801
			27.5		0.0275	0.0969
			30		0.0317	0.1097
			32.5		0.0330	0.1351
			35		0.0379	0.1620
			37.5		0.0383	0.2008

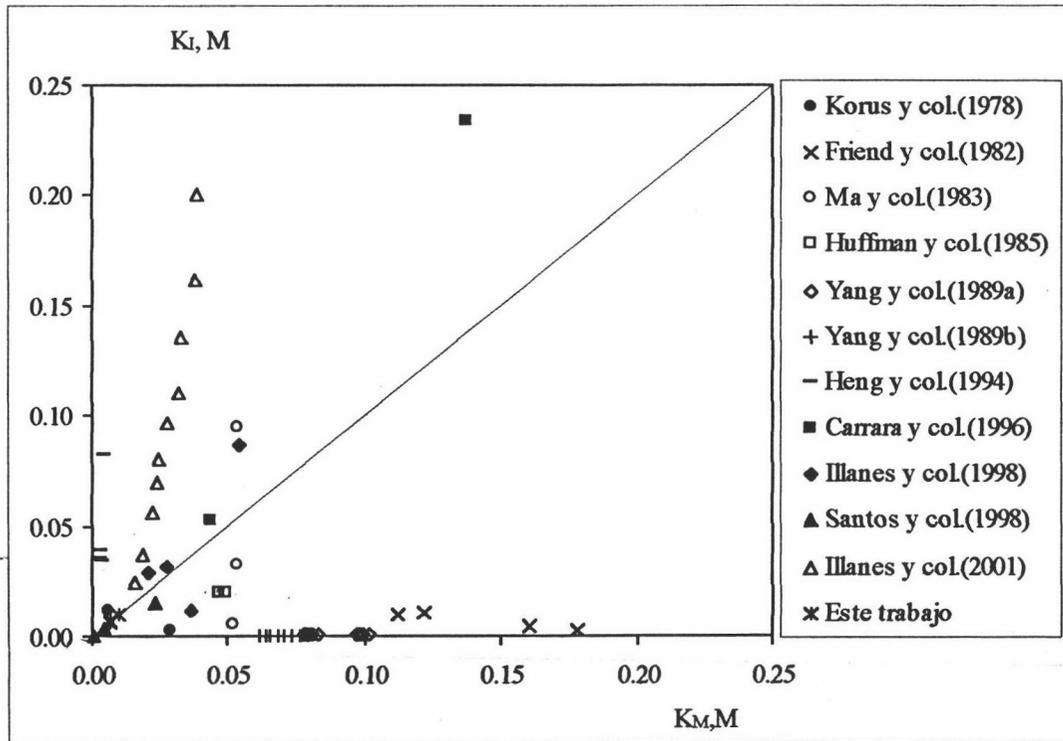


Figura 5.27 – Hidrólisis enzimática de lactosa. Representación de las constantes cinéticas K_M y K_I propuestas por distintos autores.

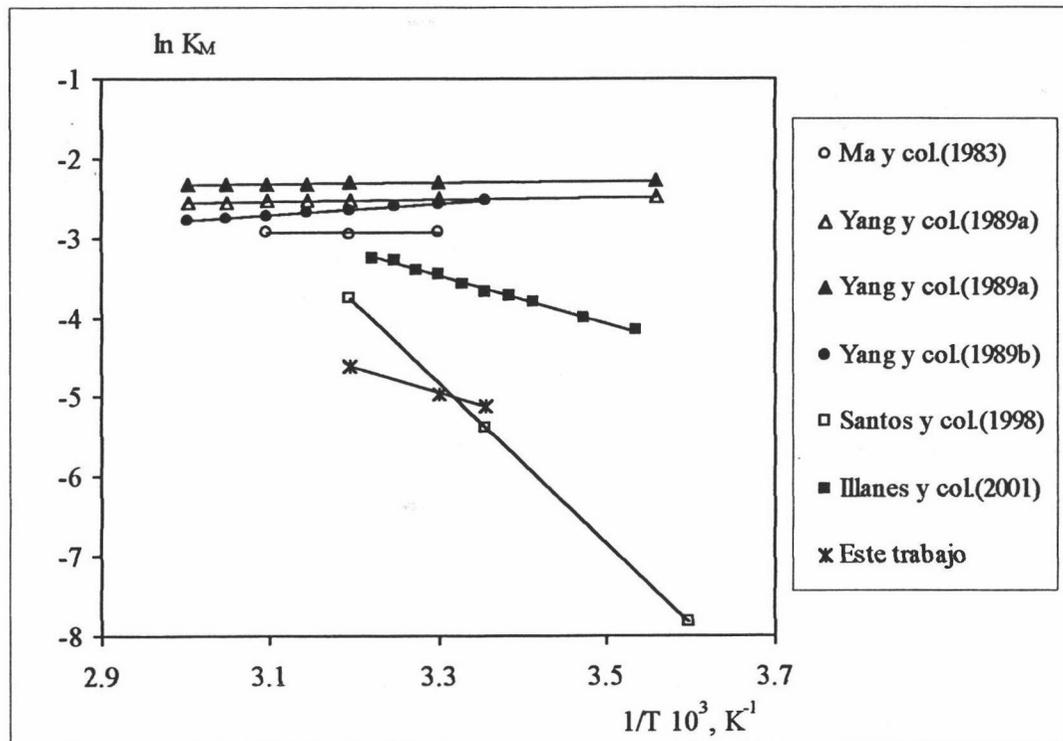


Figura 5.28 – Hidrólisis enzimática de lactosa. Ajuste de las constantes K_M propuestas por distintos autores a la ecuación de Van't Hoff.

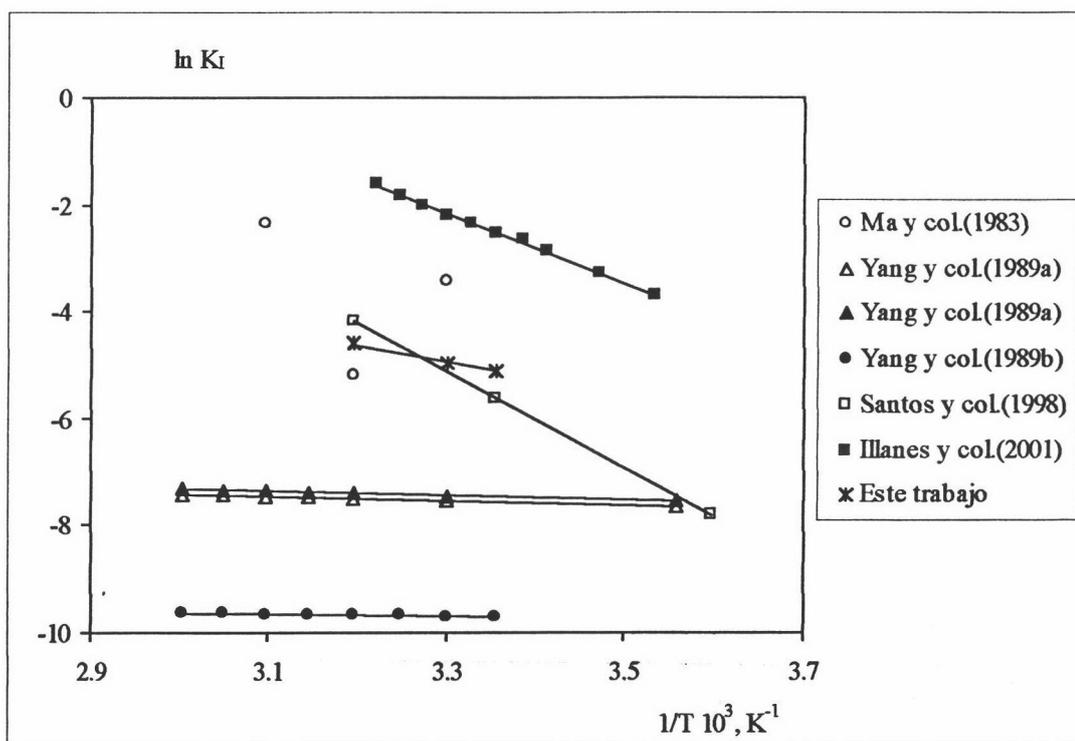


Figura 5.29 – Hidrólisis enzimática de lactosa. Ajuste de las constantes K_I propuestas por distintos autores a la ecuación de Van't Hoff.

5.3.3 Modelo cinético propuesto para la hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP.

La consideración realizada de que $K_M=K_I$, implica que la enzima posee casi la misma afinidad por el sustrato (lactosa) que por el producto de la reacción (galactosa). Incluyendo esta simplificación en la ecuación [Ec. 5.33] obtenemos que:

$$y = \left(\frac{K_M}{k e_T} + \frac{1}{k e_T} S_0 \right) [-\ln(1-x)] \quad [\text{Ec. 5.34}]$$

Como puede observarse la ecuación indica que la ordenada en el origen se debe hacer cero para todos los experimentos realizados. El ajuste de los datos experimentales obtenidos a 25, 30 y 40 °C a la ecuación [Ec 5.34] (Figuras 5.30 a 5.32), confirma que el modelo propuesto es correcto. De igual forma, la presencia de galactosa en un experimento (Tabla 5.10) realizado con cantidades equimolares (0.0347 M) de lactosa (L_0) y galactosa (G_{a0}) ($S_0 = 0.0694$ M), confirma las suposiciones realizadas.

La ecuación [Ec. 5.34] considera un modelo cinético de primer orden, como algún autor indica (Tabla 2.16), donde la constante cinética de pseudo-primer orden dependería de S_0 . Este resultado sugiere que la velocidad de la reacción está controlada por la ruptura del complejo enzima-sustrato. Esto supone que la etapa limitante es la etapa 2 del modelo cinético [Ec. 2.4], lo que implica que la constante de Michaelis representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato y que la lactosa se haya unida a la enzima por el grupo galactosil, como algunos autores postulaban (Mahoney (1998b), In y col. (1998) y Klewicki (2000)) para la formación de oligosacáridos a partir de lactosa. De esta forma podría explicarse de una forma sencilla que los valores de K_M y K_I sean similares.

Tabla 5.10 - Hidrólisis de lactosa en RDMP.
Lactozym, 30 °C, Tampón K^+ y Mg^{+2}
 $L_0 = 0.0347 \text{ M}$ $G_{a0} = 0.0347 \text{ M}$ $S_0 = 0.0694 \text{ M}$
 $C_{E0} = 0.50 \text{ g L}^{-1}$

$t, \text{ h}$	$10^2 y, \text{ g h L}^{-1}$	x
0.000	0.00	0.000
0.025	1.24	0.054
0.042	2.10	0.076
0.075	3.73	0.129
0.120	6.00	0.190
0.170	8.49	0.265
0.250	12.5	0.350
0.333	16.7	0.445
0.417	20.8	0.500
0.500	25.0	0.584
0.590	29.5	0.632
0.670	33.5	0.699
0.787	39.3	0.728
0.930	46.5	0.799
1.250	62.5	0.883

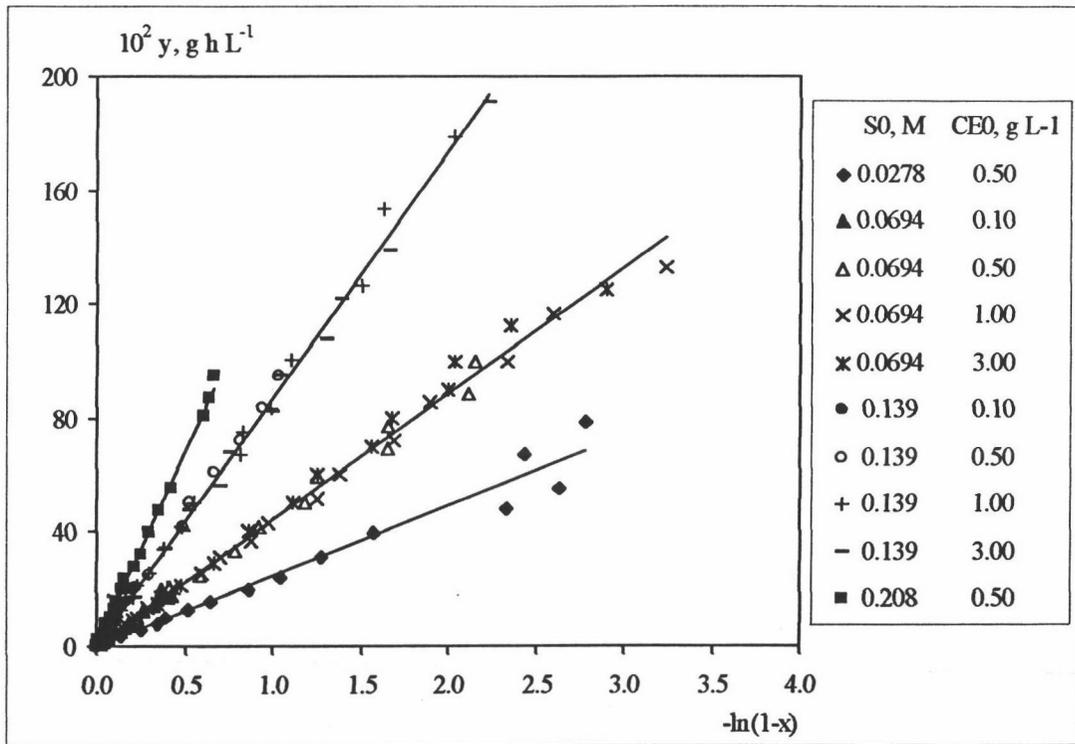


Figura 5.30 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RDMP. Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ [Ec. 5.34] 25°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

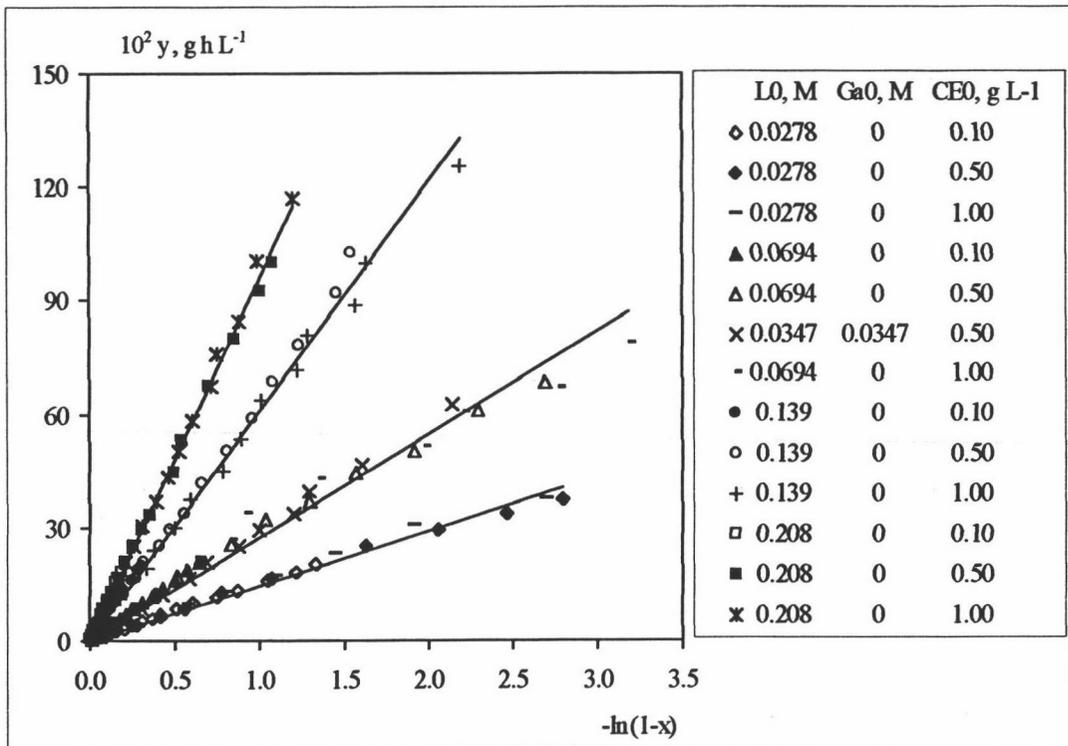


Figura 5.31 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RDMP. Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ [Ec. 5.34] 30°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

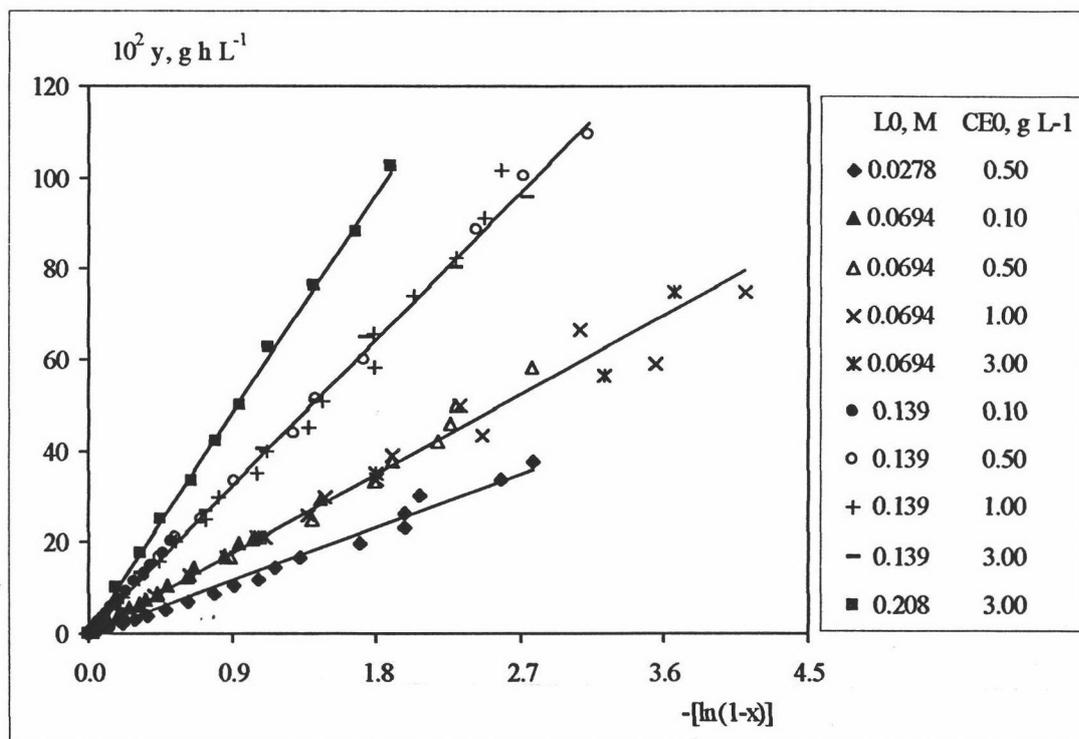


Figura 5.32 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RDMP. Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ [Ec. 5.34] 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

En la Tabla 5.11 se muestra el valor de las pendientes de las rectas de ajuste obtenidas a partir de las Figuras 5.30 a 5.32. La representación de las pendientes obtenidas a cada temperatura frente a S_0 se ajustan a una recta (Figura 5.33), permitiendo obtener el valor de k y K_M a 25, 30 y 40°C. Sin embargo los valores obtenidos por regresión lineal no son razonables, por lo que se ha recurrido a una regresión no lineal para determinar el valor de las constantes k y K_M (Tabla 5.12).

Tabla 5.11 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Pendiente de ecuación [Ec. 34] (Figuras 5.30 a 5.32)

T, °C	S_0, M	$(K_M / k e_T + S_0 / k e_T), g h L^{-1}$	r^2
25	0.0278	0.246	0.964
	0.0694	0.443	0.994
	0.139	0.870	0.997
	0.208	1.34	0.997
30	0.0278	0.145	0.989
	0.0694	0.272	0.980
	0.139	0.607	0.995
	0.208	0.955	0.998
40	0.0278	0.116	0.996
	0.0694	0.194	0.984
	0.139	0.360	0.996
	0.208	0.535	0.999

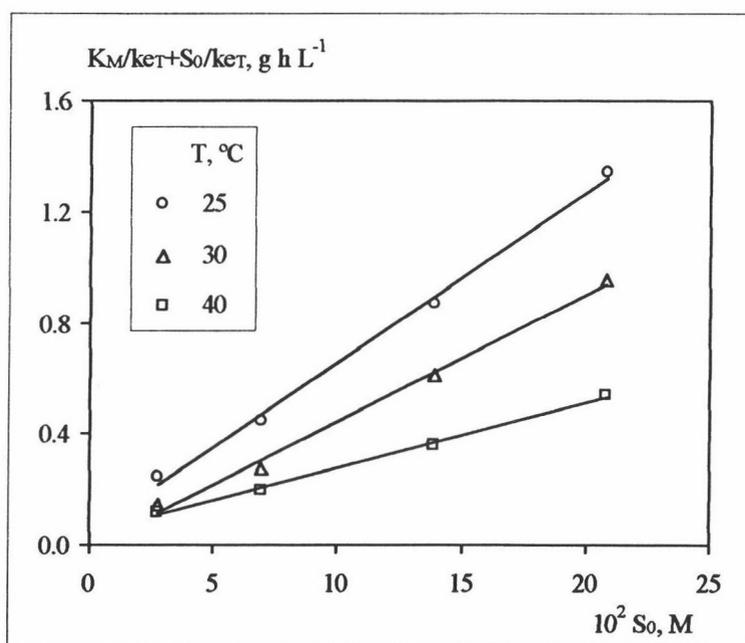


Figura 5.33 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Representación de pendiente de [Ec. 5.34] frente a S_0 . Influencia de la temperatura Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Tabla 5.12 – Hidrólisis de lactosa en RDMP - Constantes cinéticas obtenidas por ajuste de los datos a [Ec. 5.37] mediante regresión no lineal.

T, °C	k_{eT} , mol g ⁻¹ h ⁻¹	CV (%)	K_M , M	CV (%)
25	0.168	1.0	0.0060	5
30	0.227	0.5	0.0070	6
40	0.414	1.2	0.0100	5

Las constantes cinéticas k (Figura 5.33) y K_M (Figuras 5.28 y 5.29) obtenidas para cada temperatura en el presente trabajo se ajustan a la ecuación de Arrhenius y Van't Hoff respectivamente con $r^2 > 0.998$.

En la Figura 5.34 se muestra el ajuste de las constantes cinéticas k propuestas por distintos autores (Tabla 5.9) a la ecuación de Arrhenius. Como se puede observar la ordenada en el origen varía de unos autores a otros ya que este parámetro depende de cómo se defina la concentración de enzima (masa de proteína por litro, masa de solución enzimática por litro). No obstante en esta figura se puede observar que las pendientes resultantes son muy similares, por lo que la energía de activación para k es semejante (Tabla 5.13), salvo para Papayannakos y col.(1993). Los valores de la

energía de activación (E_a), entalpía de formación ($(-\Delta H_f)_a$) y factor pre-exponencial se muestran en la Tabla 5.13.

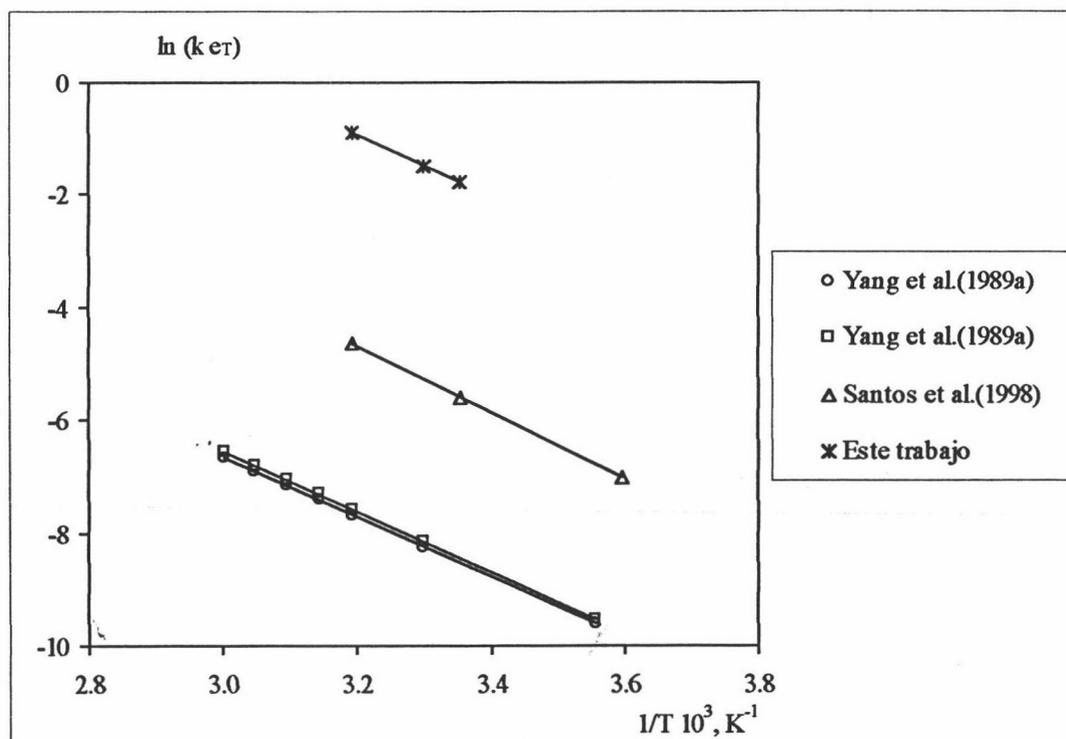


Figura 5.34 – Hidrólisis de lactosa. Ajuste de $k_e r$ propuestas por distintos autores a la ecuación de Arrhenius.

Tabla 5.13 - Parámetros cinéticos propuestos por distintos autores y calculados en el presente trabajo para la reacción de hidrólisis enzimática de lactosa mediante β -galactosidasas.

Autor	Origen de enzima	k		K_M		K_I	
		Factor preexponencial, $mol\ g^{-1}\ h^{-1}$	E_a , Kcal mol^{-1}	Factor preexponencial, M	$(-\Delta H_f)_a$, Kcal mol^{-1}	Factor preexponencial, M	$(-\Delta H_f)_a$, Kcal mol^{-1}
Papayannakos y col. (1993)	<i>A. Niger</i> (soluble)		7.69		7.38		16.7
Yang y col. (1989a)	<i>A. Niger</i> (soluble)	1.41 10^4	10.7				
		1.04 10^4	10.6				
Santos y col. (1998)	<i>K. Fragilis</i> (soluble)	1.50 10^6	11.8	2.48 10^{12}	20.1	4.73 10^{10}	17.9
Ladero y col. (2000)	<i>K. Fragilis</i> (inmovilizada)		10.9	2.06 10^7	13.3	9.87 10^8	15.5
Illanes y col. (2000/2001)	<i>K. Marxianus</i> (inmovilizada)		10.4	5.23 10^2	5.87	2.66 10^8	13.0
Este trabajo	<i>K. Fragilis</i> (soluble)	2.71 10^7	11.2	2.77 10^2	6.39	2.77 10^2	6.39

En las Figuras 5.35 a 5.37 se muestra el ajuste del modelo propuesto [Ec. 5.34] a los datos experimentales primarios obtenidos. La observación visual parece demostrar que el modelo propuesto justifica la dependencia experimental observada. Así mismo los residuales obtenidos se distribuyen en la mayor parte de los experimentos realizados aleatoriamente a un lado y otro del cero, comprobándose que más del 77% de los resultados experimentales obtenidos presentan un error inferior al 5% con respecto a los calculados a partir del modelo planteado.

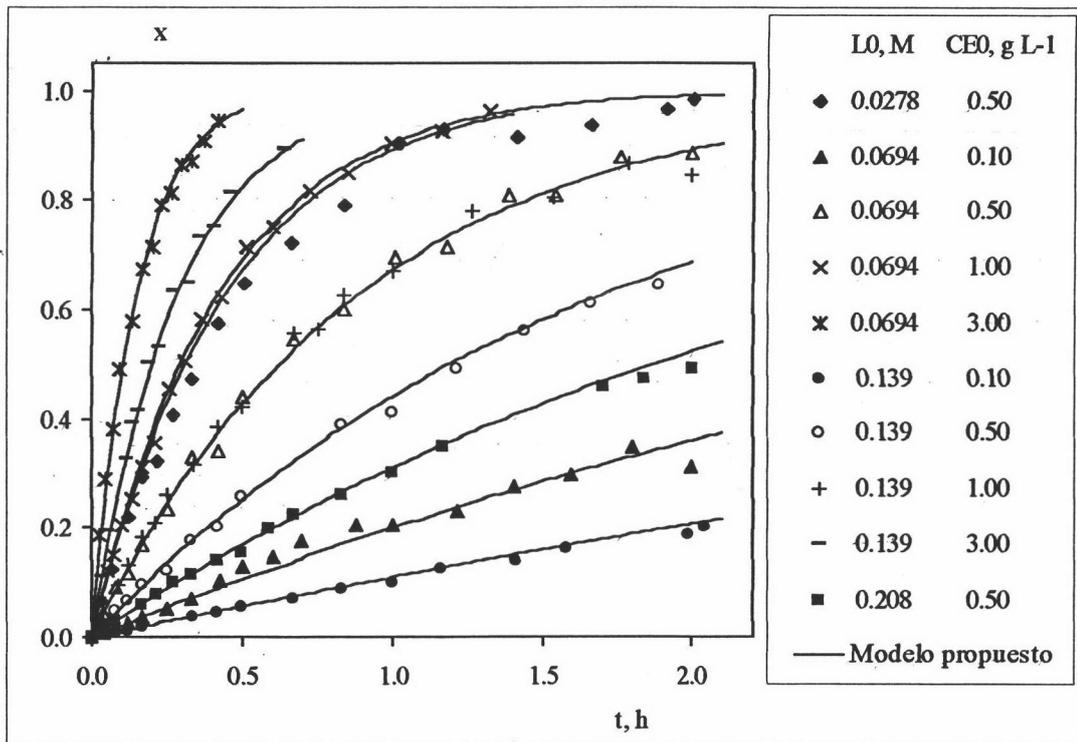


Figura 5.35 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 25°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

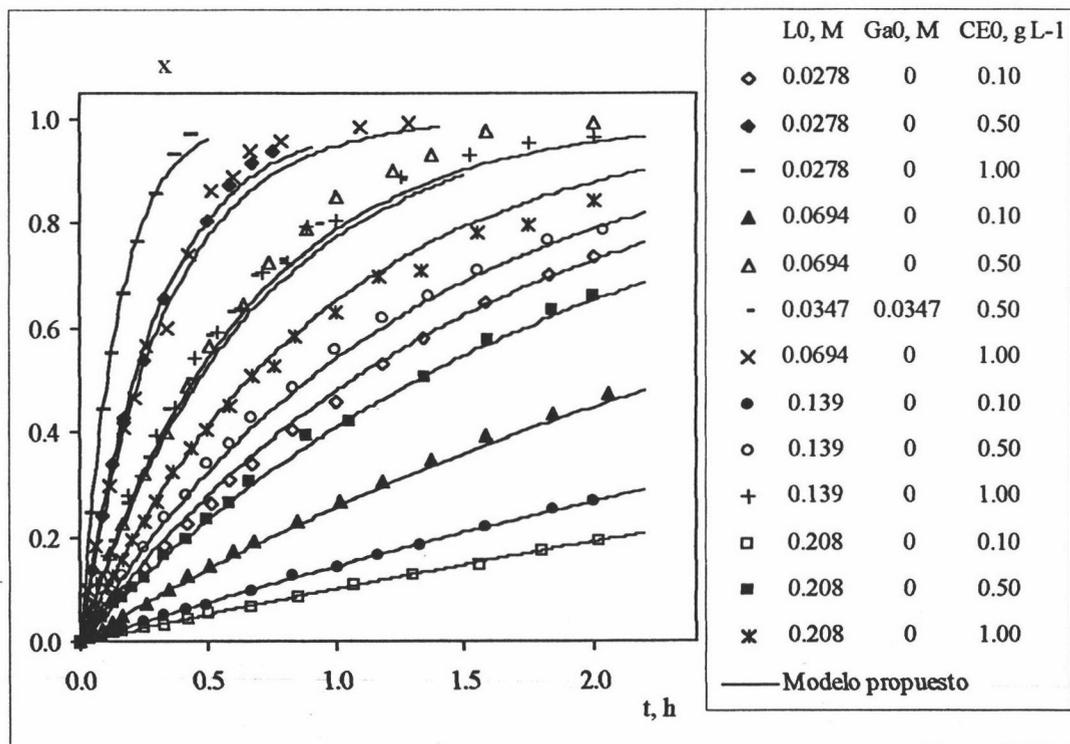


Figura 5.36 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 30°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

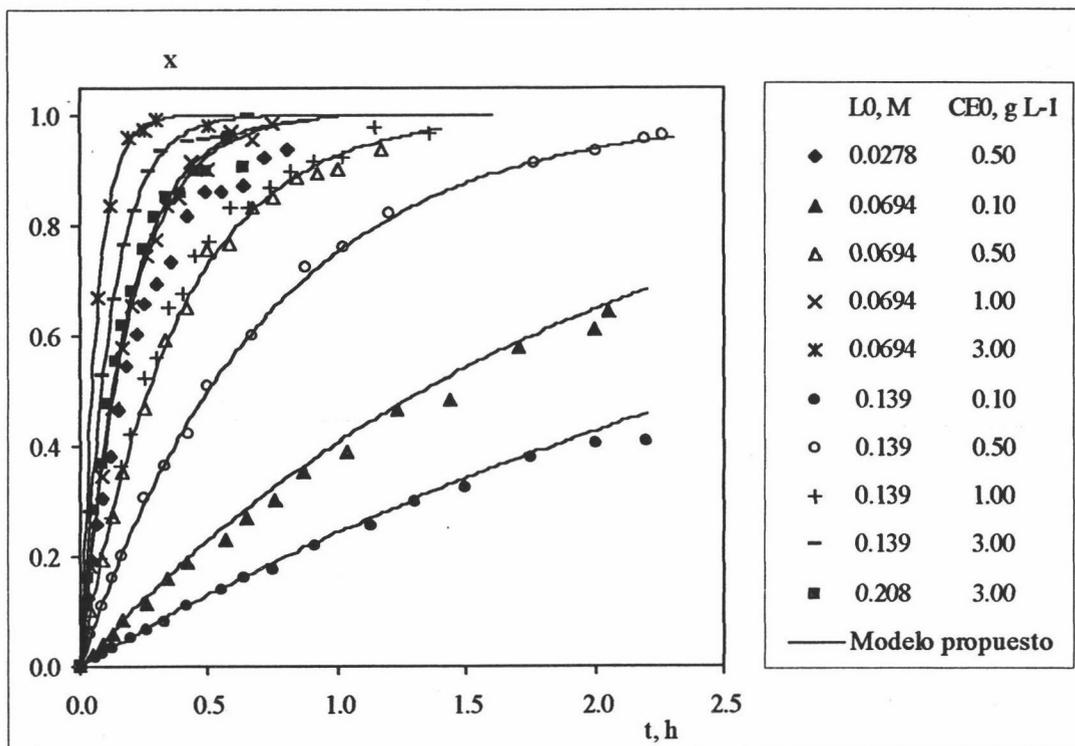


Figura 5.37 – Hidrólisis de lactosa en RDMP. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C Lactozym Tampón K⁺ y Mg⁺²

5.4 Isomerización fructosa glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

5.4.1 Modelo de reactor de fibra hueca.

El comportamiento del reactor de fibra hueca puede considerarse diferencial, como pone de manifiesto la proximidad de las concentraciones de glucosa obtenidas a la entrada (G_i) y salida (G_f) del mismo en función del tiempo de operación durante un experimento realizado a 40°C con una concentración de fructosa de 0.10 M y una masa de enzima en el circuito del ECS del RFHR de 1.00 g. En la **Tabla 5.14** se muestra para el experimento realizado la concentración de glucosa medida a la entrada y salida del reactor (G_i y G_f) y en el circuito del ECS (G_c) en función del tiempo de reacción. En el circuito del ECS se considera que existe mezcla perfecta dada la agitación existente. Para las fibras se establece la hipótesis de flujo pistón.

Si el reactor de fibra hueca puede considerarse diferencial, un balance de glucosa en el mismo conduce a:

$$q G_i + m (r_{FG})_m = q G_f \quad [\text{Ec. 5.35}]$$

en estado cuasi-estacionario, es decir, despreciando la variación de la concentración de glucosa en el sistema frente a la que se produce en el reactor entre la entrada y la salida.

La velocidad de reacción media $(r_{FG})_m$ entre la entrada y salida del reactor puede calcularse a partir de la expresión:

$$(r_{FG})_m = \frac{q (G_f - G_i)}{m}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.36}]$$

aunque dada la pequeña diferencia existente entre las concentraciones G_f y G_i , los valores de $(r_{FG})_m$ obtenidos por la ecuación anterior presentan desviaciones importantes como se observa en la **Tabla 5.14** donde se tabula la velocidad de reacción $(r_{FG})_m$ evaluada a partir de la ecuación [Ec. 5.36]. En la **Figura 5.38** se ha representado esta velocidad $(r_{FG})_m$ en función del tiempo de reacción, observándose su dispersión. Esto impide utilizar la citada ecuación para evaluar la velocidad de reacción en función del tiempo, pero confirma que el comportamiento del reactor se aproxima a diferencial.

Tabla 5.14 – Isomerización fructosa-glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR). Módulo NT1808S. 40°C S₀ = 0.10 M m = 1.00 g

t, h	¹ V _i , L	G _i , M	G _f , M	G _c , M	(r _{FG}) _m , mol g ⁻¹ h ⁻¹
0.000	0.6008	0.000000			
0.087	0.6003	0.000250		0.000133	
0.167	0.5998	0.000466	0.000472		0.000222
0.275	0.5993	0.000710		0.000688	
0.333	0.5988	0.000827	0.000844		0.000666
0.500	0.5983	0.00117			
0.667	0.5978	0.00150	0.00151		0.000444
0.833	0.5973	0.00179		0.00177	
1.000	0.5968	0.00206	0.00208		0.000888
1.250	0.5963	0.00257			
1.525	0.5958	0.00308	0.00309		0.000444
1.757	0.5953	0.00366		0.00361	
2.017	0.5948	0.00409	0.00414		0.00178
2.252	0.5943	0.00457		0.00456	
2.470	0.5938	0.00521	0.00522		0.000444
2.667	0.5933	0.00526			
2.837	0.5928	0.00565	0.00567		0.000666
2.917	0.5923	0.00592		0.00588	
3.002	0.5918	0.00610			

¹ Volumen de disolución en el RFHR para cada tiempo.

Si se realiza un balance de glucosa a todo el sistema, se obtiene:

$$V \frac{dG}{dt} = V_c C_{EC} r_{FG} \quad [\text{Ec. 5.37}]$$

siendo V el volumen de la disolución contenida en el RFHR, y V_c y C_{EC}, el volumen de fase líquida y la concentración de enzima contenida en el circuito del ECS, respectivamente, y r_{FG} es la velocidad neta de transformación fructosa-glucosa.

Introduciendo la masa de enzima (m) y la conversión (x), [Ec. 2.31], en la [Ec. 5.37], quedaría de la forma:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{m}{V} \frac{r_{FG}}{S_0} \quad [\text{Ec. 5.38}]$$

y teniendo en cuenta la variable intensiva de tratamiento (y) definida por la ecuación [Ec. 2.39], la ecuación que gobierna el comportamiento del dispositivo experimental del reactor de fibra hueca con recirculación sería:

$$r_{FG} = S_0 \frac{dx}{dy} \quad [\text{Ec. 5.39}]$$

sujeta a la condición:

$$t = 0 \quad x = x_0$$

[Ec. 5.40]

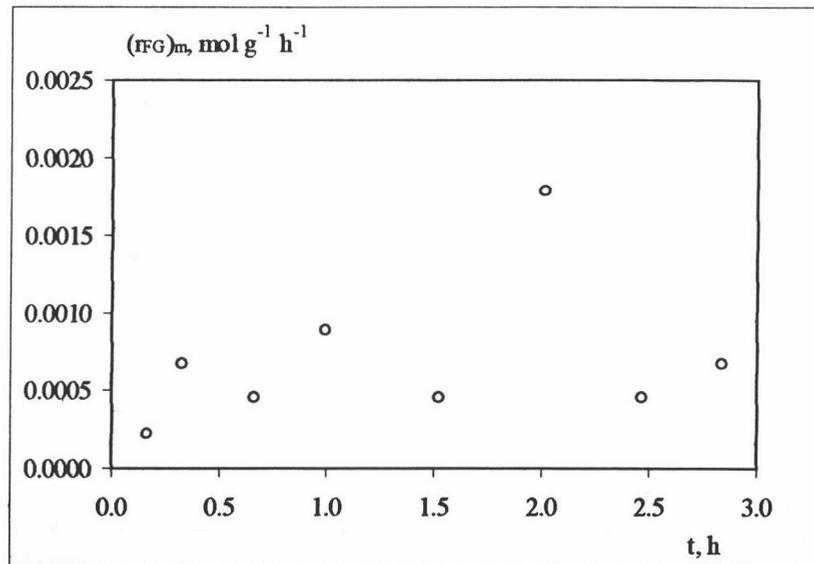


Figura 5.38 – Velocidad media de reacción $(r_{FG})_m$ de isomerización fructosa glucosa en RFHR. Módulo NT1808S. 40°C $S_0=0.10 \text{ M}$ $m=1.00 \text{ g}$.

En experimentos posteriores se llevó a cabo el estudio de la reacción a partir de la concentración de glucosa medida en el tanque agitado en función del tiempo de reacción.

5.4.2 Comprobación del modelo cinético.

Al aplicar el modelo cinético desarrollado, [Ec. 2.45], a los resultados experimentales obtenidos para la reacción de isomerización fructosa-glucosa en el RFHR (Tablas 4.85 a 4.92), se observa que éste se cumple de forma aceptable (Figura 5.39).

De la pendiente de las rectas obtenidas es posible evaluar la constante cinética de pseudoprimer orden en el RFHR, denominada $(k_a)_{HF}$ ([Ec. 2.45]), mostrándose su valor en la Tabla 5.15. El valor de $(k_a)_{HF}$ se mantiene prácticamente constante para experimentos realizados a una misma concentración total de fructosa y distintas concentraciones de enzima ensayadas, disminuyendo su valor al aumentar la

concentración de fructosa inicial. Para cálculos posteriores se ha considerado un valor medio de esta constante (\bar{k}_a)_{HF} obtenida a cada S_0 (Tabla 5.15).

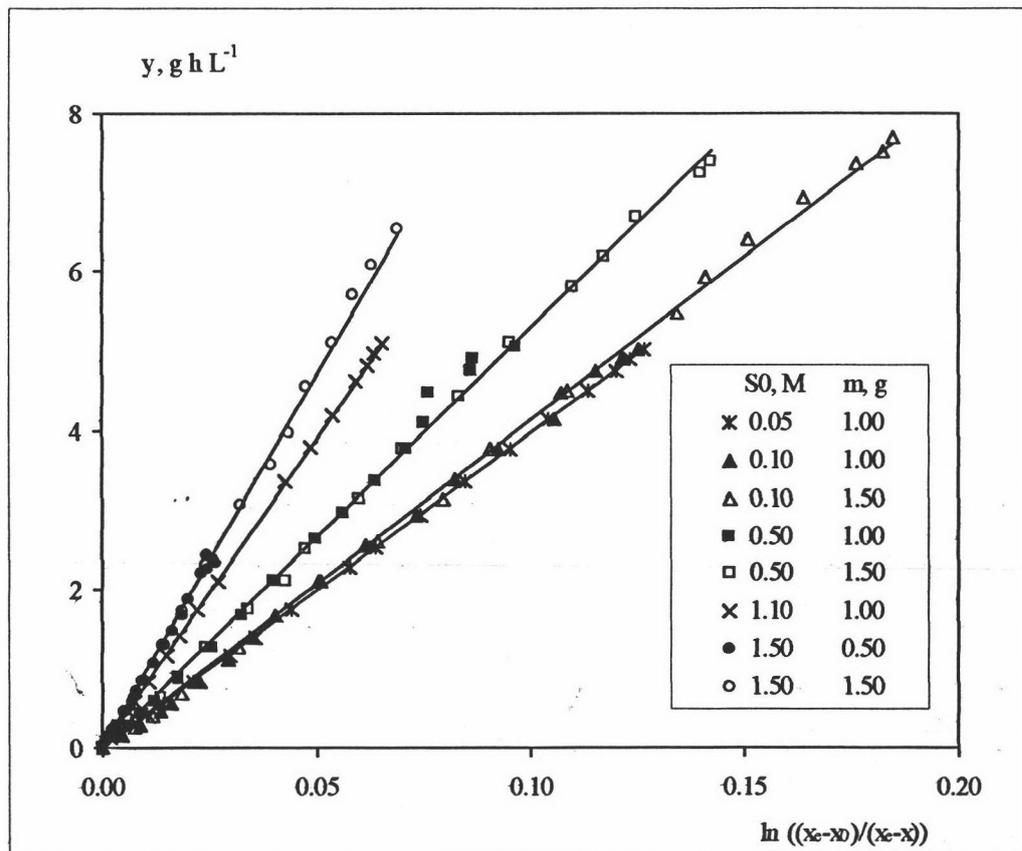


Figura 5.39 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR. Representación de y frente a $\ln ((x_e - x_0)/(x_e - x))$ según [Ec. 2.45] Módulo NT1808S 40°C

5.4.3 Comparación de los resultados obtenidos en el RDMP y RFHR.

En las Figuras 5.40 a 5.44 se muestran conjuntamente los resultados obtenidos al aplicar la ecuación [Ec. 2.45] a los experimentos llevados a cabo en el reactor discontinuo mezcla perfecta (RDMP) y en el reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR) en condiciones experimentales semejantes. En estas figuras podemos observar que se alcanza una menor conversión para los experimentos llevados a cabo en el RFHR que para los realizados en el RDMP, haciéndose menor esta diferencia a medida que aumenta la concentración de sustrato, siendo mínima a una concentración inicial de fructosa de 1.50 M.

Tabla 5.15 – Determinación de constante cinética de pseudoprimer orden $(k_a)_{HF}$ para la reacción de isomerización fructosa-glucosa en reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR) Módulo NT1808S 40°C

S_0, M	m, g	$(k_a)_{HF}, L g^{-1} h^{-1}$	r^2	$(\bar{k}_a)_{HF}, L g^{-1} h^{-1}$
0.05	1.00	0.0253	0.999	0.0253
0.10	1.00	0.0247	0.998	0.0244
	1.50	0.0240	0.999	
0.50	1.00	0.0185	0.995	0.0187
	1.50	0.0190	0.999	
1.10	1.00	0.0128	0.999	0.0128
1.50	0.50	0.0111	0.994	0.0108
	1.50	0.0106	0.998	

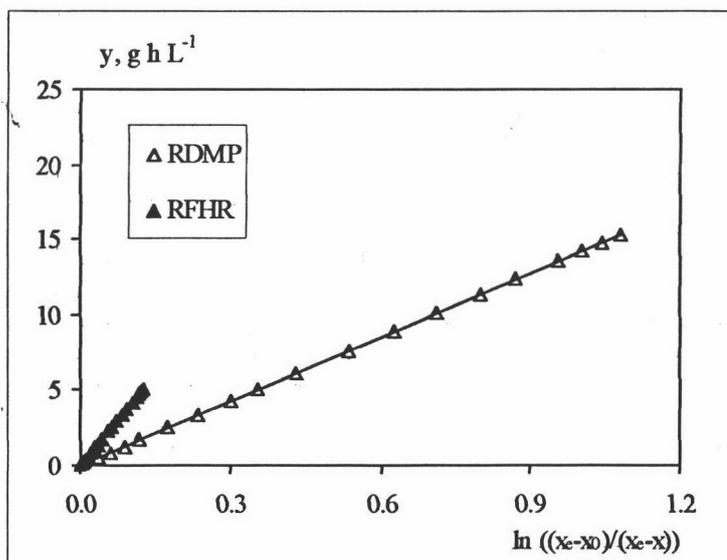
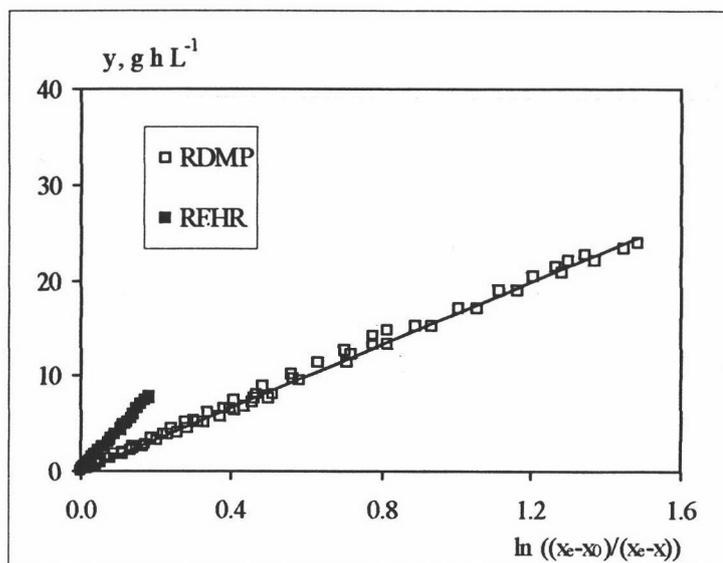


Figura 5.40 – Comparación de isomerización fructosa-glucosa en RDMP y RFHR [Ec. 2.45] 40°C, $S_0 = 0.05 M$

Figura 5.41 – Comparación de isomerización fructosa-glucosa en RDMP y RFHR [Ec. 2.45] 40°C, $S_0 = 0.10 M$



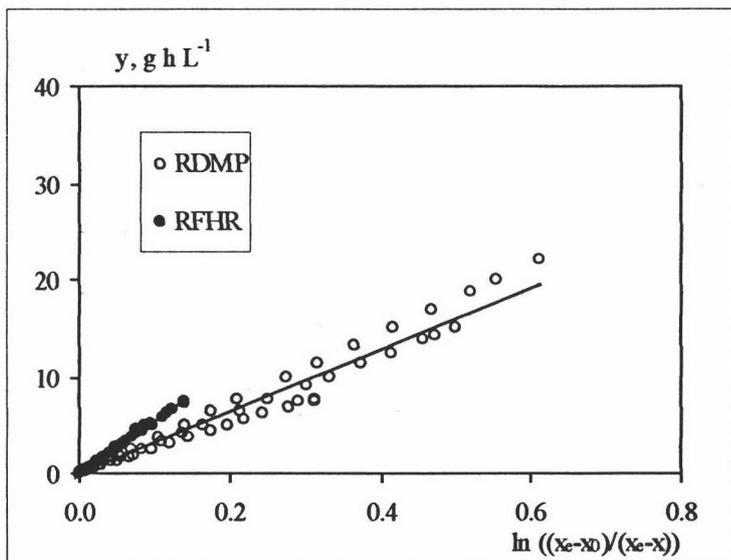


Figura 5.42 –
Comparación de
isomerización fructosa-
glucosa en RDMP y
RFHR [Ec. 2.45] 40°C,
 $S_0 = 0.50 \text{ M}$

Figura 5.43 –
Comparación de
isomerización fructosa-
glucosa en RDMP y
RFHR [Ec. 2.45] 40°C,
 $S_0 = 1.10 \text{ M}$

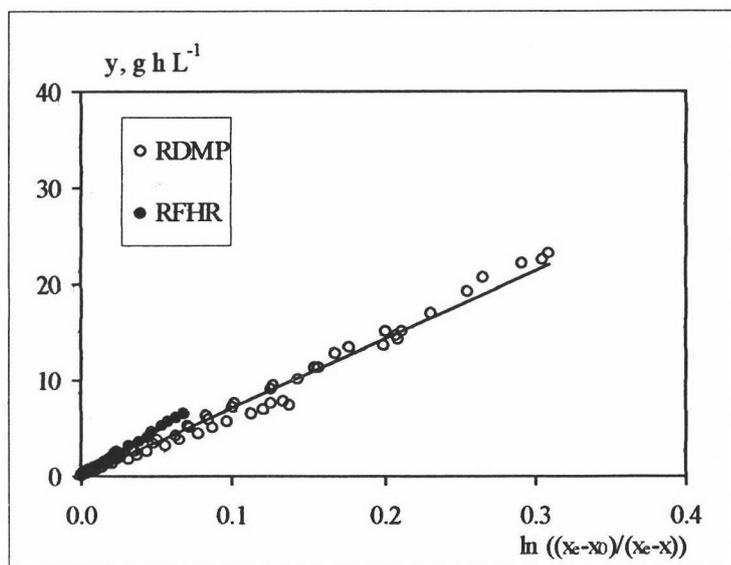
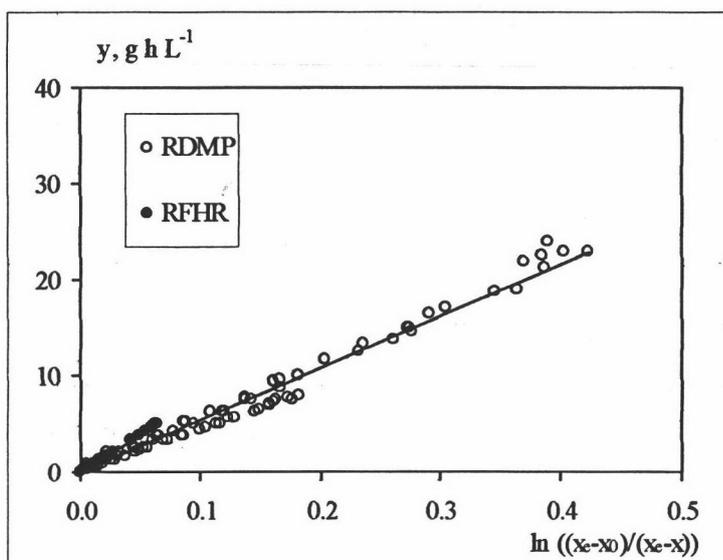


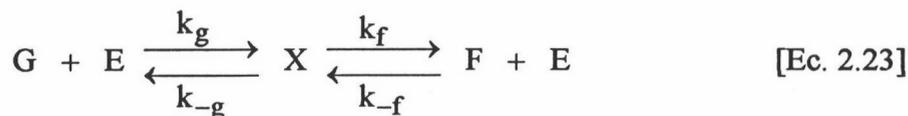
Figura 5.44 –
Comparación de
isomerización fructosa-
glucosa en RDMP y
RFHR [Ec. 2.45] 40°C,
 $S_0 = 1.50 \text{ M}$

El hecho de que en el RFHR se alcancen conversiones menores que en el RDMP parece que no se debe a una desactivación de la enzimática provocada esfuerzos cortantes producidos por la bomba en el ECS, como ya se corroboró para la enzima β -galactosidasa en el apartado 3.5.3. Del mismo modo la resistencia ofrecida por la membrana y las películas de líquidos a la transferencia de sustratos y productos es prácticamente despreciable, tal y como se observó en el apartado 5.4.1. La posible explicación de este efecto ya fue apuntada en el apartado 5.1.4 a partir de la medida de actividad en un RFHR, y parece estar motivada por una retirada de enzima del seno de la disolución, acumulándose ésta sobre la membrana del módulo de fibra hueca.

Estas experiencias previamente constatadas, junto al hecho observado de que al incrementar la concentración de sustrato parece disminuir la diferencia existente entre el RFHR y el RDMP, parece indicarnos la existencia de una adsorción de la enzima libre en la membrana del reactor, estableciéndose para este dispositivo un mecanismo cinético mostrado en el apartado siguiente.

5.4.4 Modelo cinético en el reactor de fibra hueca.

El mecanismo cinético para la isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.23] responde a:



Si suponemos que existe un equilibrio de adsorción reversible de la enzima libre en la membrana:



donde En es la concentración de enzima libre nativa activa unida a los centros activos de la membrana y (n) la concentración de centros vacantes activos para la adsorción de enzima libre en la superficie de la membrana, definiéndose K_A como:

$$K_A = \frac{En}{E n} \quad [\text{Ec. 5.42}]$$

Admitiendo que la superficie de la membrana es muy grande con respecto a la concentración de enzima, la concentración de centros vacantes para la adsorción de la enzima en la superficie de la membrana (n) podrá suponerse constante e incluirse en la constante de adsorción de la forma:

$$K_D = K_A n \quad [\text{Ec. 5.43}]$$

y por tanto:

$$K_D = \frac{E_n}{E} \quad [\text{Ec. 5.44}]$$

Realizando un balance de enzima al sistema, la concentración de enzima libre, E , sería igual a:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{F}{K_{mf}} + \frac{G}{K_{mg}} + K_D} \quad [\text{Ec. 5.45}]$$

donde e_T son los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo y C_E los gramos de complejo enzimático activo total por litro. Esta ecuación pone de manifiesto que a medida que la concentración de fructosa y glucosa se incrementa, la concentración de enzima libre presente disminuye. La velocidad de reacción dentro del RFHR, $(r_{FG})_{HF}$, vendrá dada por:

$$(r_{FG})_{HF} = \frac{V_{mf}/K_{mf} (F - K_e G)}{1 + \frac{F}{K_{mf}} + \frac{G}{K_{mg}} + K_D}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.46}]$$

Como se indicó, la reacción de isomerización responde a una cinética de pseudoprimer orden, y por tanto $K_{mf} \approx K_{mg} = K_M$. La velocidad de reacción en el RDMP, $(r_{FG})_{MP}$, y en el RFHR, $(r_{FG})_{HF}$, vendrían definidas por:

$$(r_{FG})_{MP} = \frac{V_{mf}/K_M (F - K_e G)}{1 + \frac{S_0}{K_M}}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.47}]$$

$$(r_{FG})_{HF} = \frac{V_{mf}/K_M (F - K_e G)}{1 + \frac{S_0}{K_M} + K_D}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.48}]$$

donde, como definíamos en [Ec. 2.32], $S_0=F+G$

A partir de la velocidad de reacción de isomerización fructosa-glucosa en un RDMP, $(r_{FG})_{MP}$, definida en [Ec. 5.47] la variable intensiva de tratamiento vendría definida por:

$$y = \frac{1}{(k_a)_{MP}} \ln\left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x}\right) \quad [\text{Ec. 5.49}]$$

donde $(k_a)_{MP}$ es la constante cinética de pseudoprimer orden para la isomerización fructosa-glucosa en el RDMP.

Para el RFHR, aplicando en la ecuación [Ec. 5.48] las suposiciones realizadas para el RDMP ($k_f=k_g$) llegaríamos a una expresión que relaciona la variable intensiva de tratamiento (y) con $\ln((x_e-x_0)/(x_e-x))$ de forma similar a la obtenida para el RDMP:

$$y = \frac{1}{(k_a)_{HF}} \ln\left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x}\right) \quad [\text{Ec. 5.50}]$$

donde $(k_a)_{HF}$ es la constante cinética de pseudoprimer orden para la isomerización fructosa-glucosa en el RFHR.

Si definimos un factor de efectividad en el módulo de fibra hueca, η_{HF} , como la relación entre la velocidad de reacción en el RFHR y la obtenida en el RDMP, y considerando las ecuaciones [Ec. 5.47] a [Ec. 5.50], el factor de efectividad podría calcularse según la expresión:

$$\eta_{HF} = \frac{(r_{FG})_{HF}}{(r_{FG})_{MP}} = \frac{K_M + S_0}{K_M + S_0 + K_M K_D} = \frac{(k_a)_{HF}}{(k_a)_{MP}} \quad [\text{Ec. 5.51}]$$

llegándose finalmente a la expresión:

$$\frac{\eta_{HF}}{1 - \eta_{HF}} = \frac{1}{K_D} + \frac{S_0}{K_M K_D} \quad [\text{Ec. 5.52}]$$

expresión que puede utilizarse para calcular la constante de adsorción de la enzima sobre la membrana, K_D , y la constante de Michaelis-Menten, K_M , de isomerización fructosa-glucosa. En la **Tabla 5.16** se presentan los valores del factor de efectividad calculados a partir de los experimentos realizados en los dos reactores (RDMP y RFHR) a cada concentración de sustrato, utilizando los valores medios de la constante cinética de pseudoprimer orden obtenidos en experimentos realizados a las distintas concentraciones de enzima ensayada.

Tabla 5.16 – Isomerización fructosa-glucosa - Constantes de pseudo-primer orden calculadas en RDMP y RFHR 40°C

S_0, M	$(\bar{k}_a)_{MP}, L g^{-1} h^{-1}$	$(\bar{k}_a)_{HF}, L g^{-1} h^{-1}$	η_{HF}	$\eta_{HF} / (1-\eta_{HF})$
0.05	0.0705	0.0253	0.358	0.558
0.10	0.0608	0.0244	0.401	0.668
0.50	0.0338	0.0187	0.555	1.245
1.10	0.0199	0.0128	0.644	1.808
1.50	0.0151	0.0108	0.715	2.508

En la **Figura 5.45** se muestra la linealización propuesta por la ecuación [Ec. 5.52], observándose la linealidad ($r^2=0.9895$) indicada al representar los valores de $\eta_{HF} / (1-\eta_{HF})$ frente a S_0 .

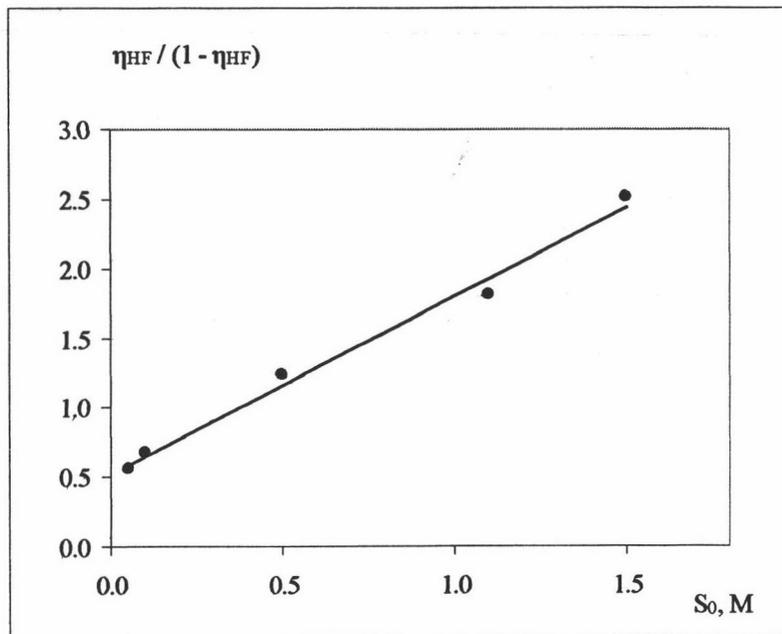


Figura 5.45 - Isomerización fructosa-glucosa. Linealización propuesta según ecuación [Ec. 5.52] 40°C

El valor de K_D se calcula mediante regresión no lineal, utilizándose el valor de K_M calculado para los experimentos realizados en el RDMP (**Tabla 5.7**), obteniéndose un valor de:

$$K_D = 2.08 \quad (CV = 3\%)$$

En las **Figuras 5.46 a 5.50** se muestra la curva de ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales obtenidos en el RFHR. La observación visual parece demostrar

que el modelo propuesto justifica la dependencia experimental observada. Así mismo los residuales obtenidos se distribuyen en la mayor parte de los experimentos realizados aleatoriamente a un lado y otro del cero, comprobándose que más del 60% de los resultados experimentales obtenidos presentan un error inferior al 5% con respecto a los calculados a partir del modelo planteado.

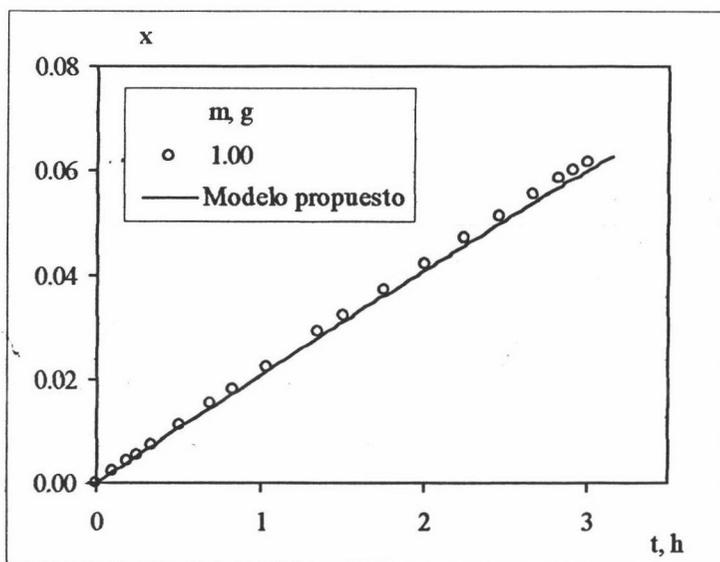
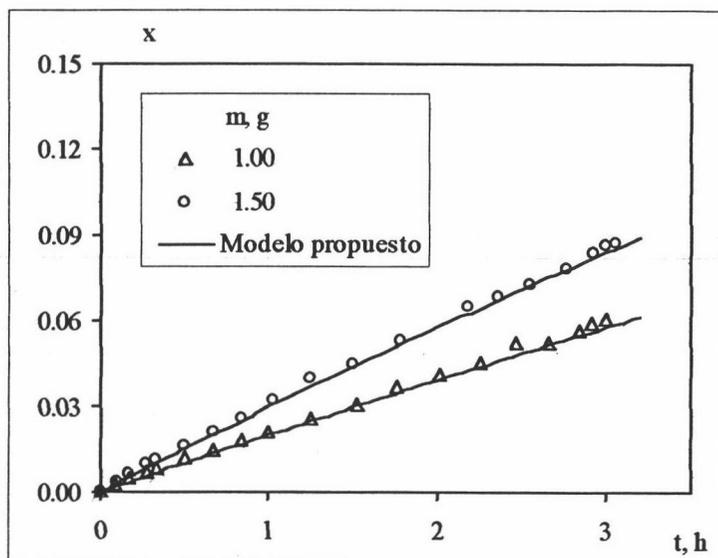


Figura 5.46 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Módulo NT1808S. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C $S_0=0.05$ M Tampón Mg^{+2}

Figura 5.47 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Módulo NT1808S. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C $S_0=0.10$ M Tampón Mg^{+2}



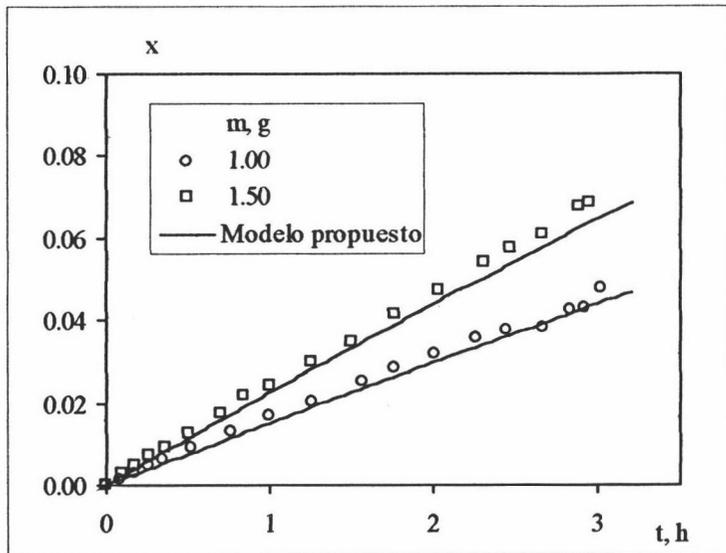


Figura 5.48 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Módulo NT1808S. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C $S_0=0.50$ M Tampón Mg^{+2}

Figura 5.49 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Módulo NT1808S. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C $S_0=1.10$ M Tampón Mg^{+2}

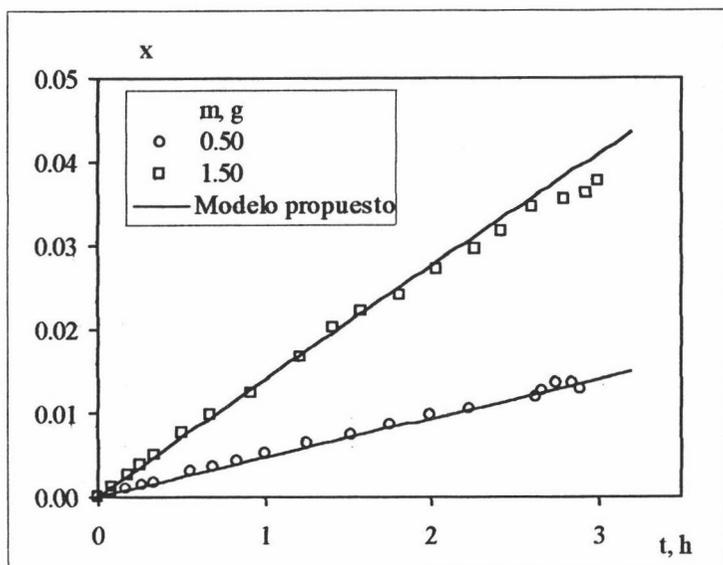
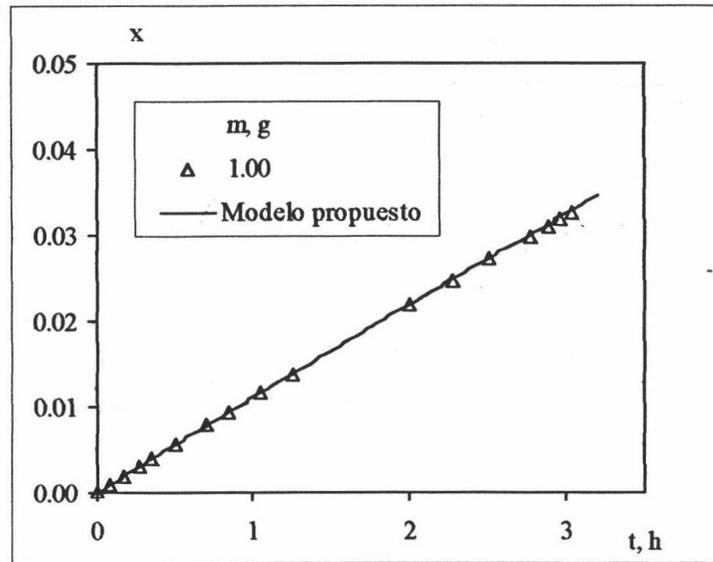


Figura 5.50 – Isomerización fructosa-glucosa en RFHR Módulo NT1808S. Ajuste de modelo propuesto a datos experimentales. 40°C $S_0=1.50$ M Tampón Mg^{+2}

5.5 Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

5.5.1 Modelo de reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

Como se verificó en un capítulo anterior (apartado 5.4.1), la membrana y las películas de líquido formadas a ambos lados de ella no ofrecen resistencia alguna a la transferencia de glucosa. Así mismo, se verificó el comportamiento diferencial que el reactor de fibra hueca presenta. Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para estudiar la isomerización glucosa-fructosa dentro del RFHR, para la hidrólisis de lactosa, el balance a la glucosa generada dentro de un RFHR nos daría que:

$$V \frac{dG}{dt} = V_c C_{EC} r_{HL} \quad [\text{Ec. 5.53}]$$

donde V es el volumen total de disolución utilizado en el sistema; G es la concentración de glucosa medida en cada momento en el tanque agitado; V_c y C_{EC} , el volumen de fase líquida y la concentración de enzima en el circuito del ECS, y r_{HL} la velocidad de la reacción de hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa por unidad de masa de enzima y tiempo.

Para una concentración inicial de glucosa igual a cero, tal y como definíamos en la ecuación [Ec. 2.8], la conversión (x) en cada momento vendrá dada por la concentración de glucosa medida en el tanque agitado en cada momento (G) dividida por la concentración de lactosa inicial (L_0). Introduciendo la masa de enzima, m , y la conversión en la expresión anterior, quedaría en la forma:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{m}{V} \frac{r_{HL}}{L_0} \quad [\text{Ec. 5.54}]$$

y considerando la variable intensiva de tratamiento, y , definida por la ecuación [Ec. 4.2], la velocidad de reacción dentro del dispositivo experimental RFHR vendría dada por:

$$r_{HL} = L_0 \frac{dx}{dy} \quad [\text{Ec. 5.55}]$$

5.5.2 Hidrólisis enzimática de lactosa en un reactor de fibra hueca con recirculación (RFHR).

Se han realizado experimentos de hidrólisis enzimática de lactosa en RFHR con Tampón K^+ y Mg^{+2} a $pH=6.75$ en un módulo de fibra hueca modelo NT1975 fabricado con membrana de acetato de celulosa, estudiándose la influencia de la temperatura, concentración de enzima y sustrato (Tablas 4.94 a 4.115). También se realizaron experimentos cinéticos a $40^\circ C$ en otros módulos de fibra hueca fabricados en acetato de celulosa (NT1175 y NT1375), que poseen diferente superficie de membrana (Tabla 3.1), y polisulfona (BLS632) (Tablas 4.117 a 4.124).

Al aplicar el modelo cinético planteado para la hidrólisis de lactosa [Ec. 5.34] a los datos experimentales obtenidos en un RFHR con el módulo NT1975 y BLS632 se observa (Figuras 5.511 a 5.54) que la ecuación ajusta adecuadamente los datos experimentales hasta que la variable intensiva de tratamiento alcanza cierto valor a partir del cual la conversión aumenta mucho más lentamente, siendo este efecto más acusado a mayor temperatura.

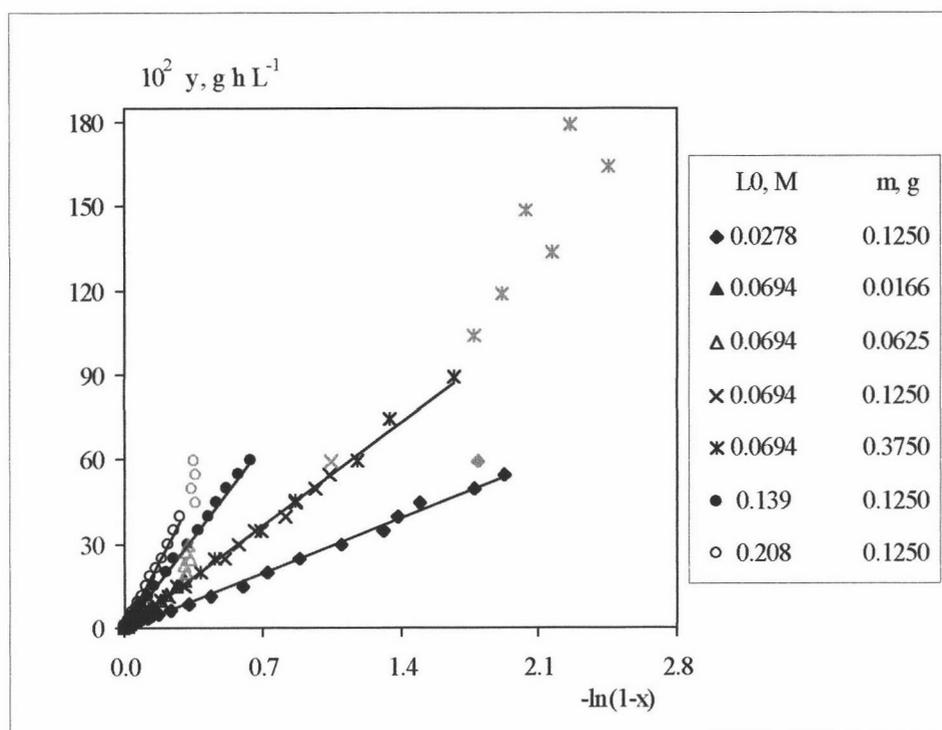


Figura 5.51 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975). Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] $25^\circ C$ Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2} (color negro: datos que se ajustan a modelo, color azul: datos que no se ajustan al modelo)

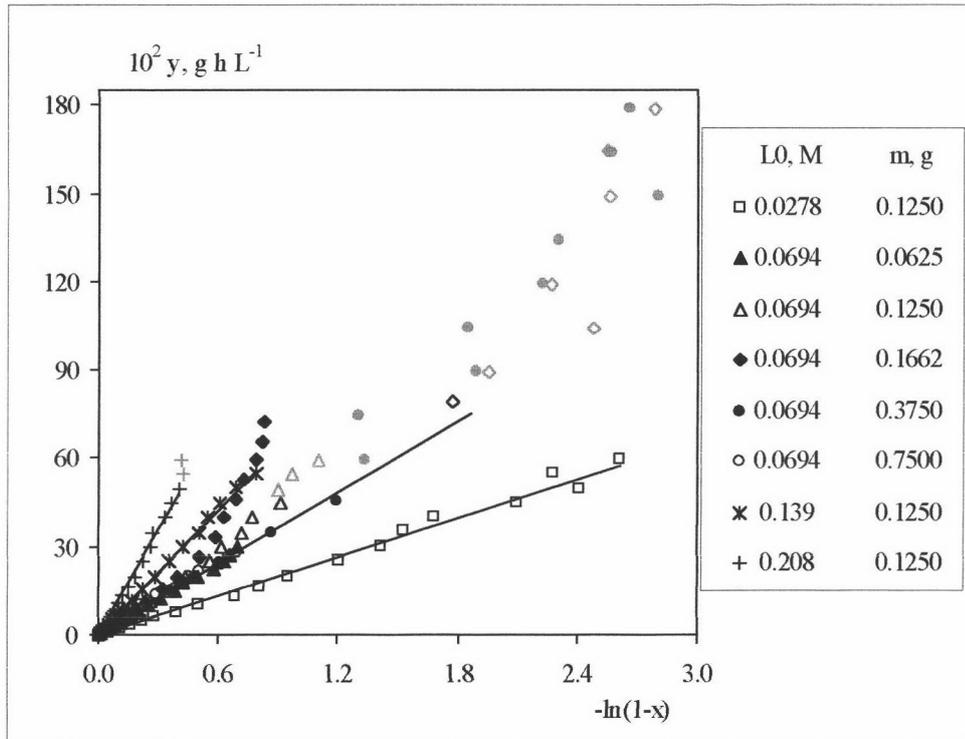


Figura 5.52 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975). Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 30°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2} (color negro: datos que se ajustan a modelo, color azul: datos que no se ajustan al modelo)

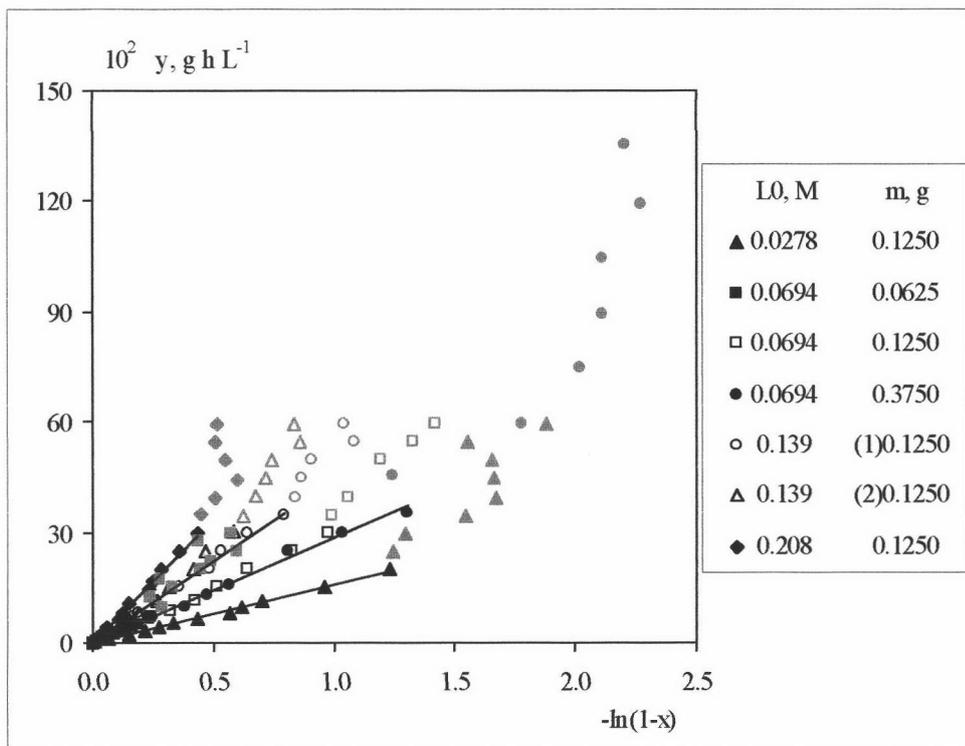


Figura 5.53 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975). Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2} (color negro: datos que se ajustan a modelo, color azul: datos que no se ajustan al modelo)

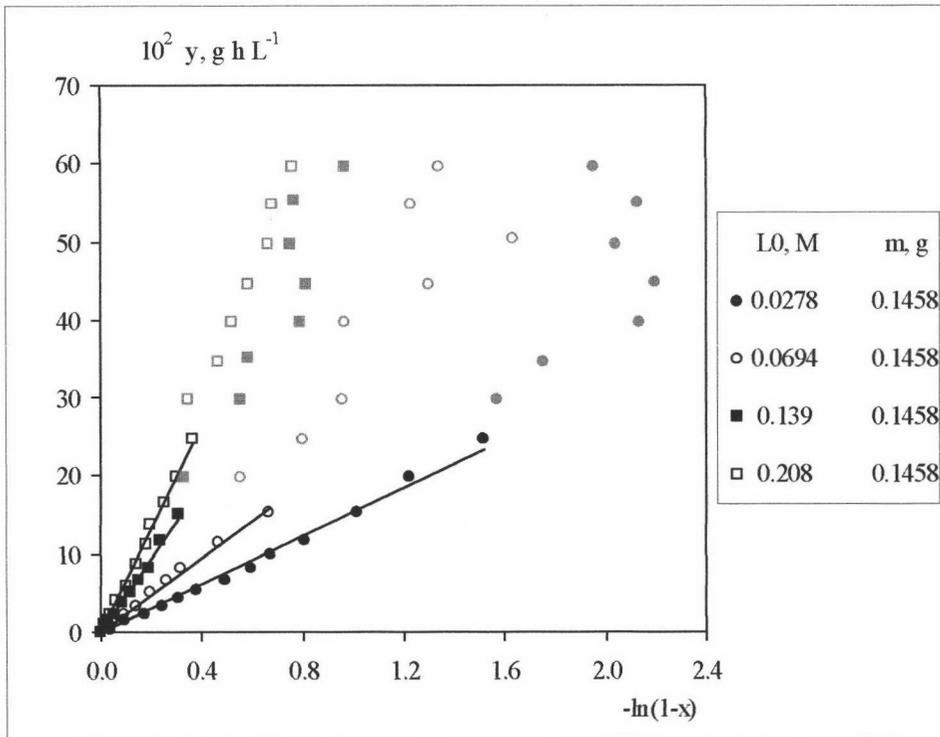


Figura 5.54 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo BLS632). Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2} (color negro: datos que se ajustan a modelo, color azul: datos que no se ajustan al modelo)

Este hecho podría ser debido a una adsorción o acumulación de la enzima en la membrana, que provocaría la disminución del contacto entre el sustrato (lactosa) y la enzima, haciéndose la reacción mucho más lenta.

En las Figuras 5.55 y 5.56 podemos observar el comportamiento mostrado por los tres módulos de fibra hueca fabricados en acetato de celulosa modificado (NT1175, NT1375 y NT1975) a 40°C y a distintas concentraciones de sustrato. En ambas figuras se observa que los experimentos realizados en los tres módulos presentan el mismo comportamiento durante la fase inicial de la reacción de acuerdo con el modelo cinético planteado. Transcurrido cierto tiempo se detecta que la conversión del sistema aumenta muy lentamente o se hace prácticamente constante. Este hecho es detectado con anterioridad en aquellos módulos que poseen menor superficie.

Por otra parte, la conversión máxima alcanzada antes del cambio de comportamiento aumenta al incrementarse la superficie de la membrana, perdiéndose la linealidad del modelo a tiempos menores en módulos que poseen menor superficie. Así a $L_0=0.0278 M$, la pérdida de linealidad se produce aproximadamente a $t=0.6$ horas para NT1175 ($1.08 m^2$) y NT1375 ($1.35m^2$), y a $t=1$ hora para NT1975 ($1.95 m^2$).

En la **Figura 5.57** se muestran experimentos realizados en el módulo NT1975 con diferentes masas de enzima. Se puede observar cómo la linealidad se pierde a tiempos menores cuando se utiliza más cantidad de enzima, alcanzándose sin embargo conversiones mayores.

También se realizaron experimentos con el módulo de fibra hueca denominado BLS632 con fibras de polisulfona y área similar al módulo NT1975. Las condiciones experimentales ensayadas son: 40°C, 0.1458 gramos de enzima y diferentes concentraciones de sustrato. En las **Figuras 5.58** y **5.59** se comparan experimentos de hidrólisis de lactosa en RFHR realizados a la misma concentración de enzima total, concentraciones de sustrato diferentes y módulos de fibra hueca de material de membrana distinto y áreas superficiales semejantes. Inicialmente se observa que el comportamiento es similar, pero para el módulo de polisulfona la pérdida de linealidad se produce a tiempos mayores, alcanzándose también una mayor conversión final. La diferencia en el comportamiento de ambos dispositivos experimentales parece reducirse cuando se incrementa la concentración de sustrato.

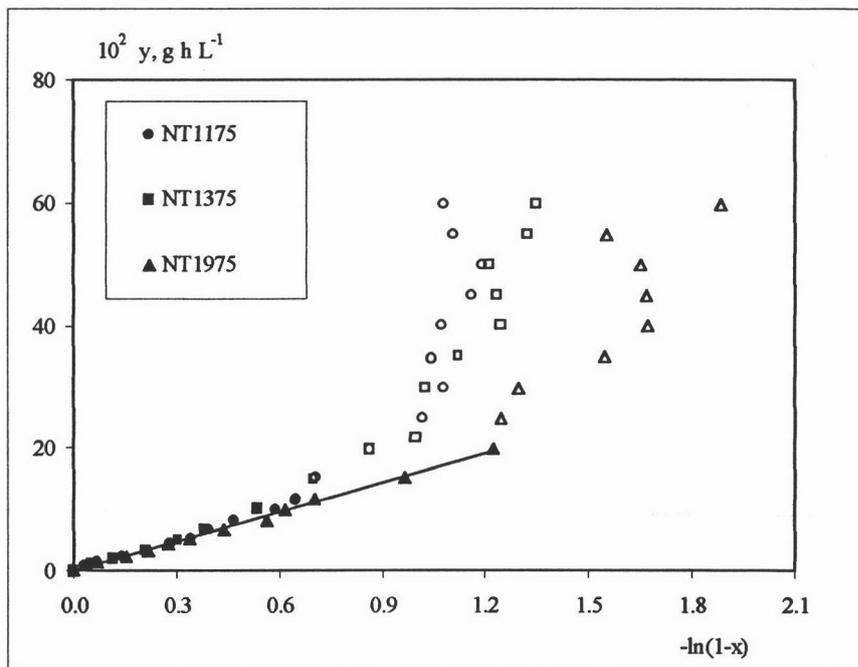


Figura 5.55 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Comparación de resultados obtenidos con módulos de distinta área superficial con membrana de acetato de celulosa (Cuprophane®)
Ajuste de datos experimentales a ecuación [Ec. 5.34] 40°C Lactozym $L_0=0.0278 \text{ M}$
 $m=0.1250 \text{ g}$ Tampón K^+ y Mg^{+2} (Símbolos rellenos se ajustan a modelo, símbolos huecos no se ajustan a modelo)

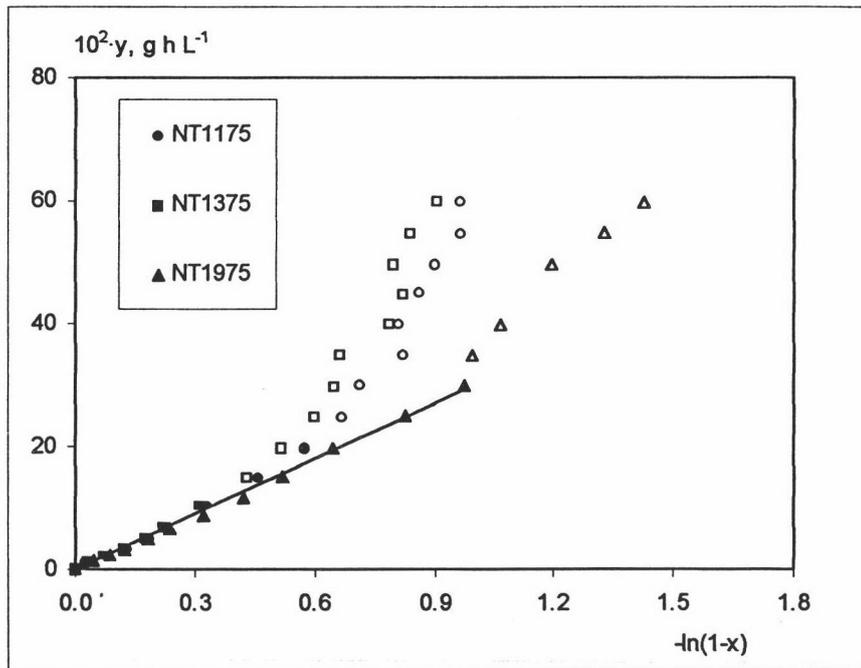


Figura 5.56 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Comparación de resultados obtenidos con módulos de distinta área superficial con membrana de acetato de celulosa (Cuprophane®) Ajuste de datos experimentales a ecuación [Ec. 5.34] 40°C Lactozym $L_0=0.0694$ M $m=0.1250$ g Tampón K^+ y Mg^{+2} (Símbolos rellenos se ajustan a modelo, símbolos huecos no se ajustan a modelo)

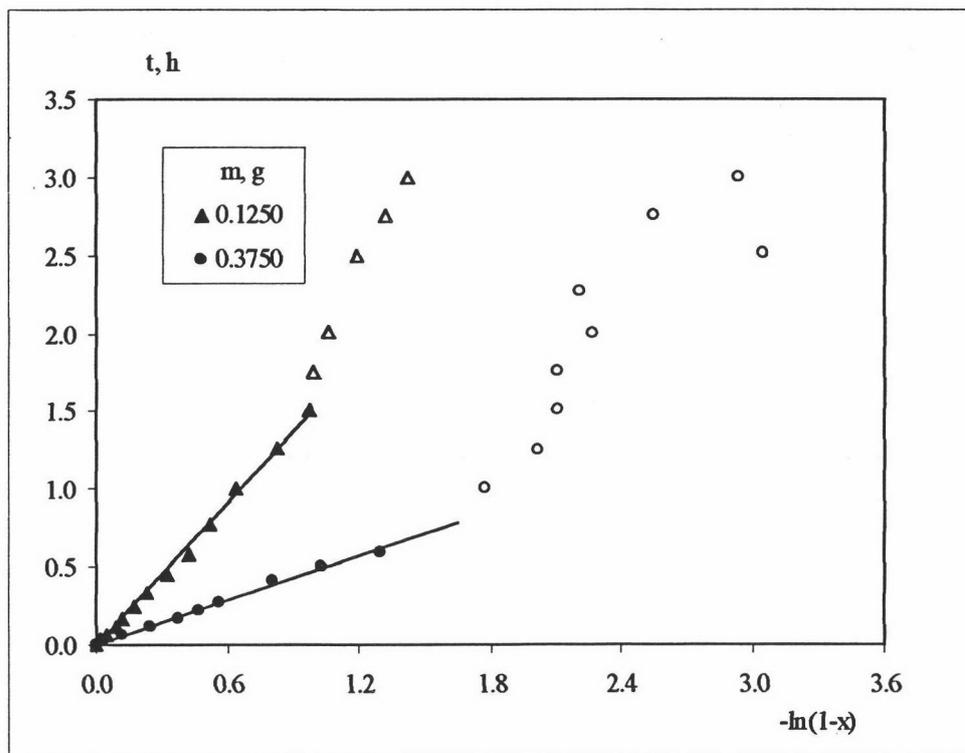


Figura 5.57 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Comparación de resultados obtenidos con distinta masa de enzima. 40°C Lactozym $L_0=0.0694$ M Tampón K^+ y Mg^{+2} (Símbolos rellenos se ajustan a modelo, símbolos huecos no se ajustan a modelo)

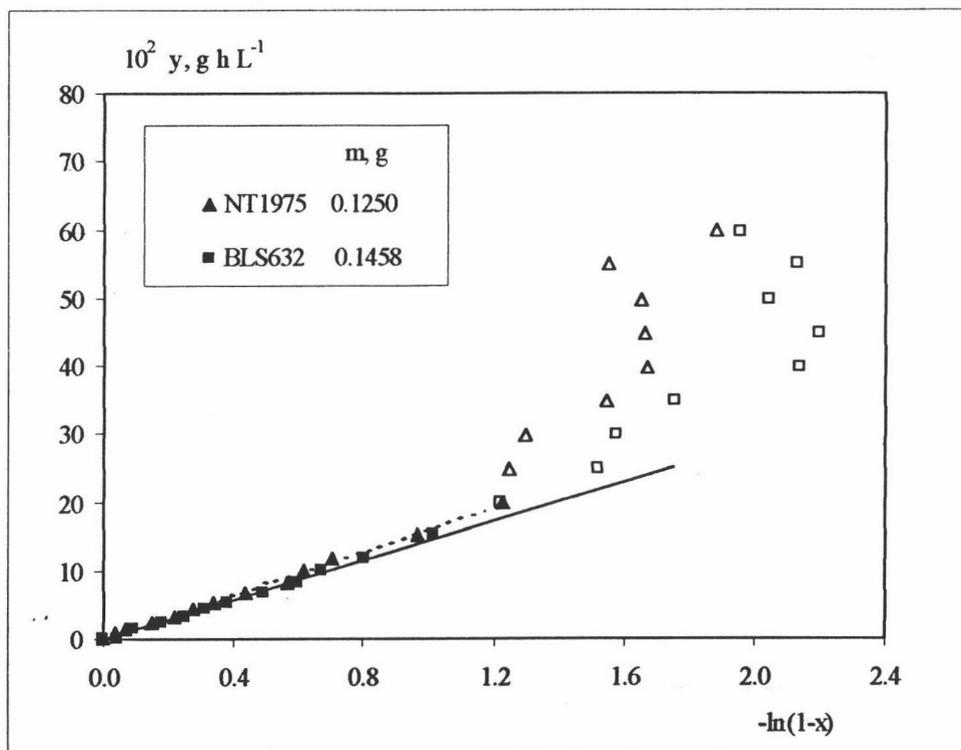


Figura 5.58 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Comparación de resultados obtenidos en módulos de distinta área superficial y composición de membrana. Ajuste de datos experimentales a ecuación [Ec. 5.34] $40^{\circ}C$ Lactozym $L_0=0.0278 M$ Tampón K^+ y Mg^{+2} (Símbolos rellenos se ajustan a modelo, símbolos huecos no se ajustan a modelo) (--- Línea de ajuste a módulo NT1975, — Línea de ajuste a módulo BLS632)

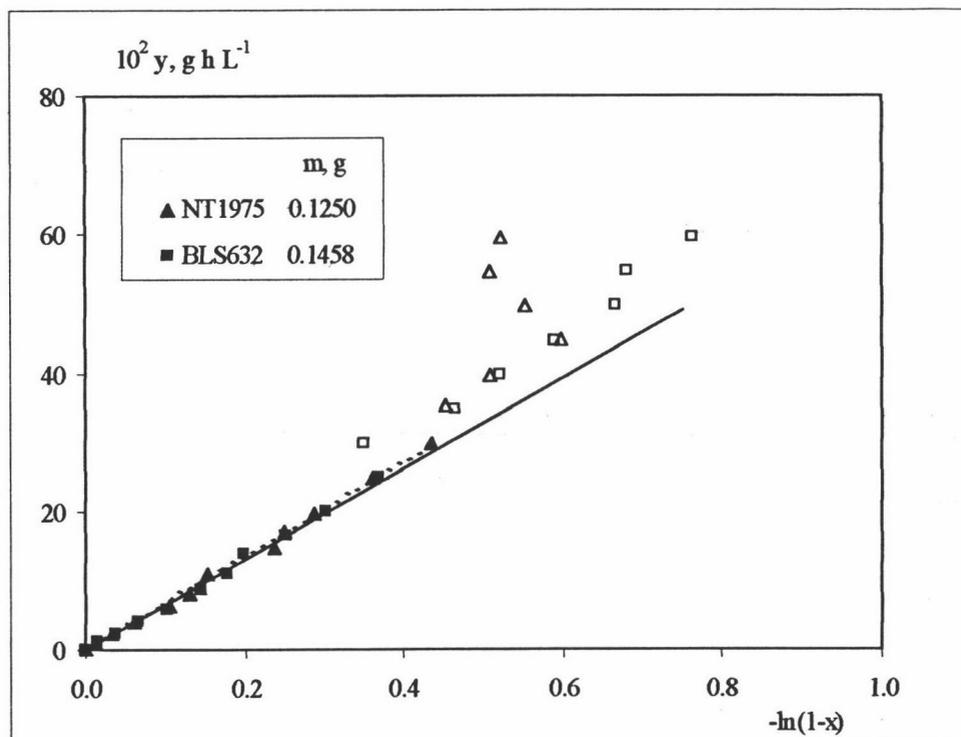


Figura 5.59 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Comparación de resultados obtenidos en módulos de distinta área superficial y composición de membrana. Ajuste de datos experimentales a ecuación [Ec. 5.34] $40^{\circ}C$ Lactozym $L_0=0.208 M$ Tampón K^+ y Mg^{+2} (Símbolos rellenos se ajustan a modelo, símbolos huecos no se ajustan a modelo) (--- Línea de ajuste a módulo NT1975, — Línea de ajuste a módulo BLS632)

5.5.3 Comparación de los resultados obtenidos en el RDMP y RFHR.

En las Figuras 5.60 a 5.65 se muestran conjuntamente, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos al aplicar la ecuación [Ec. 5.34] a experimentos realizados a una concentración de sustrato en RDMP y RFHR a 25 y 40°C, con Tampón K^+ y Mg^{+2} , y distintas concentraciones de enzima. Al comparar los resultados obtenidos a distintas temperaturas en ambos dispositivos, podemos observar que se alcanza una menor conversión en los experimentos llevados a cabo en el RFHR que en los llevados a cabo en el RDMP. Para una misma temperatura, las desviaciones de comportamiento entre ambos reactores se producen a menores conversiones cuando se incrementa la concentración de sustrato. Estas diferencias entre RDMP y RFHR son menores a 25°C.

Dado que la enzima en las condiciones de pH y temperatura ensayadas no se desactiva, y teniendo en cuenta que dentro del RFHR parece existir una disminución de la actividad enzimática en función del tiempo (apartado 4.1.3), se ha considerado en primer lugar para la interpretación de los experimentos cinéticos una adsorción reversible de la enzima libre en la membrana de igual forma que se considera para la isomerización fructosa-glucosa, eliminando los datos experimentales que se desvían del modelo al considerar que el cambio de comportamiento podría estar provocado por una disminución del flujo transmembrana provocado por la retirada de la enzima del sistema y adsorción sobre las fibras del módulo (Figura 5.66).

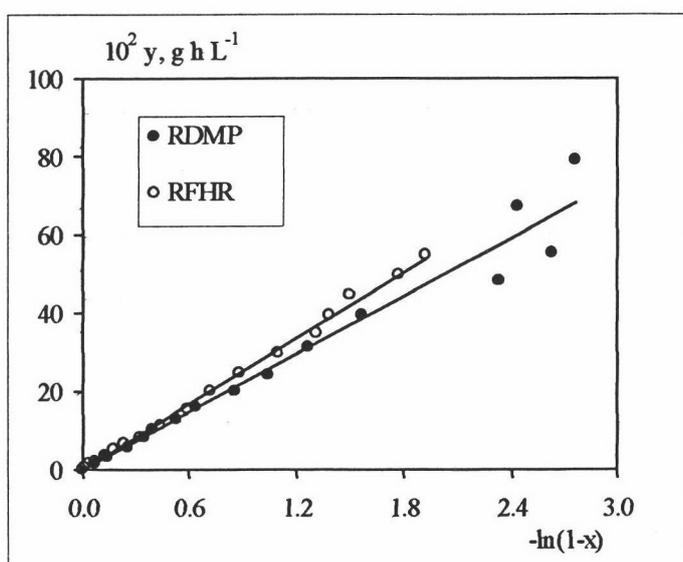


Figura 5.60 – Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 25°C $L_0=0.0278$ M Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Figura 5.61 – Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 25°C $L_0=0.0694$ M Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

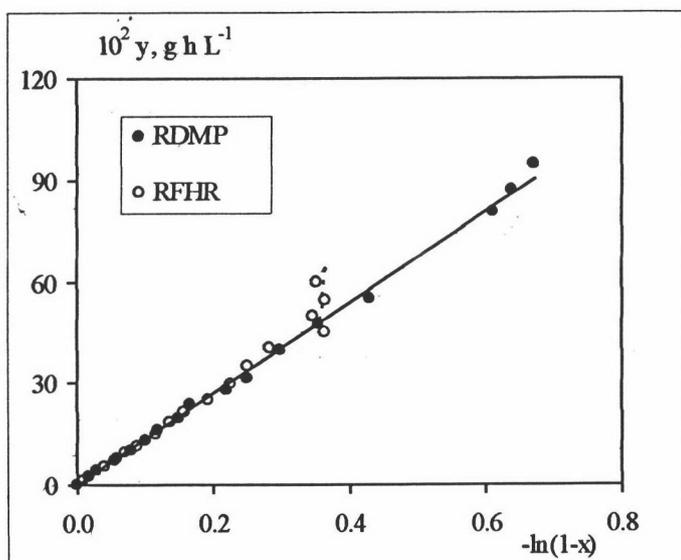
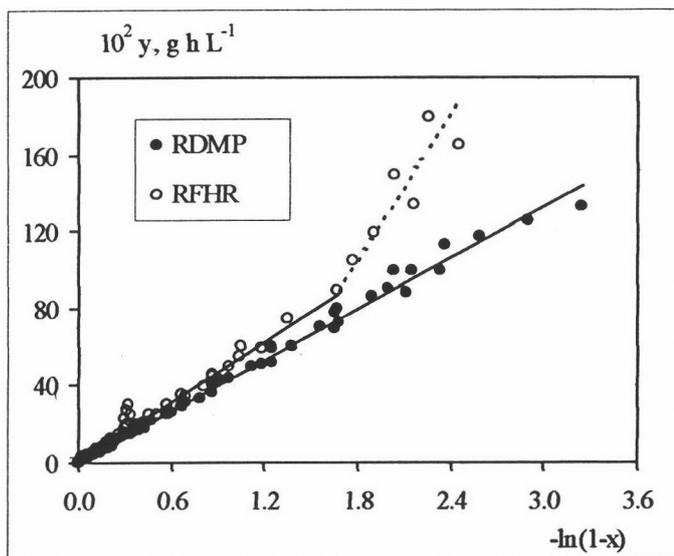
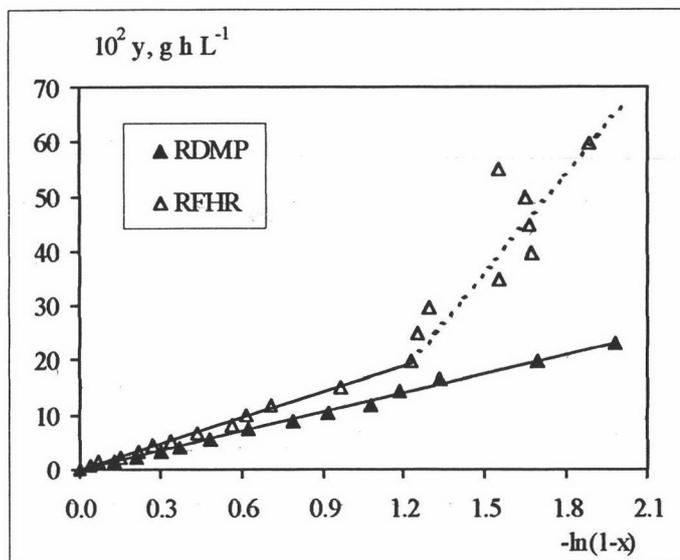


Figura 5.62 – Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 25°C $L_0=0.208$ M Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Figura 5.63 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 40°C $L_0=0.0278$ M Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}



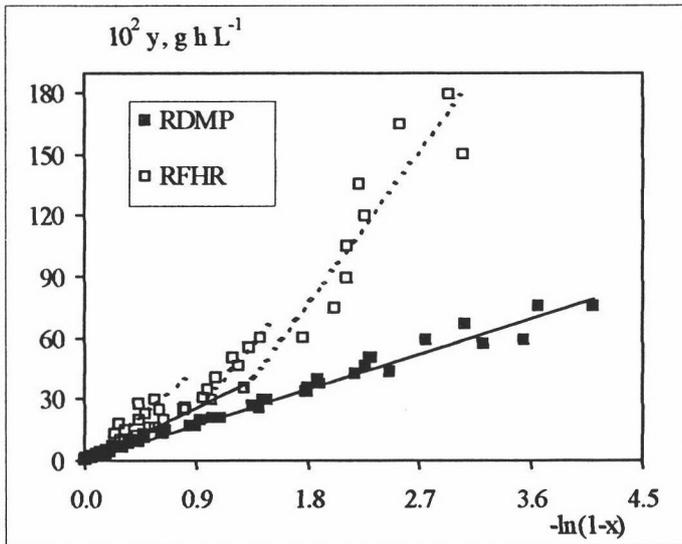
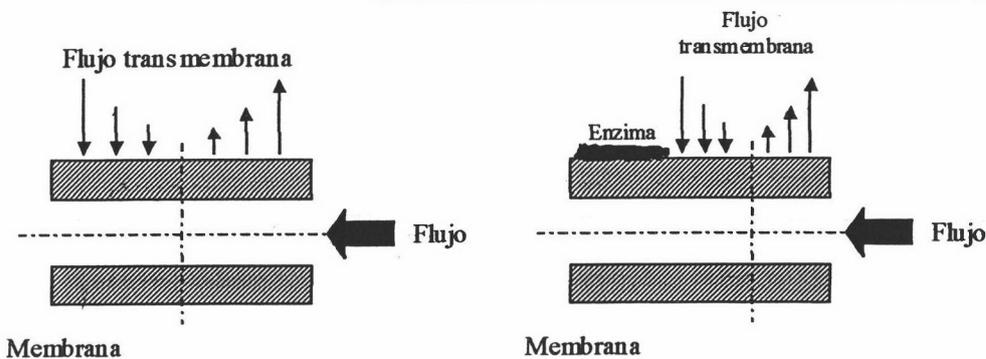
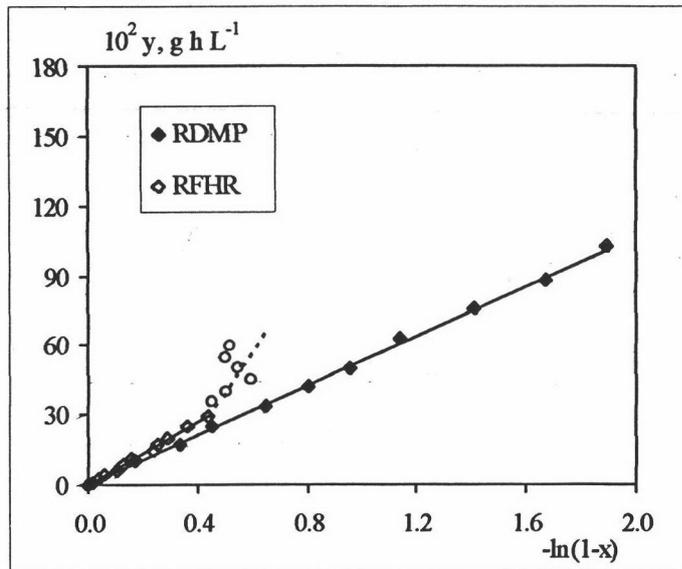


Figura 5.64 – Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 40°C $L_0=0.0694 \text{ M}$ Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

Figura 5.65 – Hidrólisis de lactosa en RDMP y RFHR (módulo NT1975) Variación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ según [Ec. 5.34] 40°C $L_0=0.208 \text{ M}$ Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}



a) Inicio - Enzima en disolución.

b) Durante reacción - Acumulación de enzima al final de la fibra (Taylor y col. (1994), Patkar y col. (1995))

Figura 5.66 – Distribución de proteína en membrana de sistemas de ultrafiltración.

5.5.4 Modelo cinético de hidrólisis de lactosa con adsorción de la enzima libre en la membrana del módulo de ultrafiltración de un RFHR.

El mecanismo cinético para la hidrólisis de lactosa, tal y como se definió en las ecuaciones [Ec. 2.3] a [Ec. 2.5] era:



Si suponemos, tal y como definimos para la isomerización fructosa-glucosa en RFHR, que existe una adsorción reversible de la enzima libre en la membrana tendremos que:



donde En es la concentración de enzima libre nativa activa unida a los centros activos de la membrana y (n) la concentración de centros vacantes activos para la adsorción de enzima libre en la superficie de la membrana, definiéndose K_A como:

$$K_A = \frac{En}{E \cdot n} \quad [\text{Ec. 5.57}]$$

Admitiendo que la superficie de la membrana es muy grande con respecto a la concentración de enzima, la concentración de centros vacantes para la adsorción de la enzima en la superficie de la membrana (n) podrá suponerse constante e incluirse en la constante de adsorción de la forma:

$$K_D = K_A \cdot n \quad [\text{Ec. 5.58}]$$

y por tanto:

$$K_D = \frac{En}{E} \quad [\text{Ec. 5.59}]$$

Considerando en equilibrio las etapas recogidas en [Ec. 2.3] y [Ec. 2.5], y reacción controlante la [Ec. 2.4] aplicamos la aproximación de estado estacionario a los

complejos EL, EGa y En, y teniendo en cuenta que $K_M=K_I$, el balance a la enzima libre (E) nos daría:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{S_0}{K_M} + K_D} \quad [\text{Ec. 5.60}]$$

donde e_T son los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo, C_E los gramos de complejo enzimático activo total por litro, K_D es la constante del equilibrio de adsorción de la enzima libre y S_0 la suma de la concentración inicial de lactosa (L_0) y galactosa (Ga_0) que para cada experimento permanece constante.

Considerando la [Ec. 2.11] que determina la velocidad de reacción de la hidrólisis de lactosa; a partir de la definición de la concentración del complejo EL [Ec. 2.9], sustituyendo la definición de la concentración de la enzima libre E ([Ec. 5.60]) e introduciendo la variable intensiva de tratamiento y ([Ec. 4.2]), se llega a la expresión:

$$\frac{dx}{dy} = \frac{k e_T (1-x)}{S_0 + K_M (1+K_D)} \quad [\text{Ec. 5.61}]$$

Integrando esta expresión concluiremos que para el RFHR, la variable intensiva de tratamiento (y) se puede expresar como:

$$y = \left[\frac{S_0}{k e_T} + \frac{K_M (1+K_D)}{k e_T} \right] [-\ln(1-x)] , \text{ g h L}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.62}]$$

De la representación de y frente a $[-\ln(1-x)]$ se obtiene para cada experimento realizado el valor de la pendiente a partir de los datos que mantienen la linealidad del modelo, considerándose para experimentos realizados a una misma temperatura y concentración de sustrato ensayada, un valor medio de la pendiente $\left(\frac{K_M \cdot (1+K_D)}{k e_T} + \frac{S_0}{k e_T} \right)$ (Tabla 5.17). Al representar esta pendiente frente a S_0 debería obtenerse una línea recta para cada temperatura ensayada. A modo de ejemplo, en la Figura 5.67 se muestra el ajuste realizado para un RFHR que utiliza un módulo NT1975. Esta representación permite calcular el valor de $(k e_T)$ a cada temperatura, ajustándose esta constante a la ecuación de Arrhenius (tal y como se observa en la Figura 5.68) y verificando la aplicación del modelo planteado a los datos experimentales donde se observa una relación lineal entre la variable intensiva de tratamiento (y) y $[-\ln(1-x)]$.

La velocidad de reacción en el RFHR, $(r_{HL})_{HF}$, teniendo en cuenta el modelo planteado, sería:

Tabla 5.17 – Pendiente de ajuste obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales de hidrólisis de lactosa en RFHR a la ecuación [Ec. 5.34]

Módulo	T, °C	L ₀ , M	m, g	$K_M(1+K_D)/k e_T + S_0/k e_T$, g h L ⁻¹	r ²	$(K_M(1+K_D)/k e_T + S_0/k e_T)$, g h L ⁻¹
NT1975	25	0.0278	0.1250	0.281	0.997	0.281
			0.0166	0.494	0.997	
		0.0694	0.1250	0.557	0.997	0.523
			0.1250	0.512	0.998	
		0.139	0.3750	0.530	0.997	
			0.1250	0.939	0.999	0.939
	0.208	0.1250	1.35	0.997	1.35	
	30	0.0278	0.1250	0.223	0.991	0.223
			0.0625	0.404	0.997	
		0.0694	0.1250	0.479	0.993	
			0.1662	0.391	0.997	0.414
		0.3750	0.391	0.997		
			0.7500	0.416	0.972	
	0.139	0.1250	0.707	0.999	0.707	
	0.208	0.1250	1.18	0.995	1.18	
	40	0.0278	0.1250	0.159	0.997	0.159
			0.0625	0.272	0.991	
		0.0694	0.1250	0.299	0.997	0.283
0.3750			0.277	0.990		
0.139		(1) 0.1250	0.443	0.996		
		(2) 0.1250	0.497	0.991	0.470	
0.208	0.1250	0.675	0.997	0.675		
NT1375	40	0.0278	0.1250	0.166	0.996	0.166
		0.0694	0.1250	0.302	0.990	0.302
NT1175	40	0.0278	0.1250	0.170	0.993	0.170
		0.0694	0.1250	0.305	0.991	0.305
BLS632	40	0.0278	0.1458	0.154	0.990	0.154
		0.0694	0.1458	0.239	0.995	0.239
		0.139	0.1458	0.469	0.992	0.469
		0.208	0.1458	0.655	0.995	0.655

$$(\tau_{HL})_{HF} = L_0 \frac{dx}{dy} = \frac{k e_T L_0 (1-x)}{S_0 + K_M (1+K_D)} = \frac{L_0 (1-x)}{\frac{S_0}{k e_T} + \frac{K_M (1+K_D)}{k e_T}}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.63}]$$

Considerando la variable S₀ (definida como la suma de las concentraciones iniciales de lactosa (L₀) y galactosa (Ga₀) [Ec. 2.14]) dentro de la ecuación [Ec. 2.13], la suposición realizada de que K_M ≈ K_I, y la definición de la variable intensiva de tratamiento y ([Ec. 4.2]), la velocidad de la reacción de hidrólisis de lactosa en el RDMP, (τ_{HL})_{MP}, vendría dada por:

$$(\tau_{HL})_{MP} = L_0 \frac{dx}{dy} = \frac{k e_T L_0 (1-x)}{S_0 + K_M} = \frac{L_0 (1-x)}{\frac{S_0}{k e_T} + \frac{K_M}{k e_T}}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.64}]$$

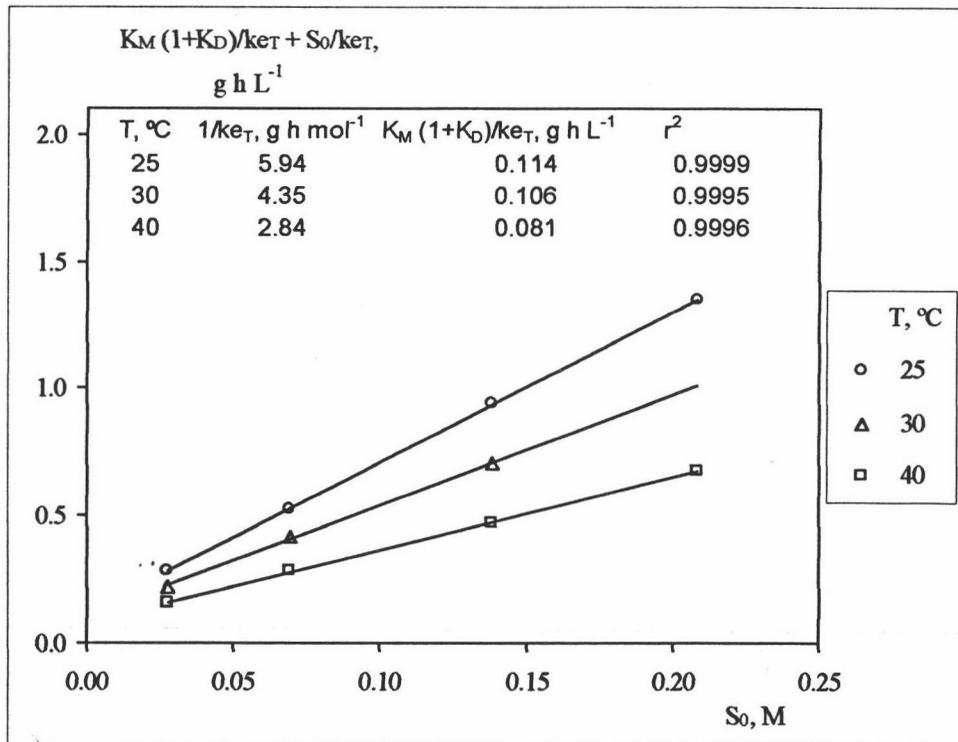


Figura 5.67 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Representación de $(K_M (1+K_D)/k_{eT} + S_0/k_{eT})$ frente a S_0 Influencia de la temperatura.

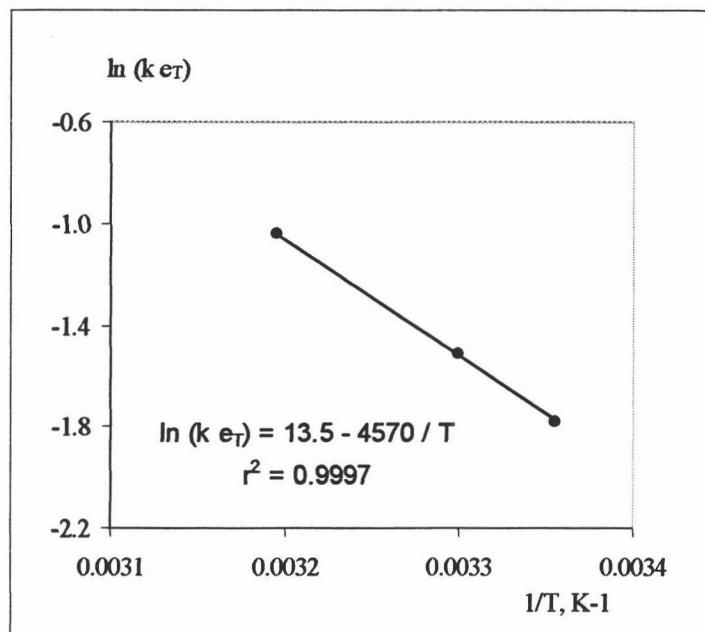


Figura 5.68 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Dependencia de $(k e_T)$ con la temperatura según la ecuación de Arrhenius.

Al igual que para la reacción de isomerización fructosa-glucosa, podemos definir el factor de efectividad del RFHR (η_{HF}) como la relación entre la velocidad de reacción en el RFHR y la obtenida en el RDMP de forma que, considerando las ecuaciones [Ec. 5.63] y [Ec. 5.64] podría calcularse este factor según la expresión:

$$\eta_{HF} = \frac{(r_{HL})_{HF}}{(r_{HL})_{MP}} = \frac{\frac{S_0}{k e_T} + \frac{K_M}{k e_T}}{\frac{S_0}{k e_T} + \frac{K_M(1+K_D)}{k e_T}} = \frac{K_M + S_0}{K_M + S_0 + K_M K_D} \quad [\text{Ec. 5.65}]$$

llegándose finalmente a una expresión idéntica a la obtenida para la isomerización fructosa-glucosa [Ec 5.52] donde:

$$\frac{\eta_{HF}}{1 - \eta_{HF}} = \frac{1}{K_D} + \frac{S_0}{K_M K_D} \quad [\text{Ec. 5.66}]$$

expresión que puede utilizarse para calcular la constante de adsorción reversible de la enzima sobre la membrana (K_D) y la constante de Michaelis-Menten (K_M) para la hidrólisis enzimática de lactosa en RFHR.

En la **Tabla 5.18** se presenta el valor del factor de efectividad calculado a partir de los experimentos de hidrólisis realizados en el RDMP y RFHR con módulo NT1975 para cada temperatura y concentración de sustrato ensayado. Como puede observarse el factor de efectividad obtenido para la hidrólisis de lactosa se aproxima a la unidad (especialmente a 25°C), haciéndose mayor al disminuir la temperatura y al aumentar la concentración de sustrato. A 25°C y una concentración de sustrato inicial de 0.208 M la velocidad de reacción en ambos reactores es prácticamente igual.

Tabla 5.19 – Factor de efectividad para la hidrólisis enzimática de lactosa en RDMP y RFHR con módulo NT1975.

T, °C	S ₀ , M	η_{HF}	$\eta_{HF} / (1 - \eta_{HF})$
25	0.0278	0.874	6.93
	0.0694	0.847	5.54
	0.139	0.927	12.7
	0.208	0.995	213
30	0.0278	0.652	1.87
	0.0694	0.657	1.91
	0.139	0.859	6.07
40	0.0278	0.734	2.75
	0.0694	0.686	2.18
	0.139	0.766	3.26
	0.208	0.792	3.80

El cálculo de $\eta_{HF}/(1-\eta_{HF})$ [Ec. 5.66] está sujeto a errores importantes, por lo que sólo se aprecia la linealidad preconizada por esta ecuación a la temperatura de 40°C, donde los factores de efectividad son menores (Figura 5.69). La constante cinética K_D se obtiene por tanto mediante regresión no lineal de los datos a la ecuación [Ec.5.62], considerando que el valor de k y K_M es igual al obtenido en el RDMP. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5.19**, observándose mediante la covarianza (CV) que en todos los casos indicados el error de estos parámetros es igual o inferior al 5%.

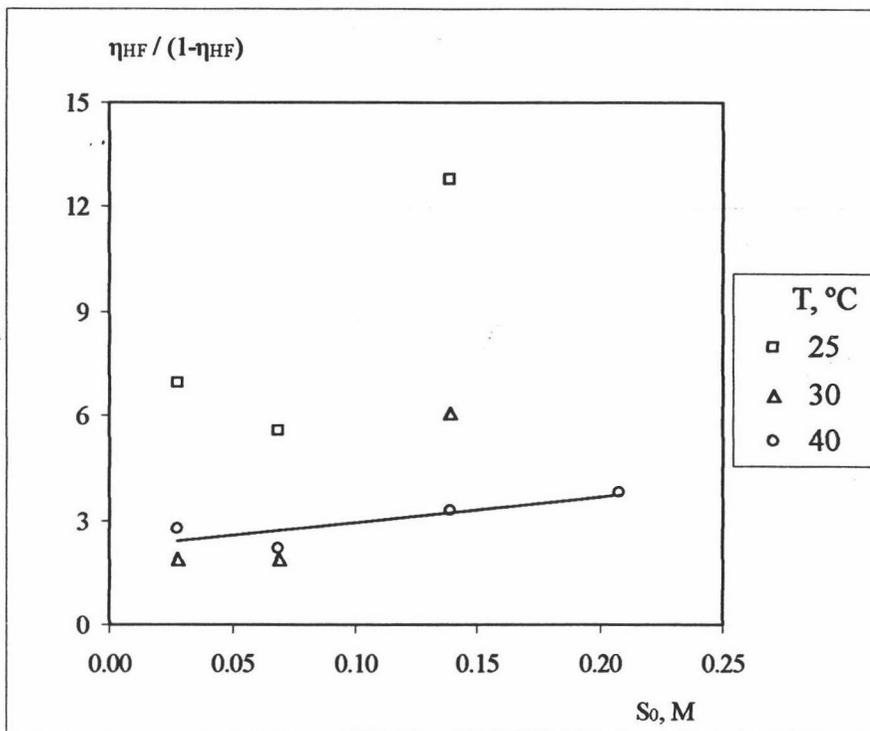


Figura 5.69 – (Detalle) Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) – Linealización propuesta en la ecuación [Ec. 5.66]

Tabla 5.19 – Hidrólisis de lactosa en RFHR - Constante K_D obtenida mediante regresión no lineal de los datos a [Ec.5.62]

Material	T, °C	K_D	CV(%)
Acetato de celulosa	25	2.18	2
	30	2.28	4
	40	3.79	4
Polisulfona	40	2.72	5

La constante K_D , y por tanto la adsorción, aumenta con la temperatura tal y como pone de manifiesto (Cheryan (1998b)) para la adsorción de proteínas sobre membranas. Para el módulo NT1975, la representación de la constante K_D obtenida en función de la temperatura tal y como la ecuación de Van't Hoff sugiere, se recoge en la Figura 5.70, observándose que el ajuste no es del todo bueno ($r^2=0.93$).

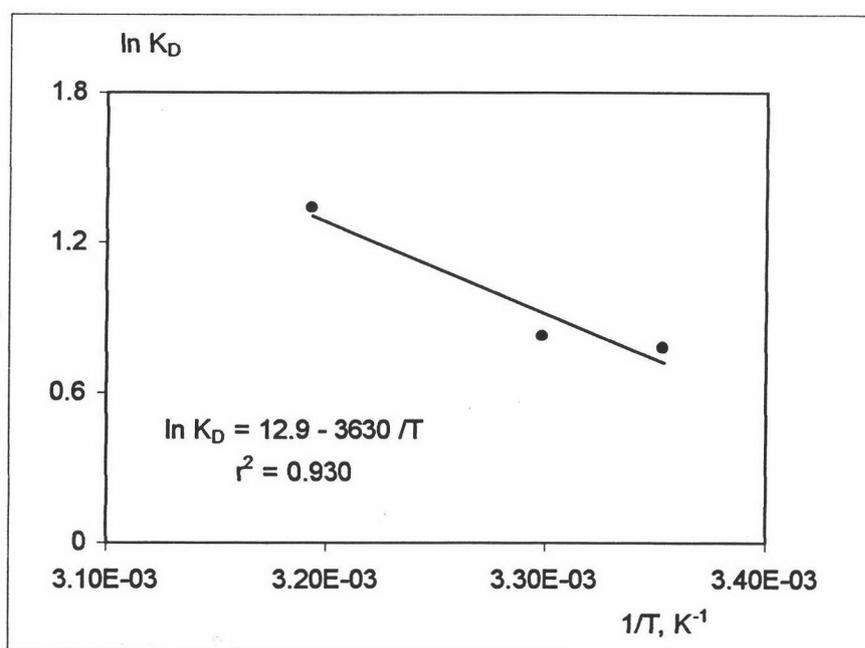


Figura 5.70 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975). Ajuste de la constante K_D a la ecuación de Van't Hoff.

En las Figuras 5.71 y 5.72 se muestra a título de ejemplo el ajuste del modelo (adsorción reversible de la enzima libre en la membrana) a los datos experimentales obtenidos para la hidrólisis de lactosa en RFHR con el módulo NT1975. En la Figura 5.73 se muestra el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en distintos módulos a 40°C y $L_0=0.0694$ M. En todas estas figuras se observa que para las temperaturas, concentración de sustrato y enzima analizadas, se cumple satisfactoriamente el modelo.

No obstante el modelo planteado no explica el cambio de pendiente observado en la mayoría de los experimentos cinéticos realizados.

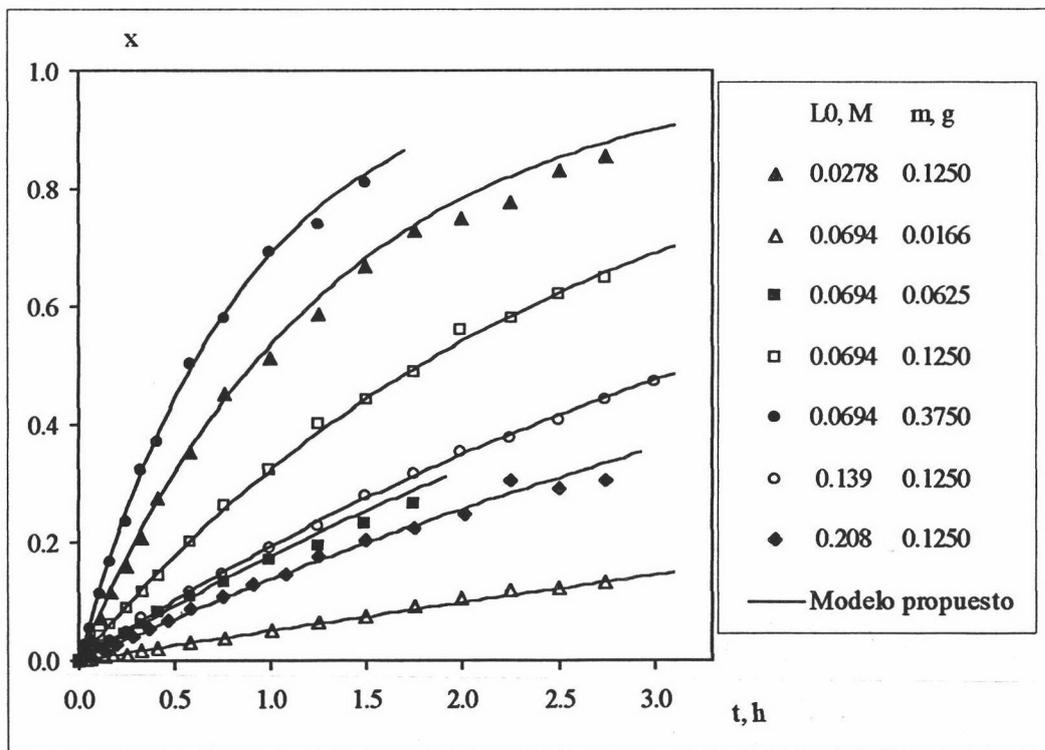


Figura 5.71 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Ajuste de modelo de adsorción de enzima libre a los datos experimentales considerados. 25°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

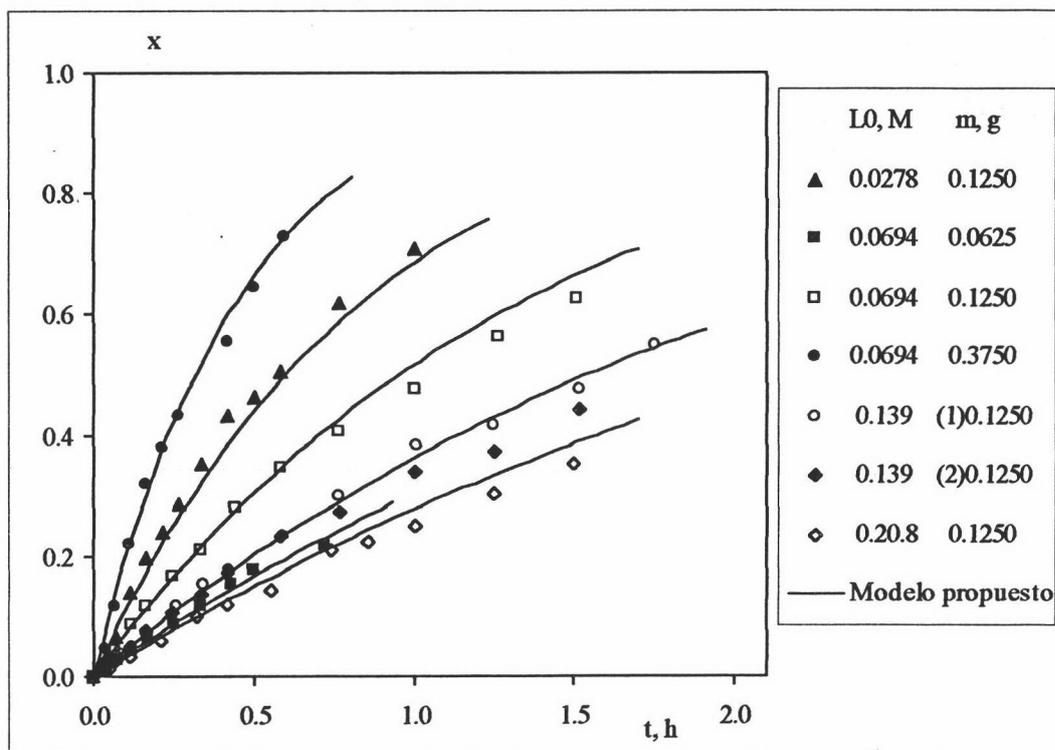


Figura 5.72 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Ajuste de modelo de adsorción de enzima libre a los datos experimentales considerados. 40°C Lactozym Tampón K^+ y Mg^{+2}

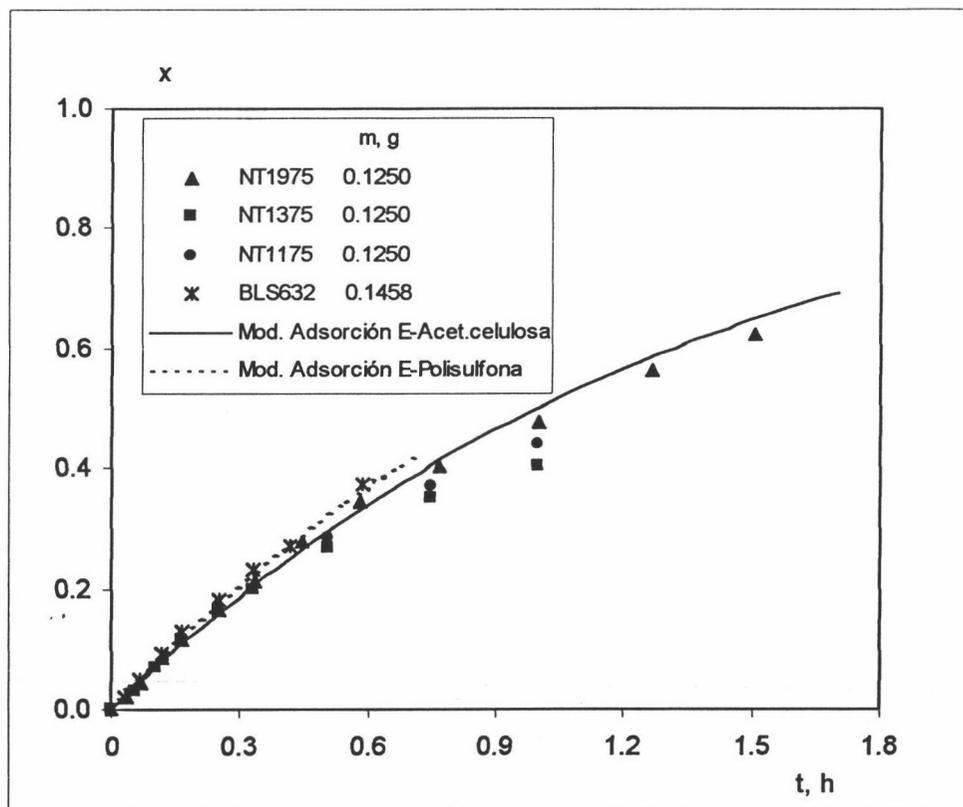


Figura 5.73 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Aplicación de modelo de adsorción de enzima libre a los datos experimentales considerados obtenidos en diferentes módulos de fibra hueca. 40°C $L_0=0.0694$ M Tampón K^+ y

5.5.5 Modelo cinético de hidrólisis de lactosa con adsorción del complejo enzima-galactosa EGa en la membrana del módulo de ultrafiltración de un RFHR.

Los resultados experimentales obtenidos en el RFHR muestran una separación con respecto a los obtenidos en el RDMP de la forma indicada en la Figura 5.74. Estos resultados sugieren que las diferencias de comportamiento de ambos reactores aumentan a medida que la conversión progresa, lo que podría indicar que esa diferencia sea debida a algún producto de la reacción. Por otro lado, la causa más frecuente que explica estas diferencias de comportamiento entre ambos reactores es la adsorción de la enzima en la membrana, que se retira del medio de reacción y queda inutilizada para la catálisis. A partir de las observaciones anteriores podría considerarse que la especie que se adsorbe es fundamentalmente el intermedio enzima-galactosa, cuya concentración va aumentando a medida que progresa la reacción.

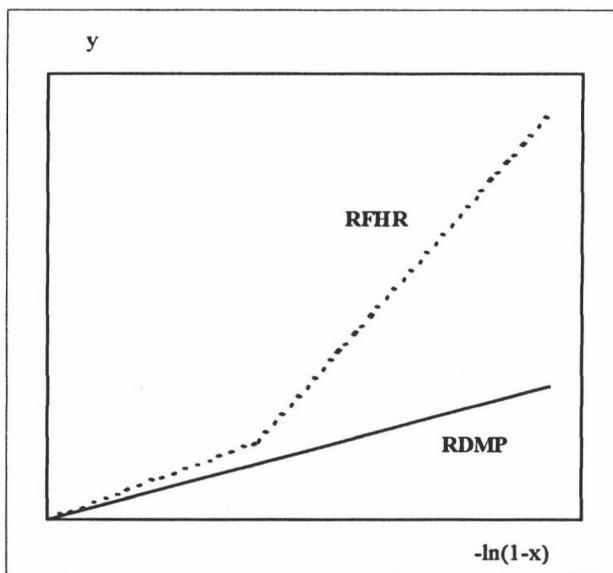
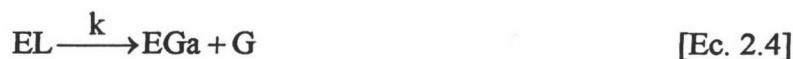


Figura 5.74 – Disposición relativa de los datos obtenidos para la hidrólisis enzimática de lactosa en un RDMP y RFHR.

Admitiendo esta hipótesis, el mecanismo sería el mismo que en fase homogénea, añadiendo una etapa de adsorción del intermedio enzima-galactosa (EGa):



donde las etapas [Ec. 2.3], [Ec. 2.5] y [Ec. 5.67] están en equilibrio y [Ec. 2.4] es la etapa controlante y EGan es el complejo enzimático enzima-galactosa unido a la membrana. La constante de equilibrio K_A viene definida como:

$$K_A = \frac{EGan}{EGa \cdot n} \quad [\text{Ec. 5.68}]$$

Considerando que $K_M \approx K_I$ y las ecuaciones [Ec. 2.6], [Ec. 2.7], [Ec. 2.9], [Ec. 2.10] y [Ec. 2.14], la suma de la concentración de los complejos EL y EGa vendría definida por:

$$EL + EGa = E \frac{S_0}{K_M} \quad [\text{Ec. 5.69}]$$

Admitiendo que la superficie de la membrana es muy grande con respecto a la concentración de enzima, la concentración de centros vacantes para la adsorción en la superficie de la membrana (n) podrá suponerse constante e incluirse en la constante de adsorción de la forma:

$$K_D = K_A n \quad [\text{Ec. 5.70}]$$

y considerando que $K_M \approx K_I$ y las ecuaciones [Ec. 2.7], [Ec. 2.10], [Ec. 5.68] y [Ec. 5.70] la concentración del complejo enzimático EGa adsorbido sobre en la membrana (EGan) sería igual a:

$$EGan = E \frac{K_D}{K_M} (Ga_0 + L_0x) \quad [\text{Ec. 5.71}]$$

Realizando un balance de enzima al sistema, la concentración de enzima libre E viene definida por:

$$E = \frac{e_T C_E}{1 + \frac{S_0}{K_M} + \frac{K_D}{K_M} (Ga_0 + L_0x)} \quad [\text{Ec. 5.72}]$$

donde e_T son los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo y C_E los gramos de complejo enzimático activo total por litro.

La aparición de la conversión en el denominador de esta ecuación indica una disminución continua de la concentración de enzima libre al progresar la reacción. La velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa [Ec. 2.11] (en $\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) vendrá determinada por la de la etapa controlante, y por tanto:

$$r = k_{EL} = \frac{k}{K_M} E L_0(1-x) = \frac{\frac{k}{K_M} L_0(1-x) e_T C_E}{1 + \frac{S_0}{K_M} + \frac{K_D}{K_M} (Ga_0 + L_0x)} = L_0 \frac{dx}{dt} \quad [\text{Ec. 5.73}]$$

Introduciendo la variable intensiva de tratamiento, y , definida en la ecuación [Ec. 4.2], nos queda que:

$$\frac{dx}{dy} = \frac{\frac{k}{K_M} e_T (1-x)}{1 + \frac{S_0}{K_M} + \frac{K_D}{K_M} (Ga_0 + L_0x)} \quad [\text{Ec. 5.74}]$$

separando variables e integrando obtenemos:

$$y = \frac{K_M + S_0(1+K_D)}{k e_T} [-\ln(1-x)] - \frac{K_D L_0}{k e_T} x \quad [\text{Ec. 5.75}]$$

con lo que el nuevo término que aparece en la ecuación del modelo debería explicar la diferencia de comportamiento. Esta ecuación implica sólo un parámetro más que la usada para explicar el comportamiento del RDMP, $(K_D L_0)/ke_T$, que debe ser proporcional a la concentración inicial de lactosa y variar con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Van't Hoff.

Aplicando la ecuación [Ec. 5.75] a los resultados experimentales obtenidos con los diferentes módulos, y considerando los valores de k y K_M obtenidos en el RDMP, mediante regresión no lineal se calcula el valor de la constante K_D para los diferentes módulos utilizados (Tabla 5.20).

Tabla 5.20 – Hidrólisis de lactosa en RFHR - Constante K_D obtenida mediante regresión no lineal de los datos a [Ec. 5.75]

Material	Módulo	T, °C	K_D	CV(%)
Acetato de celulosa	NT1975	25	0.667	5
		30	1.09	3
		40	2.97	3
	NT1375	40	8.12	4
	NT1175	40	5.82	3
Polisulfona	BLS632	40	2.48	5

CV(%) = covarianza

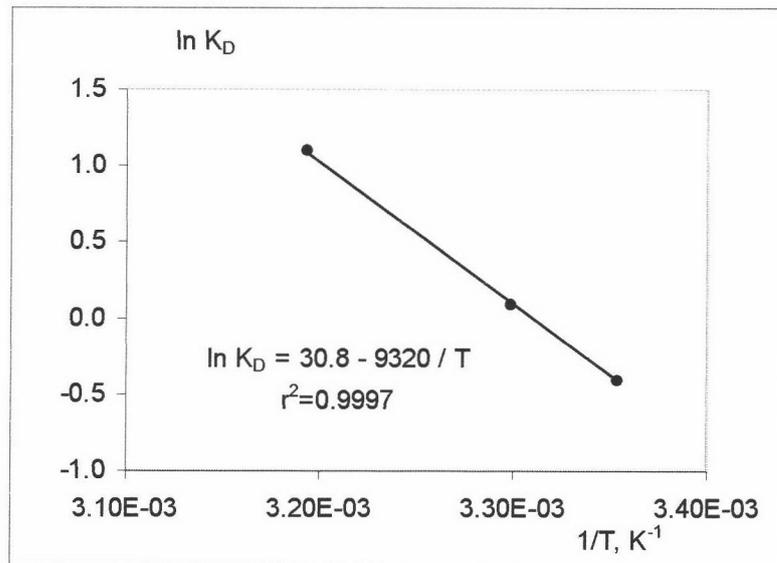
Las constantes K_D obtenidas a diferentes temperaturas para el módulo NT1975 indican un incremento de la adsorción con la temperatura tal y como Cheryan (1998b) pone de manifiesto. En la Figura 5.75 se representa K_D según la ecuación de Van't Hoff sugiere, obteniéndose una entalpía de adsorción de:

$$\Delta H_{ad} = 18.6 \text{ kcal mol}^{-1}$$

cuyo orden de magnitud parece indicar una quimiadsorción del complejo EGa sobre la membrana.

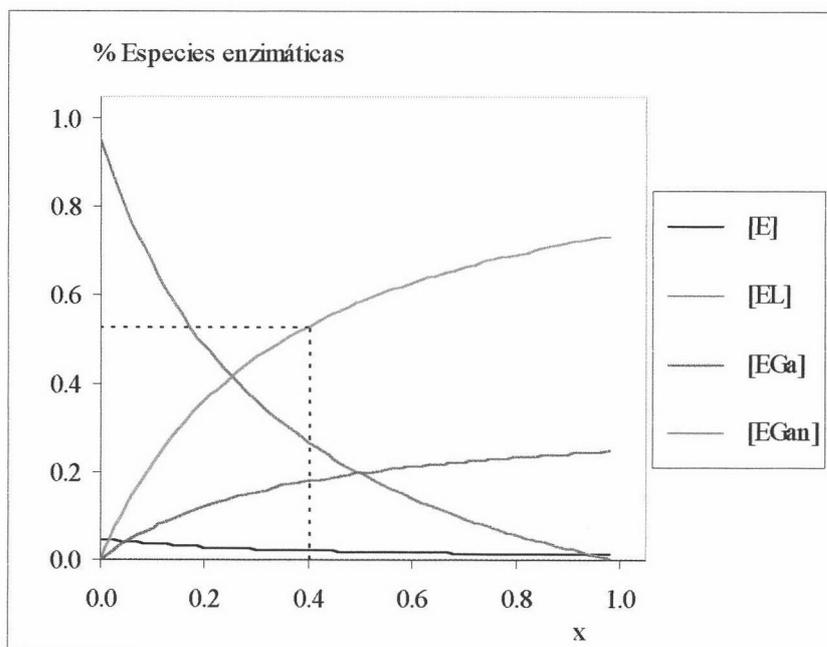
A partir de las ecuaciones [Ec. 2.9], [Ec. 2.10], [Ec. 5.71] y [Ec. 5.72] se puede simular la variación de la concentración de las distintas especies enzimáticas presentes en función de la conversión. A modo de ejemplo, en la Figura 5.76 se indica la distribución de las distintas especies enzimáticas a 40°C en el módulo NT1975, para una concentración de lactosa inicial de 0.208 M y en ausencia de galactosa inicial. Se observa que la concentración de enzima libre es mucho menor que la del resto de los complejos enzimáticos formados. El complejo enzimático adsorbido a la membrana,

EGan, es aproximadamente un 50% de la enzima total para una conversión de 0.40, donde comienza el cambio de pendiente de este experimento (**Figura 5.65**).



**Figura 5.75 - Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975)
Ajuste de K_D a la ecuación de Van't Hoff.**

La constante de adsorción obtenida para el módulo de polisulfona a 40°C es similar a la del módulo de acetato de celulosa. McDonogh y col. (1990) obtiene también adsorciones similares para la proteína BSA en experimentos de ultrafiltración con ambos materiales.



**Figura 5.76 – Estimación de distintas especies enzimáticas presentes en la hidrólisis enzimática de lactosa en RFHR (módulo NT1975)
40°C $L_0 = 0.208 M$ $Ga_0 = 0 M$.**

Los mayores valores de K_D encontrados en módulos de acetato de celulosa y menor área superficial (NT1375 y NT1175) y la independencia de estas constantes con la superficie de la membrana parece indicar que la superficie del módulo no es limitante. Si tenemos en cuenta que la concentración de centros vacantes para la adsorción del complejo EGa sobre la membrana (n) se puede expresar como:

$$n = n_T - EGan \quad [\text{Ec. 5.76}]$$

siendo n_T la concentración total de centros activos de la membrana, la suposición realizada en el modelo planteado por la que la concentración de EGan es despreciable frente a n_T , es correcta. El mayor valor de K_D para estos dos módulos indica por tanto un mayor número de centros activos en estas membranas que, aunque fabricadas con un mismo material, pertenecen a lotes de fabricación distintos. Esto conllevaría que el comportamiento de la membrana puede ser distinto según con el proceso de fabricación que haya sufrido.

En las **Figuras 5.77 a 5.82** se muestran los resultados obtenidos en los diferentes módulos y condiciones experimentales ensayadas. La observación visual parece demostrar que el modelo propuesto justifica la dependencia experimental observada. Para la mayor parte de los experimentos realizados se observa que los residuales obtenidos se distribuyen aleatoriamente a un lado y otro del cero, observándose no obstante la existencia de una alta dispersión (57% de los puntos experimentales considerados presentan una diferencia del 10 % con respecto a los calculados a partir del modelo

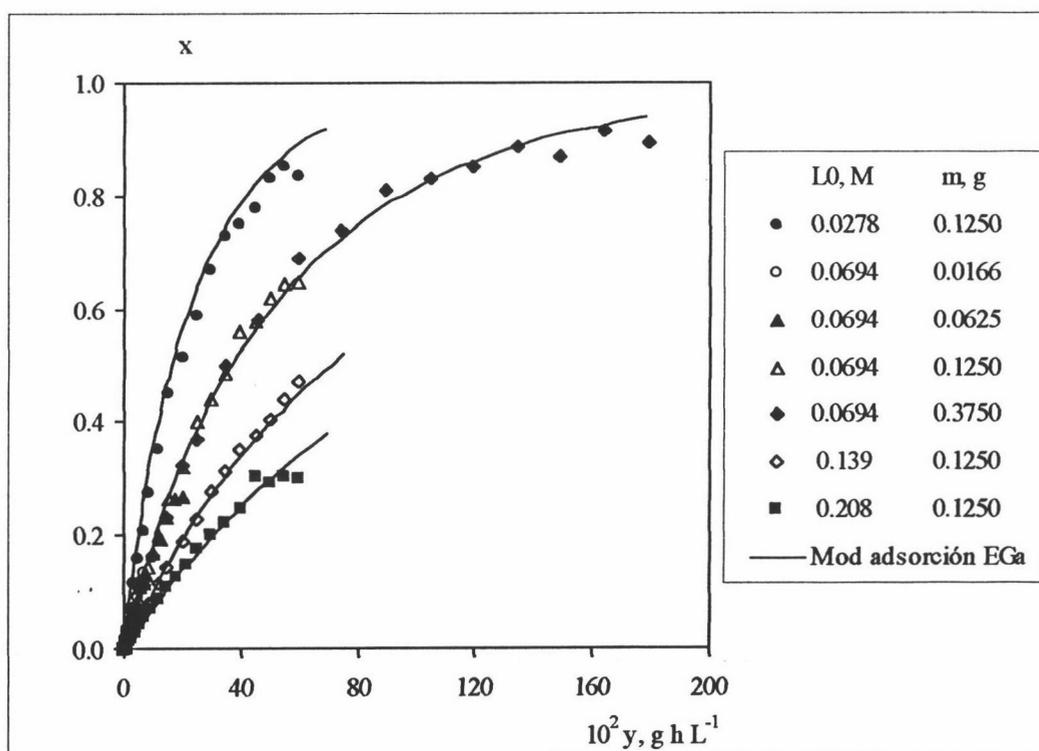


Figura 5.77 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Modelo de adsorción de complejo EGA sobre la membrana. 25°C

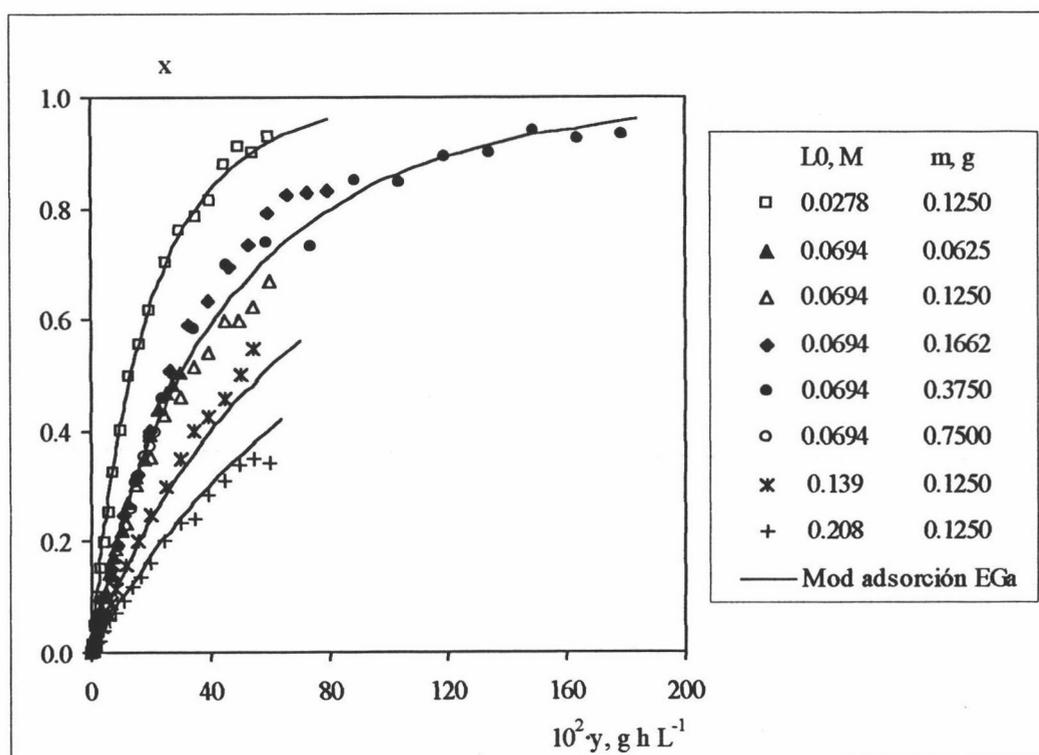


Figura 5.78 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Modelo de adsorción de complejo EGA sobre la membrana 30°C

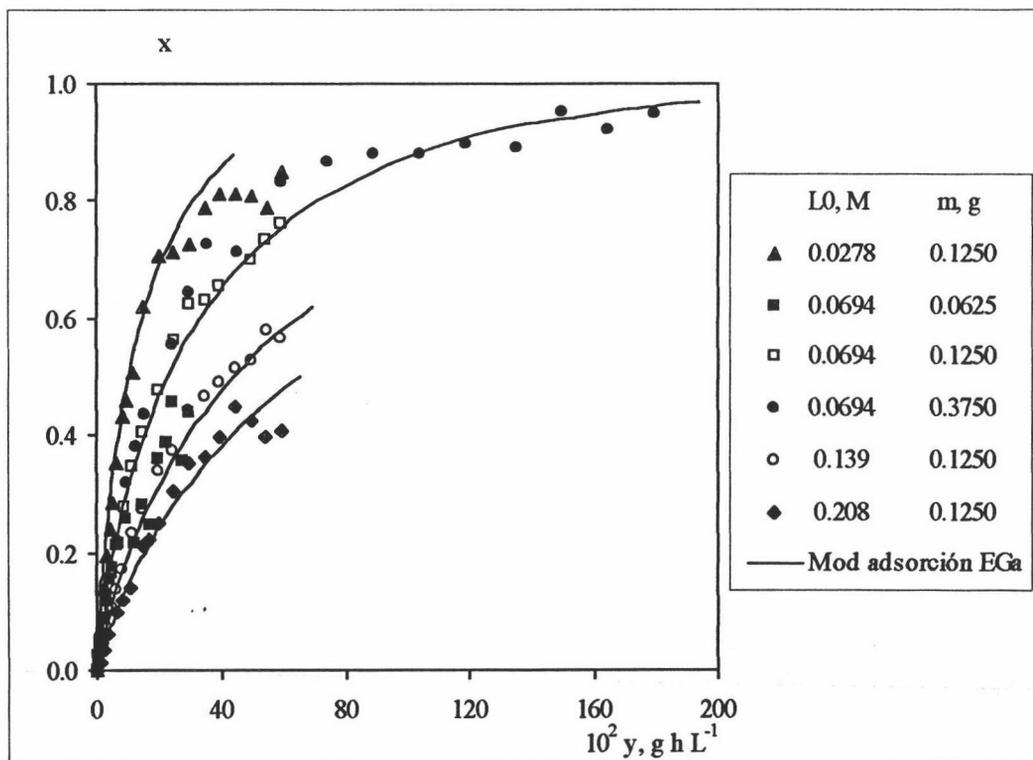


Figura 5.79 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1975) Modelo de adsorción de complejo EGa sobre la membrana 40°C

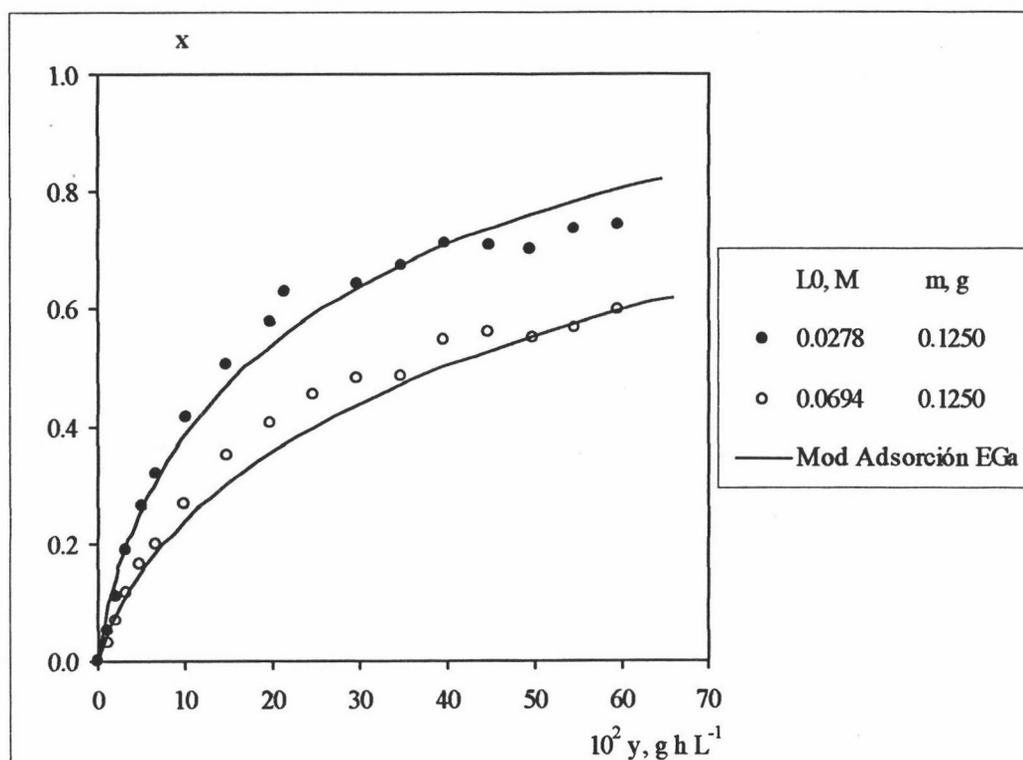


Figura 5.80 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1375) Modelo de adsorción de complejo EGa sobre la membrana 40°C

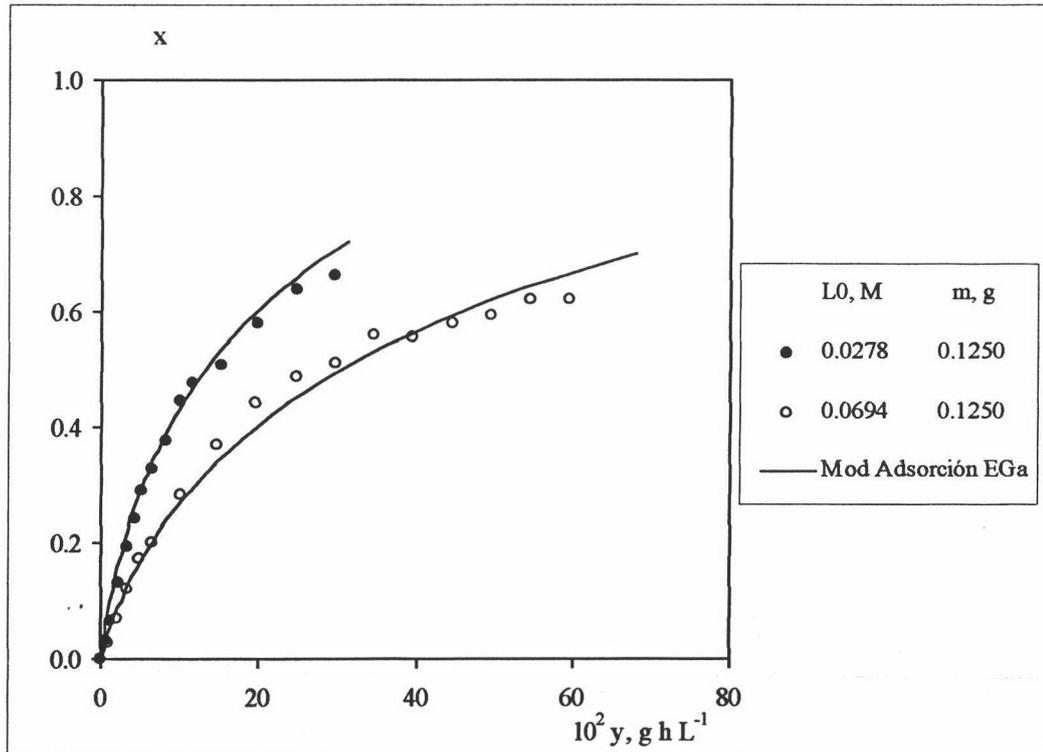


Figura 5.81 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1175) Modelo de adsorción de complejo EGA sobre la membrana 40°C

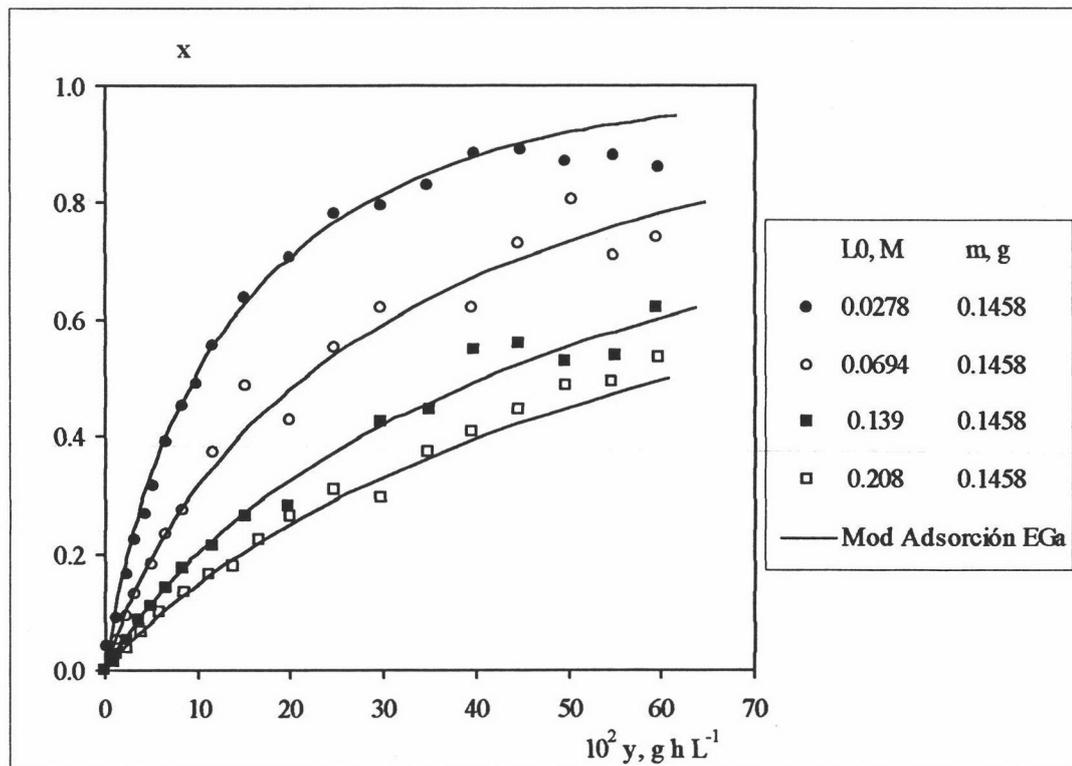


Figura 5.82 – Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo BLS632) Modelo de adsorción de complejo EGA sobre la membrana 40°C

5.6 Comparación de los reactores en su aplicación industrial.

El reactor de fibra hueca con recirculación se ha utilizado para llevar a cabo la reacción de isomerización fructosa-glucosa con la enzima glucosa isomerasa y para la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasa. La comparación de los resultados obtenidos en reactores diferentes nos permite analizar las ventajas e inconvenientes de su aplicación industrial.

Para la isomerización fructosa-glucosa se compara el comportamiento de los reactores estudiados (RDMP y RFHR) y un reactor de recirculación de lecho fijo utilizado en trabajos previos (Luzón González (1993), Camacho y col.(1996)) con la enzima glucosa isomerasa inmovilizada Sweetzyme T. La comparación se realiza mediante el factor de efectividad, que en el RFHR (η_{HF}) se define como la relación entre la velocidad de reacción en el RFHR y la obtenida en el RDMP, y en el reactor de lecho fijo con recirculación (η_{LF}) como la relación entre la velocidad de reacción en el reactor de lecho fijo con recirculación y la obtenida en el RDMP. En la **Tabla 5.21** se muestran los valores representados en la **Figura 5.83**.

**Tabla 5.21 – Isomerización fructosa-glucosa.
Comparación de efectividad de RDMP, RFHR y reactor de
lecho fijo con recirculación.**

T, °C	S ₀ , M	η_{HF}	¹ η_{LF}
40	0.05	0.358	
	0.10	0.401	
	0.50	0.555	0.434
	1.00		0.428
	1.10	0.644	
	1.50	0.715	
	2.00		0.356
50	0.50		0.365
	1.00		0.333
	2.00		0.365
60	0.50		0.270
	1.00		0.261
	2.00		0.295

¹ Datos de Luzón González (1993) y Camacho y col. (1996)

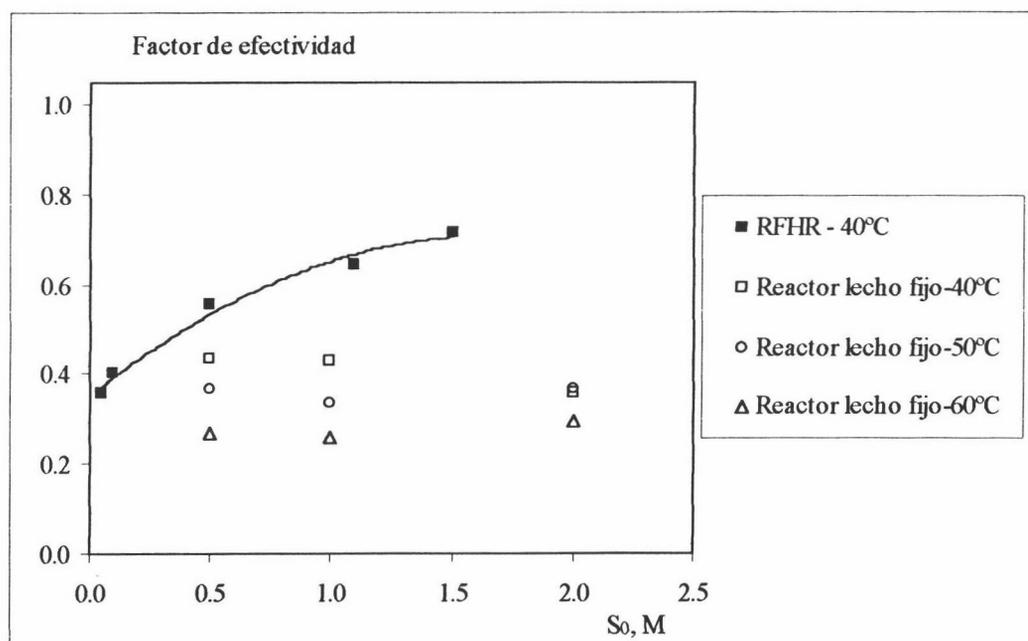


Figura 5.83 – Isomerización fructosa-glucosa. Comparación de efectividad del RFHR y reactor de lecho fijo con recirculación con respecto al RDMP.

Las mayores productividades se obtienen con el RDMP, pero este tipo de reactor presenta desde el punto de vista industrial los inconvenientes inherentes al sistema discontinuo: alto costo de mano de obra, frecuentes paradas y puestas en marcha y lo que es más importante, la necesidad de recuperar o eliminar del producto final la enzima empleada en el proceso. Por estas razones se suele utilizar el reactor de lecho fijo con la enzima inmovilizada en aplicaciones industriales.

Para la isomerización fructosa-glucosa, el RFHR presenta mayor efectividad que el reactor de lecho fijo con recirculación, aumentando esta efectividad al aumentar la concentración de sustrato y permitiendo la reutilización de la enzima. Este reactor podría ser adecuado para llevar a cabo la isomerización fructosa-glucosa.

Para la hidrólisis enzimática de lactosa, donde se produce la adsorción reversible del complejo EGa en la membrana, el factor de efectividad depende de la conversión alcanzada. Si consideramos las velocidades de reacción en moles de glucosa producidos por gramo de enzima y hora en el RDMP ([Ec. 5.64]) y en el RFHR (a partir de [Ec. 5.74]) como:

$$(r_{HL})_{HF} = L_0 \frac{dx}{dy} = \frac{k e_T L_0 (1-x)}{K_M + S_0 + K_D(Ga_0 + L_0x)}, \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \quad [\text{Ec. 5.77}]$$

el factor de efectividad en el RFHR (η_{HF}) vendría definido por:

$$\eta_{HF} = \frac{(r_{HL})_{HF}}{(r_{HL})_{MP}} = \frac{K_M + S_0}{K_M + S_0 + K_D(Ga_0 + L_0x)} \quad [\text{Ec. 5.78}]$$

En la **Figura 5.84** se representa a modo de ejemplo la variación del factor de efectividad con la conversión a distintas temperaturas, $L_0 = 0.0278 \text{ M}$ y $Ga_0 = 0 \text{ M}$. Se observa que los mayores factores de efectividad se consiguen a bajas temperaturas. Sin embargo, al producirse en esta reacción la adsorción del complejo EGa en la membrana, se hace necesario un aporte suplementario de enzima durante el proceso y la utilización de diferentes módulos en serie para conseguir conversiones de lactosa cercanas al 80% necesarias para evitar problemas de intolerancia de lactosa.

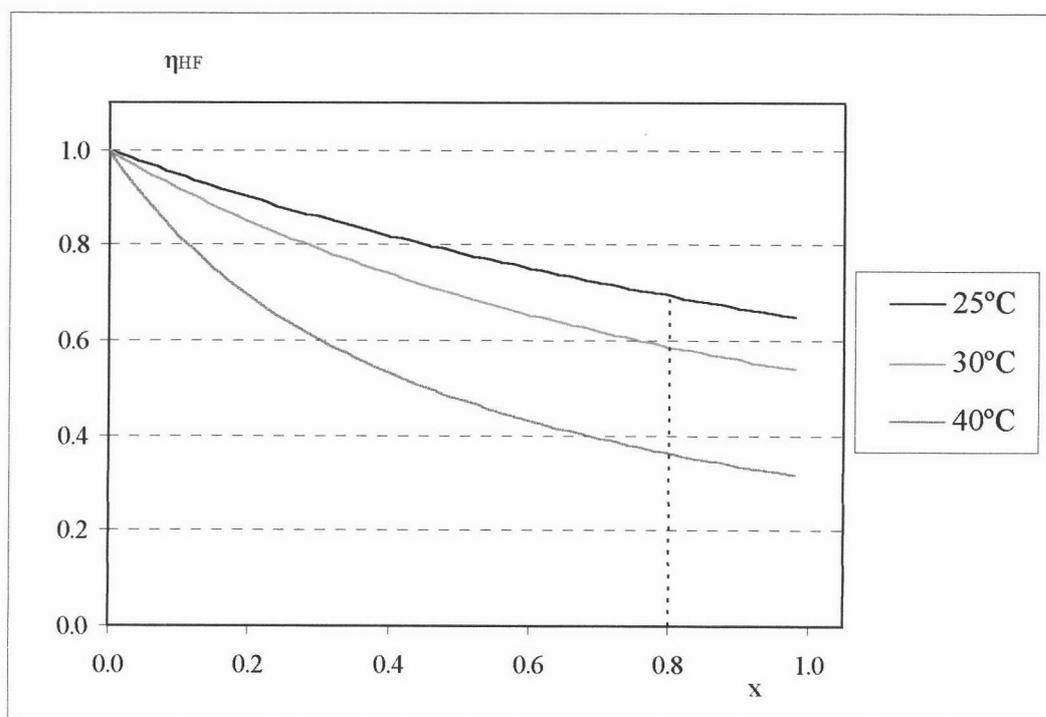


Figura 5.84 – Factor de efectividad del RFHR (η_{HF}) a distintas temperaturas. Módulo NT1975 $L_0=0.0278 \text{ M}$ $Ga_0 = 0 \text{ M}$.

En la **Figura 5.85** se comparan los resultados obtenidos en experimentos de hidrólisis de lactosa en RFHR realizados con flujos de lumen y ECS en contracorriente (**Tabla 4.117**) y en paralelo (**Tabla 5.22**). Se observa que para flujo en paralelo, la pérdida de la linealidad ocurre a una conversión mayor y mayor tiempo de reacción. En este experimento en paralelo, tras alcanzar una conversión prácticamente constante se modifica el sentido de flujo, consiguiéndose un nuevo aumento en la conversión del sistema. Este hecho podría ser utilizado para obtener mayores conversiones en la aplicación industrial .

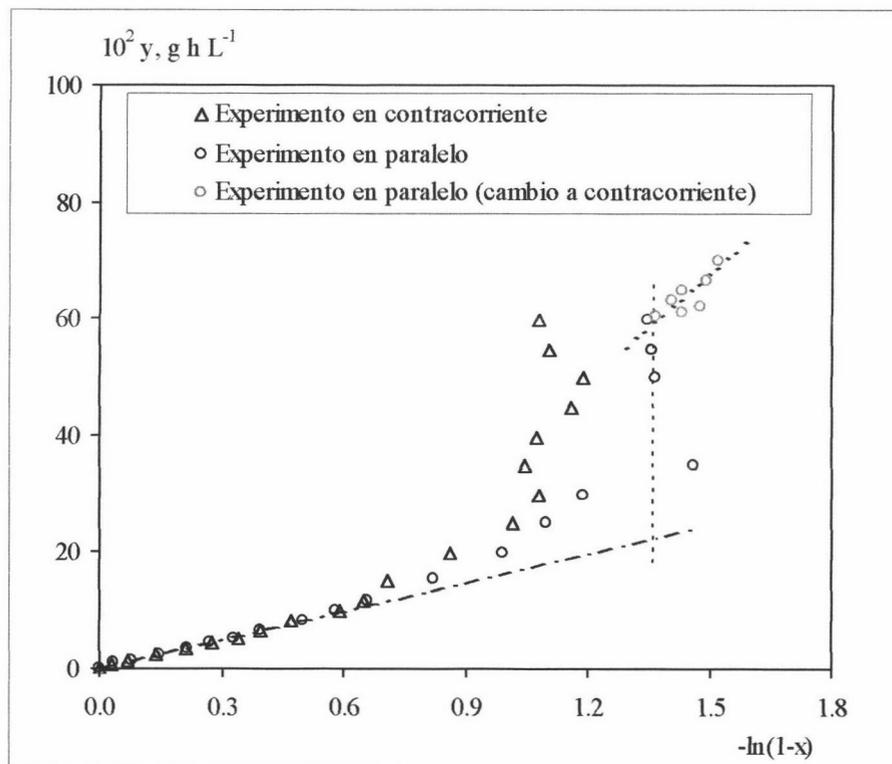


Figura 5.85– Hidrólisis de lactosa en RFHR (módulo NT1175) Influencia de sentido de flujo. 40°C $L_0=0.0278 \text{ M}$ $m=0.1250 \text{ g}$

A partir de las ecuaciones [Ec. 5.64] y [Ec. 5.77] se puede determinar la velocidad de reacción dentro del RDMP, $(r_{HL})_{MP}$, y en el RFHR suponiendo la adsorción reversible del complejo EGa en la membrana del complejo EGa, $(r_{HL})_{HF}$. Si se representan estas velocidades de reacción en función de x (**Figura 5.86**), observamos que para 25°C no existen diferencias excesivamente grandes entre la velocidad mostrada por ambos reactores en todo el rango de conversiones. A conversiones próximas a 0.8

(grado de hidrólisis admisible por personas intolerantes a la lactosa) la velocidad de reacción en el RFHR a distintas temperaturas es prácticamente similar. Esto nos lleva a pensar que una vez alcanzadas dentro del sistema conversiones próximas a 0.8, la hidrólisis de lactosa podría llevarse a cabo en el RFHR a 25°C lo que supondría un ahorro energético importante.

Para conseguir mayores productividades podría combinarse la utilización de los dos reactores, RDMP y RFHR, iniciándose la reacción a temperaturas altas (40°C) en el RDMP para posteriormente recircular la disolución hacia el ECS del RFHR, trabajando dentro de este reactor a 25°C.

Tabla 5.22 – Hidrólisis de lactosa en RFHR. Módulo NT1175
Influencia de sentido de flujo

40°C L ₀ = 0.0278 M m = 0.1250 g Tampón K ⁺ y Mg ⁺²			
Flujo	t, h	10 ² y, g h L ⁻¹	x
Paralelo	0.000	0.00	0.000
	0.043	0.85	0.036
	0.072	1.41	0.077
	0.117	2.30	0.137
	0.167	3.29	0.195
	0.217	4.28	0.239
	0.267	5.27	0.284
	0.333	6.59	0.329
	0.417	8.24	0.394
	0.500	9.89	0.440
	0.583	11.6	0.484
	0.770	15.3	0.561
	1.00	19.8	0.628
	1.25	24.8	0.667
	1.50	29.8	0.697
	1.75	34.8	0.769
	2.50	49.8	0.746
2.75	54.8	0.743	
3.00	59.8	0.741	
Contracorriente	3.03	60.4	0.746
	3.07	61.1	0.762
	3.12	62.1	0.772
	3.17	63.1	0.755
	3.25	64.8	0.762
	3.33	66.5	0.775
	3.50	69.8	0.782

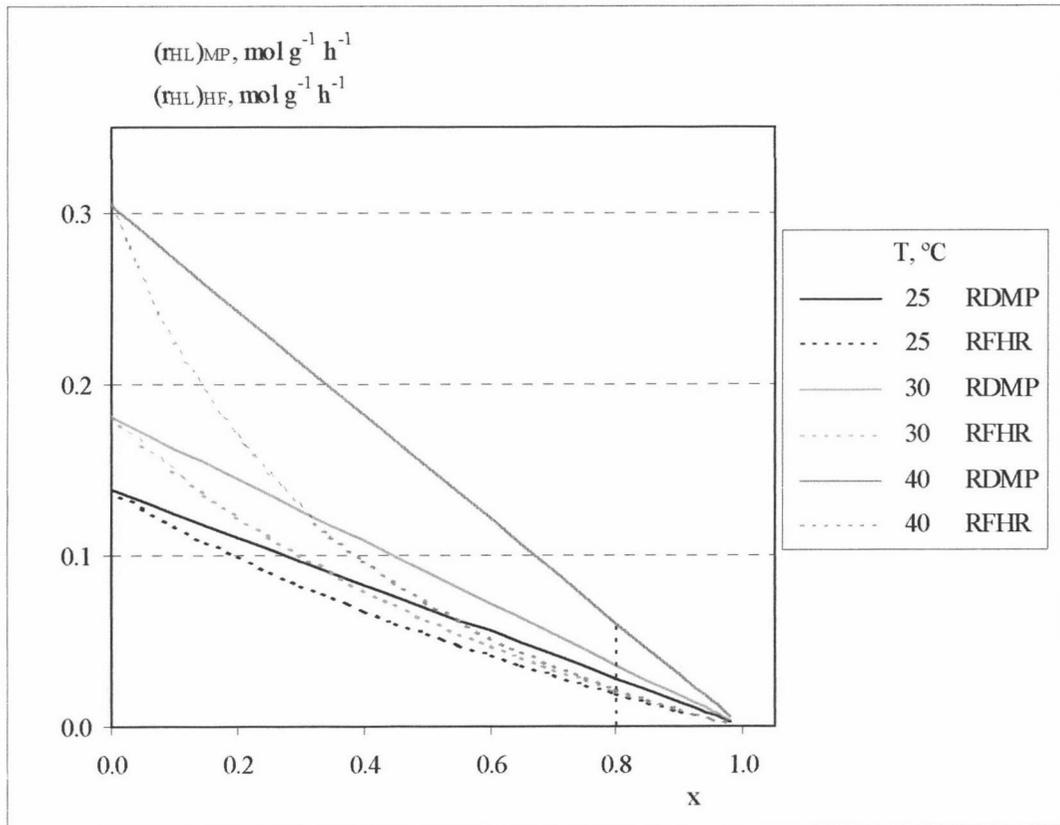


Figura 5.86 – Velocidad de reacción de RDMP y RFHR (módulo NT1975) en función del grado de hidrólisis del sistema experimental. $L_0=0.0278 \text{ M}$
 $Ga_0 = 0 \text{ M}$.

6. CONCLUSIONES

- 1 La enzima glucosa isomerasa mantiene su estabilidad hasta 60°C, no presentando desactivación alguna en el rango experimental ensayado. La enzima β -galactosidasa se desactiva a temperaturas superiores a 40°C. Se ha comprobado que en presencia de iones K^+ y Mg^{+2} la enzima β -galactosidasa se estabiliza, mientras que en presencia de iones Na^+ se desactiva incluso a 25°C.
- 2 Se han ensayado dos modelos cinéticos para explicar el comportamiento de las enzimas β -galactosidasas frente al pH. El modelo que mejor ajusta los datos de actividad frente al pH es un modelo que considera la formación de las especies EH_2^{+2} y E^- . Se observa el mismo comportamiento frente al pH de las enzimas Lactozym y Maxilact.
- 3 Se propone un modelo cinético que explica la desactivación térmica de las β -galactosidasas Lactozym y Maxilact en los dos tampones ensayados. Este modelo implica que la enzima nativa se transforma reversiblemente en una especie intermedia no activa que posteriormente se desactiva irreversiblemente.
- 4 Se propone para la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasa un modelo cinético de inhibición por galactosa simplificado que supone que las constantes K_M y K_I son iguales. Esto implica que la lactosa y galactosa ocupan el lugar activo de la enzima con igual probabilidad. La velocidad de reacción puede por tanto determinarse de la forma:

$$r_{HL} = \frac{k e_T L_0 (1-x)}{K_M + L_0 + Ga_0}$$

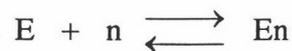
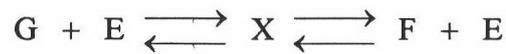
Las constantes $k e_T$ y K_M se pueden expresar en función de la temperatura como:

$$k e_T = 2.71 \cdot 10^7 \exp\left(-\frac{5630}{T}\right), \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

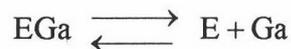
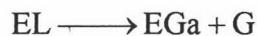
$$K_M = 2.77 \cdot 10^2 \exp\left(-\frac{3200}{T}\right), \text{ M}$$

- 5 Se han estudiado en un reactor de fibra hueca con recirculación las reacciones enzimáticas de isomerización fructosa-glucosa, mediante la enzima Spezyme GI, e hidrólisis de lactosa, mediante la enzima Lactozym, observándose en todos los casos que las conversiones obtenidas son menores a las conseguidas en un reactor discontinuo mezcla perfecta.

- 6 En la reacción de isomerización fructosa-glucosa llevada a cabo en un reactor de fibra hueca con recirculación parece existir una adsorción reversible de la enzima nativa activa libre en la membrana del módulo de fibra hueca mientras que en la reacción de hidrólisis de lactosa en este mismo reactor existe una adsorción reversible del complejo EGa.
- 7 Se propone un modelo cinético para la isomerización fructosa-glucosa con la enzima glucosa isomerasa en el RFHR que considera una reacción reversible de pseudoprimer orden y un equilibrio de adsorción reversible de la enzima nativa activa libre en la membrana de la forma:



- 8 Se propone un modelo cinético para la hidrólisis de lactosa en el RFHR que considera la inhibición por galactosa y una adsorción reversible del complejo EGa sobre la membrana del módulo de fibra hueca de la forma:



- 9 La constante de adsorción K_D obtenida para el módulo de fibra hueca NT1975 de membrana de acetato de celulosa se puede expresar en función de la temperatura de la forma:

$$K_D = 2.38 \cdot 10^{13} \exp\left(-\frac{9320}{T}\right), \text{ a dim ensional}$$

7. NOMENCLATURA

a	Actividad enzimática
a_0	Actividad enzimática inicial
ABS_{610}	Absorbancia 610 nm
a_{norm}	Actividad enzimática normalizada [Ec. 4.1], adimensional
b	Variable adimensional [Ec. 5.17]
BSA	Seroalbúmina bovina
c	Variable adimensional [Ec. 5.17]
C_E	Concentración de complejo enzimático activo total, $g L^{-1}$
C_{E0}	Concentración de complejo enzimático total inicial, $g L^{-1}$
C_{EC}	Concentración de enzima en el circuito del ECS, $g L^{-1}$
CV	Covarianza, %
d	Diámetro de partícula [Ec. 2.22]
d_0	Diámetro inicial de partícula [Ec. 2.22]
D	Concentración de especie enzimática no activa [Ec. 2.21] (desactivación reversible)
DL	Diálisis
E	Concentración de enzima libre activa en el medio de reacción, M
E_0	Concentración de enzima libre activa inicial en el medio de reacción, M
E_1, E_2	Concentración de especies enzimáticas modificadas ([Ec. 2.19])
E_a	Energía de activación, $Kcal mol^{-1}$
ECS	Espacio extracapilar (espacio comprendido entre la pared exterior de las fibras y la carcasa del módulo de fibra hueca)
E_d	Concentración de enzima desactivada, M
EGa	Concentración del complejo enzima-galactosa libre en el medio de reacción, M
EGa_n	Concentración de complejo enzimático EGa adsorbida reversiblemente sobre los centros activos de la membrana del módulo de fibra hueca, M
E_h	Concentración de enzima libre no activa en el medio de reacción, M
EL	Concentración del complejo enzima-lactosa libre en el medio de reacción, M
En	Concentración de enzima nativa activa libre adsorbida reversiblemente sobre los centros activos de la membrana del módulo de fibra hueca, M
e_T	Moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático activo, $mol g^{-1}$

F	Concentración de fructosa, M
G	Concentración de glucosa, M
G ₀	Concentración de glucosa inicial, M
G _a	Concentración de galactosa, M
G _{a0}	Concentración de galactosa inicial, M
G _c	Concentración de glucosa en el circuito del ECS, M
G _f	Concentración de glucosa a la salida del módulo de fibra hueca del RFHR, M
G _i	Concentración de glucosa a la entrada del módulo de fibra hueca del RFHR, M
GOD	Glucosa oxidasa
ΔH_{ad}	Entalpía de adsorción, Kcal mol ⁻¹
$(-\Delta H_f)_a$	Entalpía de formación, Kcal mol ⁻¹
I	Concentración de especie enzimática no activa [Ec. 2.21] (desactivación irreversible)
k	Constante de velocidad de la reacción limitante en la hidrólisis enzimática de lactosa [Ec. 2.4], mol glucosa mol enzima ⁻¹ h ⁻¹
k ₁ , k ₂	Constantes cinéticas de semireacciones ([Ec. 2.19])
K ₀	Parámetro cinético [Ec. 2.37], M
K ₁	Parámetro cinético [Ec. 2.38], M ⁻¹
K ₂ , K ₃	Constantes de equilibrio de modelo de actividad que supone la pérdida y captura de un protón [Ec. 5.3], M
K ₄	Constante de equilibrio de modelo de actividad que supone la pérdida y captura de 1 ó 2 protones, respectivamente [Ec. 5.9], M ²
K ₅	Constante de equilibrio de modelo de actividad que supone la pérdida y captura de 1 ó 2 protones, respectivamente [Ec. 5.9], M
k _a	Constante cinética de pseudoprimer orden para la reacción de isomerización fructosa-glucosa, L g ⁻¹ h ⁻¹
k _a '	Parámetro cinético de la reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.41], L g ⁻¹ h ⁻¹
(k _a) _{MP}	Constante cinética de pseudoprimer orden obtenida para la isomerización fructosa-glucosa en RDMP, L g ⁻¹ h ⁻¹
(k _a) _{HF}	Constante cinética de pseudoprimer orden obtenida para la isomerización fructosa-glucosa en RFHR, L g ⁻¹ h ⁻¹
K _A	Constante de equilibrio de adsorción de distintas especies enzimáticas sobre la membrana del módulo de fibra hueca, M ⁻¹
K _b	Parámetro cinético de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.42], adimensional
k _c	Constante de velocidad [Ec. 5.5] y [Ec. 5.14], L g ⁻¹ h ⁻¹

Nomenclatura

k_d	Constante cinética de desactivación, h^{-1}
K_d	Parámetro cinético [Ec. 5.21], adimensional
K_D	Constante de equilibrio de adsorción de distintas especies enzimáticas en la membrana del módulo de fibra hueca considerando no limitante la concentración de centros activos de la membrana, adimensional
KDa	Kilodalton
K_e	Constante de equilibrio de isomerización, adimensional
k_f	Constante cinética de reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.23], $L mol^{-1} h^{-1}$
k_{-f}	Constante cinética de reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec.2.23], h^{-1}
k_g	Constante cinética de reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.23], $L mol^{-1} h^{-1}$
k_{-g}	Constante cinética de reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec.2.23], h^{-1}
k_h	Constante cinética individual de modelo de desactivación de la enzima con la temperatura [Ec. 5.13], h^{-1}
K_h	Parámetro cinético [Ec. 5.21], adimensional
k_{ih}	Constante cinética individual de modelo de desactivación de la enzima con la temperatura [Ec. 5.13], h^{-1}
K_I	Constante de equilibrio de inhibición de enzima por galactosa [Ec. 2.10], M
K_M	Constante de Michaelis-Menten de la reacción de hidrólisis de lactosa [Ec. 2.9], M Constante de Michaelis-Menten para la transformación fructosa-glucosa [Ec. 2.43], M
K_{mf}	Constante de Michaelis-Menten para la transformación fructosa-glucosa, M
K_{mg}	Constante de Michaelis-Menten para la transformación glucosa-fructosa, M
k_r	Parámetro cinético [Ec. 2.36], h^{-1}
k_v	Constante de velocidad [Ec. 2.22]
L	Concentración de lactosa monohidratada, M
L_0	Concentración de lactosa inicial, M
m	Masa de enzima, g
MF	Microfiltración
n	Concentración de centros activos vacantes de la membrana, M
N	Concentración de enzima nativa activa [Ec. 2.21]
NF	Nanofiltración
n_T	Concentración de centros activos totales de la membrana, M

ONP	o-nitrofenol
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
POD	Peroxidasa
PVC	Cloruro de polivinilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
q	Caudal, L h ⁻¹
r	Velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa [Ec. 2.11], mol L ⁻¹ h ⁻¹
RDMP	Reactor discontinuo mezcla perfecta
r _{FG}	Velocidad neta para la transformación fructosa-glucosa [Ec. 2.28], mol g ⁻¹ h ⁻¹
(r _{FG}) _m	Velocidad media para la transformación fructosa-glucosa [Ec.5.36], mol g ⁻¹ h ⁻¹
(r _{FG}) _{MP}	Velocidad neta para la transformación fructosa-glucosa en un RDMP [Ec.5.47], mol g ⁻¹ h ⁻¹
(r _{FG}) _{HF}	Velocidad neta para la transformación fructosa-glucosa en un RFHR [Ec.5.48], mol g ⁻¹ h ⁻¹
RFHR	Reactor de fibra hueca con recirculación
r _{HL}	Velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa, mol g ⁻¹ h ⁻¹
(r _{HL}) _{MP}	Velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa en RDMP (definido en [Ec.5.64]), mol g ⁻¹ h ⁻¹
(r _{HL}) _{HF}	Velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa en RFHR (definido en [Ec.5.63]), mol g ⁻¹ h ⁻¹
RO	Ósmosis inversa
S ₀	Concentración total de hexosas en la reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.32], M Suma de concentración de lactosa y galactosa inicial [Ec. 2.14], M
t	Tiempo, h
T	Temperatura, K
UF	Ultrafiltración
V	Volumen de fase líquida, L
V _c	Volumen de líquido en el circuito del ECS, L
V _{max}	Velocidad máxima de reacción, mol g ⁻¹ h ⁻¹
V _{mf}	Velocidad máxima de la reacción de transformación fructosa-glucosa [Ec. 2.29], mol g ⁻¹ h ⁻¹
WPC	Concentrados de proteínas de suero

Nomenclatura

x	Conversión de fructosa en glucosa [Ec. 2.31], adimensional Conversión de lactosa en glucosa y galactosa [Ec. 2.8], adimensional
X	Concentración de complejo enzimático intermedio [Ec. 2.24], M
x_e	Conversión de equilibrio para la reacción de isomerización fructosa-glucosa [Ec. 2.34], adimensional
x_0	Conversión inicial para la reacción de isomerización fructosa-glucosa, adimensional
y	Variable intensiva de tratamiento para la reacción de isomerización-fructosa-glucosa e hidrólisis enzimática de lactosa, $g\ h\ L^{-1}$
α	Actividad residual [Ec. 5.22], adimensional
α_1, α_2	Actividades relativas de las especies enzimáticas E_1 y E_2 respecto a la actividad enzimática de la enzima E, adimensional
η_{HF}	Factor de efectividad del RFHR con respecto al RDMP, adimensional
η_{LF}	Factor de efectividad del reactor de lecho fijo con recirculación con respecto al RDMP, adimensional
θ	Tiempo espacial modificado
τ	Variable [Ec. 5.17], adimensional,

8. BIBLIOGRAFÍA

Adu-Amankwa, B. and Constantinides, A. Mathematical modeling of diffusion and reaction in the hydrolysis of vegetable protein in an immobilized enzyme recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, **26**, 156-166

Aimar, P., Baklouti, S. and Sánchez, V. Membrane-solute interactions: influence on pure solvent transfer during ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 1986, **29**, 207-224

Álvarez, M.T., Álvarez, R. and Coca, J. Modelos matemáticos para la transferencia de materia en sistema fluido-membrana-fluido. II. Membrana homogénea – Fluidos no homogéneos y membranas no homogéneas. *Ing. Química.* 1989a, **7**, 193-197

Álvarez, M.T., Álvarez, R. and Coca, J. Modelos matemáticos para la transferencia de materia en sistema fluido-membrana-fluido. I. Membranas y fluidos homogéneos. *Ing. Química.* 1989b, **7**, 257-262

Álvarez, R., San Martín, F. and Coca, J. Polarización de concentración en los procesos con membranas. I. Concepto y aplicaciones a la ósmosis inversa. *Ing. Química.* 1989c, **3**, 199-205

Andrés, S.J., Álvarez, R. and Coca, J. Polarización de concentración en los procesos con membranas. II. Aplicación a la ultrafiltración. *Ing. Química.* 1991, **2**, 211-219

Bakken, A.P., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Use of novel immobilized β -galactosidase reactor to hydrolyze the lactose constituent of skim milk. *Biotechnol. Bioeng.* 1990, **36**, 293-309

Bakken, A.P., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Use of novel immobilized β -galactosidase reactor to hydrolyze the lactose constituent of skim milk. II. Multiresponse nonlinear regression analysis of kinetic data. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991, **28/29**, 741-756

Bakken, A.P., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus Circulans*). *Biotechnol. Bioeng.* 1992, **39**, 408-417

Bark, T.N., Kim, I.H. and Chang, H.N. Recycle hollow fiber enzyme reactor with flow swing. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, **27**, 1185-1191

Batchelder, B.T. Electrodialysis applications in whey processing. *Bull. IDF.* 1988, **212**, 84-90

Becerra, M., Baroli, B., Fadda, A.M., Blanco Méndez, J. and González Siso, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, **29**, 506-512

Berrueta-Jiménez, J. and García-Valle, T. Hidrólisis enzimática de lactosa en reactores de lecho fijo. *Ing. Química.* 1988, **246**, 141-146

Bódalo, A., Gómez, J.L., Gómez, E., Bastida, J. and Máximo, M.F. Fluidized bed reactors operating with immobilized enzyme systems: design model and its experimental verification. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, **17**, 915-922

Bressollier, P., Petit, J.M. and Julien, R. Enzyme hydrolysis of plasma proteins a CSTR ultrafiltration reactor: performances and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, **31**, 650-658

Bucke, C. Developments in sweeteners – 1. (Hough, C.A., Parker, K.J. and Vlitos, A.J., Ed.). Appl. Sci. Publishers, London, 1979

Bury, D. and Jelen, P. Lactose hydrolysis using a disrupted dairy culture: evaluation of technical and economical feasibility. *Can. Agr. Eng.* 2000, **42(2)**, 75-80

Camacho-Rubio, F., Jurado-Alameda, E., González-Tello, P. and Luzón González, G. Isomerización enzimática fructosa-glucosa. *Anales de Química*. 1994, **90**, 195-200

Camacho-Rubio, F., Jurado-Alameda, E., González-Tello, P. and Luzón González, G. Kinetic study of fructose-glucose isomerization in a recirculation reactor. *Can. J. Chem. Eng.* 1995, **73**, 935-940

Camacho-Rubio, F., Jurado-Alameda, E., González-Tello, P. and Luzón González, G. A comparative study of the activity of free and immobilized enzymes and its application to glucose isomerase. *Chem. Eng. Sci.* 1996, **51**(17), 4159-4165

Cantarella, M., Cantarella, L., Cirielli, G., Gallifuoco, A. and Alfani, F. Sucrose bioconversion in membrane reactors. *J. Membrane Sci.* 1989, **41**, 225-236

Carpio, C., González, P., Ruales, J. and Batista-Viera, F. Bone-bound enzymes for food industry application. *Food Chem.* 2000, **68**, 403-409

Carrara, C.R. and Rubiolo, A.C. Immobilization of β -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* 1994, **10**, 220-224

Carrara, C.R. and Rubiolo, A.C. Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase. *Proc. Biochem.* 1996, **31**(3), 243-248

Carrara, C.R. and Rubiolo, A.C. A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with β -galactosidase immobilized on chitosan. *Chem. Eng. J.* 1997, **65**, 93-98

Cavaille, D. and Combes, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces Lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1995, **22**, 55-64

Chen, F.S., Weng, H.S. and Lai, C.L. The performance of immobilized glucose isomerase supported by shrimp chitin in various types of reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 1983, **25**, 725-731

Chen, K.C., Suga, K. and Taguchi, H.J. Effects of pore and film diffusion resistances and deactivation of enzyme on the overall reaction rate of immobilized enzyme. *J. Ferment. Technol.* 1980, **58**, 439-445

Chen, K.C. and Wu, J.Y. Substrate protection of immobilized glucose-isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, **30**, 817-824

Cheryan, M. Membrane chemistry, structure and function. In: *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. (Technomic Publishing Company Inc., Ed.). Lancaster, Pennsylvania, USA, 1998a, 31-69

Cheryan, M. Fouling and cleaning. In: *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. (Technomic Publishing Company Inc., Ed.). Lancaster, Pennsylvania, USA, 1998b 237-291

Cheryan, M. Applications. In: *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. (Technomic Publishing Company Inc., Ed.). Lancaster, Pennsylvania, USA, 1998c 345-494

Ching, C.B. and Ho, Y.Y. Isomerization of glucose to fructose in a fluidized bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, **20**, 303-309

Deeslie, W.D. and Cheryan, M. A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Performance and kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 1981, **23**, 2257-2271

Deeslie, W.D. and Cheryan, M. A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Factors affecting long-term stability of the reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1982, **24**, 69-82

Dixon, M. and Webb, E. Enzymes. Longman Group Ltd., 3^d Edition, 1979.

El-Masry, M.M., De Maio, A., Di Martino, S., Bencivenga, U., Rossi, S., Manzo, B.A., Pagliuca, N., Canciglia, P., Portaccio, M., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon-grafted membranes. Part 2: Non-isothermal conditions. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*. 2000a, **9**, 231-244

El-Masry, M.M., De Maio, A., Di Martino, S., Diano, N., Bencivenga, U., Rossi, S., Grano, V., Canciglia, P., Portaccio, M., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon-grafted membranes. Part 1. Isothermal conditions. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*. 2000b, **9**, 219-230

El-Masry, M.M., De Maio, A., Di Martino, S., Grano, V., Rossi, S., Pagliuca, N., Abd El-Latifa, Z.H., Moustafa, A.B., D'Úva, A., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Influence of the non-isothermal conditions on the activity of enzymes immobilized on nylon grafted membranes. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*. 2000c, **11**, 113-126

Fink, D.J. and Rodwell, V.W. Kinetics of a hollow fiber dehydrogenase reactor. *Biotechnol. Bioeng*. 1975, **27**, 1029-1050

Flaschel, E., Raetz, E. and Renken, A. The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus Niger*. *Biotechnol. Bioeng*. 1982, **24**, 2499-2518

Flores, M.V., Ertola, R.J. and Voget, C.E. Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Lebensm.-Wiss.u-Technol*. 1996, **29**, 503-506

Friend, B.A. and Shahani, K.M. Characterization and evaluation of *Aspergillus Oryzae* lactase coupled to a regenerable support. *Biotechnol. Bioeng*. 1982, **24**, 329-345

Fujii, T., Miyawaki, O. and Yano, T. Modeling of hollow-fiber capillary reactor for the production of L-alanine with coenzyme regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, **38**, 1166-1172

Fujikawa, H. and Itoh, T. Differences in the thermal inactivation kinetics of *Escherichia Coli* β -galactosidase in vitro and in vivo. *Biocontrol Sci.* 1997, **2**(2), 73-78

Furusaki, S., Nozawa, T. and Nomura, S. Membrane enzyme reactor with simultaneous separation using electrophoresis. *Bioproc. Eng.* 1990, **5**, 73-78

Futselaar, H. The transverse flow membrane module: construction, performance and applications, Enschede, The Netherlands, 1993.

Garman, J., Coolbear, T. and Smart, J. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, **46**, 22-27

Gekas, V., Aimar, P., Lafaille, J-P. and Sanchez, V. A simulation study of the adsorption-concentration polarisation interplay in protein ultrafiltration. *Chem. Eng. Sci.* 1993, **48**(15), 2753-2765

Giancomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. and Batista-Viera, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces Lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 1998, **4**, 313-327

Giancomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F. and Brena, B.M. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 2001, **11**, 597-606

Gist-Brocades nv. Industrial Products Division, Delft, Holland. Maxilact^R L2000. Technical data sheet, Mil-04/81.07.Sp.03.

González-Siso, M.I. and Suárez-Doval, S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, **16**, 303-310

González Siso, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* 1996, **57**, 1-11

Gösta Bylund, M.Sc. Dairy processing handbook. Tetra Park Processing Systems, Lund, Sweeden, 1995.

Gram, J., De Bang, M. and Villadsen, J. An automated glucose isomerase reactor system with online flow injection analyzers for monitoring of pH, glucose and fructose concentrations. *Chem. Eng. Sci.* 1990, **45**(4), 1031-1042

Habulin, M. and Knez, Z. Enzymatic synthesis of *n*-butyl oleate in a hollow fiber membrane reactor. *J. Membrane Sci.* 1991, **61**, 315-324

Harju, M. Lactose hydrolysis. *B. Int. Dairy Fed.* 1987, **212**, 50-54

Hausser, C. Membrane attack complex formation during hemodialysis treatment. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1990, **102**(5), 140-142

Havewala, N.B. and Pitcher, W.H. *Enzyme Engineering*. (Pye, E.K. and Wingard, L.D.Jr., Eds.) Plenum Press, NY, 1974.

Heng, M.H. and Glatz, C.E. Ion exchange immobilization of charged β -galactosidase fusions for lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **44**, 745-752

Henley, J.P. and Sadana, A. A mathematical analysis of enzyme stabilization by a series-type mechanism: influence of chemical modifiers. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, **26**, 959-969

Henley, J.P. and Sadana, A. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, **28**, 1277-1285

Ho Kim, I. and Nam Chang, H. Variable volume enzyme reactor with ultrafiltration swing: a theoretical study on CSTR case. *AIChE J.* 1983, **29**, 645-651

Hoq, M.M., Koike, M., Yamane, T. and Shimizu, S. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic hollow fiber reactor. *Agr. Biol. Chem.* 1985, **49**, 3171-3178

Huffman, L.M. and Harper, W.J. Lactose hydrolysis in batch and hollow fibre membrane reactors. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 1985, **20**, 57-63

Illanes, A., Altamirano, C., Aillapan, A., Tomasello, G. and Zuñiga, M.E. Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, **23**, 3-9

Illanes, A., Wilson, L. and Tomasello, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, **27**, 270-278

Illanes, A., Wilson, L. and Tomasello, G. Effect of modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 2001, **11**, 531-540

In, M-J. and Jin, J. Characterization of β -galactosidase from a *Bacillus* SP. with high catalytic efficiency for transgalactosylation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, **8**(4), 318-324

Ishikawa, H., Takase, S., Tanaka, T. and Hikita, H. Experimental investigation of G6P production and simultaneous ATP regeneration by conjugated enzymes in an ultrafiltration hollow-fiber reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1989a, **34**, 369-379

Ishikawa, H., Tanaka, T., Takase, S. and Hikita, H. Theoretical analysis of G6P production and simultaneous ATP regeneration by conjugated enzymes in an ultrafiltration hollow-fiber reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1989b, **34**, 357-368

Iwasaki, K-I, Nakajima, M. and Nakao, S-I. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase. *Proc. Biochem.* 1996, **31**(1), 69-76

Jacobson, R.H., Zhang, X-J., DuBose, R.F. and Matthews, B.W. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. Coli*. *Nature.* 1994, **369**, 761-766

Janssen, A.E.M., Klabbers, C., Franssen, M.C.R. and Van't Riet, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, **13**, 565-572

Joglekar, R., Clerman, R., Oulette, R.P. and Chermisinoff, P.N. Biotechnology in Industries. Ann Arbor Science Publishers, L.T.D, London, 1979, 73-97

Jones, C.K.S., White, E.T. and Yang, R.Y.K. Enzymatic hydrolysis of lactose in a hollow fiber reactor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1984, **434**, 119-122

Joshi, M.S., Gowda, L.R. and Bhat, S.G. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, **11**, 439-443

Jurado-A., E., González-T., P. and Luzón-G., G. Estudio cinético de la isomerización fructosa-glucosa en un reactor de lecho fijo a 50°C. *Afinidad.* 1994, **499**, 24-30

Kataoka, H., Saigusa, T., Mukutaka, S. and Takahashi, J. Effects of axial dispersion and mass transfer resistances on conversion in a hollow fiber enzyme reactor. *J. Ferment. Technol.* 1980, **58**, 431-437

Kawakami, K., Hamada, T. and Kusukoni, K. Performance of a hollow fiber beaker devise for continous enzymic reactions. *Enzyme Microb. Technol.* 1980, **2**, 295-298

Kelsey, L.J., Pillarella, M.R. and Zydney, A.L. Theoretical analysis of convective flow profiles in a hollow-fiber membrane bioreactor. *Chem. Eng. Sci.* 1990, **45**(11), 3211-3220

Kikkert, A., Vellenga, K., De Wilt, H.G.J. and Joosten, G.E.H. The isomerization of D-glucose into D-fructose catalyzed by whole-cell immobilized glucose isomerase. The dependence of the intrinsic rate of reaction on substrate concentration, pH and temperature. *Biotechnol. Prog.* 1981, **23**, 1087-1101

Kim, I.H. and Chang, H.N. Variable-volume hollow-fiber enzyme reactor with pulsatile flow. *AIChE J.* 1983, **29**(6), 910-914

Klewicki, R. Transglycosylation of a β -galactosyl radical, in the course of enzymic hydrolysis of lactose, in the presence of selected polyhydroxyalchols. *Biotechnol. Lett.* 2000, **22**, 1063-1066

Klibanov, A.M. and Ahern, T.J. Thermal stability of proteins. In: *Protein Engineering*. Alan R. Liss, Inc. 1987, 213-218

Kohlwey, D.K. and Cheryan, M. Performance of a β -D-galactosidase in a hollow fiber reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 1981, **3**, 64-68

Korus, R.A. and Olson, A.C. The use of alpha-galactosidase and invertase in hollow fiber reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 1977, **19**, 1-8

Korus, R.A. and Olson, A.C. Use of α -galactosidase, β -galactosidase, glucose isomerase and invertase in hollow fiber reactors. In: *Enzyme Engineering* (Pye, E.K. and Weetall, H.H., eds.). Plenum Press, NY and London, 1978, **3**, 543-549

Kulbe, K.D., Howaldt, M.W., Schmidt, K., Rothig, R.R. and Chmiel, H. Rejection and continuous regeneration of the native coenzyme NAD(P)H in a charged ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1984, **613**, 820-826

Ladero, M., Santos, A. and García-Ochoa, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces Fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, **27**, 583-592

Ladero, M., Santos, A., García, J.L. and García-Ochoa, F. Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, **29**, 181-193

Lee, S-G. and Kim, H-S. Optimal operating policy of the ultrafiltration membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **42**, 737-746

Lee, Y.Y., Fratzke, A.R., Wun, K. and Tsao, G.T. Glucose isomerase immobilized on porous glass. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, **18**, 379-385

Leuchtemberger, W., Karrenbauer, M. and Plöcker, U. Scale-up of an enzyme membrane reactor process for the manufacture of L-enantiomeric compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1984, **434**, 78-86

Lumry, R. and Eyring, H.J. Conformational changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 1954, **58**, 110-120

Luzón González, G. Estudio cinético comparado de la utilización de enzimas libres e inmovilizadas: isomerización fructosa-glucosa (tesis doctoral). Granada, 1993.

Ma, H., Monsan, P., Mayer, R. and Rouleau, D. Hydrolyse enzymatique du lactose dans un reacteur type reservoir agite. *Can. J. Chem. Eng.* 1983, **61**, 73-79

Mahoney, R., Wilder, T. and Chang, B.S. Substrate-induced thermal stabilization of lactase (*Escherichia coli*) in milk. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988a, **542**, 274-278

Mahoney, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem.* 1998b, **63**(2), 147-154

Malcata, F.X., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part. II. Uniresponse kinetic studies. *Biotechnol. Bioeng.* 1992a, **39**, 984-1001

Malcata, F.X., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part. III. Multiresponse kinetic studies. *Biotechnol. Bioeng.* 1992b, **39**, 1002-1012

Malcata, F.X., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part. IV. Effects of temperature. *Biotechnol. Bioeng.* 1992c, **39**, 1097-1111

Matson, S.L. and López, J.L. Multiphase membrane reactors for enzymatic resolution: Diffusional effects on stereoselectivity. In: *Frontiers in Bioprocessing* (Sikdar, S.K., Bier, M. and Todd, P., Eds.). CRC. Press, Florida, 1991, 391-403

McDonogh, R.M., Bauser, H., Stroh, N. and Chmiel, H. Concentration polarisation and adsorption effects in cross-flow ultrafiltration of proteins. *Desalination.* 1990, **79**, 217-231

Mohy Eldin, M.S., Portaccio, M., Diano, N., Rossi, S., Bencivenga, U., D'Uva, A., Canciglia, P., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on teflon membranes grafted by γ -radiation. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 1999, **7**, 251-261

Mohy Eldin, M.S., De Maio, A., Di Martino, S., Diano, N., Grano, V., Pagliuca, N., Rossi, S., Bencivenga, U., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Isothermal and non-isothermal lactose hydrolysis by means of β -galactosidase immobilized on a single double-grafted teflon membrane. *J. Membrane Sci.* 2000, **168**, 143-158

Nakajima, M., Jimbo, N., Nishizawa, K., Nabetani, H. and Watanabe, A. Conversion of sucrose by immobilized invertase in an asymmetric membrane reactor. *Proc. Biochem.* 1988, **22**(4), 32-35

Nakajima, M., Watanabe, A., Jimbo, N., Nishizawa, K. and Nakao, S. Forced-flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by silanization. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, **33**, 856-861

Nakajima, M., Iwasaki, K., Nabetani, H. and Watanabe, A. Continuous hydrolysis of soluble starch by free β -amylase and pullulanase using an ultrafiltration membrane reactor. *Agric. Biol. Chem.* 1990, **54**(11), 2793-2799

Nakamura, K., Kumagai, H. and Yano, T. Performance of a zig-zag fluidized bed as an immobilized enzyme reactor. *Agr. Biol. Chem.* 1984, **48**(5), 1131-1137

Nichtl, A., Buchner, J., Jaenicke, R., Rudolph, R. and Scheibel, T. Folding and association of β -galactosidase. *J. Mol. Biol.* 1998, **282**, 1083-1091

Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark. LactozymTM. File number B199i-E 1000, 1990.

Ohlson, I., Trägårdh, G. and Hahn-Hägerdal, B. Enzymatic hydrolysis of sodium-hydroxide-pretreated sawdust in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, **26**, 647-653

Ohshima, T., Wandrey, C., Kula, M-R. and Soda, K. Improvement for L-leucine production in a continuously operated enzyme membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, **27**, 1616-1618

Papayannakos, N., Markas, G. and Kekos, D. Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus Niger*. *Chem. Eng. J.* 1993, **52**, B1-B12

Park, S.H., Lee, S.B. and Ryu, D.Y. Optimization of operating temperature for continuous glucose isomerase reactor system. *Biotechnol. Bioeng.* 1981, **23**, 1237-1254

Patente U.S. n° 2.642.462

Patente U.S. n° 2.868.847

Patkar, A.Y., Koska, J., Taylor, D.G., Bowen, B.D. and Piret, J.M. Protein transport in ultrafiltration hollow-fiber bioreactors. *AIChE J.* 1995, **41**(2), 415-425

Pepper, D. and Páin, L.H. Concentration of whey by reverse osmosis. *Bull. IDF.* 1988, **212**, 25-26

Peterson, R.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase in capillary bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, **34**, 438-446

Piret, J.M. and Cooney, C.L. Mammalian cell and protein distributions in ultrafiltration hollow fiber bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 1990, **36**, 902-910

Pitcher, W.H., Ford, J.R. and Weetall, H.H. The preparation, characterization and scale-up of a lactase system immobilized to inorganic supports for the hydrolysis of acid whey. In: *Application of Immobilized Enzymes*, 1984, 792-809

Portaccio, M., Stellato, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Mohy Eldin, M.S., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, **23**, 101-106

Prazeres, D.M.F., García, F.A.P. and Cabral, J.M.S. An ultrafiltration membrane bioreactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **41**, 761-770

Prazeres, D.M.F. and Cabral, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme Microb. Technol.* 1994a, **16**, 738-744

Prazeres, D.M.F. and Cabral, J.M.S. Continuous lipolysis in a reversed micellar membrane bioreactor. *Bioproc. Eng.* 1994b, **10**, 21-27

Quax, W.J., Mrabet, N.T., Luiten, R.G.M., Schuurhuizen, P.W., Stanssens, P. and Lasters, I. Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering. *Biotechnology*. 1991, **9**, 738-742

Reichenbach, L.M.H. Lactose hydrolysis with fungal β -galactosidase in shaker flask reactors and hollow fiber membrane reactors. M.S.Thesis, Ohio State University, Columbus, OH, 1979.

Robertson, B.C. and Zydney, A.L. Protein adsorption in asymmetric ultrafiltration membranes with highly constricted pores. *J. Colloid Interf. Sci.* 1990, **134**, 563-575

Rogalski, J., Dawidowicz, A. and Leonowicz, A. Lactose hydrolysis in milk by immobilized β -galactosidase. *J. Mol. Catal.* 1994, **93**, 233-245

Rose, A.H. Economic Microbiology (In: *Microbial enzymes and bioconversions*, Vol. 5) Academic Press Inc., London, 1980.

Ryder, D.N. Hydrolysis of lactose in whey products. *B. Int. Dairy Fed.* 1989, **233**, 45-52

Sadana, A. and Henley, J.P. Effect of chemical modification on enzymatic activities and stabilities. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, **28**, 256-268

Sandfort, P.H. Advances in whey processing technology concentration by evaporation. *Bull. IDF.* 1988, **212**, 21-24

Santos, A., Ladero, M. and García-Ochoa, F. Kinetic model for the hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces Fragilis*. *Proceedings of the 7th Mediterranean Congress of Chemical Engineering*, Barcelona, 1996, 184

Santos, A., Ladero, M. and García-Ochoa, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces Fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, **22**, 558-567

Sanz, M.A., Luque, S., Berrueta, J. and Coca, J. Enzymatic membrane reactors in lactic acid esters production. (In: *Proceedings of Engineering with membranes. Vol. I*) 2001, 104-109

Shah, N.P., Spurgeon, K.R. and Gilmore, T.M. Use of dry whey and lactose hydrolysis in yogurt bases. *Milk Sci. Int.* 1993, **48**(9), 494-498

Sheldon, J.M., Reed, I.M. and Hawes, C.R. The fine structure of ultrafiltration membranes. Part 2. Protein fouled membranes. *J. Membrane Sci.* 1991, **62**, 87-102

Shin, H-J, Park, J-M and Yang, J-W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera Singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Proc. Biochem.* 1998, **33**(8), 787-792

Sims, K.A. and Cheryan, M. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, **39**, 960-967

Siso, M.I.G., Freire, A., Ramil, E., Belmonte, E.R., Torres, A.R. and Cerdán, E. Covalent immobilization of β -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Proc. Biochem.* 1994, **29**, 7-12

Snam Progetti S.p.A. Procedimiento para la escisión enzimática de la lactosa contenida en la leche o derivados de la misma. *Patente n° 31069 A/70* (Italia) 1970.

Sproull, S.D., Lim, H.C. and Schneider, D.R. A model for enzymatic isomerization of D-glucose to D-fructose in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, **18**, 633-648

Stellato, S., Portaccio, M., Rossi, S., Bencivenga, U., La Sala, G., Mazza, G., Gaeta, F.S. and Mita, D.G. A novel bioreactor operating under non-isothermal conditions. *J. Membrane Sci.* 1997, **129**, 175-184

Straatsma, J., Vellenga, K., De Wilt, H.G.J. and Joosten, G.E.H. Isomerization of glucose to fructose. 2. Optimization of reaction conditions in the production of high fructose syrups by isomerization of glucose catalyzed by a whole cell immobilized glucose isomerase catalyst. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 1983, **22**, 356-361

Sungur, S. and Yildirim, O. Batch and continuous hydrolysis of lactose using β -galactosidase immobilized on gelatin-CMC. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* 1999, **38**(4), 821-829

Szczodrak, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Penicillium notatum*. *Acta Biotechnol.* 1999, **19**, 235-250

Szczodrak, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 2000, **10**, 631-637

Takasaki, Y., Kosugi, Y. and Kanbayashi, C. Kinetic and equilibrium studies on D-glucose D-fructose isomerization catalyzed by glucose isomerase. *Agr. Biol. Chem. Tokyo.* 1969, **33**, 1527-1533

Taylor, D.G., Piret, J.M. and Bowen, B.D. Protein polarization in isotropic membrane hollow-fiber bioreactors. *AIChE J.* 1994, **40**(2), 321-333

Taylor, D.G. and Boukouris, D. Influencing hollow fiber bioreactor hydrodynamics through osmotic pressures – A model study. *Chem. Eng. Sci.* 1995, **50**(10), 1513-1517

Tu, W., Sun, S., Nu, S. and Li, X. Immobilization of β -galactosidase from *Cicer arietinum* (gram chicken bean) and its catalytic actions. *Food Chem.* 1999, **64**, 495-500

Vallat, I., Monsan, P. and Riba, J.P. Maltodextrin hydrolysis in a fluidized-bed immobilized enzyme reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, **28**, 151-157

Van der Padt, A., Sewalt, J.J.W., Agoston, S.M.I. and Van't Riet, K. *Candida rugosa* lipase stability during acylglycerol synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 1992, **14**, 805-812

Van Keulen, M.A., Vellenga, K. and Joosten, G.E.M. Kinetics of the isomerization of D-glucose into D-fructose catalyzed by glucose isomerase containing *Arthrobacter* cells in immobilized and non-immobilized form. *Biotechnol. Bioeng.* 1981, **23**, 1437-1442

Vasic-Racki, N., Pavlovic, N., Cizmek, S., Drazic, M. and Husadzic, B. Modeling of enzyme immobilization process on a porous support. *Bioproc. Eng.* 1991, **7**, 183-187

Virkkala, T. Hydrolysis of milk with Valio hydrolysis process. *Scand. Dairy Ind.* 1988, **3**, 43

Visuri, K. and Klivanov, A.M. Enzymatic production of high fructose corn syrup (HFCS) containing 55% fructose in aqueous ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, **33**, 1104-1110

Volkin, D.B. and Klivanov, A.M. Minimizing protein inactivation. In: *Protein Function: A practical approach* (Creighton, Ed.) Oxford University Press, 1989, 1-24

Vos, H.J., Zomerdijs, M., Groen, D.J. and Lluysen, K.C.A.M. Countercurrent multistage fluidized bed reactor for immobilized biocatalysts: I. Modeling and simulation. *Biotechnol. Bioeng.* 1990, **36**, 377-382

Walsh, M.K. and Swaisgood, H.E. Characterization of a chemically conjugated β -galactosidase bioreactor. *J. Food Biochem.* 1993, **17**, 283-292

Werner, W., Rey, H.G. and Wielinger, H. Properties of a New Chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD method. *Anal. Chem.* 1970, **252**, 224-228

Wojciechowski, P.W. and Brash, J.L. A computer simulation for the study of macromolecular adsorption with special applications to single-component protein adsorption. *J. Colloid Interf. Sci.* 1990, **140**(1), 239-252

Yang, S-T. and Okos, M.R. A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten-type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1989a, **34**, 763-773

Yang, S-T and Okos, M.R. Effects of temperature on lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase in plug reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1989b, **33**, 873-885

Yang, S-T, Marchio, J.L. and Yen, J-W A dynamic light scattering study of β -galactosidase: environmental effects on protein conformation and enzyme activity. *Biotechnol. Prog.* 1994, **10**, 525-531

Zadow, J.G. Lactose hydrolysis. In: *Whey and lactose processing*. (Zadow, J.G., Ed.). Elsev. Appl. Sci., NY and London, 1992, 361-408

Zale, S. and Klibanov, A.M. On the role of reversible denaturation (unfolding) in the irreversible thermal inactivation of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 1983, **25**, 2221-2230

Zhou, Q.Z.K. and Chen, X.D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.* 2001a, **9**, 33-40

Zhou, Q.Z.K. and Chen, X.D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J. Food Eng.* 2001b, **48**, 69-74

Direcciones web de interés consultadas:

* www.enzbank.com

* www.pir.georgetown.edu



Biblioteca Universitaria de Granada



01052465