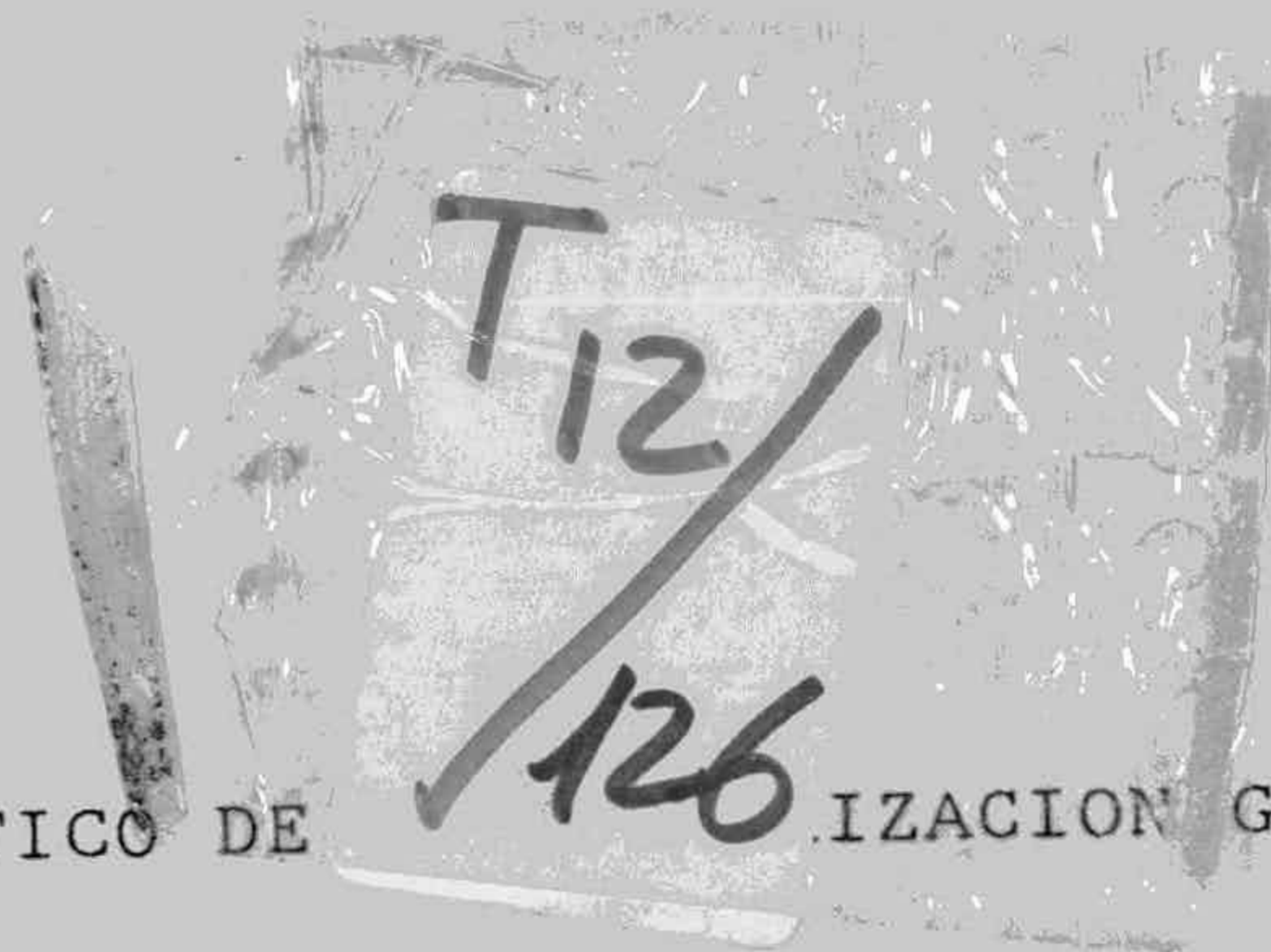


UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Ingeniería Química



ESTUDIO CINETICO DE T12 / 126 IZACION GLUCOSA-FRUCTOSA

TESIS DOCTORAL

Nicolás Cruz Pérez

Granada, 1995



PROV. T-15/127

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 23-05-95
ENTRADA NUM. 1145

Departamento de Ingeniería Química

ESTUDIO CINETICO DE LA ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA

TESIS DOCTORAL

Nicolás Cruz Pérez

Granada, 1995

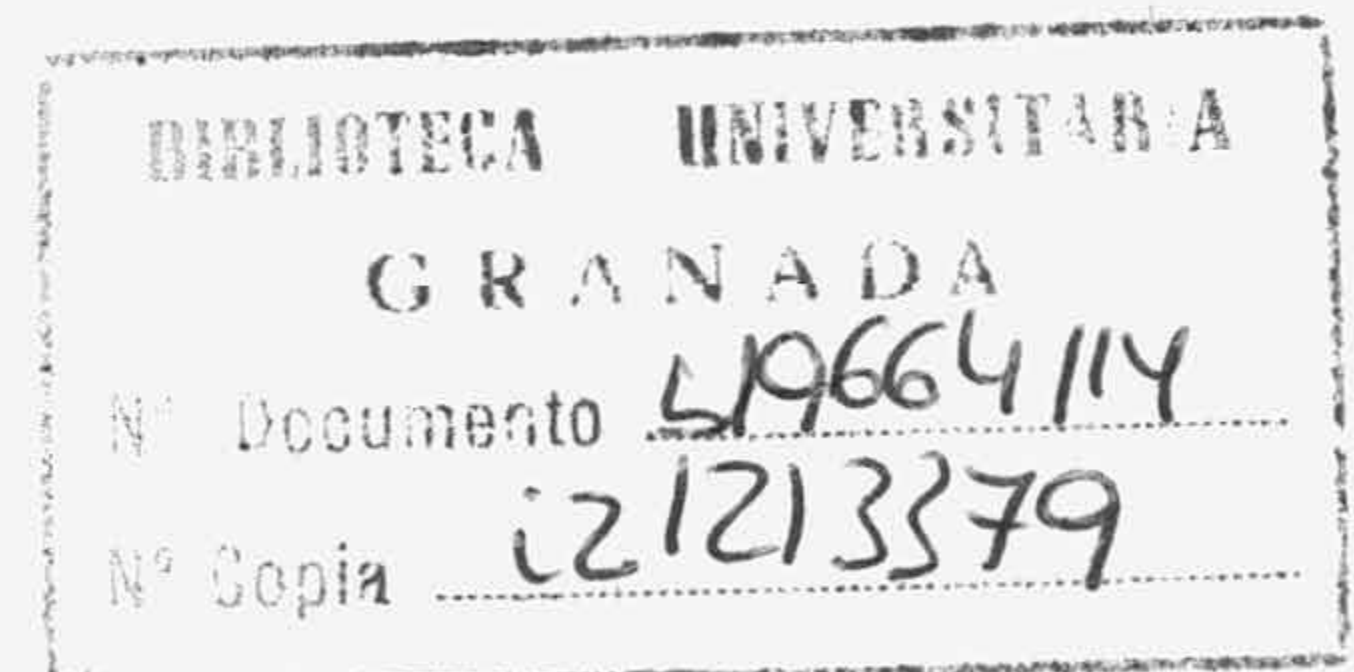
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ingeniería Química

T
12
126

Tesis Doctoral

ESTUDIO CINETICO DE LA ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA



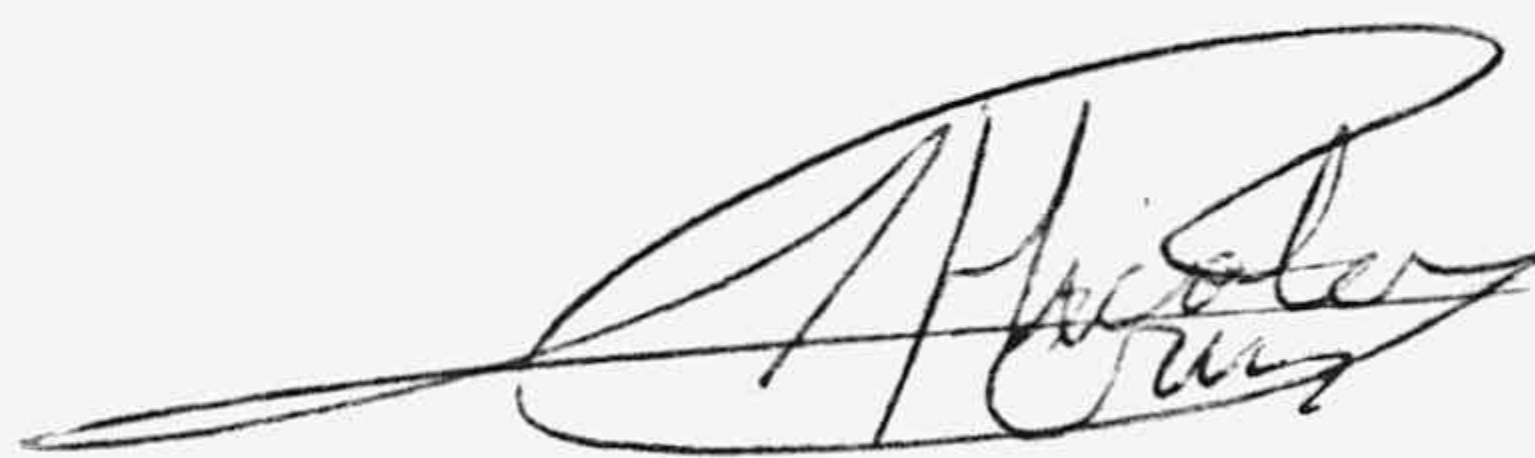
NICOLAS CRUZ PEREZ

MAYO, 1995

ESTUDIO CINETICO DE LA ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA

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

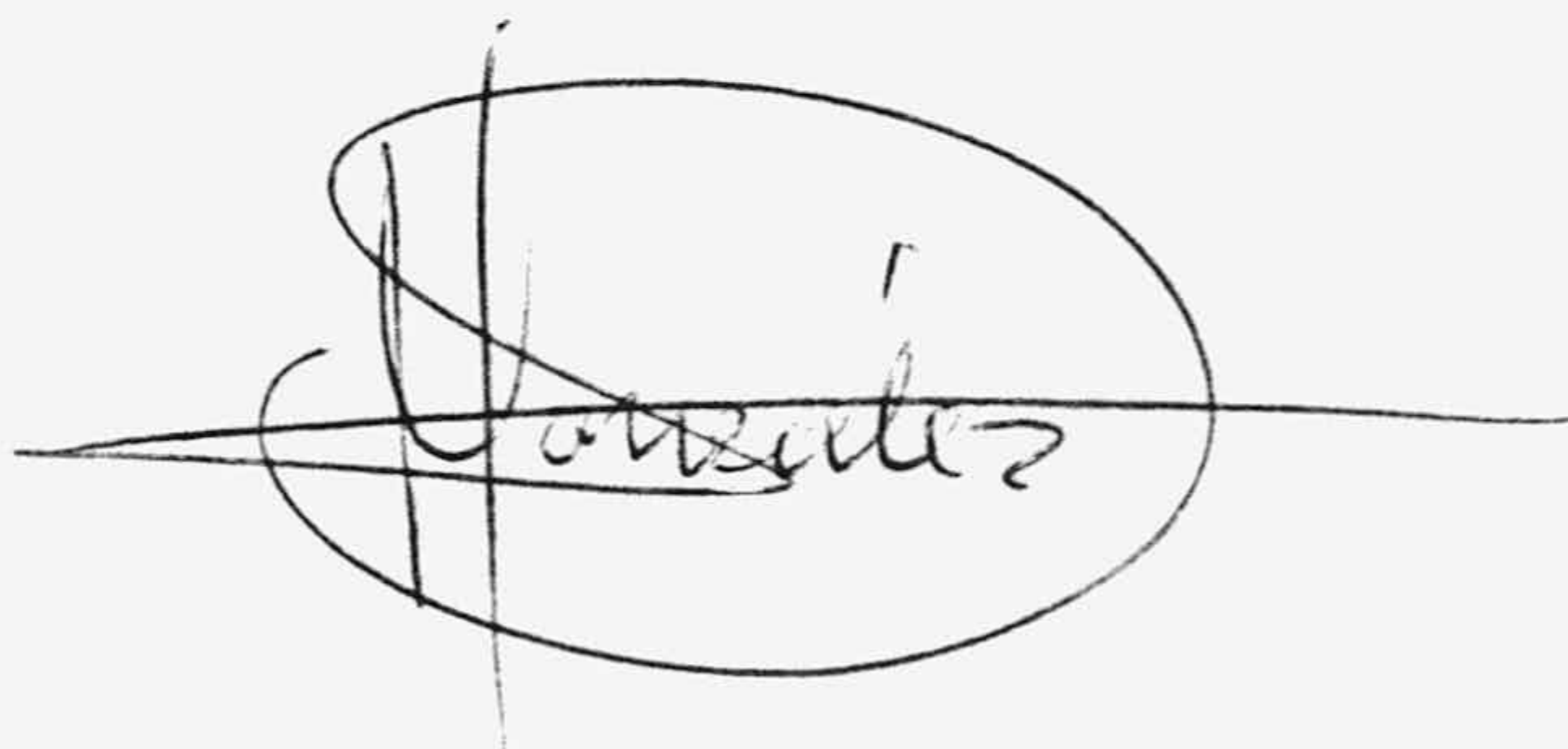
Granada, 23 de Mayo de 1995



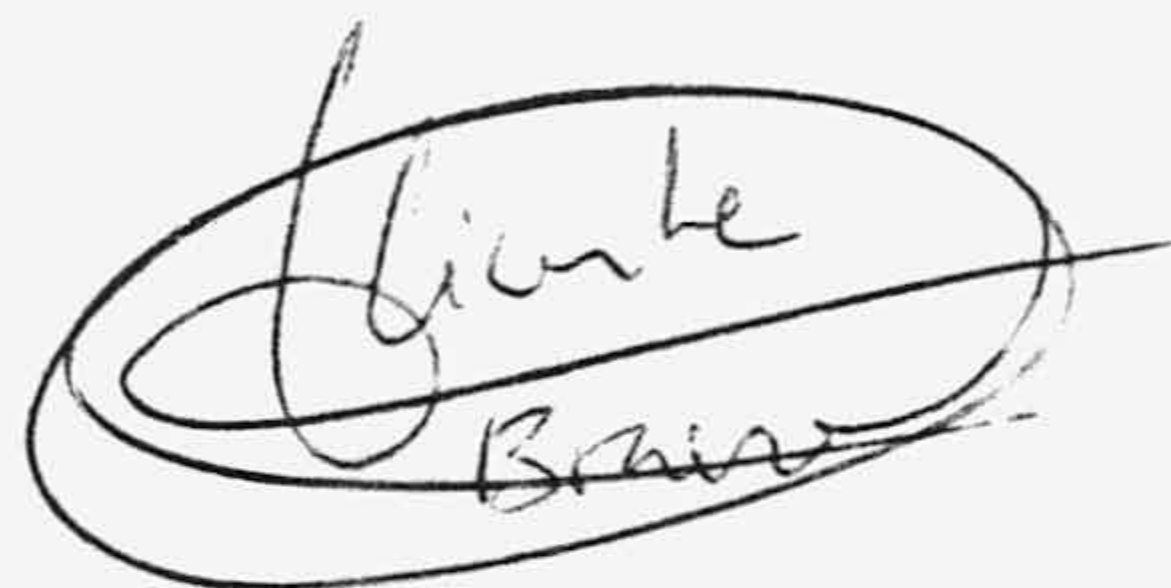
Fdo.: Nicolás Cruz Pérez

PEDRO GONZALEZ TELLO, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre.


CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Estudio cinético de la isomerización glucosa-fructosa" ha sido realizado en los laboratorios de la Escuela Universitaria Politécnica de Linares bajo la dirección del Dr. D. Vicente Bravo Rodriguez y la Dra. D^a Encarnación Jurado Alameda, por el Licenciado D. Nicolás Cruz Pérez.



LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dr.D.Vicente Bravo Rodriguez
Catedrático de Ingeniería
Química



Dra.D^aEncarnación Jurado Alameda
Profesora Titular de Ingeniería
Química

Sección Jurado
Titular de
Química

Deseo expresar mi agradecimiento:

A D. Vicente Bravo Rodriguez y D^a Encarnación Jurado Alameda por su estímulo, enseñanzas, gran dedicación y acertada dirección en la realización de esta Memoria.

A D. Fernando Camacho Rubio por sus consejos y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de los Departamentos de Química Inorgánica, Biología Vegetal, Microbiología y del Servicio de Análisis de Imágenes por su colaboración en las técnicas de porosimetría y análisis de imágenes.

A D. Germán Luzón González por su inestimable apoyo, consejos y paciencia durante los años de experimentación.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, y en definitiva a todos aquellos que me han ayudado y aconsejado durante la preparación de la presente Memoria, y que han contribuido de alguna manera, siempre desinteresadamente, a la realización de la misma.

A mi esposa e hijas.

A mis padres.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	7
2.1 Introducción	9
2.1.1 Estructura de glucosa, fructosa y almidón	11
2.1.2 Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática	16
2.1.3 Producción de jarabes de glucosa	18
2.1.4 Producción de jarabes de fructosa	23
2.2 Glucosa isomerasa	30
2.2.1 Producción de glucosa isomerasa	30
2.2.2 Condiciones de operación	33
2.2.3 Mecanismo de reacción	37
2.3 Inmovilización de enzimas	40
2.3.1 Métodos de inmovilización de enzimas	40
2.3.2 Soportes empleados en inmovilización	50
2.3.3 Inmovilización de la enzima glucosa-isomerasa	53
2.3.4 Efecto de la inmovilización sobre la cinética y las propiedades enzimáticas	54
2.4 Estudios cinéticos de la isomerización enzimática de glucosa a fructosa	55
3. TECNICA EXPERIMENTAL	79
3.1 Productos utilizados	81
3.2 Métodos de análisis	82

3.2.1	Análisis polarimétrico de glucosa y fructosa	82
3.2.2	Análisis enzimático de glucosa	85
3.3	Equilibrio de isomerización	87
3.4	Experimentos de isomerización	89
3.4.1	Experimentos de isomerización no enzimáticos	90
3.4.2	Experimentos de isomerización enzimáticos	90
3.5	Características de la enzima	94
3.5.1	Clasificación granulométrica	94
3.5.2	Actividad enzimática	95
3.5.3	Penetración de mercurio	100
3.5.4	Tratamiento de imágenes	110
4.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	117
4.1	Equilibrio de isomerización glucosa-fructosa	119
4.2	Isomerización glucosa-fructosa no enzimática	123
4.3	Isomerización enzimática fructosa-glucosa	132
5.	DISCUSION DE LAS RESULTADOS	143
5.1	Equilibrio de isomerización	145
5.2	Reacción de isomerización no enzimática	151
5.2.1	Método diferencial con análisis por polarimetría	151
5.2.2	Método diferencial con análisis enzimático	158
5.2.3	Método integral	164
5.3	Reacción enzimática	174

5.3.1	Influencia del transporte externo	174
5.3.2	Influencia del acondicionamiento con ión cobalto	175
5.3.3	Influencia del transporte interno	179
5.3.4	Experimentos cinéticos con enciam acondicionada	180
5.4	Modelo cinético	184
5.5	Desactivación enzimática	194
5.5.1	Experimentos con enzima sin acondicionar	198
5.5.2	Experimentos con enzima acondicionada con ión cobalto	201
5.6	Constantes cinéticas de isomerización	207
5.7	Transporte interno	208
5.8	Influencia del acondicionamiento con cobalto	214
6.	CONCLUSIONES	219
7.	NOMENCLATURA	225
8.	BIBLIOGRAFIA	231

1. RESUMEN.

La isomerización de glucosa a fructosa es uno de los procesos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria para la preparación de edulcorantes. La tendencia del mercado actual con respecto a la fabricación de productos dietéticos y bebidas "light" va a hacer que se incremente notablemente la producción de jarabes ricos en fructosa dadas sus características: Un mayor poder edulcorante; jarabes de alto poder higroscópico; color claro y baja viscosidad y el hecho de que la fructosa se absorba más lentamente que la glucosa y que se metaboliza sin intervención de la insulina.

Sin embargo, actualmente estos jarabes son obtenidos a partir de cereales y por tanto, dentro de la Comunidad Económica Europea que es un importador de cereales y un exportador de azúcar, estos procesos no pueden competir favorablemente con la producción de azúcar por otras vías, por tanto es necesario desarrollar y mejorar los procesos de obtención y buscar otras fuentes de producción.

En este sentido se ha estudiado la isomerización de glucosa->fructosa utilizando un reactor homogéneo perfectamente agitado con y sin la presencia de la enzima glucosa isomerasa sweetzyme A inmovilizada suministrada por Novo.

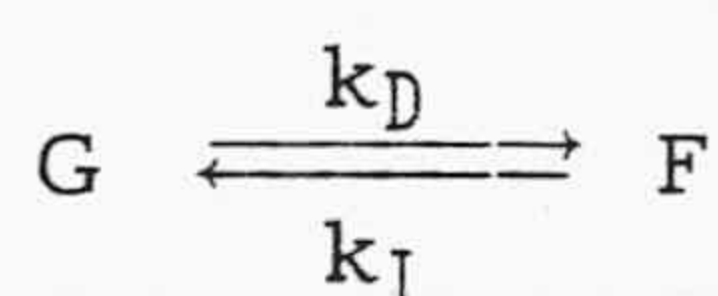
En primer lugar se estudió el equilibrio de isomerización encontrándose que la constante de equilibrio puede expresarse en función de la temperatura mediante la ecuación

$$K_e = 24.5 \exp \left(- \frac{1022}{T} \right)$$

que indica un calor de reacción para esta isomerización de 8.50 KJ/mol, la comparación de estos resultados con los publicados en la Bibliografía indica que

esta ecuación es válida en el intervalo de 30 a 80°C, pH de 6.5 a 8.5 y concentración total de hexosas desde dilución infinita hasta 3.4 M.

La reacción de isomerización no enzimática se llevo a cabo en los dos sentidos y la cinética se ha seguido polarimétricamente y enzimáticamente mediante el método de la glucosa oxidasa propuesta por Werner y col. (1970). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que esta reacción sigue una cinética de primer orden en ambos sentidos, las constantes cinéticas para la reacción

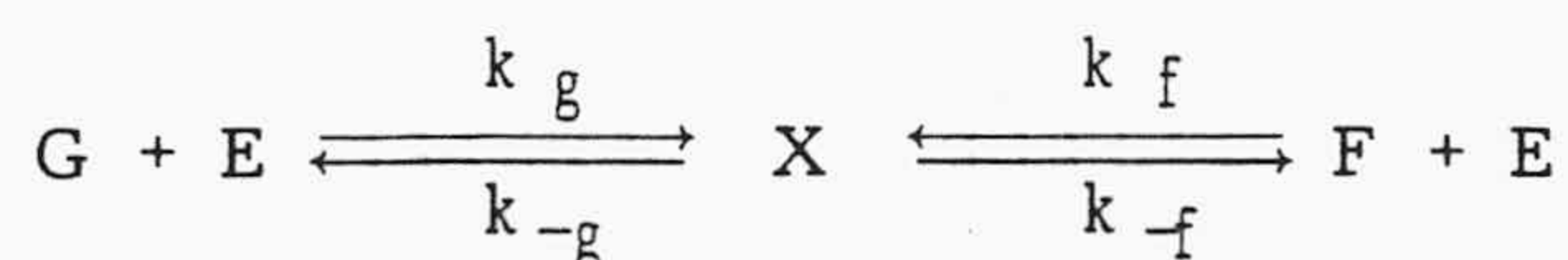


han resultado ser

T, °C	k_I, h^{-1}	k_D, h^{-1}
40	$8.28 \cdot 10^{-5}$	$7.35 \cdot 10^{-5}$
50	$4.00 \cdot 10^{-4}$	$4.15 \cdot 10^{-4}$
60	$1.15 \cdot 10^{-3}$	$1.31 \cdot 10^{-3}$

que determinan unas energías de activación de 110 y 118 KJ/mol para las reacciones inversa y directa, respectivamente.

Los resultados cinéticos obtenidos a la temperatura de 60°C, cuando se utilizaba la enzima sweetzyme A se han llevado a cabo siempre partiendo de fructosa y son consistentes con el siguiente modelo cinético



aunque en el intervalo investigado 60°C, concentración total de hexosas comprendidas entre 0.1 a 2.0 M y pH= 8.5, la ecuación cinética corresponde a

una ecuación de pseudoprimer orden, lo que indica que las constantes cinéticas elementales k_f y k_g son prácticamente iguales, así como las constantes de Michaelis-Menten K_{mf} y K_{mg} con las que están relacionadas.

Se ha comprobado experimentalmente que la velocidad de reacción es independiente de la agitación mantenida dentro del reactor por encima de 200 rpm, lo que parece indicar que a partir de esa velocidad la influencia del transporte interno es despreciable.

Los experimentos cinéticos realizados con distintos tamaños de enzima han puesto de manifiesto la existencia de efectos difusionales internos para tamaños de partícula superiores a 0.297 mm, lo que ha permitido determinar a partir del factor de efectividad y el módulo de Thiele para una reacción de pseudoprimer orden la difusividad efectiva de la fructosa en las partículas de la enzima sweetzyme A que ha resultado ser de $3.36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, resultado que esta de acuerdo con los obtenidos por distintos autores para glucosa y utilizando enzimas inmovilizadas en la matriz de un gel, procedimiento utilizado para la enzima sweetzyme A.

Las medidas de actividad realizadas con sweetzyme A han puesto de manifiesto que ésta se desactiva con el tiempo de almacenamiento, permaneciendo su actividad constante si se almacena a 4°C durante un mes aproximadamente.

El acondicionamiento de la enzima sweetzyme A con ión cobalto ha puesto de manifiesto por un lado un aumento considerable de la velocidad de reacción, siendo la constante cinética de pseudoprimer orden para la reacción de isomerización fructosa \rightarrow glucosa 0.00339 y 0.00867 L/g.h respectivamente, antes y después del acondicionamiento una vez se han eliminado el efecto de la desactivación enzimática y el transporte interno. Por otro lado, el acondicionamiento de la enzima, produce una estabilización de ésta en cuanto que su actividad permanece constante durante el tiempo de isomerización después del acondicionamiento.

Los experimentos cinéticos realizados variando la concentración de enzima indican que ésta se desactiva con el tiempo de isomerización y con la concentración de enzima utilizada cuando no esta acondicionada, siguiendo la desactivación una cinética de primer orden. Cuando la enzima esta acondicionada con ión cobalto la desactivación enzimática parece ser sólo función de la concentración enzimática utilizada. En ambos casos se evalúan dos factores de eficacia que permiten eliminar el efecto de esta desactivación y determinar las constantes cinéticas de pseudoprimer orden para la isomerización fructosa→glucosa libre de estos efectos a la temperatura de 60°C.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1 INTRODUCCION.

Hay pocas áreas en la industria de alimentos que hallan progresado más rápidamente que la industria de los jarabes de glucosa y fructosa. El conocimiento de que el almidón se podía convertir en azúcares por calentamiento con ácidos diluidos se tenía desde hace más de 165 años, pero no se había aplicado desde el punto de vista industrial. Fue el descubrimiento y aplicación de la enzima glucosa isomerasa en 1950 lo que ha permitido el desarrollo de la industria de los edulcorantes a gran velocidad, produciéndose actualmente jarabes de glucosa-fructosa con distintos porcentajes de estos azúcares a partir de almidón de maíz, que son destinados a uso industrial principalmente.

En la Tabla 2.1 se muestra la evolución del consumo de edulcorantes en distintos países hasta 1985, observándose un notable incremento del consumo de los jarabes de fructosa y glucosa en función del tiempo; en la Comunidad Económica Europea sin embargo, la facilidad para producir jarabes de glucosa y fructosa está limitada en cuanto que Europa es un importador de cereales y un exportador de azúcar, obtenida de caña de azúcar y remolacha fundamentalmente, así el mercado de edulcorantes líquidos en Europa (1980), comprendía sólo el 15% del uso industrial, y entre el 5-6% del mercado total de edulcorantes producidos, en contraste con el obtenido por Estados Unidos, en ese mismo año, que comprendió el 47% del uso industrial, y cerca del 33% respecto al mercado total. Sin embargo, la tendencia del mercado actual para la fabricación de productos dietéticos y bebidas "light" va a hacer que se incremente notablemente la producción de estos jarabes, dadas sus características, indicadas en la Tabla 2.2, y aunque estos jarabes en algunas aplicaciones comerciales pueden competir favorablemente con la producción de azúcar por otras vías, es

necesario desarrollar y mejorar sus procesos de obtención e intentar encontrar otras fuentes de producción, especialmente en aquellos países donde la producción de maíz es limitada.

TABLA 2.1

CONSUMO DE EDULCORANTES

(Millones de toneladas de materia prima en base seca)

País	Edulcorante	1970	1975	1980	1985
EE.UU.	Sacarosa	10.13	9.30	9.98	10.44
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.45	1.80	2.40
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	1.73	2.30	2.13	2.16
Canadá	Sacarosa	1.05	1.05	1.16	1.21
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	-	0.05	0.12
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.18	0.20	0.21	0.24
CEE	Sacarosa	10.50	10.00	10.96	11.47
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	-	0.30	0.40
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.80	1.10	1.14	1.24
Japón	Sacarosa	3.00	2.80	3.04	3.33
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.05	0.33	0.45
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.80	1.10	1.14	1.24
Total	Sacarosa	24.68	23.15	25.14	26.44
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.50	2.48	3.37
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	3.06	4.15	3.99	4.21

TABLA 2.2
CARACTERISTICAS Y APLICACIONES DE
LOS JARABES RICOS EN FRUCTOSA

Característica	Aplicación
Poder edulcorante de la fructosa más elevado que glucosa y sacarosa	Fabricación de alimentos dietéticos
La fructosa se absorbe más lentamente que la glucosa y se metaboliza sin intervención de la insulina	Fabricación de alimentos para diabéticos
Jarabes con gran poder higroscópico	Panadería y bollería
Color claro y viscosidad baja	Bebidas refrescantes

2.1.1 Estructura de glucosa, fructosa y almidón.

La glucosa y fructosa se encuentran de forma abundante en la naturaleza como azúcares libres Tabla 2.3, combinadas juntas en la sacarosa y polimerizadas en sustancias de reserva como almidón, glucógeno e inulina. También, y de forma más abundante se encuentra en la celulosa, de las plantas superiores, pero en este caso es menos accesible porque está asociada con la lignina.

La glucosa puede existir en cualquiera de las tres formas cristalinas en las que está presente como anillo de piranosa: α -D glucosa anhidra; α -D glucosa monohidrato y β -D glucosa anhidra. Las propiedades físicas de esas tres formas son diferentes y se muestran en la Tabla 2.4. En disolución, la mutarrotación ocurre para dar una mezcla de equilibrio que a 25°C contiene cerca del 62% de la forma β .

TABLA 2.3

AZUCARES LIBRES EN FRUTAS Y VEGETALES COMO PORCENTAJE EN BASE FRESCA, Bucke (1979)

Fruta	Sólidos totales, %	Glucosa %	Fructosa %	Sacarosa %	Maltosa %
Manzana	15.96	1.17	6.04	3.78	trazas
Albaricoque	14.44	1.73	1.28	5.84	
Zarzamora	15.28	2.48	2.15	0.59	0.66
Arándano	15.89	3.76	3.82	0.19	0.08
Pasa	15.68	3.33	3.68	0.95	0.64
Grosella	14.81	3.29	3.90	1.21	
Uva (<i>Vitis labruscana</i>)	19.13	6.86	7.84	2.25	1.58
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	17.97	5.35	5.33	1.32	2.19
Melocotón	12.79	0.91	1.18	6.92	0.12
Pera	13.58	0.95	6.77	1.61	0.31
Ciruela	17.97	3.49	1.53	4.94	0.15
Frambuesa (roja)	20.67	2.40	1.58	3.68	
Frambuesa (negra)	28.22	4.56	4.84	1.90	
Cereza (agria)	15.05	4.30	3.28	0.40	
Cereza (dulce)	22.39	6.49	7.38	0.22	
Fresa	9.45	2.09	2.40	1.03	0.07
Remolacha	11.19	0.18	0.16	6.11	
Zanahoria	12.00	0.85	0.85	4.24	
Pepino	3.46	0.86	0.86	0.06	
Lechuga	4.97	0.25	0.46	0.10	
Melón	12.74	2.56	2.62	5.86	
Ruibarbo	6.20	0.42	0.39	0.09	
Tomate	5.23	1.12	1.34	0.01	

TABLA 2.4
PROPIEDADES FISICAS DE D-GLUCOSA Y D-FRUCTOSA

Propiedad	α -D-Glucosa	α -D-Glucosa monohidrato	β -D-Glucosa	β -D-Fructosa
Peso molecular	180.16	198.16	180.16	180.16
Punto de fusión, °C	146	83	150	104
Solubilidad a 25°C ^a	62	30.2	72	
(% en peso)	(51.2)	(51.2)	(51.2)	(80)
Rotación específica ^a	112.2°	112.2°	18.7°	-135°
(α_D^{20})	(52.70)	(52.70)	(52.70)	(-92)
Calor de disolución a 25°C (cal/g)	-14.2	25.2	-6.2	

^a Los valores entre paréntesis son después de la mutarrotación.

La fructosa cristaliza como la forma anhidra piranosa de β -D fructosa pero en solución, mutarota y la mezcla de equilibrio contiene también el 30% de la forma furanosa a 25°C.

El almidón, después de la celulosa, es la principal sustancia de tipo glucídico sintetizada por los vegetales superiores a partir de la energía solar, y es el constituyente fundamental de los cereales, pero también se encuentra en algunos tubérculos y leguminosas. En la Tabla 2.5 se indican las composiciones en almidón de algunas de estas especies, (Mercier, 1982 y Vian, 1976). El almidón está presente en cereales, tubérculos y leguminosas en forma de pequeños gránulos dispersos en la matriz proteica de la célula. Estos gránulos cuando se extraen de la planta tienen el aspecto de un polvo blanco, insoluble en agua fría y poseen una estructura física organizada en zonas amorfas y cristalinas, debido a la asociación intermolecular de los dos principales constituyentes del almidón, amilosa y amilopectina.

TABLA 2.5
 CONTENIDO EN ALMIDÓN DE ALGUNOS CEREALES,
 TUBERCULOS Y LEGUMINOSAS,
 Mercier (1982) Y Vian (1976).

Tubérculos	Almidón % M.S.	Leguminosas	Almidón % M.S.	Cereales	Almidón % M.S.
Patata	65-85	Judías	30-35	Avena	63-67
Ñame	68-83	Lentejas	55-68	Trigo	67-69
Mandioca	85-87	Guisantes	38-43	Maíz	71-74
Boniato	69-72	Habas	30-43	Arroz	75-88
				Cebada	65-68

La amilosa está constituida por una cadena lineal formada por unidades de glucosa anhidra unidas por enlaces $\alpha(1-4)$; representa entre el 15% y el 25% de los hidratos de carbono totales en los cereales y en los tubérculos y su grado de polimerización está comprendido entre 200 y 6000. En cambio, la amilopectina es una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa anhidra están ligadas por enlaces $\alpha(1,4)$ cuando forman parte de cadenas lineales y por $\alpha(1,6)$ si actúan como nexo de unión entre dos cadenas para formar ramificaciones (los enlaces $\alpha(1,6)$ representan entre el 5% y el 10% de los enlaces totales, aproximadamente una ramificación $\alpha(1,6)$ cada 20-30 unidades de monómero en el polímero principal). Esta sustancia tiene un peso molecular mucho más alto que la amilosa, ya que su grado de polimerización está comprendido entre 10^5 y 10^9 . En la Figura 2.1 se indica la estructura de estas macromoléculas.

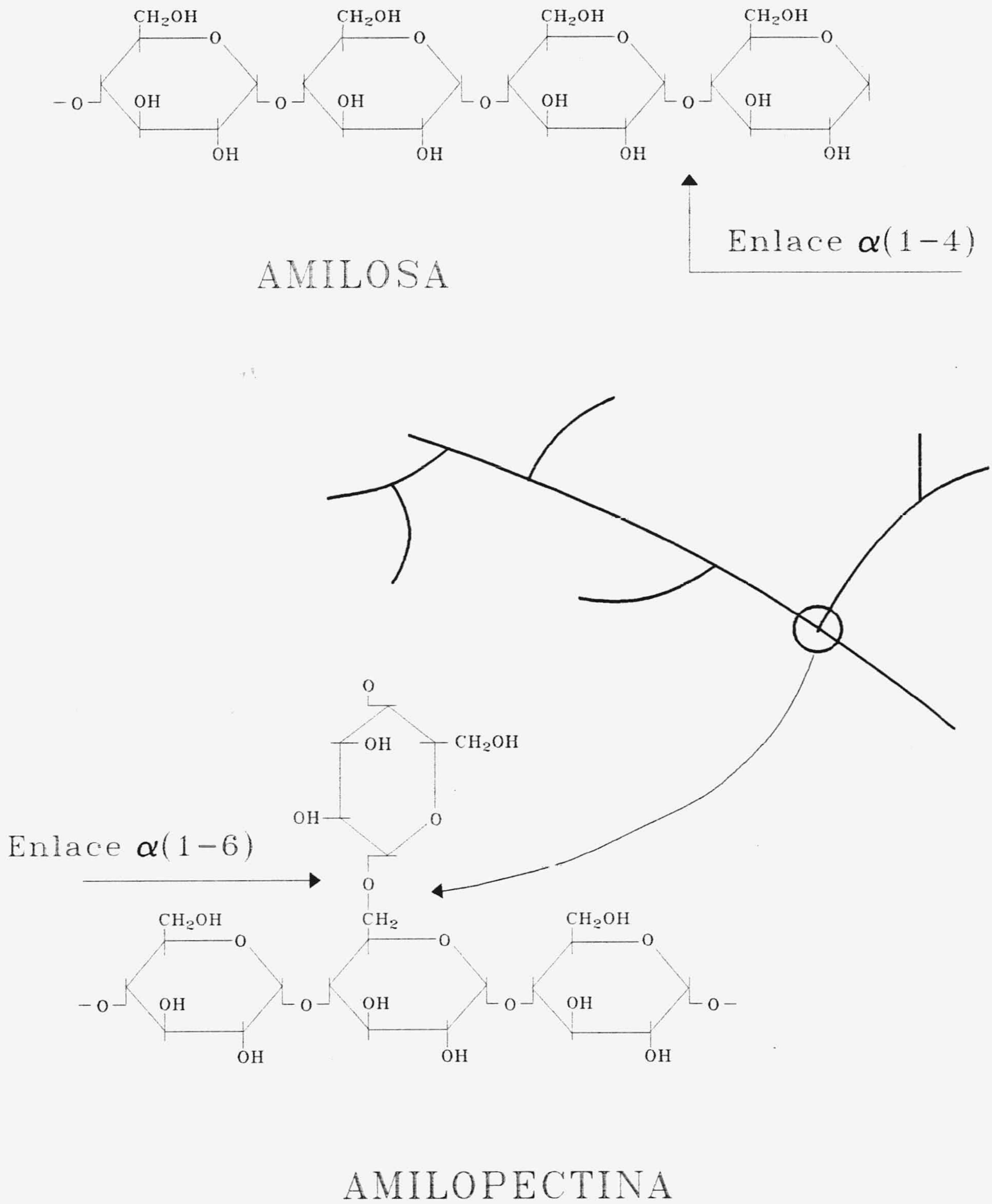


Figura 2.1. Estructura de amilosa y amilopectina.

2.1.2 Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del almidón.

Si tenemos en cuenta la estructura del almidón, para realizar la hidrólisis enzimática de éste, se comprende que es necesario utilizar enzimas específicas para los enlaces $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-6)$ y/o $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$. Dentro de las enzimas específicas del enlace $\alpha(1-4)$, las más importantes son las amilasas (α -amilasas y β -amilasas). La α -amilasa se caracteriza por hidrolizar al azar las cadenas de amilosa y amilopectina, produciendo en el primer caso maltosa y glucosa y en el segundo, además de las sustancias anteriores, cadenas más o menos ramificadas (dextrinas), ya que estas enzimas no hidrolizan los enlaces $\alpha(1-6)$. Las α -amilasas atacan las cadenas de almidón al azar y pueden clasificarse, por tanto, como endoenzimas.

Estas endoenzimas, que producen dextrinas, son las más utilizadas en la Industria Alimentaria y conducen a unos oligosacáridos (2 a 7 unidades de glucosa) ramificados o lineales, conocidos comercialmente como maltodextrinas o jarabes de glucosa. El grado de dextrinificación o hidrólisis se suele expresar mediante el concepto de dextrosa equivalente (D.E.) que corresponde al número de grupos reductores liberados/100 g de materia seca. Así, en la práctica, el término jarabe de dextrinas se aplica a los productos con D.E. comprendida entre 3 y 20 y jarabe de glucosa cuando D.E. > 20.

Las β -amilasas son exoenzimas que atacan a las cadenas de almidón por sus extremos no reductores liberando maltosa; la acción de esta enzima se bloquea cuando encuentra un enlace $\alpha(1-6)$ y son bastante menos utilizadas que las α -amilasas. Se obtienen a partir de *B. polymixa*, *B. megaterium*, *B. cereus* y ciertas especies de *Streptomyces* y *Pseudomonas*, Mercier (1982).

En el grupo de las enzimas específicas del enlace $\alpha(1-6)$ se encuentran la pululanasa y la isoamilasa. La primera de ellas, descubierta en 1961 en cultivos de *Enterobacter aerogenes*, *Echeriquia intermedia*, *Streptococcus mitis* y ciertas especies de *Streptomices*, hidroliza fácilmente la amilopectina del almidón, pero sin embargo no puede romper un enlace $\alpha(1-6)$ que una un solo residuo

anhidro-glucosado en una cadena de residuos unidos por enlaces $\alpha(1-4)$, lo que explica que su sustrato más pequeño sea la 6-maltosil-maltosa.

La isoamilasa es una enzima complementaria de la pululanasa que se obtiene de cultivos de *Pseudomonas* y *Cytophaga*. Es específica para los enlaces $\alpha(1-6)$, y su sustrato más pequeño es la 6-d-D-maltotriosil-maltosa. Tanto la pululanasa como la isoamilasa, o ambas, completan la acción de las α y β -amilasas cuando actúan sobre el almidón solubilizado; este hecho hace que se haya intentado utilizarlas para la producción industrial de maltosa y/o jarabes ricos en maltosa, ya que liberan como mínimo maltosa y maltotriosa, respectivamente, Mercier (1982) y Ducroo (1982).

Las enzimas que atacan tanto a los enlaces $\alpha(1-4)$ como los $\alpha(1-6)$ son las amiloglucosidasas o glucoamilasas. Proviene de microorganismos del género *Rhizopus* y *Aspergillus*, y se caracterizan por hidrolizar la amilosa y la amilopectina liberando D-glucosa, Mercier (1982) y Ducroo (1982). Estas enzimas se unen más fácilmente a las cadenas largas que a las cortas e hidrolizan antes los enlaces $\alpha(1-4)$ que los enlaces $\alpha(1-6)$. Sin embargo, industrialmente es aconsejable un tratamiento previo con α -amilasas para solubilizar el almidón a dextrinas y, por tanto, que las glucoamilasas puedan catalizar la hidrólisis posterior en fase homogénea o inmovilizadas. En la Tabla 2.6 se indica el origen y algunas de las condiciones de operación óptimas para las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del almidón.

La glucosa comercial es producida, generalmente por la hidrólisis del almidón utilizando ácidos, enzimas o ambos; la fructosa se obtiene a partir de la hidrólisis de sacarosa; a partir de la glucosa, por isomerización alcalina o enzimática y también por hidrólisis de la inulina. Los jarabes de glucosa, maltosa, fructosa y oligosacáridos de mayor peso molecular se obtienen por hidrólisis del almidón y son ampliamente utilizados en la industria de alimentos. A continuación se desarrollan los principales procesos industriales para la obtención de estos edulcorantes.

TABLA 2.6
 CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES DE LAS ENZIMAS UTILIZADAS EN LA
 HIDROLISIS DEL ALMIDON, MERCIER (1982)

Enzima	Origen	pH	Tipo de enlace	Tipo de ataque	Productos Amilosa	terminales Amilopectina
α -amilasa	A. oryzae	6.0	$\alpha(1-4)$	endo	glucosa	dextrinas
E.C.3.2.1.1	B. subtilis	6.5			maltosa	
	B. licheniformis					
β -amilasa	Microbiano	5.0	$\alpha(1-4)$	exo	maltosa	maltosa
E.C.3.2.1.2		7.5			glucosa	dextrinas
Pululanasa	Microbiano	6.0	$\alpha(1-6)$	endo	ninguno	cadena lineales
E.C.3.2.1.41						
Isoamilasa	Microbiano	3.5	$\alpha(1-6)$	endo	ninguno	cadena lineales
E.C.3.2.1.68						
Amiloglucosidasa	Microbiano (Rhizopus	4.5	$\alpha(1-4)$	exo	glucosa	glucosa
E.C.3.2.1.3	y Aspergillus)		$\alpha(1-6)$			
Isomerasa	B. coagulans	8.2	isomerización		glucosa	y fructosa
E.C.3.5.1.5	S. violaceo niger					

2.1.3 Producción de jarabes de glucosa.

En teoría es posible hidrolizar completamente el almidón para producir sólo glucosa, pero en la práctica debido a las propiedades y estructura de la amilosa y amilopectina del almidón, las altas temperaturas que requiere el proceso y la reactividad de la glucosa producida, el máximo DE conseguido en los procesos industriales no alcanza a DE = 97, y aun más bajo cuando se utilizan ácidos para iniciar la hidrólisis.

El proceso convencional para la obtención de monohidrato de glucosa es el esquematizado en la Figura 2.2, Bucke (1979). Un "slurry" de almidón obtenido por molturación húmeda y que contiene un 30-40% de sólidos se acidifica en un reactor a presión hasta un pH = 1.8 y se mantiene a 160°C, siendo el tiempo de residencia lo que determina la conversión. El hidrolizado de

almidón obtenido del reactor es un líquido turbio amarillento que es neutralizado hasta pH = 4.5 (punto isoeléctrico del conjunto de proteínas presentes). Las proteínas precipitadas son filtradas y/o centrifugadas para quitarlas del medio, junto con las grasas; las trazas de color se eliminan con carbón activo o resinas de intercambio iónico. El jarabe se concentra hasta un 80% en sólidos siendo el producto final un jarabe muy viscoso y sin color; a partir de este jarabe, una vez enfriado a 40-45°C y por cristalización durante 4-5 días se obtiene el monohidrato de glucosa, Figura 2.2.

Los jarabes obtenidos por hidrólisis ácida no superan el contenido de DE de 55, presentan un color elevado y sabor picante. Por otra parte, la acción catalítica no específica del ataque ácido produce además hidrolizados de un amplio rango de pesos moleculares, Tabla 2.7, existen pérdidas de glucosa y como consecuencia de la neutralización posterior el jarabe queda con un gran contenido en sales que hay que eliminar.

TABLA 2.7

AZUCARES PRODUCIDOS EN HIDROLISIS ACIDA, Buke (1979).

Componente	Dextrosa equivalente			
	Muy bajo (25)	Bajo (35)	Regular (42)	Alta (55)
Glucosa	7	14	21	32
Maltosa	8	12	15	19
Maltotriosa	11	11	10	13
Azúcares pesados y dextrinas	74	63	54	36

Para obtener jarabes con un contenido más elevado en DE de 93-94, es preciso añadir la enzima amiloglicosidasa después de haber conseguido un contenido en DE de 15 con el ataque ácido, Figura 2.2.

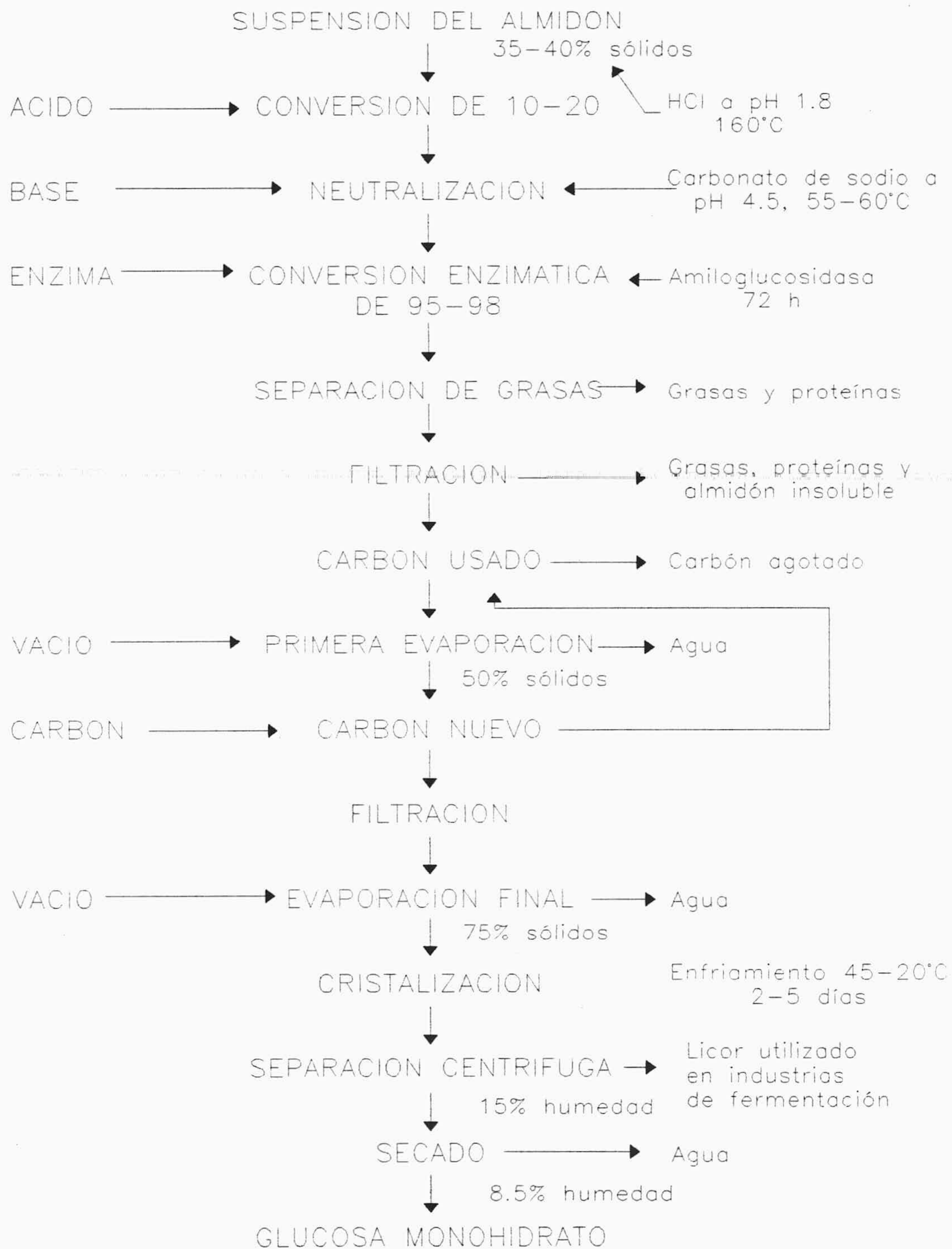


Figura 2.2. Obtención de glucosa.

Otro proceso industrial ampliamente utilizado para la obtención de jarabes de glucosa se esquematiza en la Figura 2.3, Joglekar *et al.* (1979), Bucke (1979), Reilly (1985), la hidrólisis del almidón para obtener jarabe de glucosa, D.E. > 20, se lleva a cabo en dos etapas; en la primera de ellas se realiza la solubilización parcial del almidón por efecto combinado de la temperatura (gelatinización a 85 - 140 °C) y de la α -amilasa termoestable del *B. licheniformis*, que conduce a la formación de maltodextrinas (licuación). La segunda etapa es la llamada sacarificación, en la cual, las amiloglicosidasas (por ejemplo de *Aspergillus niger*) transforman dextrinas y maltosa en glucosa.

La primera etapa puede realizarse sobre una suspensión de almidón (30 - 45% en peso) en tanques agitados a pH 6-7. El efecto combinado de la temperatura y la enzima admite varias alternativas. 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); así, por ejemplo, para el almidón procedente de grano la temperatura empleada es de 105-110°C. 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 (retrogradación) del almidón después del enfriamiento.

La utilización de una α -amilasa como agente de aclarado reduce la formación de productos indeseables y el nivel de sales se puede mantener bajo; sin embargo, presenta el inconveniente de su estabilidad limitada frente a la temperatura, ya que son estables hasta 85°C y a más de 95°C durante tiempos cortos de reacción y en presencia de Ca^{2+} como agente estabilizador; estas temperaturas y estos tiempos de reacción no permiten la gelatinización completa de los tipos de almidón comúnmente utilizados. Este problema puede resolverse con un tratamiento de calor subsiguiente a 120-140°C y, posiblemente, una adición posterior de α -amilasa para hidrolizar el almidón gelatinizado en este último tratamiento calorífico. Los procesos de este tipo son los más habitualmente utilizados en la licuación enzimática del almidón.

La segunda etapa, sacarificación, se puede realizar en fase homogénea o, lo que es más frecuente, mediante glucoamilasa inmovilizada y en continuo, ya que mediante esta técnica se consiguen disminuir las reacciones de reversión de la glucosa a di y oligosacáridos, permite tratar grandes cantidades de sustrato con la misma enzima y se disminuye el volumen de la instalación, Vallat *et al.* (1986).

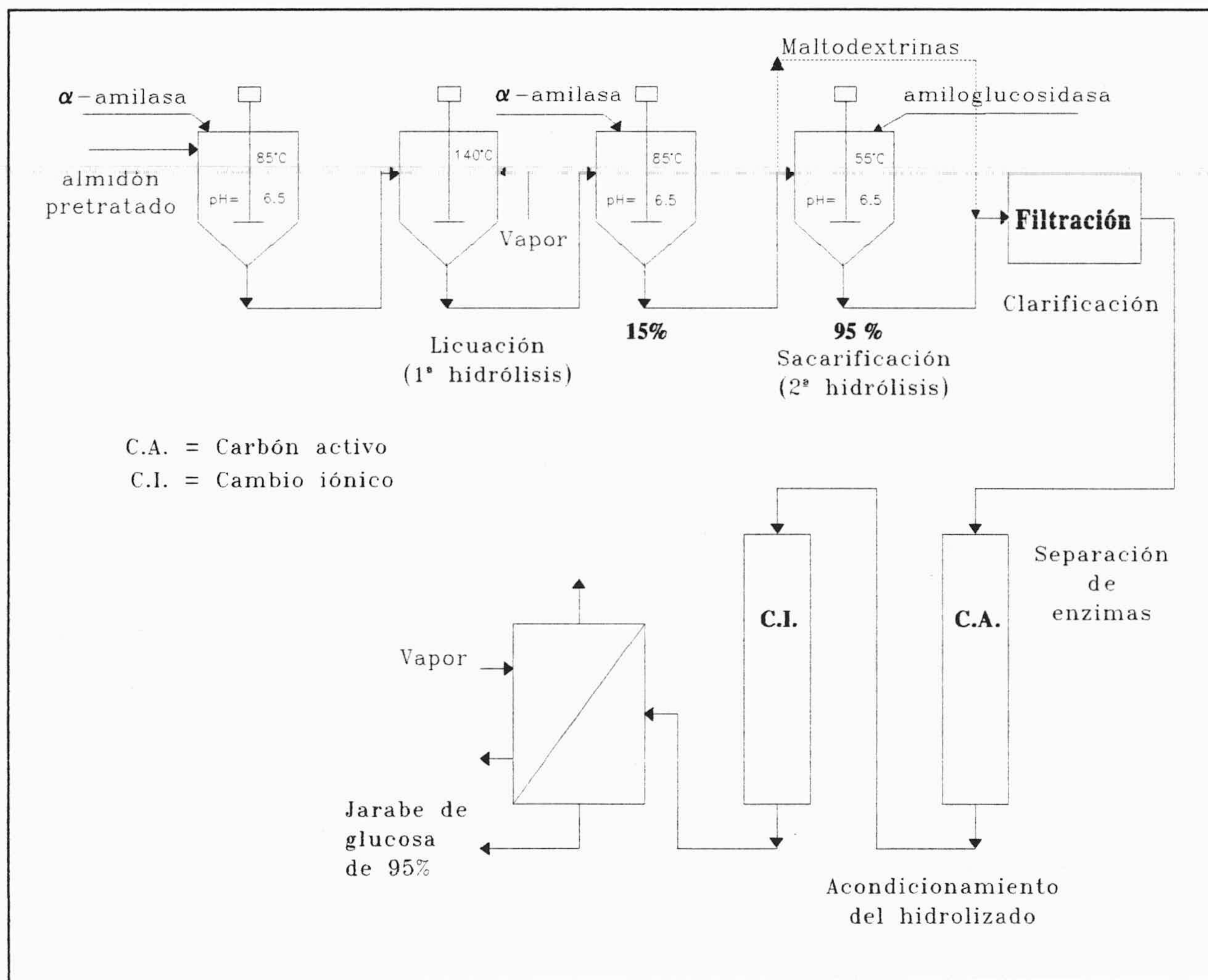


Figura 2.3. Producción de jarabe de glucosa.

Otro tipo de jarabes se pueden producir, los jarabes de maltosa, donde éste azúcar es el principal componente. Estos jarabes son obtenidos sustituyendo la α -amilasa bacteriana por la α -amilasa fúngica en combinación con la β -amilasa y amiloglicosidasa, también se utiliza la enzima pululanasa (enzima desramificadora) para acelerar el proceso. Estos jarabes tienen viscosidades y poder edulcorante intermedio entre los jarabes con un contenido de DE 42 y la glucosa. Combinando las enzimas mencionadas anteriormente pueden obtenerse hidrolizados de muy diferentes composiciones, Tabla 2.8.

TABLA 2.8

COMPOSICION DE DISTINTOS JARABES OBTENIDOS POR HIDROLISIS ENZIMATICA, Bucke (1979).

Componente	Jarabes obtenidos por hidrólisis enzimática			
	Alto contenido en dextrosa	Alto contenido en maltosa		Maltosa/dextrosa mezclados
	DE = 95	DE = 46	DE = 42	DE = 63
Dextrosa	92	3	6	38
Maltosa	4	55	45	35
Maltotriosa	2	12	12	12
Azúcares con alto peso molecular	2	30	37	15

2.1.4 Producción de jarabes de fructosa.

La obtención de jarabes de alto contenido en fructosa, HFCS, se obtiene fundamentalmente por isomerización de glucosa a fructosa, Figura 2.4, mediante la enzima glucosa isomerasa E.C.5.3.1.5.

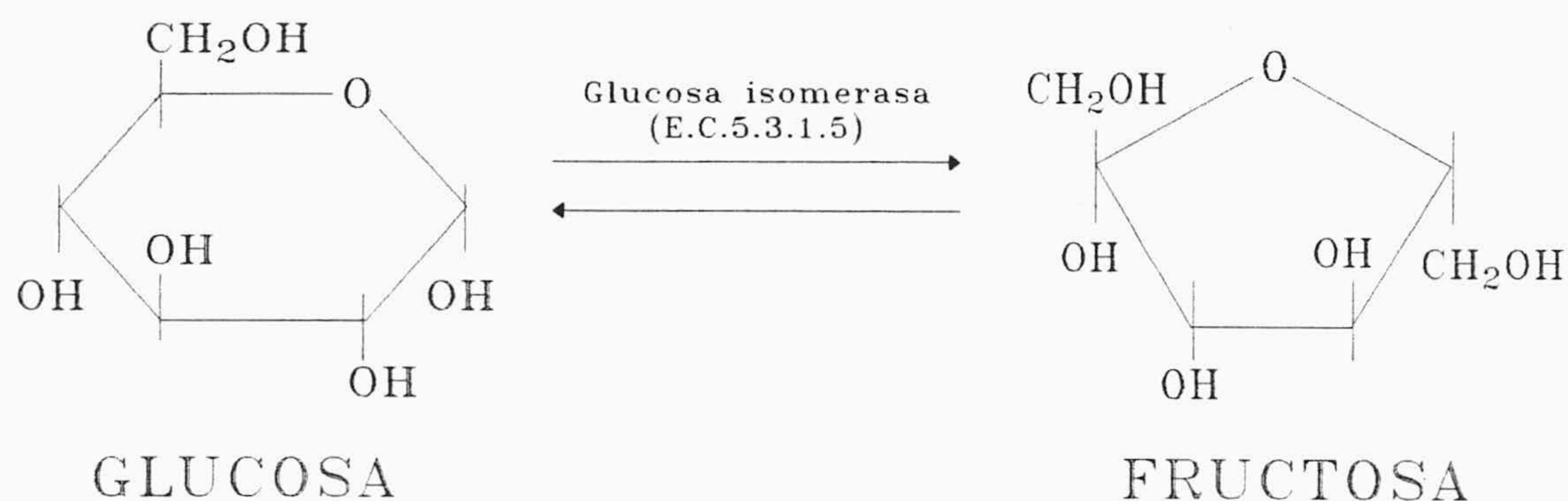


Figura 2.4. Reacción de isomerización.

Este proceso es interesante en cuanto que la fructosa tiene un poder edulcorante más elevado que la glucosa y sacarosa, Tabla 2.9. Este hecho hace que para un mismo poder edulcorante el contenido energético sea más pequeño, propiedad que es aprovechable en la preparación de alimentos dietéticos con bajo contenido en calorías. Además, la fructosa se absorbe en el intestino más lentamente que la glucosa y es metabolizada sin intervención de la insulina, por lo que se utiliza en la preparación de alimentos para diabéticos. Por otra parte, 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. Los jarabes de glucosa y fructosa son de color blanco claro y de viscosidad relativamente baja, y se utilizan, además de en las industrias ya mencionadas, en la fabricación de bebidas refrescantes.

La isomerización de glucosa a fructosa se realiza en continuo, ya que se trata de un sustrato líquido (jarabe de glucosa) y la enzima se puede inmovilizar sobre un soporte y utilizar a éste como relleno en una columna por la que se hace circular la fase líquida.

TABLA 2.9
PODER EDULCORANTE RELATIVO DE ALGUNOS AZUCARES

Azúcar	Poder edulcorante
Sacarosa	1.0
Glucosa (dextrosa)	0.7
Fructosa	1.5
Maltosa	0.3
Jarabe de glucosa (D.E.=60%)	0.6
Jarabe de glucosa (D.E.=37%)	0.4

El proceso de isomerización consta de las etapas esquematizadas en la Figura 2.5

- Preparación de la alimentación.
- Isomerización.
- Filtración.
- Acondicionamiento del producto.
- Evaporación.

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 y añadiendo 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, 42% fructosa y 50% glucosa, conocido como HFCS (high fructose corn syrup, debido a su contenido en fructosa y a la utilización del maíz como materia prima) se acondiciona me-

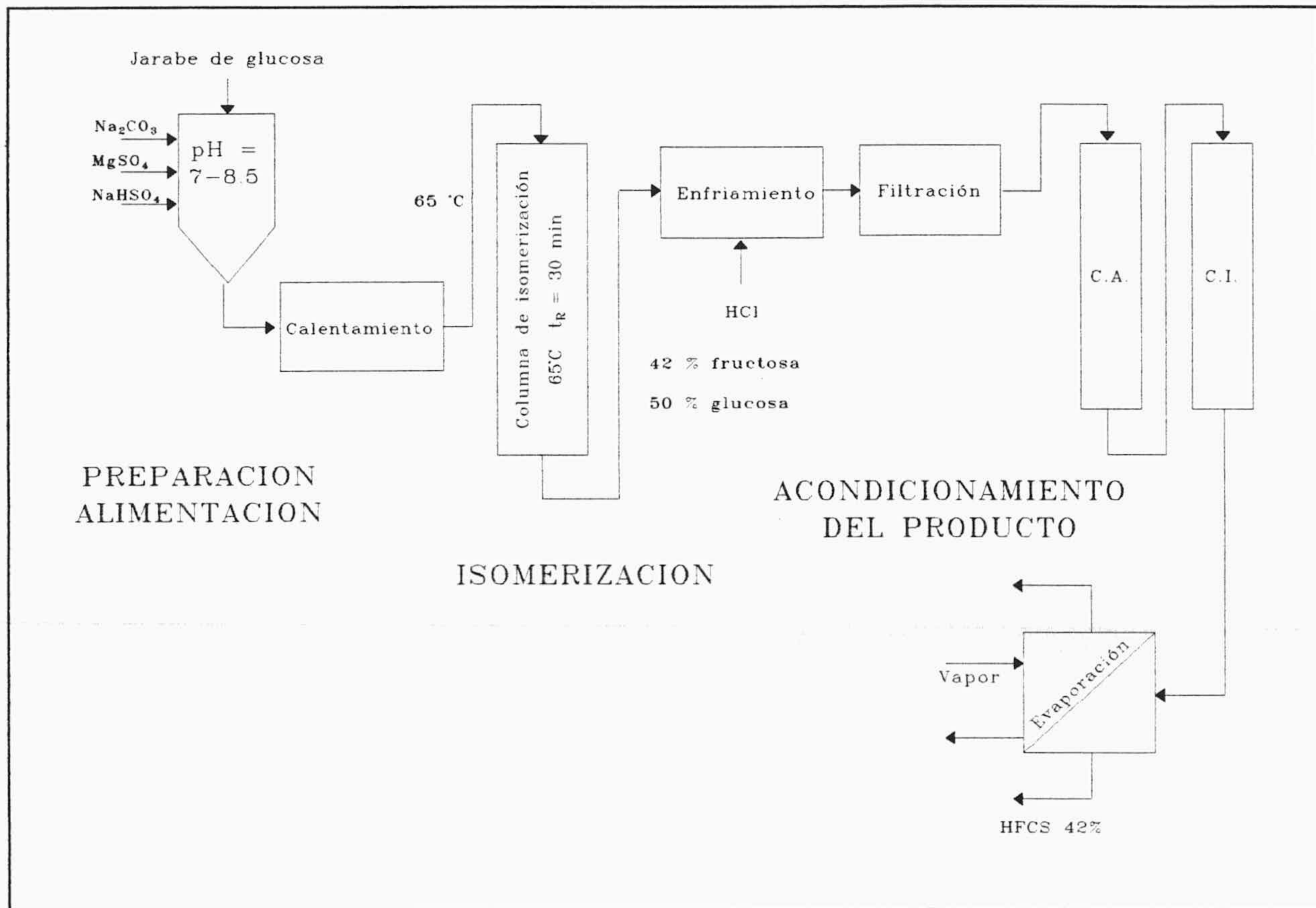


Figura 2.5. Producción de jarabe de fructosa.

diante filtración y la utilización de dos columnas una de carbón activo y otra de intercambio iónico para eliminar las enzimas y sales indeseables. Finalmente el jarabe obtenido se concentra hasta el 71% en sólidos obteniéndose jarabes con un 42% en fructosa.

Por otra parte el jarabe de fructosa 42%, antes de la evaporación puede separarse en 2 corrientes tal como se muestra en la Figura 2.6, una de ellas se pasa a través de una columna revestida de gel de ácido bórico donde se adsorben las moléculas de glucosa y la fructosa pasa a su través. Mezclando la corriente inicial de HFCS del 42% con la de un contenido aproximado del 90% en HFCS y con evaporación se consiguen obtener jarabes de distintas proporciones de HFCS.

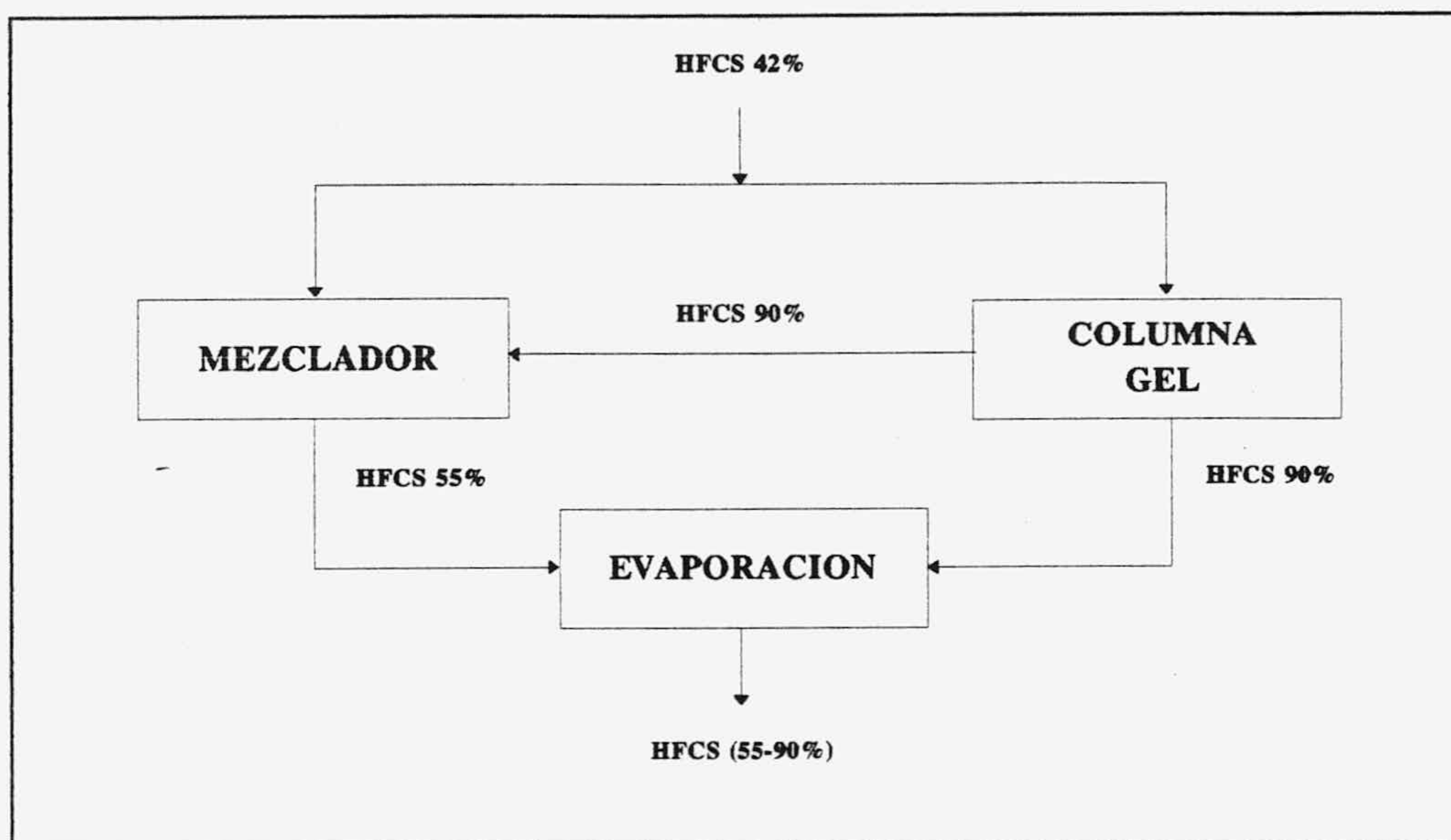


Figura 2.6. Concentración de jarabes de fructosa.

Las técnicas de concentración de HFCS son caras, ya que usualmente es una separación por cromatografía. Por ello se están ensayando métodos alternativos para llevar a cabo la isomerización; entre los más utilizados está elevar la temperatura de reacción a 100°C (con lo que se disminuye considerablemente la vida media de la enzima) y utilizar medios no acuosos, por ejemplo etanol, Visuri y Klibanov (1987).

También se pueden obtener jarabes de glucosa-fructosa mediante la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa, Figura 2.7, se lleva a cabo mediante una enzima llamada invertasa, E.C. 3.2.1.26, obtenida por fermentación de *Saccharomices*, *Aspergillus*, entre otros microorganismos. El proceso se realiza en continuo, ya que estas enzimas se utilizan inmovilizadas en reactores de lecho fijo o fluidizado, a pH = 5.0 y temperaturas de 50-55°C. Las etapas del proceso son análogas a las indicadas en la isomerización de glucosa, aunque como es lógico cambian las condiciones de operación, Predhome (1984), Thibanet (1984), Mousan *et al.* (1984) y López (1982).

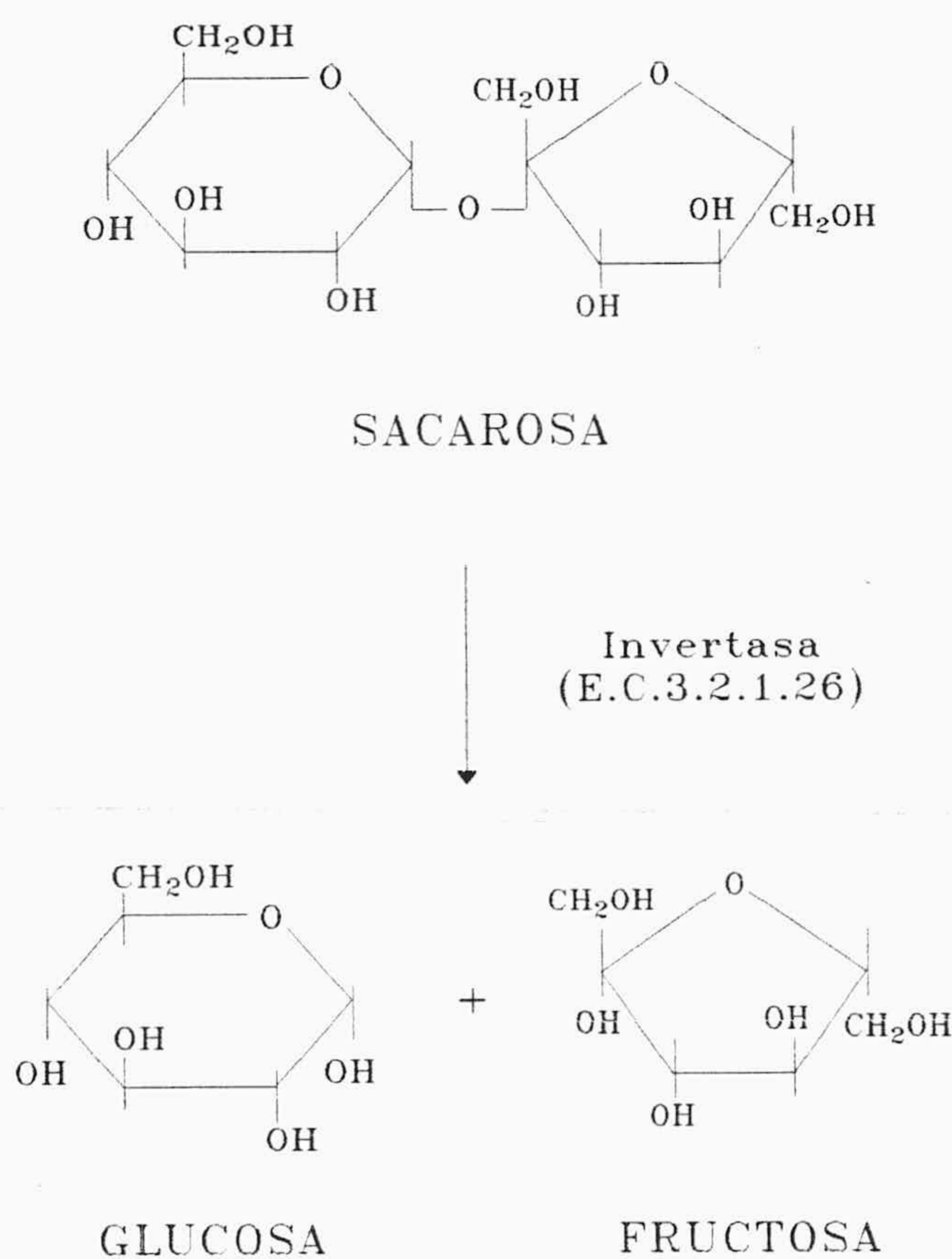


Figura 2.7. Inversión de la sacarosa.

Todas las plantas de la familia compuestas producen y almacenan fructosa en forma de inulina. Los tubérculos de aguaturma (Breen 1964) y achicoria (Chubey y Dorrel 1977) han sido utilizados para la producción de fructosa y son probablemente las fuentes alternativas para la producción de fructosa y jarabes con alto contenido en fructosa en áreas templadas. En la Figura 2.8 se muestra un diagrama de flujo para la obtención de fructosa a partir de tubérculos de aguaturma propuesto por Breen (1964). El producto final obtenido puede contener un 10-20% de glucosa.

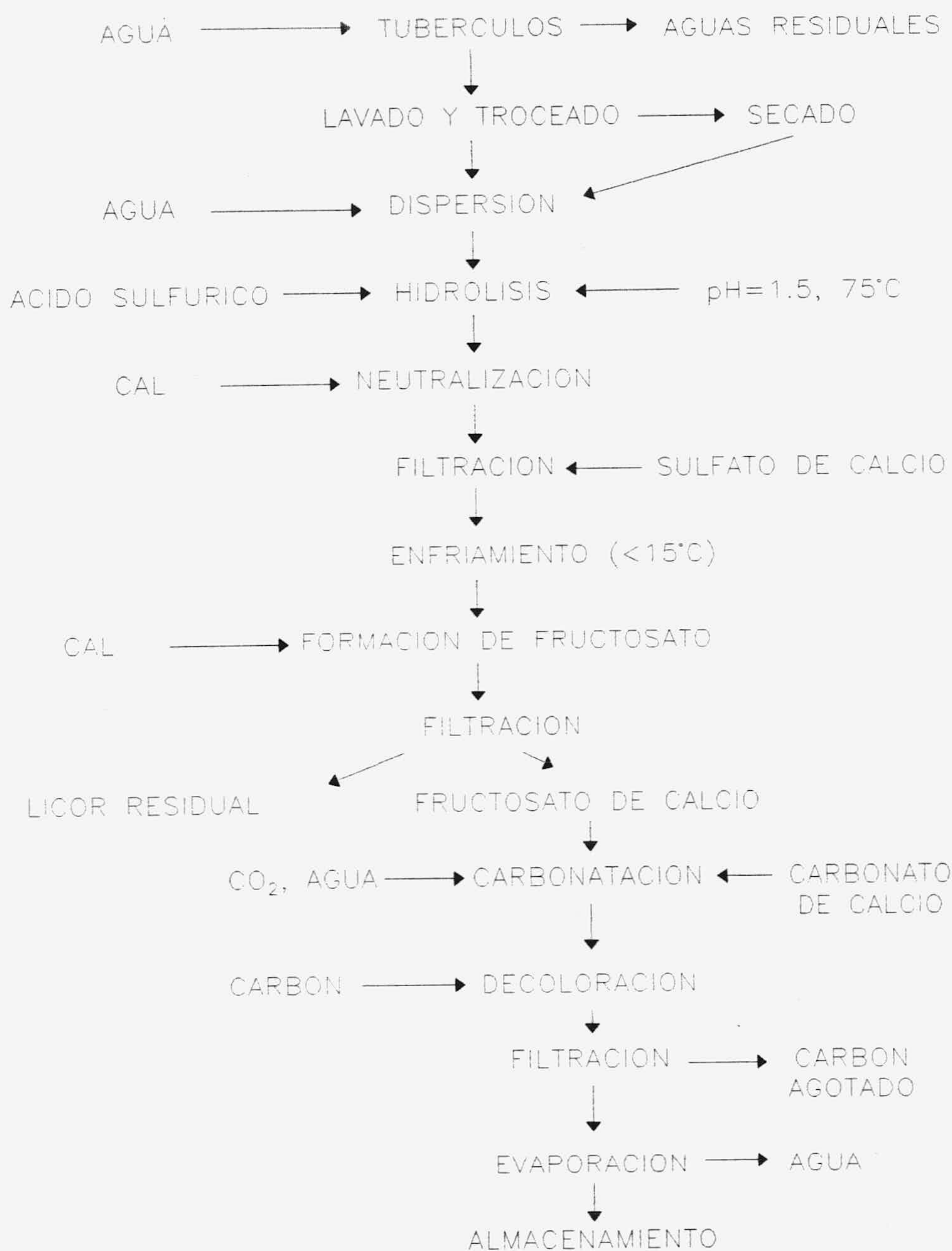


Figura 2.8. Obtención de fructosa a partir de tubérculos de aguaturma.

2.2 GLUCOSA ISOMERASA.

La enzima glucosa isomerasa, EC 5.3.1.5, es la D-xylosa ketol-isomerasa ó xylosa isomerasa, puede producirse a partir de varios microorganismos algunos de los cuales están indicados en la Tabla 2.10.

La estructura de ésta enzima ha sido estudiada por Berman *et al.* (1974) que realizaron un estudio cristalográfico con Rayos X determinando que la D-xylosa isomerasa presentaba dos formas, cristalizadas como prismas hexagonales: una forma A de densidad 1.21 g/cm^3 y unas dimensiones $a= 93.9$; $b= 99.4$ y $c= 102.7 \text{ \AA}$, mientras que la forma B tenía una densidad de 1.27 g/cm^3 y sus dimensiones características $a= 94.5$; $b= 98.9$ y $c= 87.0$. Proponen una estructura formada por dos moléculas tetraméricas con cuatro subunidades idénticas cada una. Este resultado está de acuerdo con lo obtenido por electroforesis de esta enzima.

Hoge-Angeletti (1975) analiza la composición de aminoácidos de la enzima determinando su peso molecular 165.000. En una solución de guanidina clorhídrica 6 M la enzima se disocia en dos subunidades de 43.000 y 40.000 de peso molecular, lo que sugiere también una estructura tetramérica para la proteína, compuesta de cuatro cadenas de polipéptidos de casi igual peso molecular.

2.2.1 Producción de glucosa isomerasa.

La producción de glucosa isomerasa a partir de distintos microorganismos requiere generalmente la presencia de xilosa o xilano, así Kent y Emery (1973) obtienen glucosa isomerasa a partir de *Lactobacillus brevis* encontrando que se incrementa el rendimiento obtenido en la producción de ésta enzima utilizando una estirpe modificada NCDO-474 de este bacilo y un medio de cultivo conteniendo 2% de xilosa; 0.5% de glucosa; 5% de peptona bacteriológica; 3% de extracto de levaduras; 1% de acetato sódico; 0.04% de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$; 0.01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ y 0.01% de $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, el crecimiento era efectuado a

30°C y una agitación suave. Sin embargo la utilización de xilosa o xilano para la producción industrial de la enzima puede ser económicamente inviable.

TABLA 2.10

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GLUCOSA ISOMERASA

Microorganismo	Referencia
<i>Pseudomonas hydrophila</i>	Marshall y Kooi (1957)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Natake y Yoshimura (1963)
<i>Aerobacter cloacae</i>	Tsumira y Sato (1965)
<i>Bacillus coagulans</i>	Danno (1971)
<i>Bacillus megaterium</i>	Takasaki y Tanabe (1964)
<i>Escherichia intermedia</i>	Natake (1966)
<i>Brevibacterium pentoaminoacidum</i>	Ichimura <i>et al.</i> (1965)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Yamanaka (1963)
<i>Micrococcus sp.</i>	Yamanaka (1965)
<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	Takasaki y Tanabe (1967)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Kent y Emery (1973)
<i>Streptomyces albus</i>	Takasaki <i>et al.</i> (1969)
<i>Streptomyces phaeochromogenus</i>	Tsumira y Sato (1965)
<i>Streptomyces bambengiensis</i>	Vasic-Racki <i>et al.</i> (1991)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Volkin y Klibanov (1989)
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Visuri y Klibanov (1987)
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	Ching y Ho (1984)
<i>Actinophaes missouriensis</i>	Visuri y Klibanov (1987)

Especies de *Streptomyces* producen la enzima en medios conteniendo xilano o materiales que lo contengan tal como el salvado de trigo, cortezas de cereales etc. Buki *et al.* (1976) con distintas especies de *Streptomyces: albus, gracilis, matensis, niveus, y platensis* obtienen glucosa isomerasa en un medio que contiene (en g/l): salvado de trigo 30; cereales macerados líquidos 40; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1; $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.24. Después de la inoculación con 1 ml de una suspensión de esporas, el crecimiento se continua 48 horas a 28°C con aireación. Posteriormente otro medio (100 mL) conteniendo 40 g/L de líquido de cereales macerado, 4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 4 g/L de sorbitol; 8 g/L de glucosa y 0.24 g de Cl_2Co se inoculaba con 5 mL del cultivo anterior y 1 g de xylosa, agitando durante 40 horas a 28°C se obtiene un filtrado que tiene una actividad de glucosa isomerasa de 40 unidades/mL .

Takasaki (1975) utilizando *Streptomyces albus* indica que el contenido en el medio de cultivo de Cl_2Co incrementa el rendimiento en la producción de glucosa isomerasa pasando a 27.8 unidades/mL en lugar de 20 unidades/mL sin la presencia de este ión. La importancia de la xilosa en el medio de cultivo ha sido también puesta de manifiesto por Takasaki (1976) utilizando el mismo microorganismo anterior en un medio de cultivo conteniendo (w/v) 3% de salvado de trigo; 2% de líquido de cereales macerados; 0.024% de $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y 0.1% de MgSO_4 , la adición de 0.5% de xilosa incrementa la actividad de glucosa isomerasa obtenida de 20.8 a 40.5 unidades de glucosa isomerasa/mL.

Lee *et al.* (1972) descubrieron que microorganismos del género *Arthrobacter* eran capaces de producir glucosa isomerasa en ausencia de xilosa y xilano, en un medio conteniendo 2% de glucosa; 0.01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.2% KH_2PO_4 ; 0.6% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0.15% de extracto de levaduras y 0.5% de proteínas. La patente es propiedad de la compañía R.J Reynolds Tobacco y se comercializa como RJR.

Actualmente la enzima glucosa isomerasa se obtiene industrialmente a partir de distintos microorganismos, en la Tabla 2.11 se recogen distintas

enzimas comerciales utilizadas en la obtención de jarabes de fructosa y las compañías que las producen.

TABLA 2.11
ENZIMAS COMERCIALES UTILIZADAS EN
LA PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA

Enzima	Microorganismo	Compañía productora
Maxazyme GI	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Gist-Brocade
Sweetzyme A, Q, S	<i>Bacillus coagulans</i>	Novo Industrias
Sweetzyme T	<i>Streptomyces murinus</i>	Novo Industrias
Spezyme IGI	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Finish Sugar
Sweetasa	<i>Streptomyces wedmorensis</i>	Nagasa Biochemical
RJR	<i>Arthrobacter</i>	R.J. Reynolds Tobacco
ICI	<i>Arthrobacter</i>	Imperial Chemical Industries
Spezyme GI	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Genencor International

2.2.2 Condiciones de operación.

El mecanismo de reacción de aldosa a cetosa en la reacción de isomerización puede ser catalizado utilizado tampones borato de pH 8.7, ya que éstos se acomplejan con las cetosas cambiando la posición de equilibrio (Horecker 1974). La presencia de arseniato también favorece la interconversión de D-glucosa a D-fructosa (Marshall y Kooi 1957).

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 *et al.* (1976) utilizando una enzima inmovilizada en vidrio poroso analizan la influencia de la concentración de iones Mg^{2+} , y Co^{2+} sobre la actividad de la enzima Figura 2.9 y Figura 2.10. Estos autores encuentran que el ión Mg^{2+} causa un considerable incremento de la actividad de la enzima, siendo su concentración óptima 0.1 M. La presencia de Co^{2+} incrementa la actividad de la enzima por debajo de $pH = 6$, a pH mayores es despreciable el efecto de este ión. El pH óptimo de actuación de la enzima es 7 y por debajo de 5 no presenta actividad enzimática.

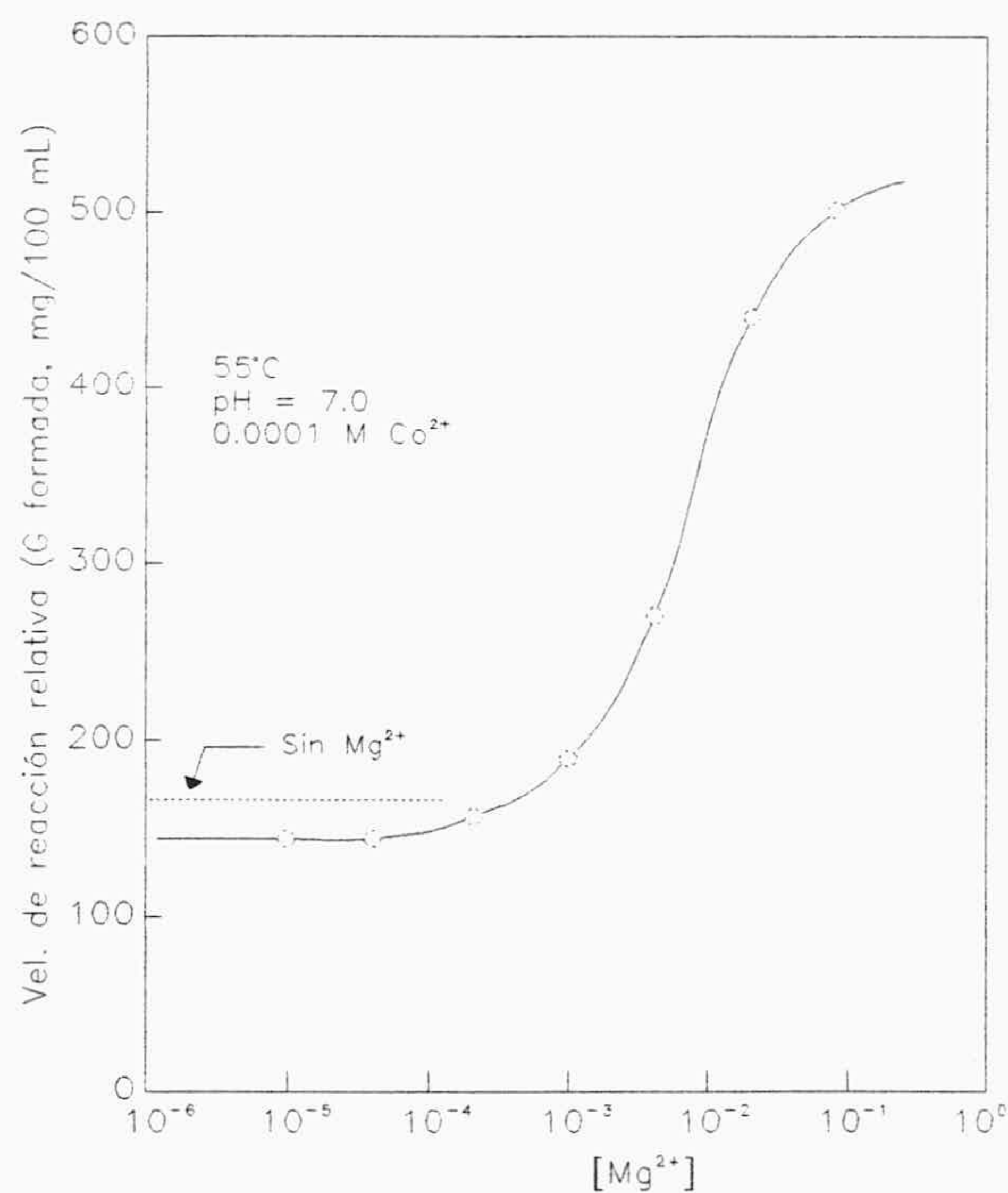


Figura 2.9. Efecto del ion Mg^{2+} sobre la actividad de la glucosa isomerasa. Lee *et al.* (1976).

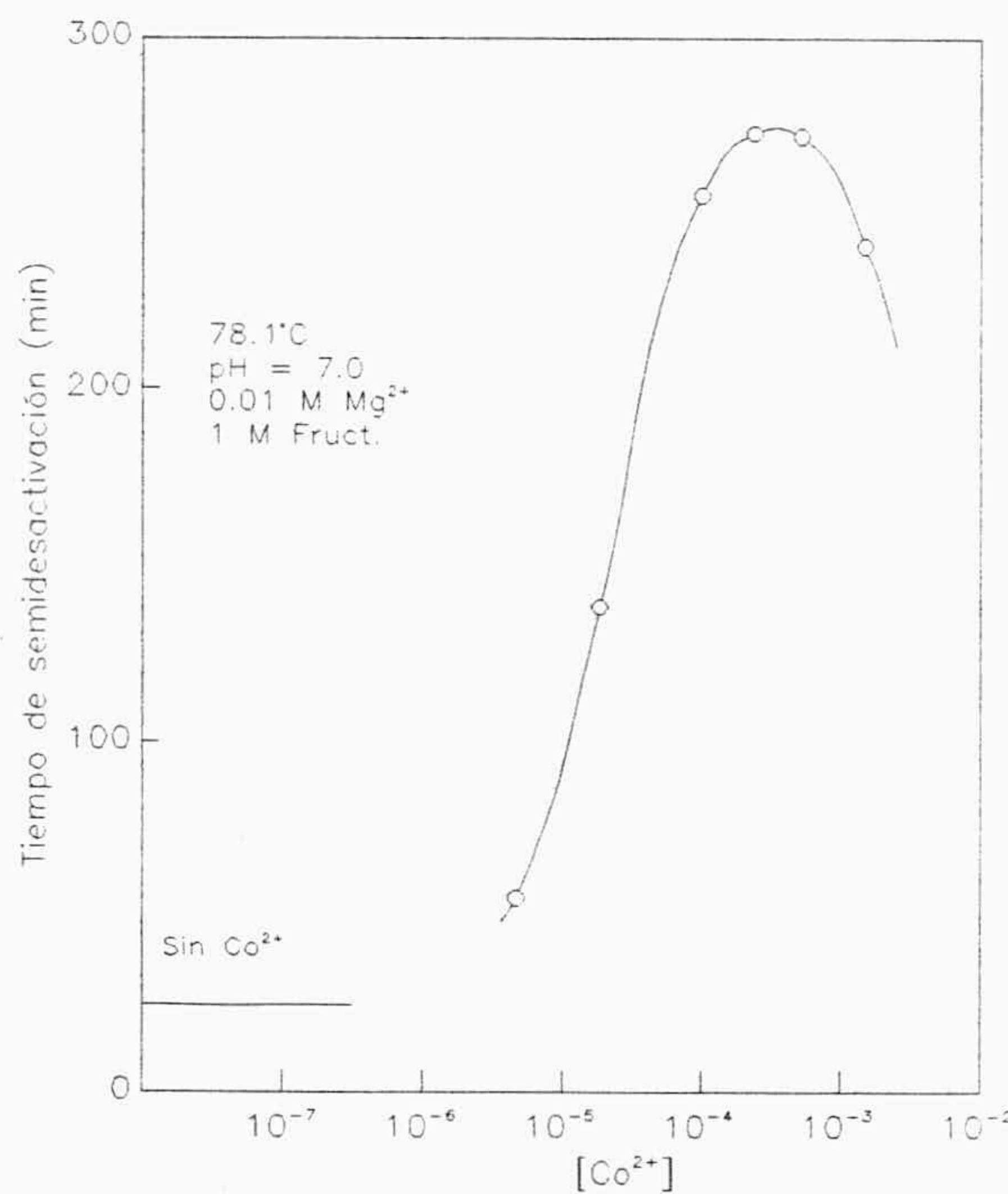


Figura 2.10. Efecto del ion cobalto sobre la actividad, Lee *et al.* (1976).

La influencia del ión Co^{2+} sobre la estabilidad de la enzima sin embargo, si tiene un efecto acusado tal como se puede observar en la Figura 2.11 ya que incrementa el tiempo de vida media de ésta, estando su concentración óptima comprendida entre $2.5 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Por otra parte ésta enzima es inhibida por la presencia de xilitol y metales pesados como Ag^+ , Hg^{2+} y Cu^{2+} . La temperatura óptima de reacción encontrada por Takasaki *et al.* (1969) para la enzima en forma soluble era de 80°C y el valor de pH entre 8 y 8.5, aunque era estable en un rango comprendido entre 4.5 y 11.

Zittan *et al.* (1975) realizaron un estudio de las condiciones de estabilidad de la enzima sweetzyme de Novo, demostrando que la enzima tenía actividad hasta temperaturas de 90°C , pero en estas condiciones su estabilidad era baja, la temperatura óptima para su utilización industrial era de 65°C no debiendo ser bajada de 60°C , para evitar la contaminación microbiana. El pH óptimo estaba comprendido entre 8 y 8.5, pero conserva el 70% de su actividad a pH 6. Cuando se utiliza a pH mayores de 8 puede omitirse la presencia de iones Co^{2+} ; en estas condiciones mantiene el 52% de su actividad después de 450 horas de actuación en funcionamiento continuo. Si el pH de la reacción es 7.6, retiene el 41% de la actividad en presencia de cobalto, sin éste ión la actividad era del 28%. Respecto a los iones magnesio encuentran un comportamiento análogo al del cobalto. Los iones Ca^{2+} y la presencia de oxígeno inhibían la actuación de la enzima.

La enzima maxazyme suministrada por Gist Brocades de Holanda, enzima proveniente de *Actinoplanes missouriensis*, presenta una vida media de 500 horas de actuación a 65°C pH 7.7 y una concentración de 3 mM de Mg^{2+} . La enzima es inhibida fuertemente por la presencia de iones níquel, zinc y cobre.

Volkin y Klivanov (1989) realizaron un estudio de la estabilidad de la enzima glucosa isomerasa libre e inmovilizada a un pH de 8 y distintas condiciones de operación, demostraron que la estabilidad de la enzima inmovilizada aumentaba 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 la temperatura de 100°C, Figura 2.12.

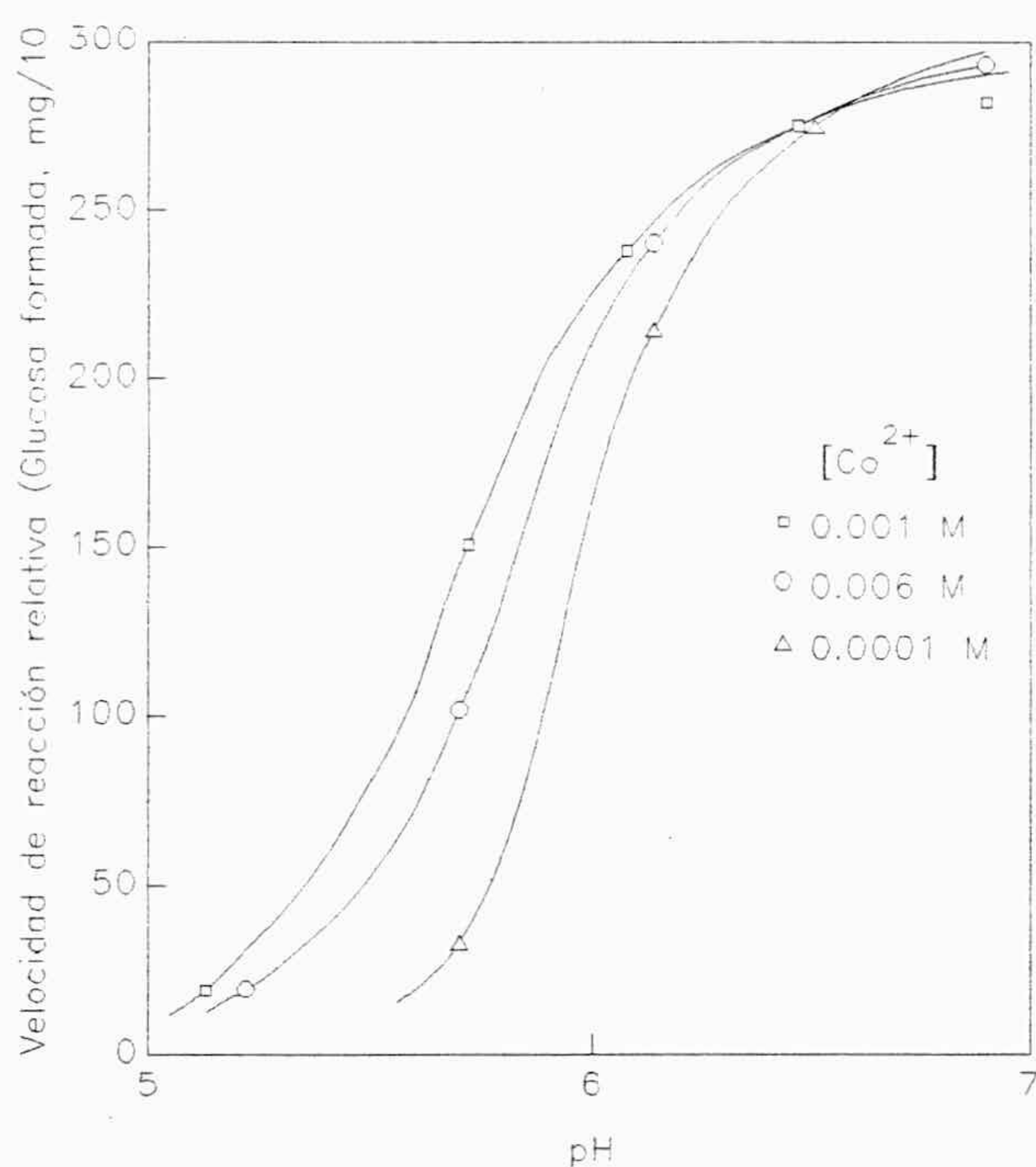


Figura 2.11. Efecto del ión Co^{2+} sobre la estabilidad de glucosa isomerasa, Lee *et al.* (1976).

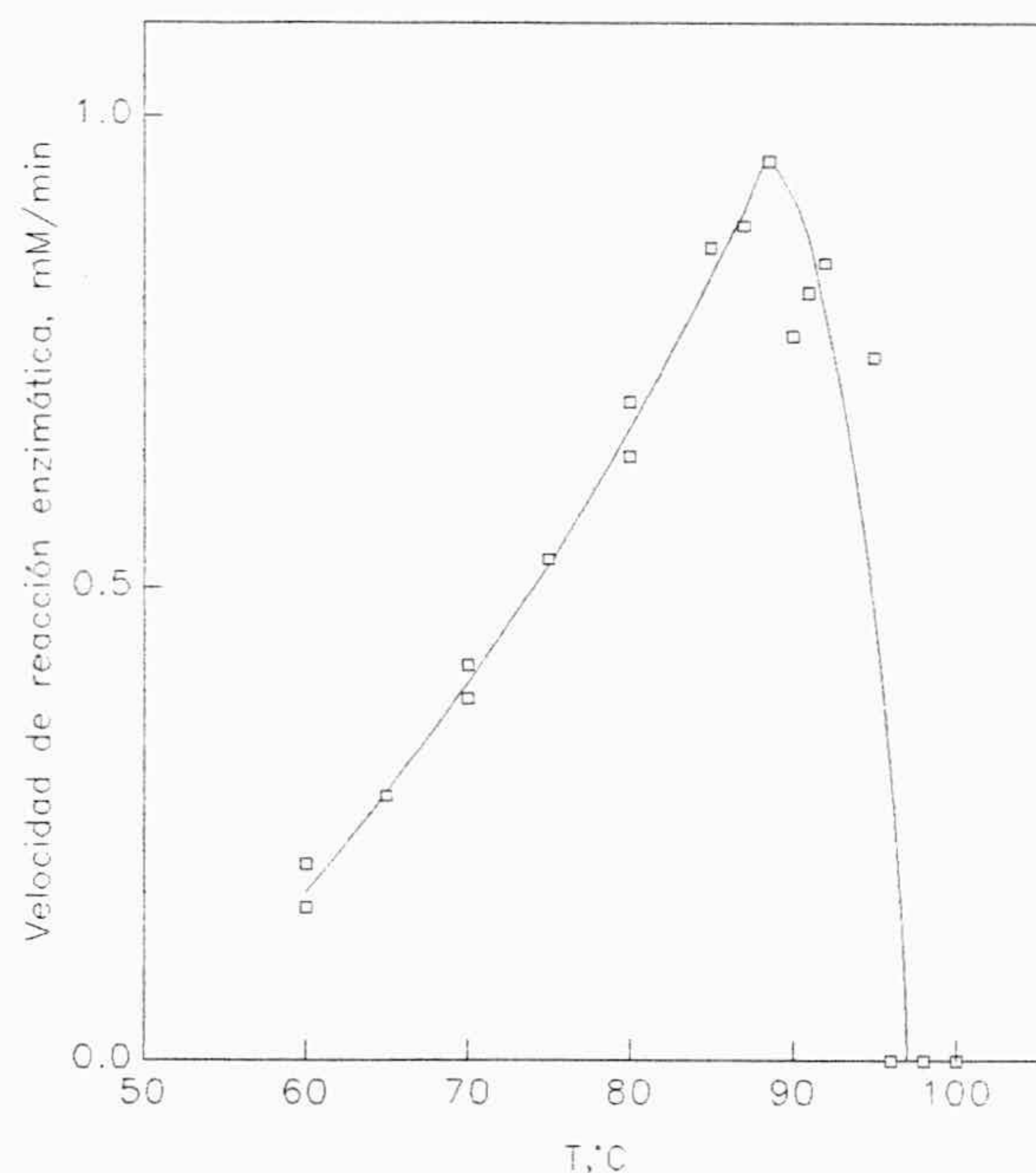
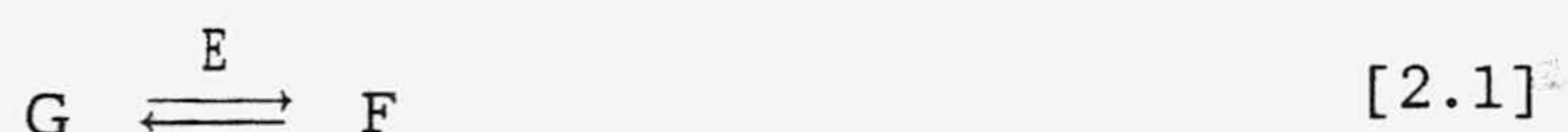


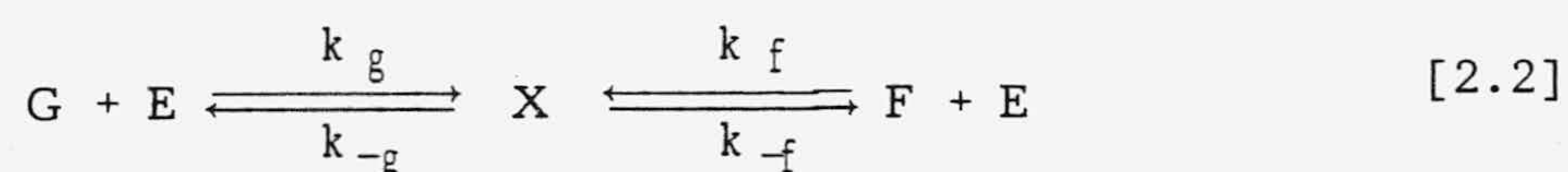
Figura 2.12. Influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción, Volkin y Klivanov (1989).

2.2.3 Mecanismo de reacción.

La isomerización enzimática glucosa-fructosa



es una reacción reversible que, de acuerdo con los conocimientos actuales, transcurre por el siguiente mecanismo



Dado que su constante de equilibrio es próxima a la unidad en el intervalo utilizado generalmente, los estudios cinéticos se realizan frecuentemente en ambos sentidos por lo que para uniformizar 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 intermedio X

$$[X] = \left(\frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}} \right) [E] \quad [2.3]$$

donde los parámetros cinéticos K_{mf} y K_{mg} representan las constantes de Michaelis-Menten para la transformación fructosa \rightarrow glucosa y glucosa \rightarrow fructosa respectivamente

$$K_{mf} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f}, M \quad [2.4]$$

$$K_{mg} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_g}, M \quad [2.5]$$

Realizando un balance de enzima y despejando la concentración de enzima libre

$$[E] = \frac{e_T c_E}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}} \quad [2.6]$$

donde e_T representa los moles de enzima activa por gramo del complejo enzimático utilizado. y c_E los gramos de complejo enzimático por litro.

De acuerdo con el mecanismo [2.2] y las ecuaciones [2.3] y [2.6], la velocidad neta para la transformación fructosa→glucosa vendrá dada por

$$r_{FG} = \frac{V_{mf} / K_{mf} ([F] - K_e [G])}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{g}_{enz} \text{ h}} \quad [2.7]$$

y para la velocidad neta de transformación glucosa→fructosa

$$r_{GF} = \frac{V_{mg} / K_{mg} \left([G] - \frac{1}{K_e} [F] \right)}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{g}_{enz} \text{ h}} \quad [2.8]$$

donde las velocidades máximas V_{mf} y V_{mg} vienen dadas por

$$V_{mf} = k_{-g} \cdot e_T, \quad \frac{\text{mol}}{\text{h g}} \quad [2.9]$$

$$V_{mg} = k_{-f} \cdot e_T, \quad \frac{\text{mol}}{\text{h g}} \quad [2.10]$$

Siguiendo también la expresión de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para una reacción irreversible. La constante de equilibrio que aparece en las ecuaciones [2.7] y [2.8] es

$$K_e = \frac{k_{-f} \cdot k_g}{k_f \cdot k_{-g}} = \left(\frac{[F]}{[G]} \right)_{\text{en el equilibrio}} \quad [2.11]$$

Las ecuaciones [2.7] y [2.8] cuando se parte de fructosa y glucosa puras para medir velocidades iniciales de reacción y estudiar independientemente ambas transformaciones se reducen a

$$(r_{FG})_0 = \frac{V_{mf} [F]}{K_{mf} + [F]} \quad [2.12]$$

$$(r_{GF})_0 = \frac{V_{mg} [G]}{K_{mg} + [G]} \quad [2.13]$$

Obsérvese que tal como se ha definido e_T la velocidad de reacción está referida a 1 g de complejo enzimático, tanto si éste es un líquido que contiene la enzima en disolución como si es un catalizador sólido con la enzima inmovilizada.

2.3 INMOVILIZACION DE ENZIMAS.

Las enzimas inmovilizadas se definen como enzimas confinadas físicamente o localizadas en una determinada región del espacio con retención de su actividad catalítica, que pueden ser utilizadas repetidamente y de forma continua.

Estas enzimas inmovilizadas presentan ventajas con respecto a las enzimas en disolución entre las que podemos destacar:

- Pueden ser añadidas o extraídas de la mezcla reaccionante sin dificultad, lo que permite un mejor control de la reacción.
- Se pueden volver a utilizar, aspecto muy importante desde el punto de vista económico.
- En muchos casos la enzima se estabiliza al ser inmovilizada.
- Los productos de la reacción no están contaminados por la presencia de las enzimas.

Las aplicaciones comerciales con enzimas inmovilizadas están limitadas a unos pocos procesos que se resumen en la Tabla 2.12.

2.3.1 Métodos de inmovilización de enzimas.

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas, la mayoría de ellos se muestran en la Figura 2.13. Las técnicas más utilizadas y sus características más importantes son las siguientes:

Adsorción física

Atrapamiento

Intercambio iónico

Entrecruzamiento

Adsorción física

La adsorción física fue el primer método artificial empleado para inmovilizar enzimas (Nelson y Griffin 1916). Es una técnica sencilla que está basada en la adsorción física de las moléculas de enzima sobre la superficie de la matriz sólida empleada como soporte.

La principal ventaja de esta técnica reside en que al no existir reacción química, los cambios conformacionales observados en la enzima tras el proceso de inmovilización son prácticamente nulos, obteniéndose una especie inmovilizada que conserva gran parte de la actividad de la disolución enzimática empleada para la inmovilización.

Entre las principales desventajas de este tipo de inmovilización destaca la desorción de la proteína durante su utilización, debido a las débiles fuerzas que unen enzima y soporte (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc.). Esta desorción provoca una importante pérdida de actividad catalítica y contaminación de los productos.

Atrapamiento

Consiste en la oclusión de la enzima en el interior de una membrana o matriz de polímero con el fin de impedir la pérdida de proteína y permitiendo la entrada de sustrato y salida de producto. Este método puede aplicarse a cualquier tipo de enzima pero su uso está restringido a reacciones que impliquen moléculas de sustrato y producto muy pequeñas.

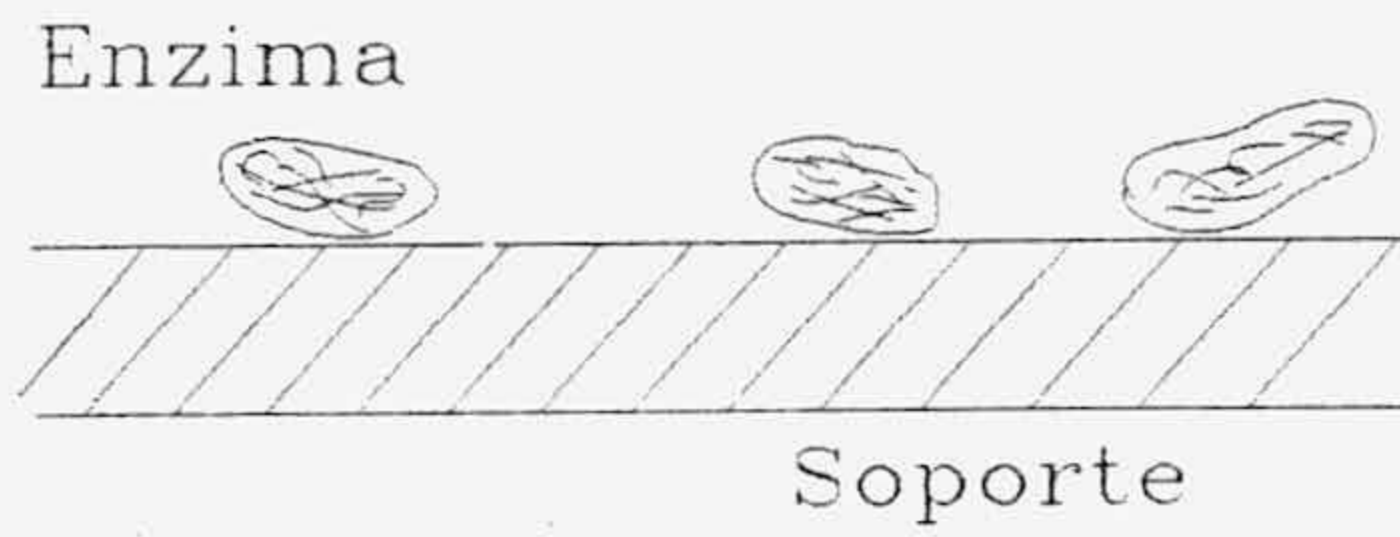
TABLA 2.12

PRINCIPALES APLICACIONES INDUSTRIALES DE ENZIMAS INMOVILIZADAS.

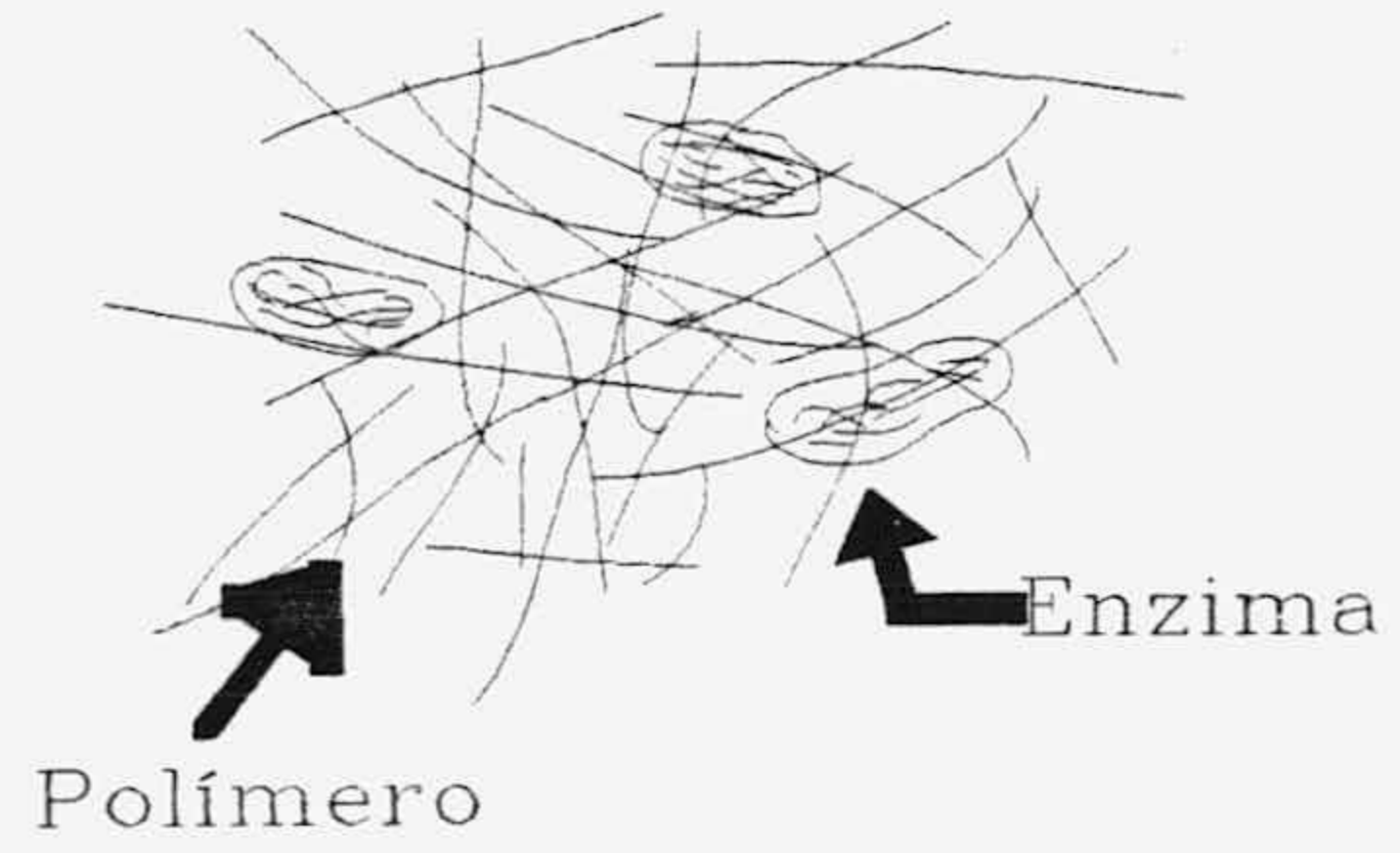
Vos *et al.* (1990).

Catalizador	Soporte	Producto
Aspartasa	poliacrilamida	ácido L-aspártico
	carraginina	
Aminoacilasa	sephadex DEAE	L-valina
		L-fenilalanina
		L-metionina
		L-alanina
		L-triptofano
Fumarasa	poliacrilamina	ácido L-málico
	carraginina	
Glucosa isomerasa	gelatina	jarabe de fructosa
		de alta concentración
	esferas de vidrio	
Penicilin acilasa	sephadex activado	ácido 6-aminopenicilánico
Lactasa	gel	lactosa libre de leche o lactosuero
	cerámica porosa	

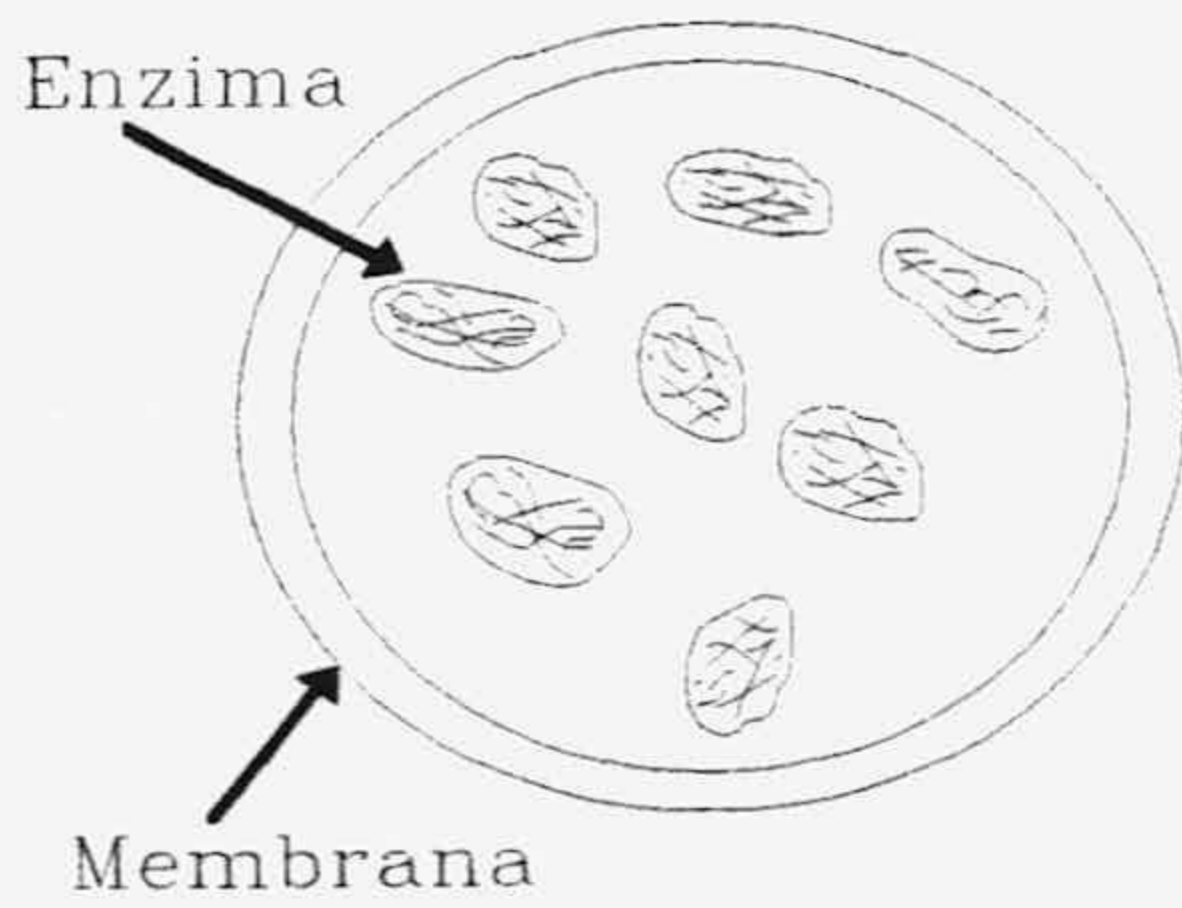
Adsorción



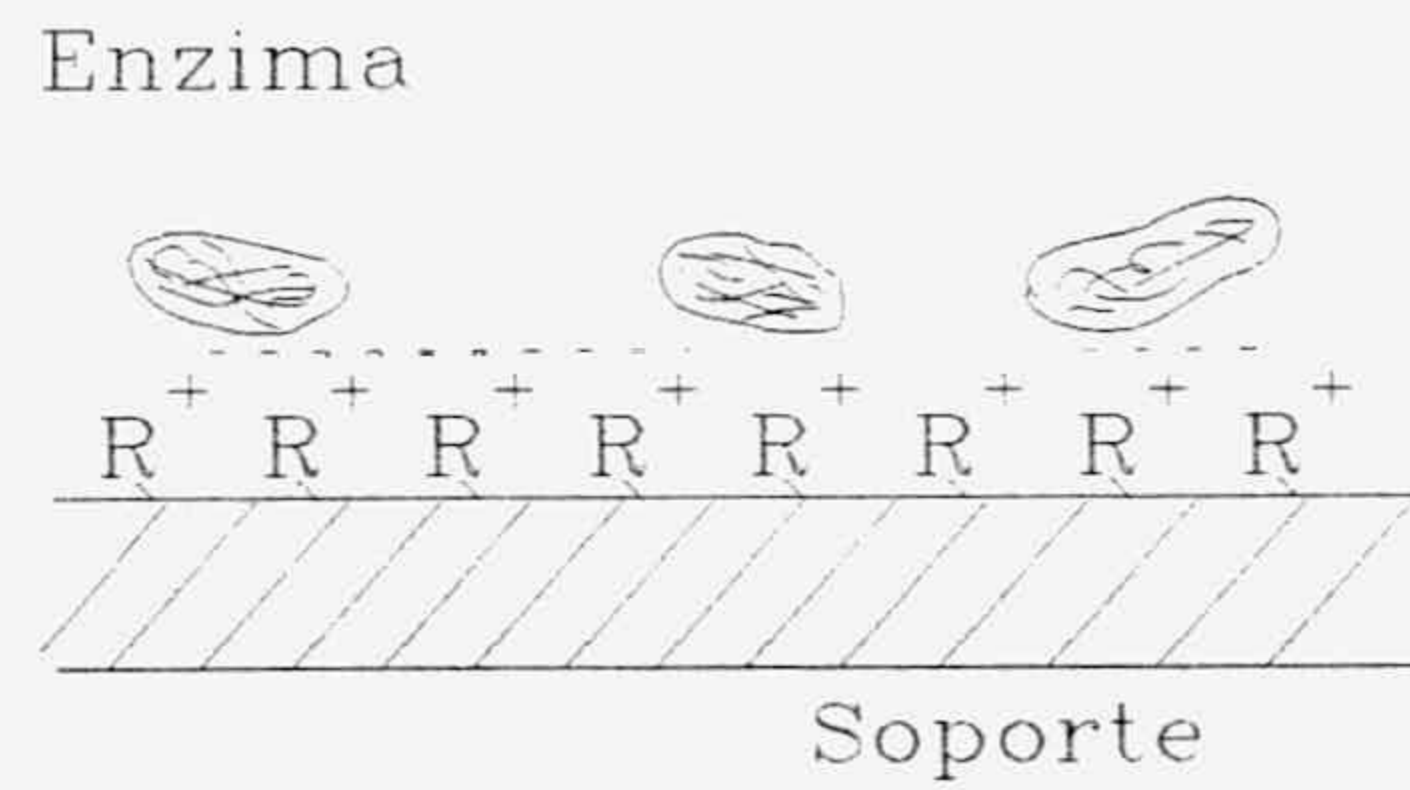
Atrapamiento



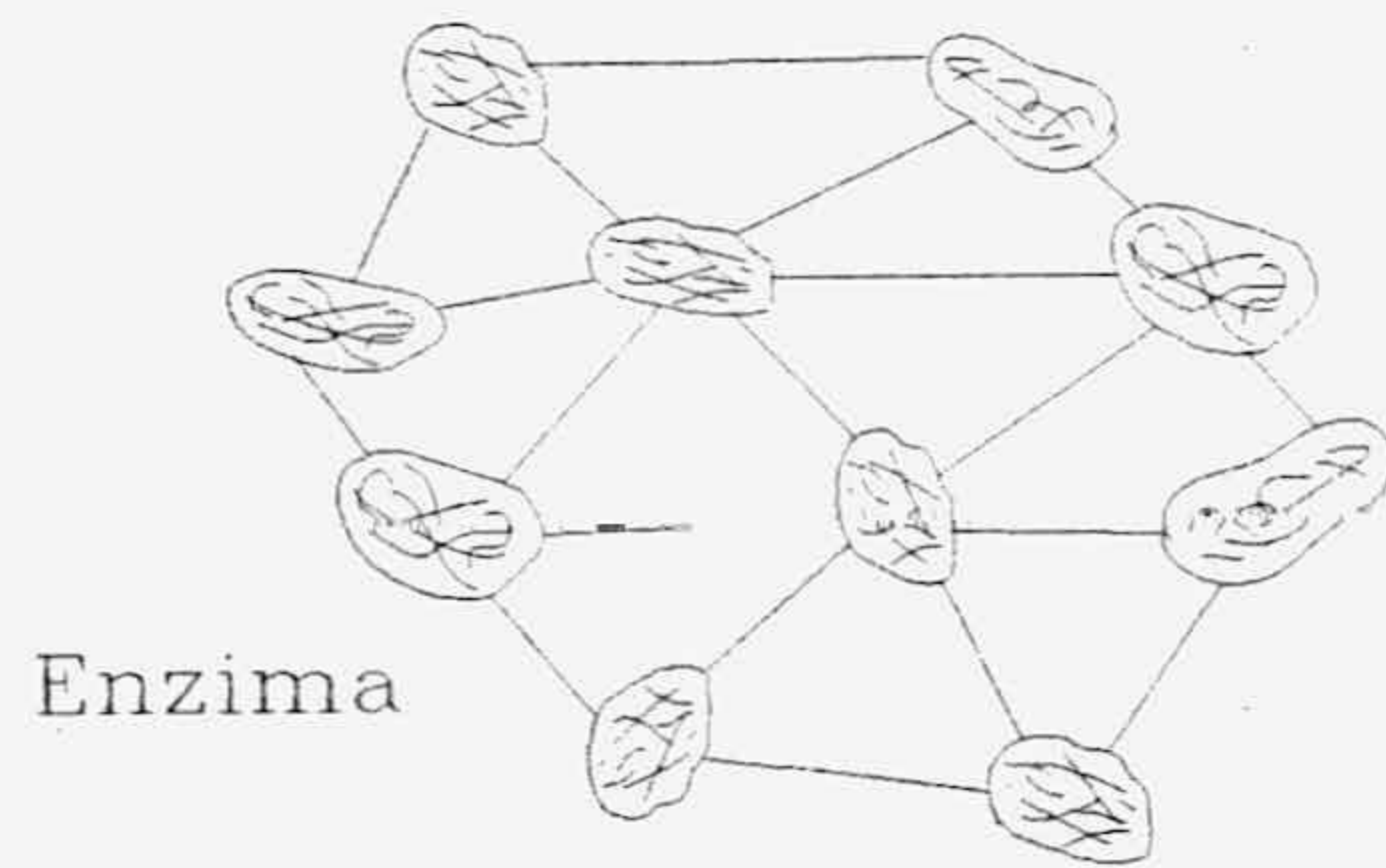
Microencapsulación



Intercambio iónico



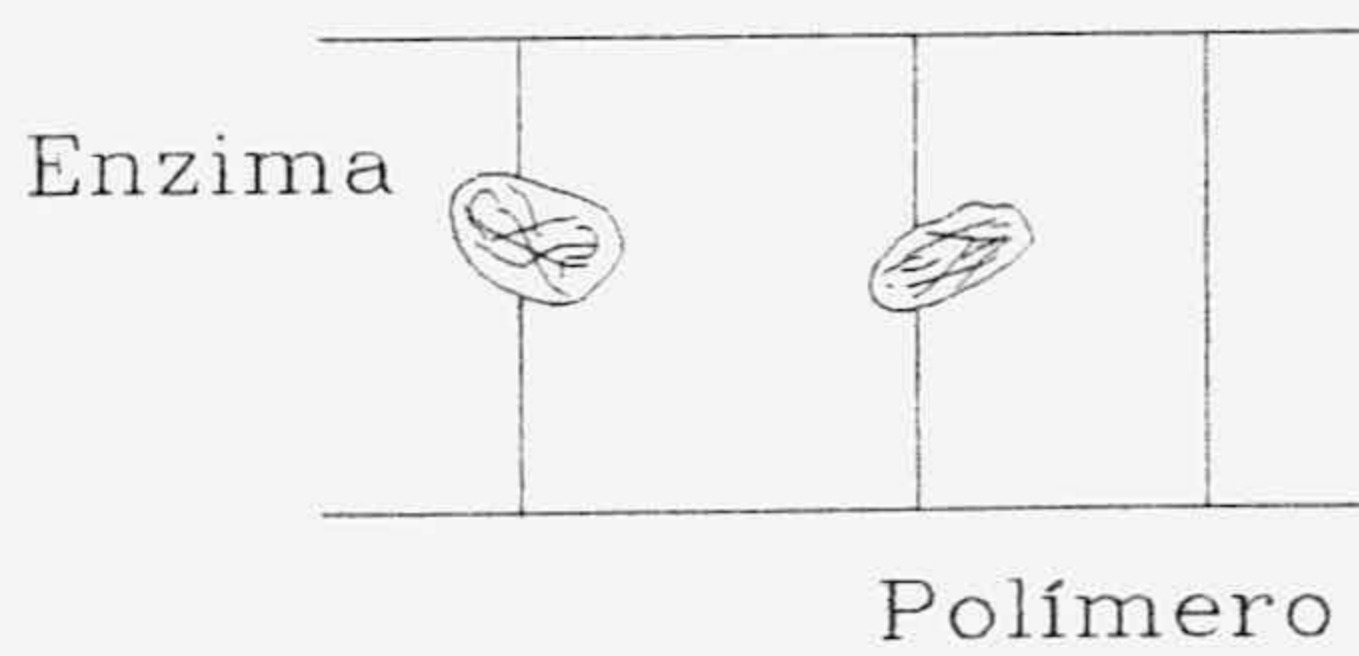
Entrecruzamiento



Adsorción y Entrecruzamiento



Copolimerización



Unión covalente

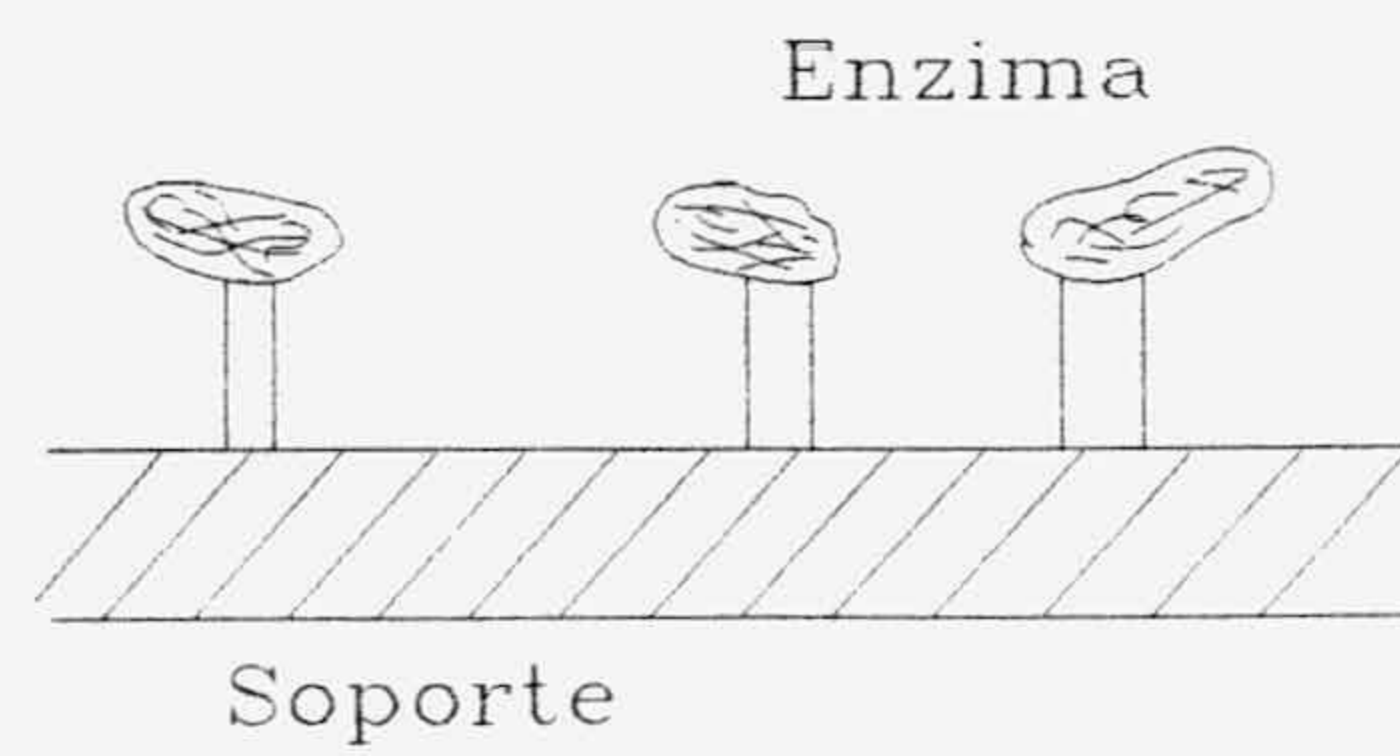


Figura 2.13. Métodos de inmovilización.

Según la forma de atrapamiento se clasifican:

- a) Atrapamiento en un gel.
- b) Atrapamiento en fibras sintéticas.
- c) Microencapsulación.

Este último método se realiza confinando las enzimas en membranas semipermeables de polímero con forma esférica y diámetros en el intervalo de 1-100 μm .

Intercambio iónico

Esta técnica se basa en la unión de moléculas de enzima a soportes sólidos que contengan residuos de intercambio iónico. Este tipo de enlace es más fuerte que la adsorción física, y puesto que se realiza en condiciones suaves de pH y temperatura, los cambios conformacionales producidos en la proteína son escasos, obteniéndose altas actividades inmovilizadas.

Entrecruzamiento

Este método supone la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante el empleo de agentes bi o multifuncionales que conducen a agregados entrecruzados de tres dimensiones totalmente insolubles en agua, por lo que no es necesario el empleo de soportes insolubles. El proceso de entrecruzamiento consiste en adicionar una cantidad adecuada de agente de entrecruzamiento a una disolución de enzima en condiciones que produzcan el mayor número de enlaces covalentes múltiples.

El agente utilizado debe poseer dos grupos funcionales idénticos (agente homobifuncional) o dos o más grupos funcionales diferentes (agente heteromultifuncional).

Las principales desventajas del método son: las dificultades para controlar la reacción, la necesidad de grandes cantidades de enzima, (gran

parte de la cual pierde su actividad por reacciones que tienen lugar en su centro activo) y la naturaleza gelatinosa del producto final.

Enlace covalente

La unión covalente entre una enzima y un soporte es, en teoría, el método más estable de inmovilización, y es la técnica más utilizada, aunque se realiza en condiciones de pH y temperatura menos suaves y el proceso de inmovilización es más complicado.

La amplia variedad de reacciones de unión y de portadores con grupo funcional capaces de llevar a cabo una unión covalente, o de ser activados para dar alguno de estos grupos, lo convierte en un método de inmovilización aplicable de forma general. Sin embargo, la complejidad de la composición y la estructura de las proteínas no permite, salvo en casos especiales, la aplicación de recetas generales o la posibilidad de seleccionar previamente el método más adecuado en cada caso.

Las enzimas son heteropolímeros constituidas por más de veinte aminoácidos diferentes, la mayor parte de los cuales poseen grupos funcionales que pueden ser utilizados para su unión con la matriz soporte (Tabla 2.13).

Los grupos funcionales de los portadores que pueden reaccionar directamente con la enzima aparecen en la Tabla 2.14, junto con el grupo de la enzima con el que pueden reaccionar. Sin embargo, la mayor parte de los soportes utilizados no poseen estos grupos reactivos, aunque tienen grupos hidroxilo, amino, amida o carboxilo que requieren una activación tras la cual pueden ser utilizados en la inmovilización.

En la Tabla 2.15 se muestra un resumen de las técnicas de inmovilización más usuales y sus ventajas e inconvenientes. Rodríguez (1991).

TABLA 2.13

RESIDUOS REACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS, Rodríguez, L. (1991).

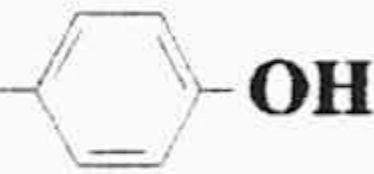
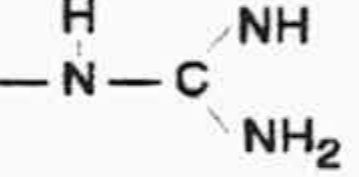

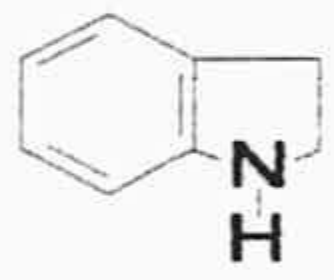
Residuo	Aminoácido original
-NH ₂	ε-Amino de la L-lisina y N-terminal del grupo amino
-SH	Tiol de la L-cisteína
-COOH	Carboxilo del ácido aspártico y del ácido glutámico y grupo carboxilo del C-terminal
	Grupo fenólico de la L-tirosina
	Grupo guanidino de la L-arginina
	Grupo imidazol de la L-histidina
-S-S-	Disulfuro de la L-cistina
	Grupo indol del L-triptófano
CH ₃ -S-	Grupo tioéter de la L-metionina
-CH ₂ OH	Hidroxilo de la L-serina y L-treonina

TABLA 2.14
 GRUPOS FUNCIONALES DE LOS PORTADORES QUE PUEDEN REACCIONAR
 DIRECTAMENTE CON LA ENZIMA Y
 GRUPO DE ESTA CON EL QUE REACCIONAN.

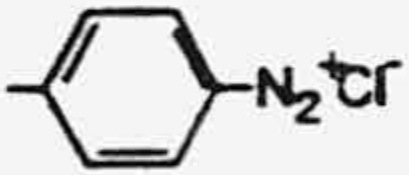
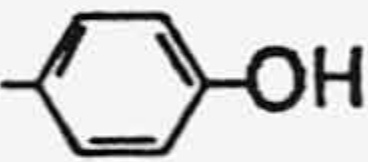
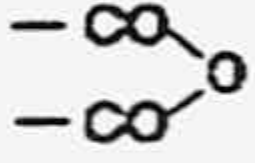
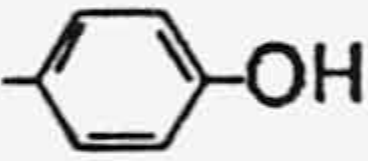
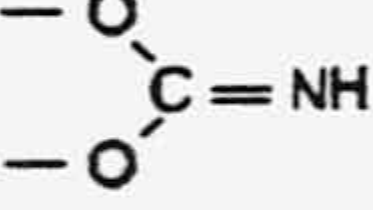
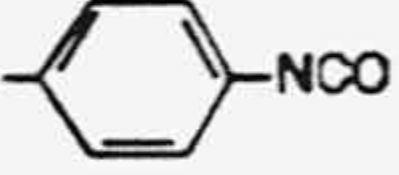
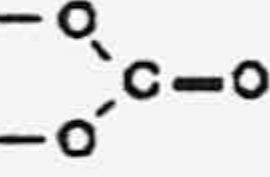
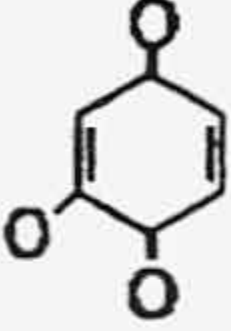
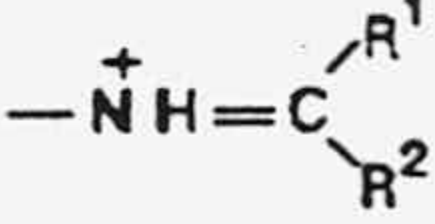
Grupo reactivo del portador		Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión
	Sal de diazonio	-NH ₂ ; -SH; 	Unión diazo
	Anhídrido ácido	-NH ₂	Formación de un enlace amida
-CH ₂ CON ₃	Azida	-NH ₂ ; -SH; 	Formación de un enlace amida
	Imidocarbonato	-NH ₂	Formación de un enlace amida
-R-NCS	Isocianato	-NH ₂	Formación de un enlace amida
	Isocianato	-NH ₂	Formación de un enlace amida
-CH ₂ COCl	Cloruro de acilo	-NH ₂	Formación de un enlace amida
	Carbonato cíclico	-NH ₂	Formación de un enlace amida
-O-CH ₂ -CH ₂ -SO ₂ -CH=CH ₂	Vinilsulfonilo	-NH ₂ ; -SH; -OH	Alquilación
	Vinilcetona	-NH ₂ ; -SH ;-OH	Arlación
-CHO	Aldehido	-NH ₂	Formación de una base de Schiff
		-CO ₂ H; -NH ₂	Reacción de Ugi

TABLA 2.14 (Continuación)

Grupo reactivo del portador		Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión
$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ -\text{COC}_2\text{H}_5 \end{array}$	Imido éster	$-\text{NH}_2$	Reacción de amidinación
$-\text{CN}$	Cianuro	$-\text{NH}_2$	Reacción de amidinación
$-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5$	Residuo disulfuro	$-\text{SH}$	Intercambio tiol-disulfuro
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CO}-\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$	O-acilisourea	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$-\text{CO}_2-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-)-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_5$	Derivado k del reactivo de Woodward	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$\text{C}_6\text{H}_3(\text{F})(\text{NO}_2)_2$	5-fluor-2,4-dinitroanilina	$-\text{NH}_2$	Arlación
$\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2\text{N}_3\text{O}$	Triazinilo	$-\text{NH}_2$	Arlación
$-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2$ X	X= $>\text{NH}_2$, $>\text{O}$, $>\text{S}$	$-\text{NH}_2$ $-\text{OH}$ $-\text{SH}$	Alquilación
$\text{C}_6\text{H}_4\text{HgCl}$	Derivado de mercurio	$-\text{SH}$	Interacción enzima mercurio
M^+	Radical-matriz	E^{\bullet} Radical-enzima	Inducción al enlace por radiación
$-\text{NH}_2$	Amina	$-\text{NH}_2$ $-\text{CO}_2\text{H}$	Formación de un enlace amida (en presencia de agentes de condensación)
$-\text{CONHNH}_2$	Acil hidracina	$-\text{NH}_2$ $-\text{CO}_2\text{H}$	

TABLA 2.15

COMPARACION ENTRE LAS DIFERENTES TECNICAS DE INMOVILIZACION

Característica	Entrecruzamiento	Adsorción	Enlace iónico	Quelación	Enlace covalente	Atrapamiento
Preparación	Intermedia	Simple	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza enlace	Fuerte	Débil	Intermedia	Intermedia	Fuerte	Intermedia
Actividad enzimimática	Baja	Intermedia	Alta	Alta	Alta	Baja
Regenerabilidad del sopote	Imposible	Posible	Posible	Posible	Rara	Imposible
Coste de inmovilización	Intermedio	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Intermedio
Estabilidad	Alta	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Alta	Alta
Aplicabilidad	No	Si	Si	Si	No	Si
Protección al ataque microbiano	Posible	No	No	No	No	Si

2.3.2 Soportes empleados en inmovilización.

Existen una gran variedad de soportes utilizados en la inmovilización enzimática, tanto orgánicos como inorgánicos, Tabla 2.16, pero se suelen clasificar en:

- Soportes no porosos y
- Soportes porosos.

Estos últimos a su vez se clasifican en:

- a) De poro controlado
- b) Distribución aleatoria de poro
- c) Estructuras de gel

Los soportes no porosos tienen el inconveniente de que su área superficial es pequeña, por tanto la superficie susceptible para el ataque de la enzima es baja. Esto se puede solventar empleando partículas pequeñas o fibras pero se originan problemas adicionales, es difícil retirarlas si están en disolución u originan elevadas pérdidas de carga si se utilizan en reactores continuos.

Dentro de las ventajas de estos soportes no porosos está el hecho de que la enzima se une al soporte en su superficie externa y por tanto se pone rápidamente en contacto con el medio reaccionante y los efectos difusionales son mínimos.

Los soportes porosos presentan dos ventajas fundamentales: su alta área superficial para la inmovilización y el hecho de que los enlaces internos protegen la enzima de las turbulencias externas. Su principal inconveniente reside en que la mayor superficie de contacto se encuentre en la estructura interna y dependiendo del tamaño de poro los sustratos pueden o no acceder a la enzima.

El tercer tipo de soportes es una estructura en forma de gel que se utiliza para atrapar o encapsular la enzima mediante enlaces covalentes o adsorción, los geles más utilizados son colágeno y poliacrilamidas. Estos geles presentan la ventaja de que se pueden realizar una gran cantidad de enlaces sin necesidad de atacar previamente la superficie pero las enzimas atrapadas en el gel o encapsuladas están limitadas por los efectos difusionales por lo que este método es válido para sustratos pequeños no para grandes moléculas. Por otra parte las partículas de geles son difíciles de utilizar en reactores de lecho fijo ya que se compactan y originan grandes pérdidas de carga.

A la hora de seleccionar un soporte para la inmovilización hay que tener en cuenta una serie de aspectos fundamentales como son:

- a) Estabilidad química con respecto al medio en el que va a ser utilizado.
- b) Area superficial elevada para inmovilizar a la enzima.
- c) Resistencia microbiana.
- d) La carga de la superficie o poro con respecto al sustrato.
- e) Estabilidad térmica.
- f) Forma o tamaño de las partículas.
- g) Posible regeneración para su posterior utilización.

TABLA 2.16

SOPORTES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Soportes inorgánicos:	Soportes orgánicos:
Caolinita	Celulosa
Sílice coloidal	Agarosa
Partículas de vidrio	Colodión
Vidrio de poro controlado	Almidón
Alúmina	Poliacrilamidas
Alúmina de poro controlado	Dextrano
Titanio de poro controlado	Nylon
Oxido de níquel	Colágeno
Zirconia de poro controlado	Copolímeros orgánicos (anhídrido maleico, etileno)
Zirconia recubierta de vidrio de poro controlado	Celulosa DEAE
Carbón (carbón vegetal)	
Hidroxiapatito	
Oxido de hierro	

2.3.3 Inmovilización de la enzima glucosa-isomerasa.

Para la inmovilización de glucosa isomerasa se han utilizado diferentes técnicas y soportes, Tabla 2.17. Sin embargo, al ser esta enzima inmovilizada producida industrialmente, la mayoría de los métodos utilizados en su inmovilización están protegidos por patentes.

TABLA 2.17

INMOVILIZACION DE GLUCOSA ISOMERASA.

SOPORTE	TECNICA	REFERENCIA
Esferas de vidrio poroso	Enlace covalente	Volkin <i>et al.</i> (1989)
Resina aniónica PRIMAFLOC C-7	Atrapamiento	Straatsma <i>et al.</i> (1983)
Resina catiónica PRIMAFLOC A-10		
Gelatina	Oclusión y entrecruzamiento con glutaraldehido	VOS <i>et al.</i> (1990)
Esferas vidrio poroso	Enlace covalente	Strandberg y Smiley (1972)
Esferas vidrio poroso	Enlace covalente	Lee <i>et al.</i> (1976)
Quitina	Adsorción	Stanley <i>et al.</i> (1976)

2.3.4 Efecto de la inmovilización sobre la cinética y las propiedades enzimáticas.

El proceso de inmovilización puede modificar tanto la cinética como diferentes propiedades de las enzimas, pudiendo provocar una disminución de la actividad específica de las mismas (Rodríguez 1991).

Los cambios provocados en la actividad enzimática pueden ser debidos a varios factores:

Efectos configuracionales: debidos a modificaciones de los aminoácidos que constituyen el centro activo de la misma ya sean cambios en la estructura proteica de la enzima y/o cambios en su carga.

Efectos estéricos: cuando el tamaño del sustrato y la enzima afectan a la interacción entre ellos.

Efectos particionales: que están relacionados con la naturaleza química del soporte empleado como matriz y especies de bajo peso molecular presentes en el medio.

Efectos difusionales: relacionados con la resistencia al transporte del sustrato desde el seno de la disolución hasta los centros activos y con la difusión de los productos de reacción hasta la disolución. Estas resistencias se clasifican en efectos de transferencia de materia externa cuando se producen entre el seno de la disolución y la superficie externa de la partícula y los efectos de transferencia de materia interna cuando lo hacen entre la superficie externa de la partícula y los centros activos de la enzima inmovilizada en una matriz porosa.

Los cambios que se han observado en las propiedades de la enzima inmovilizada pueden ser los siguientes:

Modificación de los parámetros cinéticos: constante de Michaelis y velocidad máxima de reacción que pueden aumentar o disminuir dependiendo del método empleado en la inmovilización.

Cambios de actividad frente a pH, que dependen de la carga eléctrica de la proteína que constituye la enzima y/o de la carga del soporte.

Variación del perfil de velocidad frente a la temperatura: la temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas por atrapamiento en geles y sobre soportes porosos puede verse aumentada debido a efectos difusionales en el caso de soportes porosos, que protegen a la enzima contra la desnaturalización, ya que la temperatura en el microentorno de la enzima es menor que en el seno de la disolución. Sin embargo se ha observado disminución de la temperatura (Mori *et al.* 1973) y con bastante frecuencia ningún cambio en la misma (Chibata *et al.* 1979).

Estabilidad frente a la temperatura: la influencia de la inmovilización sobre la estabilidad térmica ha sido motivo de abundantes estudios, existen todo tipo de resultados (aumento, disminución, no modificación) pero el aumento es el efecto más frecuente, observándose que cuando el método de inmovilización empleado es el enlace covalente y atrapamiento se produce un importante aumento en la estabilidad térmica, mientras que si la inmovilización se produce por adsorción física la estabilidad térmica disminuye.

2.4 ESTUDIOS CINETICOS DE LA ISOMERIZACION ENZIMATICA DE GLUCOSA A FRUCTOSA.

Desde que en 1957 fue descubierta la enzima glucosa isomerasa por Marshall y Kooi, se han llevado a cabo una serie de trabajos relacionados con esta enzima, que ya en 1966 en Japón se producía en cantidades suficientes para ser utilizada en operaciones industriales, en primer lugar en reactores discontinuos en forma soluble y posteriormente inmovilizada. Sin embargo,

estos estudios se han encaminado fundamentalmente a conseguir métodos adecuados que estabilicen la enzima, lo que ha sido el aspecto más importante para que la obtención de jarabes de fructosa sea económicamente viable; o al modo de operación de los reactores que utilizan enzimas inmovilizadas y todos aquellos aspectos que afectan al diseño del reactor.

Son pocos por tanto los trabajos cuantitativos realizados sobre el comportamiento cinético de la reacción, siendo Takasaki (1967) el que realiza un primer estudio cinético y del equilibrio de esta isomerización, utilizando enzima en forma soluble. La mayoría de los autores se limitan a obtener los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales, lo que proporciona un conocimiento limitado de la reacción, y los utilizan para el diseño y optimización del reactor. Tampoco es frecuente, en los estudios cinéticos realizados, la consideración del transporte interno o externo cuando se utilizan enzimas inmovilizadas. Estos efectos de transferencia de materia pueden reducir, de forma considerable, la velocidad de reacción y si no son tenidos en cuenta, el valor de los parámetros cinéticos aportados pueden venir afectados de errores importantes.

Otro factor importante en el estudio de enzimas inmovilizadas son los 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.

Por simplicidad los aspectos relacionados con la cinética, transporte interno y externo, estabilidad de la enzima, etc., suelen ser considerados de forma independiente; pero sería deseable para el diseño eficiente de un reactor que utilice enzimas inmovilizadas el desarrollo de un modelo que tenga en cuenta simultáneamente estos aspectos, lo que permitiría optimizar las variables de operación del proceso de isomerización glucosa-fructosa.

Entre los estudios cinéticos realizados se pueden destacar los efectuados por Sproull *et al.* (1976), Kikkert *et al.* (1981), Van Keulen *et al.* (1981), Havewala y Pitcher (1974), Chen y Wu (1986) y Luzón *et al.* (1993). Sproull *et*

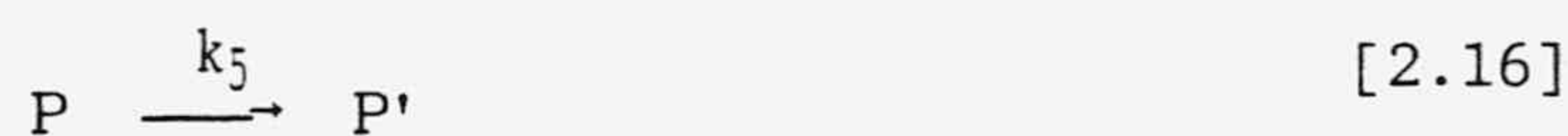
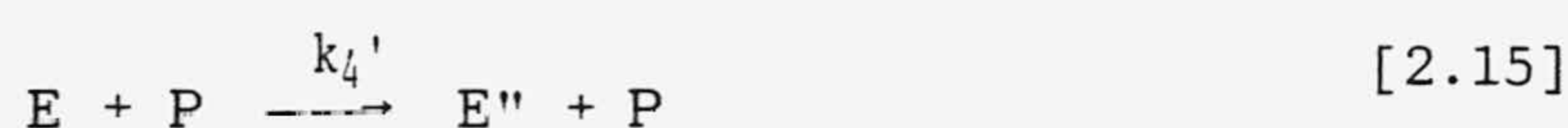
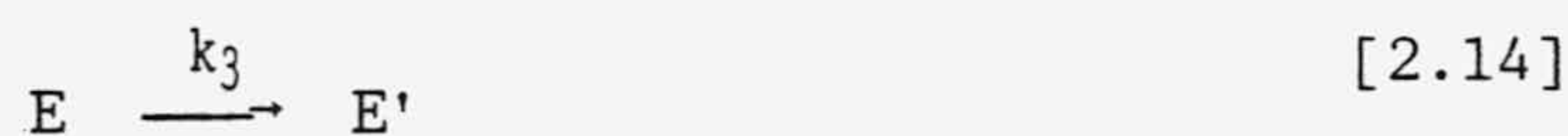
al. (1976), utilizando un conjunto de células, WC, sin inmovilizar, suministradas por Novo Industry y un reactor tipo tanque agitado, estudian el equilibrio de isomerización preparando muestras de concentraciones próximas al equilibrio y a las temperaturas 30, 45, 60, 70 y 80°C; obtienen los siguientes datos para K_e

TABLA 2.18

CONSTANTES DE EQUILIBRIO. SPROULL *et al.* (1976)

T, °C	30	45	60	70	80
K_e	0.828	0.957	1.141	1.283	1.381

También realizan estudios de desactivación a pH = 7 en ausencia de sustrato a las temperaturas de 40, 60 y 80°C proponiendo el siguiente modelo para la desnaturalización de la enzima



La enzima E se desactiva de forma irreversible por desnaturalización y por la acción de las proteasas presentes en el conjunto de células, P. Estas proteasas también se desactivan térmicamente, dando lugar a P', proteasa desactivada.

Las constantes de desactivación y sus respectivas energías de activación son las indicadas en la Tabla 2.19, donde P son los moles de proteasas por unidad de masa del conjunto de células.

TABLA 2.19

CONSTANTES DE DESACTIVACION ENZIMATICA, Sproull *et al.* (1976).

Temperatura, °C	k_4P , g WC/L	k_3 , min ⁻¹	k_5 , min ⁻¹
40	$1.667 \cdot 10^{-5}$	$2.140 \cdot 10^{-4}$	$5.706 \cdot 10^{-3}$
60	$8.473 \cdot 10^{-5}$	$5.883 \cdot 10^{-4}$	$1.578 \cdot 10^{-2}$
80	$2.549 \cdot 10^{-4}$	$1.396 \cdot 10^{-3}$	$3.625 \cdot 10^{-2}$
Energía de activación, cal/g mol	4900	10300	10100

Estos autores no tienen en cuenta los posibles efectos de transferencia de materia y suponen que el mecanismo de reacción es el indicado en el apartado 2.2.3, ecuación [2.2], cinética reversible de Michaelis-Menten. Las constantes cinéticas propuestas para la reacción de isomerización glucosa-fructosa así como las energías de activación son las indicadas en la Tabla 2.20.

Kikkert *et al.* (1981) y Van Keulen *et al.* (1981) utilizan un reactor tanque agitado para sus experimentos, dos catalizadores industriales, ICI y RJR, y células de *Arthrobacter* inmovilizadas y libres para la isomerización de glucosa a fructosa y viceversa. Eliminan los efectos de transferencia de materia interna utilizando partículas de catalizador de diámetro inferior a 140 μm .

TABLA 2.20
PARAMETROS CINETICOS, Sproull *et al.* (1976)

Temperatura, °C	40	60	80
$V_{mg} \cdot 10^4,$ mol/(min · g _{WC})	0.166	1.549	11.823
$V_{mf} \cdot 10^4,$ mol/(min · g _{WC})	0.217	1.320	6.531
K_{mg}, M	0.572	0.498	0.722
K_{mf}, M	0.691	0.472	0.553
$k_g, L/(min \cdot g_{WC})$	$6.695 \cdot 10^{-5}$	$3.248 \cdot 10^{-4}$	$1.3178 \cdot 10^{-3}$
$k_f, mol/(min \cdot g_{WC})$	$1.6726 \cdot 10^{-5}$	$1.1041 \cdot 10^{-4}$	$5.8858 \cdot 10^{-4}$
$k_{-g}, mol/(min \cdot g_{WC})$	$1.5983 \cdot 10^{-5}$	$1.3338 \cdot 10^{-4}$	$8.7536 \cdot 10^{-4}$
$k_{-f}, L/(min \cdot g_{WC})$	$7.6316 \cdot 10^{-5}$	$4.0863 \cdot 10^{-4}$	$1.8093 \cdot 10^{-3}$
Energías de Activación	$E_g = 16400$ cal/mol $E_f = 19600$ cal/mol		$E_{-g} = 22000$ cal/mol $E_{-f} = 17400$ cal/mol

Estiman los parámetros cinéticos de la reacción a partir de las velocidades iniciales y a partir de éstos la constante de equilibrio de la reacción de isomerización, indicada en la Tabla 2.23, mediante la ecuación

$$K_e = \frac{[F]_e}{[G]_e} = \frac{V_{mg} K_{mf}}{V_{mf} K_{mg}} \quad [2.17]$$

Los valores de K_{mg} y K_{mf} obtenidos, excepto K_{mf} para las células libres, son prácticamente iguales. Las constantes cinéticas del modelo de reacción reversible, ecuación [2.2] multiplicadas por la concentración de enzima en el

microorganismo, obtenidas a partir de los parámetros anteriores son las indicadas en la Tabla 2.22.

Utilizando mezclas de fructosa-glucosa a una concentración total de hexosas 3.4 Kmol/m^3 comprueban que la velocidad de reacción se ajusta a una cinética de primer orden en la forma:

TABLA 2.21

VALORES DE K_m y V_m , Kikkert *et al.* (1981) y Van Keulen *et al.* (1981).

Catalizador	T, °C	pH	$V_{mg} \cdot 10^3,$ mol/s · Kg _{cat}	$V_{mf} \cdot 10^3,$ mol/s · Kg _{cat}	K_{mg} mol/m ³	K_{mf} mol/m ³
ICI	50	8.2	4.9	4.1	300	200
ICI	60	8.2	9.4	7.6	360	270
ICI	60	7.1	7.3	8.5	390	530
ICI	65	8.2	12.2	10.5	390	320
RJR	60	8.0	12.3	10.8	340	310
Células libres	60	7.9	3.21	41	300	380
Células inmov.	60	7.9	2.91	2.21	340	300

TABLA 2.22
 CONSTANTES CINETICAS Y ENERGIAS DE ACTIVACION
 KIKKERT *et al.* (1981), VAN KEULEN *et al.* (1981).

Catalizador	T, °C	pH	$10^{-5} \text{ m}^3/(\text{s} \cdot \text{kg}_{\text{cat}})$		$10^{-3} \text{ m}^3/(\text{s} \cdot \text{kg}_{\text{cat}})$	
			$k_g e_t$	$k_{-f} e_t$	k_{-g}	k_f
ICI	50	8.2	3.0	3.6	4.1	5.0
ICI	60	8.2	4.7	6.3	7.6	9.4
ICI	65	8.2	5.8	7.2	10.5	12.2
ICI	60	7.1	4.0	2.3	8.5	7.3
RJR	60	8.0	6.8	7.5	10.8	12.3
EA (KJ/mol)		8.2	40	35	55	55

$$r_G = k_a E (G - G_e) = k_a E \left(G - \frac{G_0}{K_e + 1} \right) \quad [2.18]$$

Los valores de k_a obtenidos se muestran en la Tabla 2.23.

Havewala y Pitcher (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 dos tipos de reactores, uno de lecho fijo y otro 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.

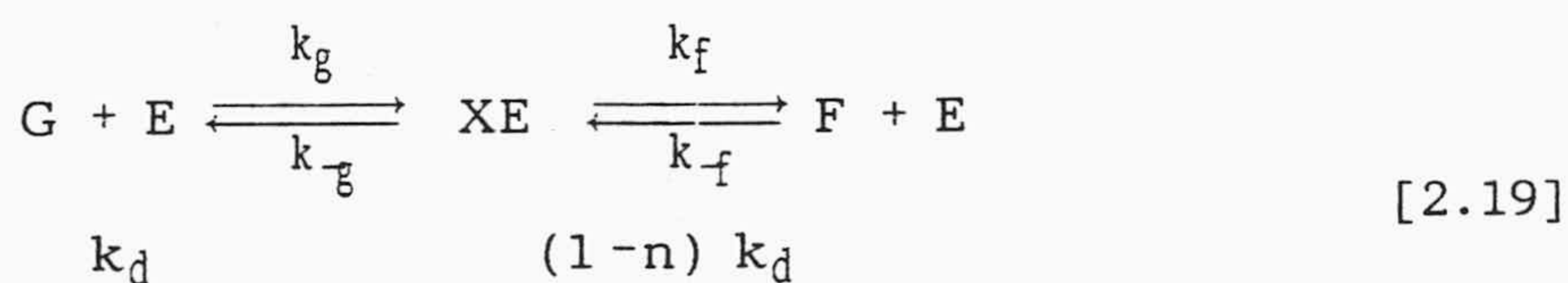
TABLA 2.23

CONSTANTE CINETICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN, Kikkert *et al.* (1981).

Cataliza- dor	T, °C	pH	k_a $m^3/(s \cdot kg_{cat})$ 10^{-6}	K_e
ICI	50	8.2	2.5	0.93
ICI	60	8.2	4.7	1.07
ICI	60	7.5	4.4	1.06
ICI	60	7.1	3.9	1.06
ICI	60	6.5	3.1	1.04
ICI	65	8.2	6.3	1.12
RJR	60	8.0	6.3	1.06

No obtienen diferencias en la velocidad de reacción para los dos sistemas utilizados cuando emplean la enzima inmovilizada. Las concentraciones de fructosa en el equilibrio son 50.4%, 51.4% y 52.3% a las temperaturas de 60, 70 y 79.5°C respectivamente.

Chen y Wu (1986) proponen el mecanismo reversible de Briggs-Haldone para la reacción de isomerización fructosa-glucosa



Enzima desactivada

Cuando $0 < n < 1$ la desactivación del complejo enzima-sustrato es más pequeña que el 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.

Emplean una enzima comercial, swetasa, con un tamaño de partícula $< 100 \mu\text{m}$ para eliminar los efectos de difusión interna y un reactor tipo tanque agitado. Determinan los parámetros cinéticos K_{mg} , K_{mf} , V_{mg} y V_{mf} a partir de velocidades iniciales de reacción a las temperaturas de 60, 65, 70, 75 y 80°C y $\text{pH} = 8.25$. Los resultados obtenidos, así como las constantes de equilibrio a estas temperaturas son los indicados en la Tabla 2.22.

TABLA 2.24

CONSTANTES CINETICAS Y DE EQUILIBRIO, Chen Y Wu (1986)

$T, ^\circ\text{C}$	V_{mg} $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cat}}$	V_{mf} $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cat}}$	K_{mg}, M	K_{mf}, M	K_e
60	$2.92 \cdot 10^2$	$1.87 \cdot 10^2$	0.70	0.45	0.99
65	$3.99 \cdot 10^2$	$3.02 \cdot 10^2$	0.78	0.60	1.02
70	$5.40 \cdot 10^2$	$4.72 \cdot 10^2$	0.84	0.83	1.13
75	$7.41 \cdot 10^2$	$7.35 \cdot 10^2$	0.93	1.13	1.23
80	$9.83 \cdot 10^2$	$1.11 \cdot 10^3$	1.01	1.57	1.38

También realizan experimentos de desactivación a $\text{pH} = 7$ y a las temperaturas de 70, 75 y 80°C utilizando varias concentraciones de sustrato. Teniendo en cuenta el modelo anteriormente expuesto, y que la desactivación total de la enzima viene dada por

$$\frac{dE_t}{dt} = -k_d (E + (1 - n) XE) \quad [2.20]$$

donde E y XE son las concentraciones de enzima activa libre, y del complejo enzima-sustrato respectivamente. Obtienen que el valor de n que ajusta los experimentos de desactivación es 0.5, lo que indica protección de la enzima por parte del sustrato.

Luzón et al. (1993)., realizan un estudio cinético de la reacción de isomerización fructosa-glucosa utilizando dos enzimas comerciales una en forma soluble SPEZYME GI suministrada por Genencor international y otra inmovilizada SWEETZYME T de Novo. La reacción de isomerización se ajusta, según estos autores, a un proceso reversible de pseudo-primer orden lo que indica que las constantes de Michaelis Menten en ambos sentidos son prácticamente iguales y por tanto que la afinidad de ambos isómeros por la enzima es muy próxima.

La constante cinética aparente de pseudo-primer orden obtenida para las dos enzimas, libre K_{aL} e inmovilizada K_{aI} se recogen en la Tabla 2.25.

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 *et al.* (1976), Chen *et al.* (1980), Straatsma *et al.* (1983) y Nakamura *et al.* (1984) y Luzón et al. (1993).

Lee *et al.* (1976) utilizan un reactor de lecho fijo con recirculación donde la enzima, proveniente de *Streptomyces* e inmovilizada por enlace covalente con glutaraldehído, está confinada.

TABLA 2.25

CONSTANTES CINETICAS DE PSEUDO-PRIMER ORDEN, Luzón et al. (1993).

T°C	S ₀	Ka _I ,L/gh	Ka _L ,L/gh
30	0.5	0.00454	
	1.0	0.00290	
	2.0	0.00145	
40	0.5	0.0119	0.0274
	1.0	0.00694	0.0162
	2.0	0.00381	0.0107
50	0.5	0.0243	0.0666
	1.0	0.0152	0.0455
	1.5	0.0122	
	2.0	0.00908	0.0249
60	0.5	0.0519	0.1921
	1.0	0.0301	0.1155
	2.0	0.018	0.0609

Analizan la influencia de la transferencia de materia interna y externa de forma experimental variando el tamaño de partícula del catalizador, entre 20 y 120 μm , la velocidad de flujo en el reactor y la temperatura, 50-75°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 pH = 7, determinando los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales de reacción siendo sus valores

$$K_{mg} = 0.21 \text{ M} \quad V_{mg} = 15.8 \frac{\text{mg}}{\text{min} \cdot \text{mL}_{\text{cat}}} \quad [2.21]$$

$$K_{mf} = 0.40 \text{ M} \quad V_{mf} = 30.5 \frac{\text{mg}}{\text{min} \cdot \text{mL}_{\text{cat}}} \quad [2.22]$$

$$K_e = 1.03 \quad [2.23]$$

Utilizando estos parámetros simulan la conversión con el curso del tiempo, considerando cinética reversible de Michaelis-Menten, no ajustando los experimentos para concentraciones de sustrato superiores a 0.5 M.

Chen *et al.* (1980) desarrollan un modelo que tiene en cuenta la influencia de la resistencia difusional en el poro y película del catalizador sobre la velocidad global de la isomerización de glucosa incluyendo también la desactivación de las células inmovilizadas dentro de un reactor diferencial de lecho fijo.

La enzima utilizada en los experimentos cinéticos son células de *Streptomyces phaeochromogenes* inmovilizadas por agregación en queratina y con diámetros de partícula 0.125 cm, 0.046 cm y 0.018 cm, el pH = 8.3, las concentraciones de sustrato comprendidas entre 0.5 y 5.10 M de glucosa y las temperaturas en el rango de 60-80°C.

Consideran cinética reversible de Michaelis-Menten modificada con una desactivación de la enzima de primer orden. Realizan un tratamiento teórico en el que evalúan dos factores de efectividad: η_D que tiene en cuenta los efectos de difusión en los poros y la desactivación y η_{Df} que además incluye los efectos de transferencia de materia en la película, en función del módulo de Thiele, el módulo de película y los parámetros cinéticos. Para la evaluación de η_D y η_{Df}

aplican un procedimiento iterativo suponiendo la concentración en la superficie de la partícula y aplicando una correlación empírica propuesta por Kobayashi *et al.* (1976) para la integración de la ecuación de continuidad en coordenadas esféricas.

A partir de las velocidades iniciales obtienen los siguientes parámetros cinéticos para la isomerización glucosa fructosa:

TABLA 2.26
VALORES DE K_{mg} , K_{mf} y K_e , Chen *et al.* (1980)

T, °C	K_{mg} mol/mL	K_{mf} mol/mL	K_e
60	$1.73 \cdot 10^{-3}$	$1.80 \cdot 10^{-3}$	1.15
65	$1.61 \cdot 10^{-3}$	$1.70 \cdot 10^{-3}$	1.22
70	$1.50 \cdot 10^{-3}$	$1.62 \cdot 10^{-3}$	1.29
75	$1.41 \cdot 10^{-3}$	$1.53 \cdot 10^{-3}$	1.36
80	$1.33 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-3}$	1.43

Evaluando los coeficientes η_D y η_{Df} a partir de los datos experimentales y comparándolos con los calculados determinan que existe una fuerte resistencia al transporte en la película.

Straatsma *et al.* (1983) analizan en un primer artículo la estabilidad de un conjunto de células de *Arthrobacter* inmovilizadas, estudiando posibles causas de desactivación enzimática: cambios de pH, temperatura y presencia de oxígeno en los experimentos de isomerización glucosa a fructosa. Posteriormente utilizan un reactor continuo sólido-líquido en el que el fluido es recirculado sobre el lecho catalítico a una velocidad mucho mayor que la de alimentación y diferentes formas de partículas: esféricas de $d_p = 0.9 \cdot 10^{-3}$ m y cilíndricas con $d_p = 5 \cdot 10^{-3}$ m y una longitud de $1.7 \cdot 10^{-3}$ m. Demuestran 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, que

son apreciables en sus experimentos. Los valores de esta constante en función del pH y la temperatura se indican en la Tabla 2.27.

TABLA 2.27

CONSTANTE CINETICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN, Straatsma *et al.* (1983).

T, °C	55	60	60	60	60	60	55
pH	7.5	6.5	7.0	7.5	8.0	8.2	6.5
$k_{a0} \cdot 10^{-6}$ $m^3/s \cdot kg_{cat}$	2.8	2.9	3.3	4.7	5.0	5.5	5.6

La estabilidad de la enzima puede expresarse en función del tiempo, pH y temperatura por

$$k_{a,t} = k_{a,0} \exp (- k'_a t) \quad [2.24]$$

$$k'_a = 2.5 \cdot 10^3 (\text{pH})^2 - 3.66 \cdot 10^{-2} \text{pH} - 2.93 \cdot 10^{-2} \cdot \exp \left(\frac{130000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{333} \right) \right) \quad [2.25]$$

Nakamura *et al.* (1984) utilizan un reactor de lecho fluidizado para el estudio cinético de la isomerización glucosa-fructosa y glucosa isomerasa de *Streptomyces phaeochrogenes* inmovilizada por atrapamiento. Desarrollan un modelo de dispersión axial considerando partículas esféricas, el efecto de la difusión interna y cinética de pseudoprimer orden. Este modelo reproduce los resultados experimentales de conversión obtenidos en el reactor de lecho fluidizado sólo para las velocidades de flujo intermedias

empleadas de 0.5 cm/min.

Miden con experimentos de impulso-respuesta el coeficiente de difusión efectivo mediante análisis de momentos y el incremento de volumen experimentado por las partículas de catalizador cuando se humedecen, y deducen que la difusividad efectiva es el 60% de la difusividad molecular.

Luzón et al. (1993), por integración de la ecuación de continuidad del sustrato en la partícula de enzima inmovilizada proponen una ecuación para el cálculo del factor de efectividad incluyendo la desviación de la cinética de pseudo-primer orden η'

$$\eta' = \frac{\beta \eta_0 + 2.614 \eta_1}{(\beta + 2.614)(\beta + 1)} \quad [2.26]$$

a partir de los valores del factor de efectividad para cinética de orden cero η_0 y uno η_1 y β

$$\eta_0 = 1 \quad \text{para} \quad m_G = 1/3 \quad [2.27]$$

$$\eta_0 = 1 - z_c^3 \quad \text{para} \quad m_G > 1/3 \quad [2.28]$$

siendo m_G el módulo de Thiele generalizado y z_c^3 la solución de la ecuación

$$z_c^3 - \frac{3}{2} z_c^2 + \frac{1}{6 m_G^2} - \frac{1}{2} = 0 \quad [2.29]$$

$$\eta_1 = \frac{1}{m_G \left(\frac{1}{\operatorname{tgh}(3m_G)} - \frac{1}{3 m_G} \right)} \quad [2.30]$$

y $\beta = K_b (x_e - x_s)$ siendo K_b para la reacción reversible de isomerización fructosa-glucosa, ecuación [2.2]

Realizan experimentos de isomerización fructosa-glucosa utilizando enzimas libres SPEZYME GI e inmovilizada SWEETZYME T cuya comparación

$$K_b = \frac{s_0}{K_0 (K_1 s_0 + 1)} \quad [2.31]$$

$$K_0 = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f + k_g} \quad [2.32]$$

$$K_1 = \frac{k_f k_g}{k_f k_{-g} + k_{-f} k_g} \quad [2.33]$$

permite el cálculo simultaneo de la actividad relativa de ambas enzimas y de la difusividad efectiva en la enzima inmovilizada, la determinación del factor de efectividad correspondiente a la enzima inmovilizada permite evaluar las constantes cinéticas elementales independientes y su variación con la temperatura.

TABLA 2.28

CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ISOMERIZACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA

T, °C	$k_f \cdot e_t = k_g \cdot e_t$, L/gh	$k_{-f} \cdot e_t$	$k_{-g} \cdot e_t$, mol/gh
30	0.0153	0.00175	0.00210
40	0.0465	0.00500	0.00539
50	0.0829	0.01512	0.01471
60	0.4223	0.03384	0.02994

Las ecuaciones obtenidas de las constantes cinéticas en función de la temperatura son:

$$k_f \cdot e_t = k_g \cdot e_t = 2.08 \cdot 10^{13} \cdot e^{\left(-\frac{87930}{RT}\right)} \frac{L}{gh} \quad [2.34]$$

$$k_{-f} \cdot e_t = 5.12 \cdot 10^{11} \cdot e^{\left(-\frac{83840}{RT}\right)} \frac{\text{mol}}{gh} \quad [2.35]$$

$$k_{-g} \cdot e_t = 2.10 \cdot 10^{10} \cdot e^{\left(-\frac{75340}{RT}\right)} \frac{\text{mol}}{gh} \quad [2.36]$$

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 *et al.* (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, consiguen un incremento del 8% de conversión si lo comparan con el reactor de funcionamiento a temperatura constante.

En la optimización de la temperatura consideran cinética enzimática reversible de Michaelis-Menten con desactivación enzimática de 1^{er} orden sin influencia de la concentración del sustrato:

$$r_{GF} = \frac{\bar{V}_m (G_0 - G_e) e^{-k_d t}}{\bar{K}_m + (G_0 - G_e)} \quad [2.37]$$

donde G_0 y G_e son las concentraciones de sustrato inicial y de equilibrio; k_d , la constante de desactivación enzimática y \bar{K}_m \bar{V}_m la constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima de reacción modificada

$$\bar{V}_m = \frac{K_{mg} V_{mf} + K_{mf} V_{mg}}{K_{mf} - K_{mg}} \quad [2.38]$$

$$K_m = \frac{K_{mg} (K_{mf} + G_0)}{K_{mf} - K_{mg}} \quad [2.39]$$

Los parámetros cinéticos de la velocidad de reacción utilizados en el modelo son evaluados experimentalmente en función de la temperatura resultando

$$\bar{V}_m = - 48.8 \exp \left(- \frac{4510}{T} \right) \quad [2.40]$$

$$K_m = - 10.8 \exp \left(- \frac{1280}{T} \right) \quad [2.41]$$

$$K_e = 4350 \exp \left(- \frac{2725}{T} \right) \quad [2.42]$$

La velocidad de desactivación enzimática decrece con la concentración de sustrato, lo que parece indicar que el sustrato protege la desactivación de la enzima. La constante de desactivación en función de la temperatura a $[G]_0 = 0.1 \text{ M}$ viene dada por

$$k_d = 1.95 \cdot 10^{12} \exp \left(- \frac{10960}{T} \right) \quad [2.43]$$

Gram y Bang (1990) desarrollan un sistema de reactores de lecho fijo en continuo con la enzima glucosa isomerasa (Sweetzyme Q) inmovilizada, automatizado con un sistema de toma de muestras y tres analizadores de inyección de flujo para la medida y control de pH, concentración de glucosa y fructosa.

Los resultados cinéticos obtenidos al variar la velocidad de alimentación del jarabe de glucosa indicaban que no existían limitaciones a la transferencia de materia externa y que la cinética era bien descrita como una reacción reversible de pseudoprimer orden, siendo $K_a = 17 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para $s_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/cm}^3$, $T = 60^\circ\text{C}$ y 9 gramos de enzima en el lecho. Encuentran también que la actividad enzimática hasta los 9 días de actuación decrece siguiendo una cinética de primer orden; sin embargo, esta actividad no se ve modificada en el rango de pH entre 7.5 a 8.5. La transferencia de materia interna no puede despreciarse para este tipo de catalizador.

Chen y Weng (1983) emplean distintos tipos de reactores y glucosa isomerasa inmovilizada en queratina con glutaraldehído para la isomerización de glucosa. Determinan experimentalmente las constantes cinéticas y de Michaelis-Menten a partir de las velocidades iniciales de reacción, siendo su valor a pH = 7.5 y 70°C

$$K_{mg} = 1.79 \text{ M}$$

$$V_{mg} = 1.08 \cdot 10^{-1} \text{ mol/min} \cdot g_{cat}$$

$$K_{mf} = 2.47 \text{ M}$$

$$V_{mf} = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/min} \cdot g_{cat}$$

y la difusividad efectiva de glucosa en la enzima inmovilizada a 70°C y $G_0 = 1.8 \text{ M}$ es $D_e = 3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, y la usan para la aplicación de un modelo teórico de flujo de dispersión radial.

La conversión obtenida con distintos tipos de reactores (flujo radial, lecho fluidizado, lecho fijo), eran prácticamente coincidentes al mismo tiempo de residencia 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.

Beck *et al.* (1986) proponen un modelo de reactor para catálisis heterogénea que tiene en cuenta los efectos del transporte interno y externo; los parámetros hidrodinámicos que gobiernan a un reactor a gran escala: disper-

sión axial de fluido, expansión de lecho y retromezcla; y la cinética reversible de la isomerización fructosa-glucosa.

Los parámetros cinéticos eran evaluados experimentalmente utilizando un reactor tipo tanque agitado. Las conversiones predichas por el modelo, son superiores a los valores experimentales de conversión obtenidos utilizando dos tipos de reactores: de lecho fijo y fluidizado. Justifican sus resultados concluyendo que las correlaciones de Bibliografía utilizadas para la transferencia de materia y dispersión no son adecuadas.

Vasic-Racki *et al.* (1991) utilizan un reactor de lecho fijo a pH = 7 y un conjunto de células inmovilizadas en alginato cálcico de *Streptomyces bambbergiensis* como catalizador para obtener los parámetros cinéticos que resultaron ser para la temperatura de 70°C los siguientes:

$$\begin{array}{ll} K_{mg} = 0.38 \text{ M} & V_{mg} = 1.23 \cdot 10^{-5} \text{ mol/s} \cdot g_{cat} \\ K_{mf} = 0.44 \text{ M} & V_{mf} = 1.34 \cdot 10^{-5} \text{ mol/s} \cdot g_{cat} \\ K_e = 0.94 & \end{array}$$

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 cinética reversible de Michaelis-Menten y que tiene 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 Ho (1984) emplean dos tipos de enzima inmovilizada, sweetase y el complejo PG-GI. Determinan los parámetros cinéticos de las reacciones directa e inversa a 60 y 70°C para los dos catalizadores utilizados, que resultaron ser

TABLA 2.29
VALORES DE K_m y V_m Ching y Ho (1984)

ENZIMA	T	K_{mg}	K_{mf}	V_{mg}	V_{mf}
	°C	M	M	mol/h·g _{cat}	mol/h·g _{cat}
sweetase	60	1.07	1.28	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$
PG-GI complejo	70	0.211	0.205	$4.43 \cdot 10^{-2}$	$4.76 \cdot 10^{-2}$

Eligen condiciones experimentales que eliminen los efectos de transferencia de materia, consideran cinética de pseudoprimer orden y proponen un modelo de flujo en pistón con dispersión axial que reproduce los resultados experimentales obtenidos con un reactor de lecho fijo y con el reactor de lecho fluidizado sólo cuando las partículas empleadas eran regulares.

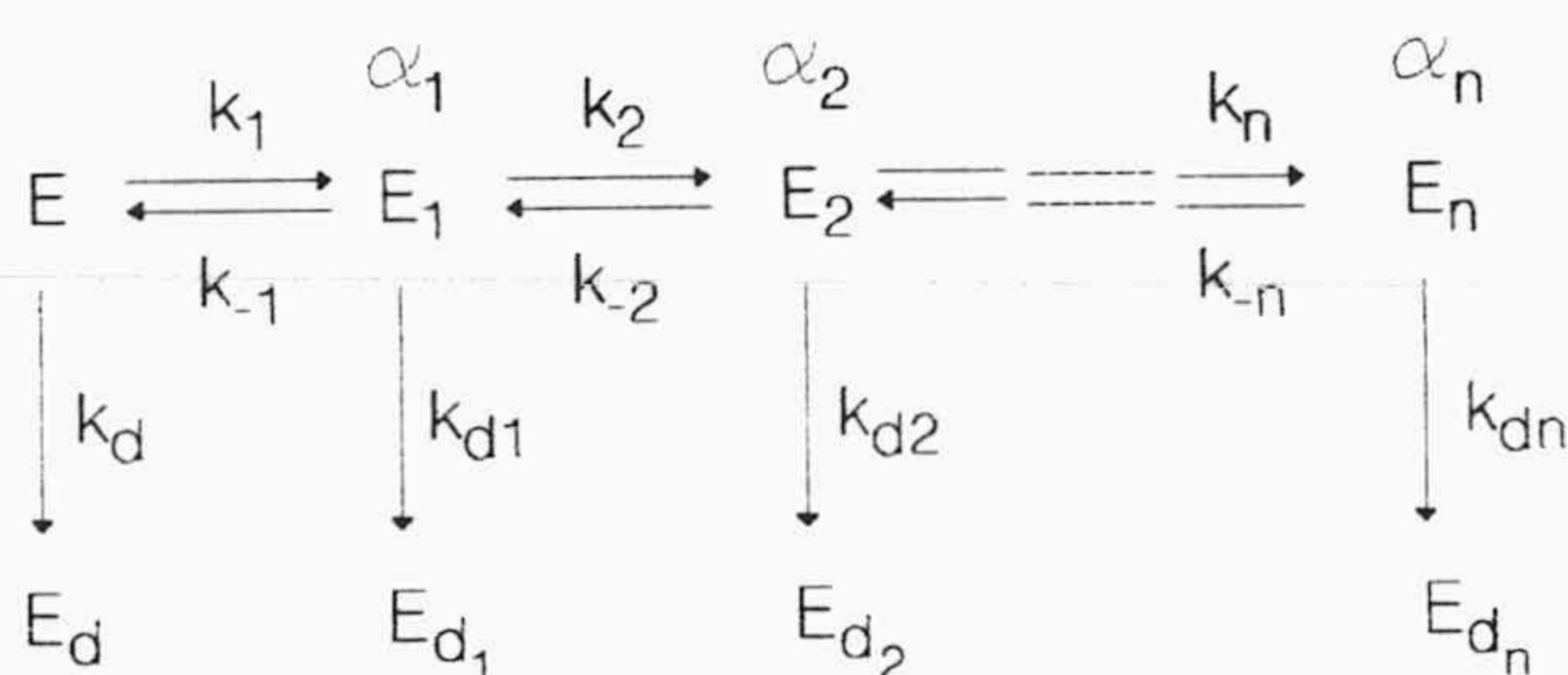
El reactor de lecho fluidizado ha sido ampliamente estudiado por Vos *et al.* (1990). Estos autores desarrollan un modelo teórico de reactor con transporte continuo del biocatalizador en contracorriente con la solución de sustrato. Utilizan glucosa isomerasa inmovilizada (maxazyme) obtenida a partir de *Actinoplanes missouriensis*, consideran 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. Simulan el comportamiento para este reactor y el de lecho fijo indicando que se necesita menor cantidad de catalizador para el reactor de lecho fluidizado con transporte continuo y puede ser útil para la utilización de enzimas con pérdida de actividad.

El estudio de la desactivación enzimática con las condiciones de operación es otro aspecto importante para el desarrollo del modelo cinético de actuación de la enzima.

Jammes P. Henley y Ajit Sadana (1985) desarrollan un modelo general de desactivación enzimática que puede ser útil para determinar el número de formas activas independientes de enzima que participan en el mecanismo de desactivación.

El modelo propuesto considera la desactivación de la enzima nativa, E, en distintas formas intermedias E₁, E₂, ... E_n cada una de las cuales puede desactivarse hasta la forma final E_d, según el esquema

[2.44]



donde α_i es la actividad específica de la forma E_i en relación a la E; k_i y k_{-i} las constantes cinéticas de primer orden respectivamente, y k_{di} las constantes de desactivación de primer orden.

El modelo una vez desarrollado establece para la actividad normalizada

$$\frac{A}{A_0} = D_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + D_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + \dots + D_n \cdot e^{-\lambda_n \cdot t} \quad [2.45]$$

donde D_i son las constantes de integración y cumplen con la condición

$$\sum D_i = 1 \quad [2.46]$$

y λ_i son función de las constantes cinéticas que intervienen en el modelo.

Posteriormente estos mismoa autores Ajit Sadana y James P. Henley (1986) desarrollan modelos para estudiar la influencia de las modificaciones químicas en la desactivación enzimática.

El modelo en serie desarrollado se utiliza para comparar los datos de desactivación de distintos autores.

Ashish Chitnis y Ajit Sadana (1989) desarrollan un modelo de desactivación enzimática en serie, utilizando el equilibrio rápido de protonización y desprotonización de la enzima junto con un proceso de desactivación relativamente más lento. Los modelos presentados son consistentes con los datos y muestran la influencia del pH en la desactivación de diferentes enzimas.

Bravo y col (1990) estudiando la hidrólisis enzimática de celobiosa obtienen desnaturalización de la enzima durante el transcurso de la reacción enzimática indicando que la velocidad de desactivación puede ajustarse mediante un modelo potencial

$$\int_0^t e \cdot dt = Y \cdot e_0 \cdot t = e_0^2 \cdot t^{-n} (2 - n) k_d \left(1 - (1 - (1 - n)) \cdot e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t \right)^{\frac{2-n}{1-n}} \quad [2.47]$$

modelo que permite determinar la constante de desactivación k_d y el orden de reacción de desactivación n realizando el tratamiento a los datos cinéticos de la hidrólisis enzimática. En la expresión anterior Y es el factor de eficacia que será igual a la unidad cuando no exista desactivación.

3. TECNICA EXPERIMENTAL.

3.1 PRODUCTOS UTILIZADOS.

El sustrato empleado ha sido D-(-) Fructosa de Merck y D(-) Glucosa de Panreac.

La enzima sweetzyme tipo A, es una enzima inmovilizada producida de cepas seleccionadas de *Bacillus coagulans* y *Streptomyces* sp.; esta enzima se utiliza fundamentalmente en operaciones discontinuas y presenta las condiciones máximas de estabilidad entre pH 8.0 y 8.5 y temperatura entre 55 y 60°C.

Las características de los restantes productos utilizados son:

- D (+) glucosa anhidra, para análisis, Panreac.
- Tris-(hidroximetil) aminometano, para análisis, Panreac.
- Sulfato de Magnesio 7-hidratado, para análisis, Panreac.
- Acido clorhídrico, 22 °Bé, Panreac.
- Sulfato de Cobalto 7-hidratado, Panreac.

En toda la investigación se ha trabajado a pH=8.5 obtenido con tampón de tris-hidroximetil-aminometano (0.05 M) y HCl, y una concentración de 2g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ para estabilizar la enzima.

3.2 METODOS DE ANALISIS.

3.2.1 Análisis polarimétrico de glucosa y fructosa

La medida de glucosa y fructosa polarimétricamente se ha realizado a la temperatura de 25°C utilizando un polarímetro E. Hartnack que proporciona el valor de la rotación del plano de polarización (α).

Como hay que analizar mezclas de glucosa y fructosa que provienen de la reacción de isomerización se planificaron experimentos para comprobar si los grados de polarización para glucosa y fructosa eran aditivos. En la Tabla 3.1 se muestran las concentraciones de glucosa y fructosa utilizadas así como el α correspondiente a cada una de ellas.

TABLA 3.1

GRADO DE POLARIZACION, α , PARA GLUCOSA Y FRUCTOSA

$[G_0], M$	$[F_0], M$	α_G	α_F	$K_{Gi},$	$K_{Fi},$
0.1	0.1	+0.9	-1.7	+9.0	-17.0
0.5	0.5	+4.4	-7.9	+8.8	-15.8
1.0	1.0	+8.9	-16.1	+8.9	-16.1
				$K_G=+8.9$	$K_F=-16.3$

Para cada disolución de fructosa o glucosa el grado de polarización estará relacionado con la concentración en la forma

$$\alpha_G = K_G [G] \quad [3.1]$$

$$\alpha_F = K_F [F] \quad [3.2]$$

Si son aditivos los grados de polarización, el grado de polarización de la mezcla (α_M) vendrá dado por

$$\alpha_M = \alpha_G + \alpha_F = K_G [G] + K_F [F] \quad [3.3]$$

Preparadas las mezclas de glucosa y fructosa que se muestran en la Tabla 3.2 se determina experimentalmente el grado de polarización de la mezcla α_{FG} y se comparan con el obtenido a partir de la ecuación [3.3], como puede observarse son prácticamente coincidentes.

TABLA 3.2

GRADO DE POLARIZACION α PARA MEZCLAS DE FRUCTOSA Y GLUCOSA

$[G_0], M$	$[F_0], M$	α_{FG}	α_M
0.25	0.25	-1.8	-1.86
0.45	0.05	+3.2	+3.19
0.50	0.50	-3.4	-3.72
0.90	0.10	+6.3	+6.38

Para evitar el posible efecto de la mutarrotación se determinaron las constantes K_F y K_G para concentraciones de fructosa y glucosa comprendidas entre 0.1 y 2.0 M midiendo el grado de polarización pasadas dos horas de la

preparación de la muestra, tiempo suficiente para que el grado de polarización permanezca constante con el tiempo; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3, siendo los valores de las constantes $K_F = -15.57$ y $K_G = +8.64$ que se han utilizado para la medida de fructosa y glucosa, respectivamente.

Utilizando la ecuación [3.3], conocidos k_G y k_F y midiendo experimentalmente α_M para un experimento de isomerización, puede seguirse la evolución de la concentración de fructosa o glucosa con el tiempo.

TABLA 3.3
DETERMINACION DE K_F Y K_G

[G],M	α_G	[F],M	α_F
2.00	+18.0	1.50	-23.4
1.75	+15.8	1.25	-19.4
1.50	+13.5	1.00	-15.6
1.25	+10.7	0.75	-11.6
1.00	+ 8.9	0.50	-7.8
0.75	+ 6.5	0.25	-3.8
0.50	+ 4.4	0.10	-1.6
0.25	+ 2.2		
0.10	+ 0.7		

3.2.2 Análisis enzimático de glucosa

El análisis de glucosa se ha realizado por el método de la glucosa-oxidasa, método GOD-Perid, propuesto por Werner et al. (1970), basado en las reacciones



donde GOD es la enzima glucosa-oxidasa, POD la enzima peroxidasa y ABTS es el 2,2'-azimo-di-(3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6))-sal diamonica. Esta última sustancia es incolora mientras que su forma oxidada, producida por la reacción [3.5] es de color verde.

El reactivo utilizado es un preparado comercial (Böehringer Mannheim GuibH, No 124036) que contiene, en proporciones definidas las enzimas GOD y POD, el compuesto ABTS y un tampón de fosfato, siendo tan sólo necesario diluirlo con agua destilada a un volumen definido. Para cada nuevo preparado de reactivo se obtuvo una recta patrón.

La determinación de glucosa se realiza en un tubo de ensayo añadiendo 0.2 mL de disolución problema, medidos con una micropipeta "Brand", a 5 mL de reactivo; esta disolución se mantiene durante 10 minutos a 40°C y se mide su absorbancia a 610 nm frente a un blanco compuesto por 5 mL de reactivo y 0.2 mL de una disolución de la misma composición que la del problema pero exenta de glucosa.

Se ha obtenido la recta patrón realizando el ensayo descrito previamente a una serie de disoluciones de glucosa de concentración comprendidas entre 50 y 200 mg/L. En la Tabla 3.4 se muestran a título de ejemplo los valores obtenidos de absorbancia (A) para cada concentración de glucosa.

En la Figura 3.1 se representa una de las rectas patrón obtenida que conduce a la ecuación

$$G = 0.003014 \cdot A$$

[3.6]

TABLA 3.4

RECTA PATRON PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA

G_0 , mg/L	A
50	0.147
50	0.149
100	0.300
100	0.302
150	0.454
150	0.452
200	0.604
200	0.602

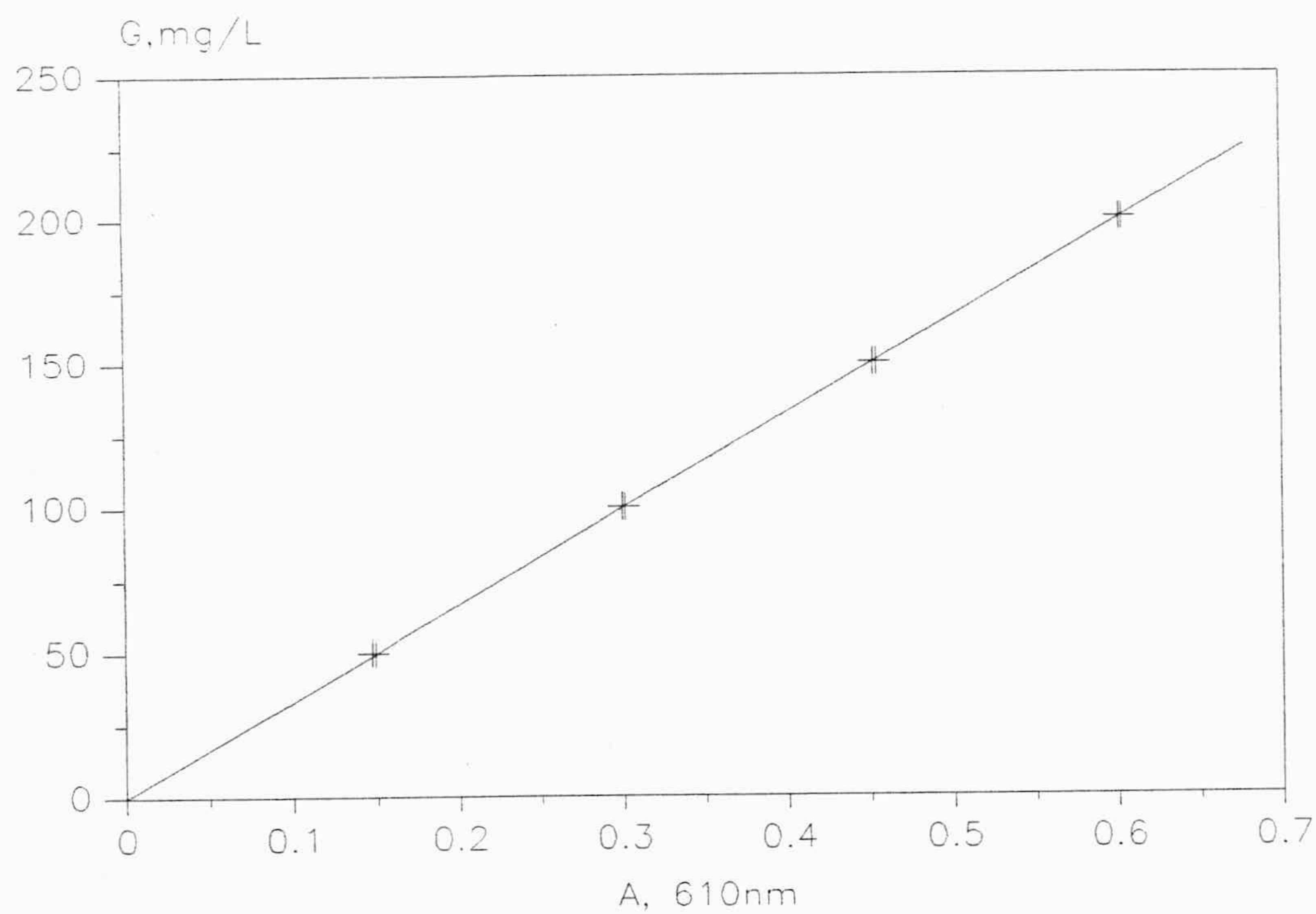


Figura 3.1. Recta patrón para la determinación de glucosa.

3.3 EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION.

Para determinar las condiciones de equilibrio para la reacción de isomerización glucosa \rightarrow fructosa necesarias para la aplicación de cualquier modelo cinético se realizaron experimentos de equilibrio a las temperaturas de 40, 50 y 60 °C en las siguientes condiciones:

Se preparan disoluciones de glucosa y fructosa de concentraciones 0.12; 0.2 y 0.28 g/L a partir de las cuales se forman mezclas para obtener condiciones próximas al equilibrio y se distribuyen en 10 tubos de ensayo a los que previamente se le añaden 0.02 g de enzima. Manteniendo la mezcla en agitación a intervalos regulares se analiza, una vez retirada la enzima por filtración, el contenido de glucosa en cada tubo de ensayo hasta que la concentración de glucosa permanece constante en función del tiempo.

Sin embargo, para la determinación de las condiciones de equilibrio, hay que tener en cuenta que tanto la enzima como la fructosa aportan una cantidad de glucosa inicial que debe ser considerada. Para ello se determina experimentalmente la concentración de glucosa en la enzima " G_E " preparando un tubo de ensayo adicional sólo con enzima y analizando la glucosa al final del experimento de equilibrio. El porcentaje de glucosa que existe inicialmente en la fructosa se ha determinado experimentalmente resultando ser del 0.08%.

Por otra parte también se analiza antes del experimento de equilibrio la glucosa inicial que existe en las mezclas de glucosa-fructosa preparadas " G_I ".

Si se tiene en cuenta que la suma de concentraciones de fructosa y glucosa siempre se mantiene constante en función del tiempo se debe cumplir que

$$G_e + F_e = G_I + F_I \quad [3.7]$$

donde G_e y F_e son las concentraciones de glucosa y fructosa en el equilibrio y G_I y F_I las concentraciones iniciales de glucosa y fructosa antes de comenzar el experimento de equilibrio.

G_I será igual a la concentración de glucosa medida experimentalmente G_i y la aportada por la enzima a cada muestra G_E , es decir

$$G_I = G_i + G_E \quad [3.8]$$

de la misma forma la concentración de fructosa inicial en el experimento de equilibrio F_I será igual a la concentración de fructosa F_0 menos la glucosa inicial, más la fructosa en equilibrio con la glucosa, que aporta la enzima, por tanto

$$F_I = 0.9992 F_0 + K_e G_E \quad [3.9]$$

siendo K_e la constante del equilibrio de isomerización definida como

$$K_e = \frac{F_e}{G_e} \quad [3.10]$$

Si tenemos en cuenta las ecuaciones [3.7], [3.8], [3.9] y [3.10] resulta

$$K_e = \frac{G_i + G_E + 0.9992 F_0 - G_e}{G_e - G_E} \quad [3.11]$$

a partir de la expresión [3.11] conocidos G_i , G_e , G_E y F_0 puede determinarse la constante de equilibrio K_e . Los resultados obtenidos para cada experimento realizado se representan en la Figura 3.2.

Como puede observarse la constante de equilibrio permanece prácticamente constante con la suma de las concentraciones de glucosa y fructosa en el equilibrio para cada temperatura ensayada por lo que para cálculos posteriores se ha tomado el valor medio de dicha constante para cada temperatura.

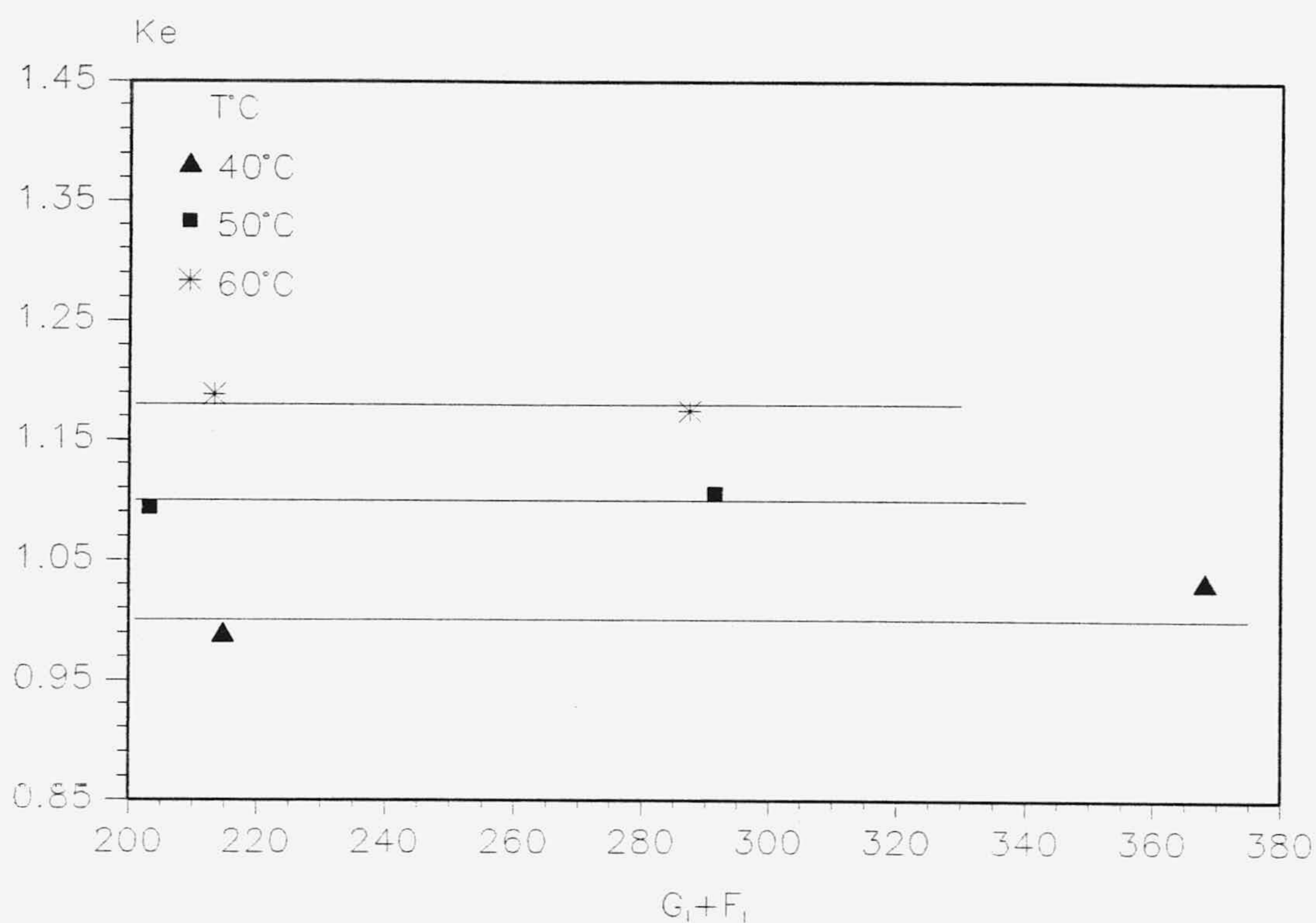


Figura 3.2. Variación de K_e con $G_I + F_I$

3.4 EXPERIMENTOS DE ISOMERIZACION.

La reacción de isomerización de glucosa \rightarrow fructosa se llevó a cabo en primer lugar sin enzima y utilizando para la medida de glucosa tanto el método de análisis polarimétrico como el método enzimático con glucosa-oxidasa indicados anteriormente.

Por otra parte, la reacción de isomerización glucosa-fructosa se realizó en presencia de enzima sweetzyme tipo A en un reactor discontinuo mezcla perfecta, para este caso la cinética del proceso se seguía por el método de la glucosa-oxidasa.

3.4.1 Experimentos de isomerización no enzimáticos

Estos experimentos se realizaban en erlenmeyer de 100 mL y en estufas de cultivo con precisión de 0.5°C, la reacción de isomerización se llevo a cabo partiendo de disoluciones de glucosa y fructosa y la cinética del proceso se seguía tomando muestras en función del tiempo y determinando el grado de polarización de la mezcla " α_M ", o analizando el contenido de glucosa por el método de la glucosa-oxidasa, como se ha comentado anteriormente. Las concentraciones de glucosa y fructosa utilizadas así como las temperaturas ensayadas se recogen en la Tabla 3.5

3.4.2 Experimentos de isomerización enzimáticos

El dispositivo utilizado en estos experimentos se esquematiza en la Figura 3.3 consiste en un tanque encamisado de 500 mL de capacidad con tapa separable, provisto de 5 bocas esmeriladas por las cuales se introduce un agitador, termómetro, pH-metro y se realiza la toma de muestra. El agitador era una varilla metálica de paletas, accionada por un motor eléctrico a una velocidad suficiente para una buena mezcla en todos los experimentos realizados. El dispositivo cuenta también con un sistema de termostatación que bombea agua a la temperatura deseada a través de la camisa del reactor.

El procedimiento experimental seguido en estos experimentos es el siguiente:

Una vez preparada la disolución de fructosa a pH=8.5 y un contenido en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 2 g/L se introducía en el reactor, se alcanzaba la temperatura deseada, se añadía la cantidad de enzima adecuada para cada experimento y a intervalos regulares de tiempo se tomaban muestras de 2 mL que eran recogidas en tubos de ensayo sobre un baño de hielo, inmediatamente la enzima se retiraba por filtración y la muestra se analizaba para determinar el contenido de glucosa por el método de la glucosa-oxidasa. Las variables ensayadas en estos experimentos se recogen en la Tabla 3.6.

TABLA 3.5.
 VARIABLES ENSAYADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE
 ISOMERIZACION NO ENZIMATICOS

	[F ₀] (M)	[G ₀] (M)	T°C
ANALISIS POLARIMETRICO	0.1	0.1	50
	0.5	0.5	50
	1.0	1.0	50
		2.0	50
	0.1	0.1	60
	0.25		60
	0.5	0.5	60
	0.75		60
	1.0	1.0	60
	1.25		60
	1.50		60
		2.0	60
	ANALISIS METODO GLUCOSA-OXIDASA	0.5	
1.0			40
2.0			40
0.5			50
1.0			50
2.0			50
0.5			60
1.0			60
2.0			60

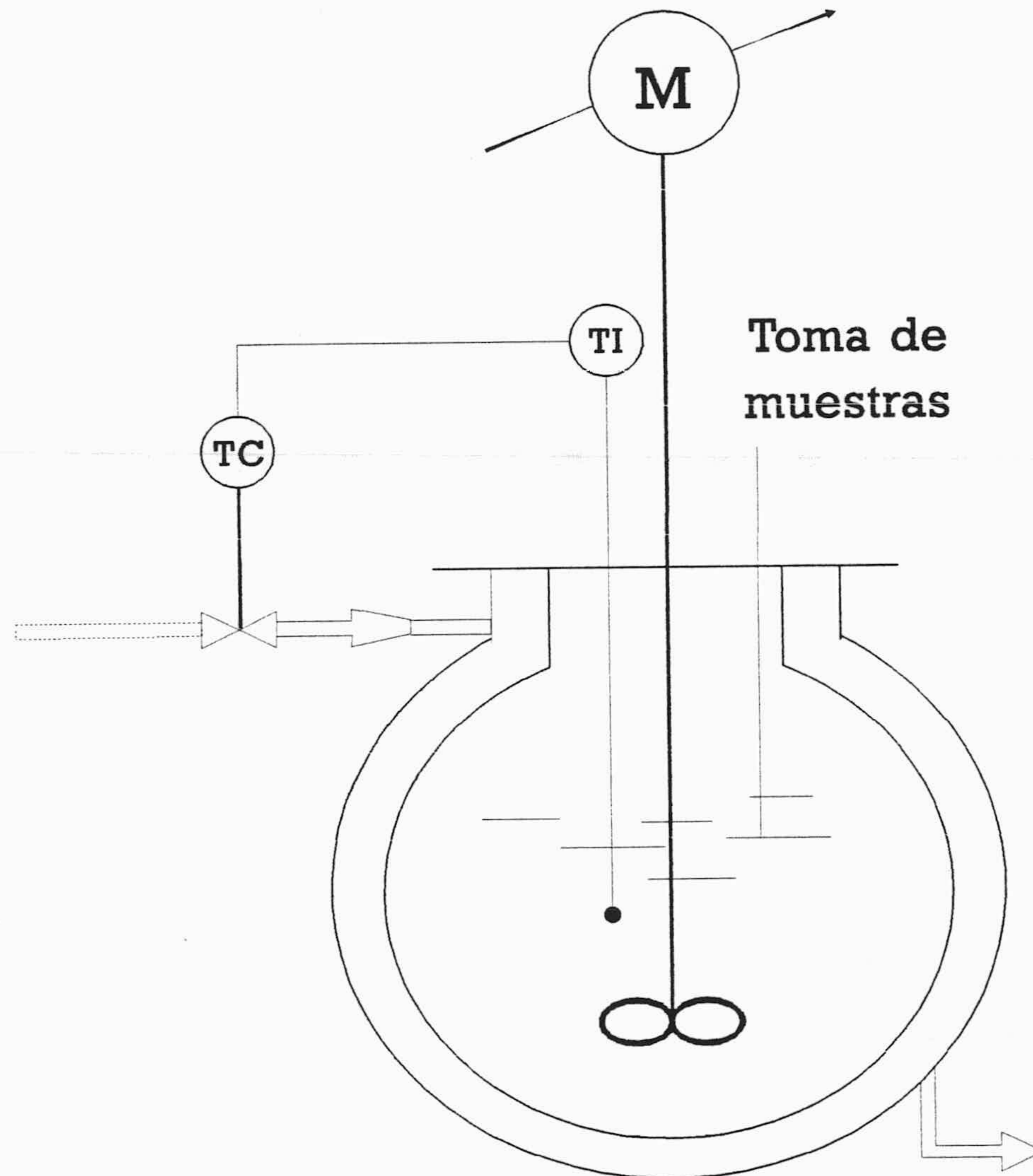


Figura 3.3. Esquema del dispositivo experimental.

TABLA 3.6
 VARIABLES ENSAYADAS EN LOS EXPERIMENTOS
 DE ISOMERIZACION ENZIMATICOS. T= 60°C.

s_0 , M	e_i	Acondicio.	d_p , mm	Va, rpm
0.1	2,4,6,12	No	0.297-0.420	200
0.1	4	No	0.420-0.590	200
0.1	4	No	0.420-0.590	300
0.1	4	No	0.420-0.590	400
0.1	4	No	0.420-0.590	500
0.1	2,4,6	Si	0.420-0.590	300
0.1	2	Si	0.053-0.088	300
0.1	2	Si	0.125-0.177	300
0.1	2	Si	0.177-0.297	300
0.1	2	Si	0.297-0.420	300
0.1	2	Si	0.420-0.590	300
0.1	2,4,6,12	Si	0.053-0.297	300
0.5	2,4,6	Si	0.053-0.297	300
1.0	2,4	Si	0.053-0.297	300
2.0	2,4,6,12	Si	0.053-0.297	300

3.5 CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA.

3.5.1. Clasificación granulométrica

Dado que las partículas con enzima inmovilizada utilizadas en esta investigación, Sweetzyme tipo A, presentaban una distribución irregular de tamaños, se procedió a su clasificación granulométrica mediante tamizado, para disponer de fracciones diferentes tamaños. Se partió inicialmente de 150 g de enzima obteniéndose los resultados que se indican en la Tabla 3.7. Como se observa la mayor cantidad de Sweetzyme A tiene un tamaño de partícula superior a 0.59 mm, tamaño que no ha sido considerado para evitar posibles efectos acusados de transferencia de materia interna en los experimentos cinéticos, el resto de Sweetzyme A se agrupó en las siguientes fracciones, Tabla 3.8.

TABLA 3.7

CLASIFICACION GRANULOMETRICA DE SWEETZYME A

Malla, mm	Masa, g	%
<0.053	1.5701	1.066
0.053-0.062	0.0079	0.0054
0.062-0.088	1.5296	0.8798
0.088-0.105	0.7339	0.4982
0.105-0.125	1.3300	0.9030
0.125-0.149	1.2389	0.8411
0.149-0.177	3.4647	2.3521
0.177-0.297	5.3910	3.6598
0.297-0.420	10.5484	7.1610
0.420-0.590	13.3734	9.0788
>0.590	108.1152	73.3960

TABLA 3.8
CLASIFICACION DE LAS FRACCIONES DE SWEETZYME A

Fracción	d_p , mm
A	0.053-0.088
B	0.125-0.177
C	0.177-0.297
D	0.297-0.420
E	0.420-0.590
M	0.053-0.297

3.5.2 Actividad enzimática

Para la medida de la actividad enzimática se han realizado experimentos de isomerización de fructosa \rightarrow glucosa utilizando una concentración de fructosa 0.1 M a la temperatura de 60°C, 200 rpm y distintas concentraciones de enzima (2,4,6,12) obtenidas a partir de la fracción D, $0.297 \leq d_p \leq 0.420$ mm. En función del tiempo se evaluó la actividad enzimática de la enzima definida como los μ moles de glucosa producidos por minuto y gramo de enzima en el reactor. En la Tabla 3.9 se muestran los resultados obtenidos de actividad en función del tiempo para las distintas concentraciones de enzima ensayadas. Como se puede observar la actividad de la enzima disminuye a medida que transcurre el tiempo de isomerización no manteniéndose constante durante el tiempo de experimentación.

Distintos autores han puesto de manifiesto que la enzima glucosa-isomerasa requiere no sólo la presencia de iones Mg^{2+} sino también de iones

Co^{2+} para su actuación y estabilización, como se puso de manifiesto en el apartado 2, Lee et al. (1976) y Sola (1986).

TABLA 3.9

MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMATICA. ENZIMA SIN ACONDICIONAR.

$s_0 = 0.1 \text{ M}$ $T = 60^\circ\text{C}$ Fracción D

	$e_i = 2 \text{ g/L}$	$e_i = 4 \text{ g/L}$	$e_i = 6 \text{ g/L}$	$e_i = 12 \text{ g/L}$
t, h	Actividad, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$			
1.00	7.971	6.757	6.675	6.936
2.00	6.572	5.963	5.941	5.852
3.00	6.085	5.297		
4.75			4.729	
5.50				4.354
5.75			4.448	
6.00	5.329	4.404		
6.50				4.092
6.75			4.343	
7.00	5.294	4.929		
8.00	5.142	4.606		4.127

Por tanto se acondicionó la enzima con iones Co^{2+} de la forma siguiente; una cantidad fija de enzima se introducía en una disolución de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0.1 g/L se mantenía con agitación suave durante 5 horas y en reposo durante 12 horas, posteriormente se filtraba y se lavaba la enzima quedando preparada para su posterior utilización en un experimento de isomerización.

En la Tabla 3.10 se recogen los resultados obtenidos de la actividad enzimática para los experimentos realizados con la enzima acondicionada con ión Co^{2+} de fracción 0.420-0.590 mm, una concentración inicial de fructosa de 0.1 M, 300 rpm y 60°C , como puede observarse la actividad enzimática permanece constante durante todo el experimento de isomerización, pero disminuye al incrementar la concentración de enzima utilizada.

En la Tabla 3.11 se muestran también la actividad enzimática para experimentos realizados con enzima acondicionada de las fracciones más pequeñas y una concentración de 2 g/L y $s_0 = 0.1$ M pero con 4 meses de diferencia entre uno y otro. Se puede observar que la actividad permanece constante con el tiempo de reacción pero ha disminuido con el tiempo de almacenamiento, por esta razón cada serie de experimentos se planificó de forma que no transcurriese un intervalo superior a 15 días entre el primero y el último experimento, tiempo en que se ha comprobado que la actividad enzimática permanece constante, también se ha realizado los experimentos en los que cambia la concentración de enzima con secuencias aleatorias.

TABLA 3.10

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. ENZIMA ACONDICIONADA.

 $s_0 = 0.1 \text{ M}$ $T = 60^\circ \text{C}$ Fracción E

	$e_i = 2 \text{ g/L}$	$e_i = 4 \text{ g/L}$	$e_i = 6 \text{ g/L}$
t, h	Actividad, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$		
1.0	3.860	3.613	2.885
2.0	4.133		
2.5		3.394	
3.0	4.200		
4.0			3.200
5.0			3.125
5.5		3.422	
6.0	4.547		3.154
6.5		3.494	
7.0	4.498		3.019
7.5		3.404	
8.0	4.638		
8.5		3.432	

Tabla 3.11

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. ENZIMA ACONDICIONADA.
 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMINETO.

$s_0 = 0.1 \text{ M}$; $T = 60^\circ\text{C}$; $e_0 = 2 \text{ g/L}$;

	Fecha	Fecha	Fecha
	5-3-92	25-3-92	15-6-92
t, h	Fracción A	Fracción B	Fracción M
1	8.721	7.911	6.591
2	8.839		7.256
3	9.266	9.133	6.996
4	9.207	8.692	7.054
6	8.927	8.971	7.112
7	9.295	8.898	7.199
8	9.148	8.883	7.198
9	8.898	8.721	6.982

3.5.3 Penetración de mercurio

La técnica de porosimetría de mercurio permite la determinación del volumen de mercurio introducido en los poros y espacios entre partículas, bajo presiones determinadas. Esta presión externa ejercida se relaciona con el tamaño de poro, mediante la ecuación desarrollada por Washburn

$$P = \frac{2\sigma\cos\theta}{r} \quad [3.12]$$

donde:

P es la presión total aplicada al mercurio

σ es la tensión superficial del mercurio en el poro igual a 480 erg/cm^2

θ es el ángulo de contacto del mercurio en las paredes del sólido igual a 140°

r es el radio del poro, supuesto cilíndrico.

Según esta ecuación, el radio del poro que se ha llenado de mercurio es inversamente proporcional a la presión ejercida.

Para esta medida se ha utilizado un porosímetro de mercurio Quantachrome Autoscan 60, que alcanza una presión de 4200 kg/cm^2 , lo que permite conocer el volumen de mercurio penetrado en los poros cuyo diámetro sea superior a 3.7 nm . El equipo se completa con un ordenador, que mediante un programa apropiado, convierte, calcula y almacena los datos obtenidos.

La determinación experimental se realiza colocando alrededor de 0.3 g de muestra en el dilatómetro, el cual se introduce en un sistema de vacío, que está provisto de una bomba rotatoria que permite alcanzar un vacío cercano a 10^3 Torr . Una vez alcanzada esta presión se invierte el sistema, de forma que la entrada al dilatómetro queda sumergida en el mercurio; posteriormente, se deja entrar aire para que empuje al mercurio hasta llenar el dilatómetro.

Una vez lleno, se extrae el dilatómetro y se llena el nivel de mercurio hasta un enrase concreto, por diferencia entre las pesadas del dilatómetro

vacío, lleno de mercurio y lleno de mercurio más muestra, en los dos últimos casos llevados al mismo enrase, se podrá calcular el volumen de mercurio desplazado por la muestra y, así, su densidad de partícula. Después de realizar dichas operaciones, el dilatómetro se introduce en la cámara de presión donde, tras ajustar las condiciones experimentales, tanto en el porosímetro como en el ordenador, se comienza a aumentar la presión hasta 3750 kg/cm^2 y se mide el volumen de mercurio introducido en los poros de la partícula.

Para aplicar esta técnica se utilizaron tres fracciones de partícula diferentes, la fracción D y E cuyo tamaño de partícula queda reflejado en el apartado 3.5.1 y, las fracciones A, B y C se han unificado obteniéndose la fracción M que corresponde al diámetro de partícula comprendido entre $0.053 < d_p < 0.297$, Tabla 3.8.

Los resultados obtenidos para las distintas fracciones se muestran en la Tabla 3.12.

La porosidad de las partículas indicada en la Tabla 3.12 se ha evaluado a partir de la expresión

$$\epsilon_p = \frac{\text{Volumen de huecos}}{\text{Volumen total}} \quad [3.13]$$

y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las distintas fracciones, la densidad media de las partículas secas y porosidad media son

$$\rho_p = 1.427 \text{ g/cm}^3 \quad \text{y} \quad \epsilon_p = 0.0518 \quad [3.14]$$

En las Tablas 3.13, 3.14 y 3.15 se presentan las presiones aplicadas P , el radio de poro R , el volumen introducido en los poros V_m , y el parámetro $dV_m/d\log R$. En la Figura 3.4 se representa el volumen de mercurio frente al radio de poro y en la Figura 3.5 $dV_m/d\log R$ frente a R , para las partículas de fracción D que se ha tomado a título de ejemplo, para las otras fracciones los resultados son análogos. Como se puede observar la mayoría de los poros existentes en las partículas tienen un radio comprendido entre 2 y 20 nm.

TABLA 3.12

DENSIDAD Y POROSIDAD DE LAS PARTICULAS DE ENZIMA SWEETZYME A

FRACCION D	
Peso de muestra	0.38 g
Volumen de mercurio desplazado	0.2633 cm ³
Densidad de las partículas secas	1.443 g/cm ³
Volumen introducido en los poros	0.035 cm ³ /g
Porosidad, ϵ_p	0.0505
FRACCION E	
Peso de muestra	0.331 g
Volumen de mercurio desplazado	0.2312 cm ³
Densidad de las partículas secas	1.4315 g/cm ³
Volumen introducido en los poros	0.0372 cm ³ /g
Porosidad, ϵ_p	0.053
FRACCION M	
Peso de muestra	0.285 g
Volumen de mercurio desplazado	0.2026 cm ³
Densidad de las partículas secas	1.4064 g/cm ³
Volumen introducido en los poros	0.0368 cm ³ /g
Porosidad, ϵ_p	0.0518

TABLA 3.13

DATOS DE INTRUSION. FRACCION D.

Presión, kPa	Radio, nm	Volumen, cm ³ /g	dV/dlgP=-dV/dlgR
309.4	2424.12	0.0000	0.0054
1322.1	567.35	0.0018	0.0058
2482.4	302.16	0.0042	0.0020
3987.3	188.11	0.0047	0.0015
6195.5	121.07	0.0047	0.0027
8593.5	87.28	0.0053	0.0031
11111.1	67.51	0.0058	0.0037
14219.4	52.75	0.0058	0.0034
18122.4	41.39	0.0061	0.0037
22236.3	33.73	0.0066	0.0045
27341.8	27.43	0.0068	0.0039
33185.7	22.60	0.0074	0.0048
40070.3	18.72	0.0076	0.0045
47932.5	15.65	0.0082	0.0000
57440.2	13.06	0.0084	0.0051
68284.1	10.98	0.0095	0.0146
80865.0	9.28	0.0103	0.0146
95611.8	7.85	0.0116	0.0313
112791.8	6.65	0.0137	0.0308
133073.1	5.64	0.0163	0.0316
156434.6	4.79	0.0182	0.0376
183874.8	4.08	0.0205	0.0268
215499.3	3.48	0.0229	0.0328
252630.1	2.97	0.0258	0.0433
295654.0	2.54	0.0289	0.0503
345857.9	2.17	0.0326	0.0556

TABLA 3.14

DATOS DE INTRUSION. FRACCION E.

Presión, kPa	Radio, nm	Volumen, cm ³ /g	dV/dlgP=-dV/dlgR
182.8	4102.35	0.0000	0.0069
1146.3	654.36	0.0048	0.0037
2264.4	331.25	0.0057	0.0020
3790.4	197.89	0.0060	0.0016
5942.3	126.23	0.0060	0.0000
8417.7	89.11	0.0063	0.0000
11033.8	67.98	0.0066	0.0044
13804.5	54.34	0.0069	0.0000
17862.17	41.99	0.0073	0.0000
22151.9	33.86	0.0076	0.0053
26870.6	27.91	0.0079	0.0046
32960.6	22.76	0.0085	0.0052
39655.4	18.91	0.0091	0.0097
47834.0	15.68	0.0100	0.0114
57215.2	13.11	0.0106	0.0111
67827.0	11.06	0.0112	0.0117
80604.8	9.31	0.0121	0.0175
95450.1	7.86	0.0130	0.0244
112644.2	6.66	0.0151	0.0305
132616.0	5.66	0.0178	0.0431
155865.0	4.81	0.0202	0.0433
183108.3	4.10	0.0227	0.0310
214739.8	3.49	0.0248	0.0437
251730.0	2.98	0.0281	0.0505
294767.9	2.54	0.0314	0.0503
345084.4	2.17	0.0350	0.0440

TABLA 3.15

DATOS DE INTRUSION. FRACCION M.

Presión, kPa	Radio, nm	Volumen, cm ³ /g	dV/dlgP=-dV/dlgR
175.8	4266.44	0.0000	0.0098
1118.1	670.82	0.0063	0.0044
2257.4	332.28	0.0074	0.0047
3692.0	203.16	0.0081	0.0030
5935.3	126.38	0.0081	0.0028
8340.4	89.93	0.0088	0.0041
10886.1	68.90	0.0091	0.0056
13720.1	54.67	0.0095	0.0042
17749.7	42.26	0.0102	0.0046
21898.7	34.25	0.0105	0.0060
26856.5	27.93	0.0109	0.0104
32742.6	22.91	0.0119	0.0062
39324.9	19.07	0.0126	0.0117
47250.4	15.87	0.0133	0.0191
56730.0	13.22	0.0144	0.0000
67362.9	11.13	0.0151	0.0192
79782.0	9.40	0.0161	0.0137
94606.2	7.94	0.0175	0.0283
111469.8	6.73	0.0204	0.0352
131125.2	5.72	0.0228	0.0364
154050.6	4.87	0.0256	0.0430
180914.2	4.15	0.0277	0.0213
212334.7	3.53	0.0291	0.0220
249071.7	3.01	0.0305	0.0289
291708.9	2.57	0.0323	0.0294
341012.7	2.20	0.0344	0.0444

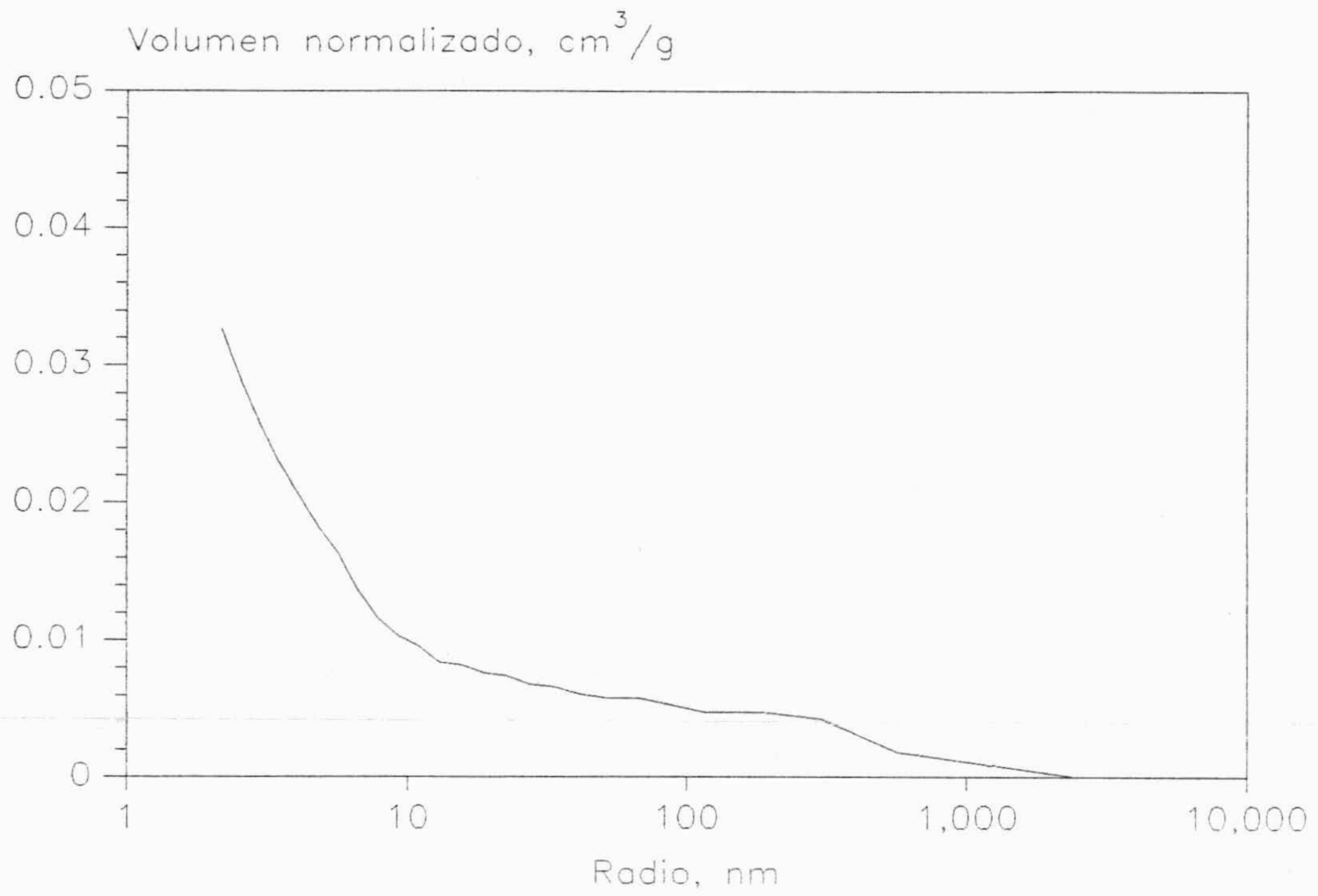


Figura 3.4. Volumen de mercurio frente al radio de poro.

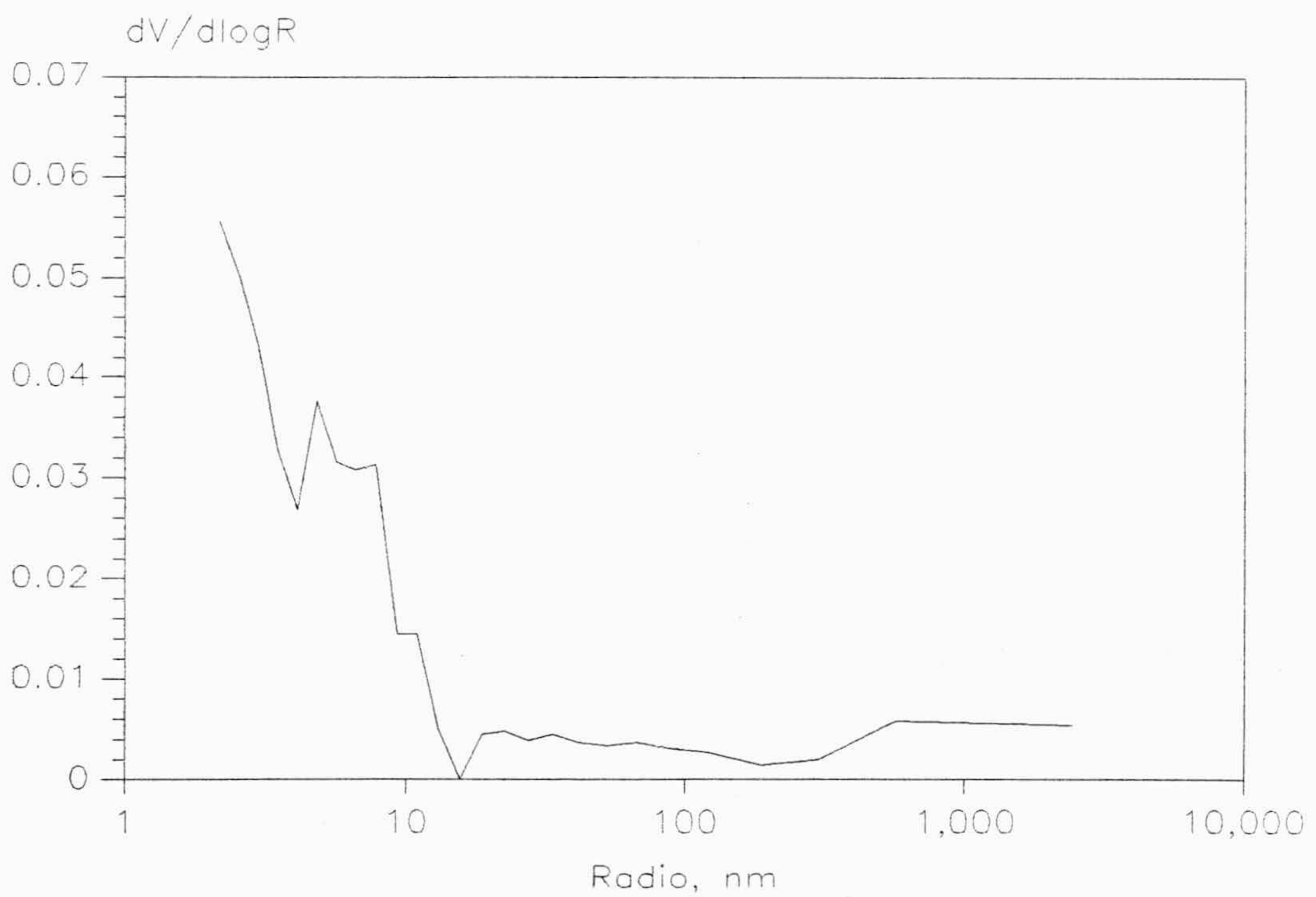


Figura 3.5.

Los valores medios obtenidos para las tres fracciones ensayadas se indican en la Tabla 3.16.

TABLA 3.16

DATOS MEDIOS DE DISTRIBUCION DE POROS EN LAS PARTICULAS
DE SWEETZYME A. FRACCION D.

Presión, kg/cm ²	Radio de poro, nm	%Volumen de mercurio en el intervalo
7757.171	2.5-25	65.32
2844.296	25-50	3.01
1422.148	50-100	2.26
21.121	100-10000	15.04

Volumen en poros mayores de 10000 nm	0.0000 cm ³ /g
Volumen en poros con radio entre 2.5 y 10000 nm	0.0300 cm ³ /g
Volumen en poros con radio menor de 2.5 nm	0.0050 cm ³ /g
Volumen total	0.0350 cm ³ /g

TABLA 3.17

DATOS MEDIOS DE DISTRIBUCION DE POROS EN LAS PARTICULAS
DE SWEETZYME A. FRACCION E.

Presión, kg/cm ²	Radio de poro, nm	%Volumen de mercurio en el intervalo
7757.171	2.5-25	64.23
2844.296	25-50	3.25
1422.148	50-100	1.63
21.121	100-10000	17.07

Volumen en poros mayores de 10000 nm	0.0000 cm ³ /g
Volumen en poros con radio entre 2.5 y 10000 nm	0.0320 cm ³ /g
Volumen en poros con radio menor de 2.5 nm	0.0051 cm ³ /g
Volumen total	0.0372 cm ³ /g

TABLA 3.18

DATOS MEDIOS DE DISTRIBUCION DE POROS EN LAS PARTICULAS
DE SWEETZYME A. FRACCION M.

Presión, kg/cm^2	Radio de poro, nm	%Volumen de mercurio en el intervalo
7757.171	2.5-25	59.05
2844.296	25-50	3.81
1422.148	50-100	2.86
21.121	100-10000	23.81

Volumen en poros mayores de 10000 nm	0.0000 cm^3/g
Volumen en poros con radio entre 2.5 y 10000 nm	0.0330 cm^3/g
Volumen en poros con radio menor de 2.5 nm	0.0039 cm^3/g
Volumen total	0.0368 cm^3/g

Como puede observarse más del 65% de los poros presentan un diámetro comprendido entre 2.5 y 25 nm.

3.5.4 Tratamiento de imágenes

Para caracterizar a las partículas húmedas y evaluar la diferencia existente entre éstas y las partículas secas se realizó un tratamiento de imágenes utilizando dos programas, ADOBE PHOTOSHOP y VISILOG 4.11.

En primer lugar, utilizando una lupa Olympus Zoom stereo Microscope modelo SZ-Tr, que llevaba acoplada un sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10AD, se realizaron fotografías sobre las partículas del catalizador, sweetzyme A, secas y otras que habían estado inmersas en una disolución de pH=8.5 y una concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 2 g/L durante 24 h. A título de ejemplo se muestran dos fotografías realizadas sobre partículas secas y húmedas en las Figuras 3.6 y 3.7, en las que también puede observarse el papel milimetrado que ha servido de escala.

Las fotografías se digitalizaron mediante un scanner SHARP, modelo COLORSCANNER JX-450 con una resolución de 1200 ppi. Los ficheros de imágenes obtenidos se llevaron a un ordenador Macintosh IIFX, y mediante el programa ADOBE PHOTOSHOP se seleccionaron en cada fotografía las partículas, una a una, y se pintaron todas del mismo color para poder aplicar después el programa VISILOG, que permite diferenciar las partículas y calcular la superficie, S_p , y el perímetro, P , de cada partícula. Los resultados obtenidos para las distintas fracciones ensayadas se muestran en la Tabla 3.19.

A partir de la superficie y el perímetro de cada una de las partículas se puede determinar la esfericidad mediante

$$\psi = \frac{\text{Superficie esfera igual volumen}}{\text{Superficie partícula}} = \frac{\text{Perímetro circulo igual área}}{\text{Perímetro de partícula}} \quad [3.15]$$



Figura 3.6. Partículas secas.

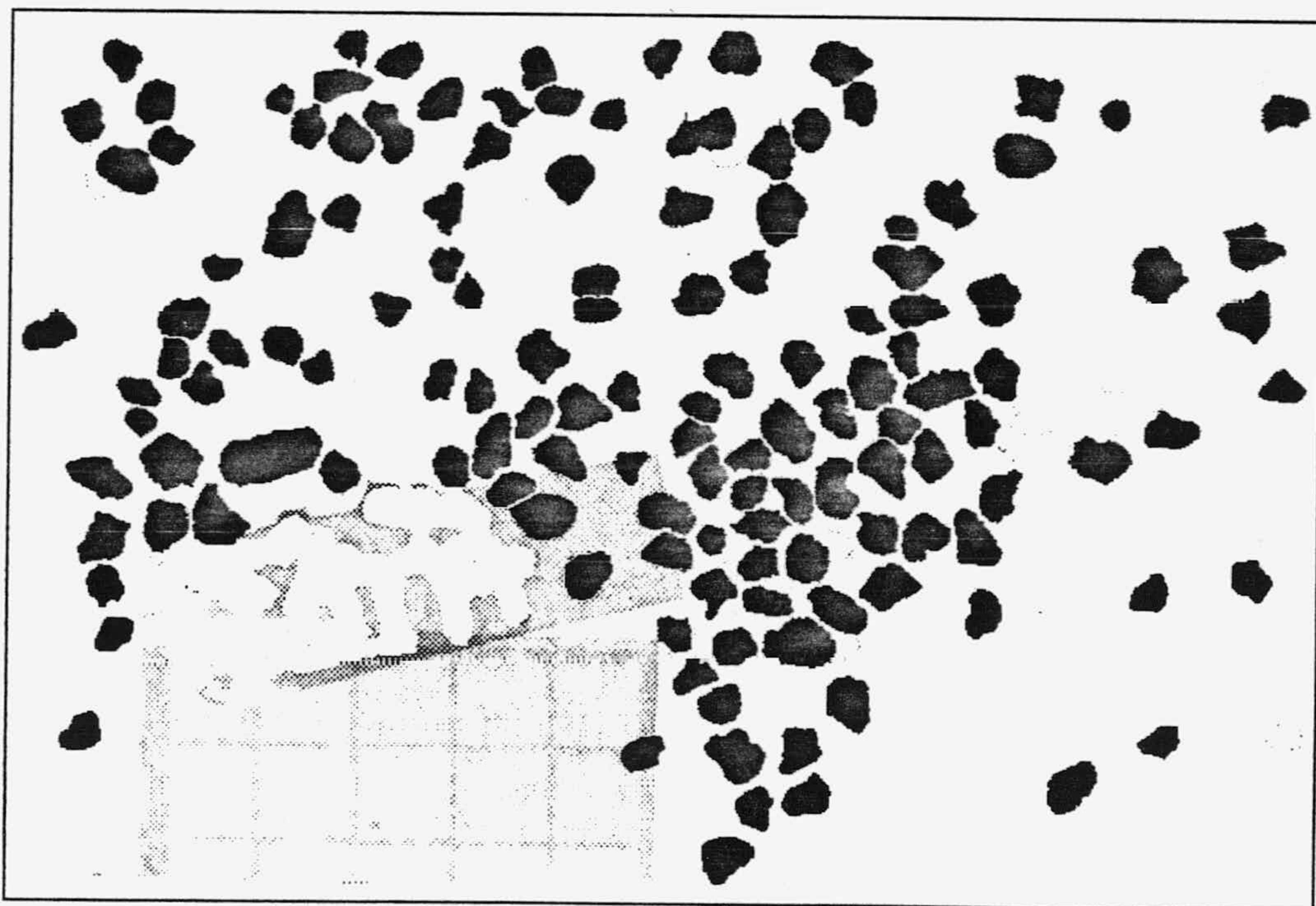


Figura 3.7. Partículas húmedas.

el diámetro medio basado en la superficie de partícula, suponiéndola esférica

$$\bar{d}_p = \sqrt{\frac{4 \sum S_{p_i}}{\pi n}} \quad [3.16]$$

y el perímetro medio

$$\bar{P} = \frac{\sum P_i}{n} \quad [3.17]$$

y la esfericidad media

$$\bar{\Psi} = \frac{\pi \bar{d}_p}{\bar{P}} = \frac{\sqrt{4 \pi n \sum S_{p_i}}}{\sum P_i} \quad [3.18]$$

Con los valores medios de diámetro de partícula y esfericidad el volumen de partícula medio, \bar{V}_p , y la superficie media de partícula, \bar{S}_p serán:

$$\bar{V}_p = \frac{\pi}{6} \bar{d}_p^3 \quad [3.19]$$

$$\bar{S}_p = \frac{\pi \bar{d}_p^2}{\bar{\Psi}} \quad [3.20]$$

Los resultados obtenidos para partículas secas y húmedas son los indicados en la Tabla 3.19. Cabe señalar la aceptable coincidencia de los \bar{d}_p para partículas secas con las correspondientes a la clasificación granulométrica, Tabla 3.8.

TABLA 3.19
 CARACTERIZACION DE PARTICULAS DE ENZIMA MEDIANTE
 EL TRATAMIENTO DE IMAGENES
 FRACCION D (0.297-0.420)

Partículas secas	Partículas húmedas
$\Sigma S_i = 150.94 \text{ mm}^2$	$\Sigma S_i = 109.25 \text{ mm}^2$
$\Sigma P_i = 1619.25 \text{ mm}$	$\Sigma P_i = 1090.75 \text{ mm}$
nº de partículas= 1165	nº de partículas= 732
$\bar{d}_p = 0.406$	$\bar{d}_p = 0.436 \text{ mm}$
$\Psi = 0.919$	$\Psi = 0.918$
$\bar{V}_p = 0.0351 \text{ mm}^3$	$\bar{V}_p = 0.0434 \text{ mm}^3$
$\bar{S}_p = 0.1411 \text{ mm}^2$	$\bar{S}_p = 0.1620 \text{ mm}^2$

FRACCION E (0.420-0.590)

Partículas secas	Partículas húmedas
$\Sigma S_i = 103.24 \text{ mm}^2$	$\Sigma S_i = 131.42 \text{ mm}^2$
$\Sigma P_i = 749.0 \text{ mm}$	$\Sigma P_i = 941.2 \text{ mm}$
nº de partículas= 352	nº de partículas= 435
$\bar{d}_p = 0.6111 \text{ mm}$	$\bar{d}_p = 0.6202 \text{ mm}$
$\Psi = 0.9022$	$\Psi = 0.9006$
$\bar{V}_p = 0.1195 \text{ mm}^3$	$\bar{V}_p = 0.1249 \text{ mm}^3$
$\bar{S}_p = 0.3251$	$\bar{S}_p = 0.3355 \text{ mm}^2$

TABLA 3.19 (Continuación)

FRACCION M (0.053-0.297)

Partículas secas	Partículas húmedas
$\Sigma S_i = 8.376 \text{ mm}^2$	$\Sigma S_i = 19.582 \text{ mm}^2$
$\Sigma P_i = 230.5 \text{ mm}$	$\Sigma P_i = 517.63 \text{ mm}$
nº de partículas= 490	nº de partículas= 1023
$\bar{d}_p = 0.1475 \text{ mm}$	$\bar{d}_p = 0.1561 \text{ mm}$
$\Psi = 0.9852$	$\Psi = 0.9693 \text{ mm}$
$\bar{V}_p = 0.001681 \text{ mm}^3$	$\bar{V}_p = 0.001992 \text{ mm}^3$
$\bar{S}_p = 0.01735 \text{ mm}^2$	$\bar{S}_p = 0.01975 \text{ mm}^2$

Una vez determinadas las características de las partículas secas y húmedas se puede definir un factor de hinchamiento, f , a partir de la expresión

$$f = \frac{d_{ph}}{d_p}$$

y evaluar la densidad de la partícula húmeda

$$\rho_{ph} = \frac{\rho_p}{f^3}$$

ρ_p determinada por la porosimetría

en la Tabla 3.20 se muestra para las distintas fracciones y las partículas húmedas el diametro medio, el factor de hinchamiento y la densidad. Para cálculos posteriores se ha utilizado un valor medio de esta densidad ρ_{ph} =evaluar

TABLA 3.20
CARACTERISTICAS DE LAS PARTICULAS HUMEDAS.

Fracción	\bar{d}_{ph}	f	ρ_{ph}
D	0.620	1.015	1.380
E	0.436	1.074	1.156
M	0.156	1.058	1.187

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En esta parte de la Memoria se indican los resultados primarios obtenidos correspondientes a los del equilibrio de isomerización y los cinéticos realizados sin la presencia de enzima y con la enzima glucosa isomerasa. A continuación se describen los resultados aportados en las distintas tablas.

4.1 Equilibrio de isomerización glucosa-fructosa

En primer lugar en las Tablas 4.1.1 a 4.1.3 se muestran los experimentos realizados para determinar el equilibrio de isomerización fructosa- \rightarrow glucosa a las temperaturas de 40; 50 y 60°C. En ellas se presentan para cada experimento G_E la concentración de glucosa aportada por la enzima; G_i la concentración de glucosa inicial que existe en las mezclas de glucosa-fructosa preparadas a unas concentraciones $[F_0]$ y $[G_0]$. En las Tablas se muestra la concentración de glucosa y la conversión en función del tiempo.

TABLA 4.1.2
 EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION
 FRUCTOSA-GLUCOSA
 TEMPERATURA 50°c

$e_0 = 2 \text{ g/L}$ $G_E = 0.0422 \text{ g/L}$
 $[F_0] = 0.0006 \text{ M}$ $[F_0] = 0.0003 \text{ M}$
 $[G_0] = 0.0006 \text{ M}$ $[G_0] = 0.0003 \text{ M}$
 $G_i = 0.1027 \text{ g/L}$ $G_i = 0.0549 \text{ g/L}$

t,h	G, g/L	x	G, g/L	x
0.00	0.1027	0.5135	0.0549	0.4575
1.50	0.1351	0.6755		
2.00			0.1005	0.8375
3.00	0.1406	0.703		
3.33			0.0903	0.7525
4.00	0.1341	0.6705		
7.00	0.1419	0.7095	0.1056	0.88
7.58			0.0986	0.8217
8.00	0.1371	0.6855		
9.00	0.1381	0.6905		
9.83			0.0987	0.8225

TABLA 4.1.3
EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION
FRUCTOSA-GLUCOSA
TEMPERATURA 60°C

$$e_0 = 2 \text{ g/L} \quad G_E = 0.0422 \text{ g/L}$$

$$[F_0] = 0.0006 \text{ M}$$

$$[F_0] = 0.0003 \text{ M}$$

$$[G_0] = 0.0006 \text{ M}$$

$$[G_0] = 0.0003 \text{ M}$$

$$G_i = 0.0958 \text{ g/L}$$

$$G_i = 0.0611 \text{ g/L}$$

t, h	G, g/L	x	G, g/L	x
0.00	0.0958	0.479	0.0611	0.5092
1.00	0.1334	0.667	0.0963	0.8025
1.00	0.1322	0.661	0.0977	0.8142
2.50			0.0956	0.7967
3.00	0.1328	0.664		
5.00	0.1302	0.651		
6.00			0.0989	0.8242
7.00	0.1291	0.6455	0.0980	0.8167
8.00	0.1309	0.6545		
8.50			0.0969	0.8075
9.00	0.1319	0.6595	0.0991	0.8258

4.2 Isomerización glucosa-fructosa no enzimática.

En la Tablas 4.2.1.1 y 4.2.1.2 se presentan los resultados experimentales obtenidos de los grados de polarización para la isomerización cuando se partía de glucosa, a las temperaturas de 50 y 60°C variando la concentración inicial de glucosa empleada. En las Tablas 4.2.2.1 y 4.2.2.2 se muestran resultados semejantes pero en este caso la isomerización se llevaba a cabo partiendo de fructosa. En todos los casos se medía el grado de polarización de la mezcla α_M en función del tiempo de isomerización.

En la Tablas 4.2.3.1 a 4.2.3.3 se recogen los resultados obtenidos para la isomerización fructosa- \rightarrow glucosa no enzimática que se han realizado, siempre partiendo de fructosa, y analizando la concentración de glucosa por el método de la glucosa oxidasa. En estos experimentos se modifica la temperatura 40; 50 y 60°C, así como la concentración de fructosa utilizada 0.5; 1.0 y 2.0 M.

TABLA 4.2.1.1
 ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA NO ENZIMATICA
 ANALISIS POLARIMETRICO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA
 TEMPERATURA 50°C

	[G ₀]= 0.1 M	[G ₀]= 0.5 M	[G ₀]= 1.0 M	[G ₀]= 2.0 M
t, h	α_M	α_M	α_M	α_M
0	+1	+5.5	+10	+18.6
23	+0.8	+4.2	+8.7	+17.7
47	+0.7	+4.1	+8.5	+17.3
71		+4.0	+8.3	+17.0
94	+0.65	+3.9	+8.1	+16.8
218	+0.6			

TABLA 4.2.1.2
 ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA NO ENZIMATICA
 ANALISIS POLARIMETRICO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA
 TEMPERATURA 60°C

	$[G_0] = 0.1 \text{ M}$	$[G_0] = 0.5 \text{ M}$	$[G_0] = 1.0 \text{ M}$	$[G_0] = 2.0 \text{ M}$
t, h	α_M	α_M	α_M	α_M
0	+0.9	+5.5	+9.5	+18.6
7	+0.75	+4.2	+8.6	+17.6
24		+3.9	+8	+16.8
30	+0.65	+3.8	+7.8	+16.3
48	+0.6	+3.55	+7.4	
71	+0.55			

TABLA 4.2.2.1

ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA NO ENZIMATICA

ANALISIS POLARIMETRICO

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA

TEMPERATURA 50°C

	[F ₀]= 0.1 M	[F ₀]= 0.5 M	[F ₀]= 1.0 M
t, h	α_M	α_M	α_M
0	-1.7	-8	-15.9
6	-1.65	-7.6	-15.3
24	-1.6	-7.5	-15.1
72	-1.6	-7.3	-14.7
120	-1.5		-14.2
144			-14
168		-6.8	-13.7

TABLA 4.2.2.2
 ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA NO ENZIMATICA
 ANALISIS POLARIMETRICO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA
 TEMPERATURA 60°C

	[F ₀]= 0.1 M	[F ₀]= 0.25 M	[F ₀]= 0.5 M	[F ₀]= 0.75 M
t, h	α_M	α_M	α_M	α_M
0	-1.65	-4	-8.1	-12.1
24	-1.6	-3.6	-7.55	-11.2
26			-7.5	-11.1
41			-7.2	-10.7
42	-1.55	-3.45		
48				-10.5
66			-6.8	-10.3
90	-1.45	-3.25		
98	-1.4	-3.2		
114			-6.5	-9.75
122			-6.4	-9.5
138	-1.3	-3		

TABLA 4.2.2.2 (Continuación)

	$[F_0]= 1.0 \text{ M}$	$[F_0]= 1.25 \text{ M}$	$[F_0]= 1.50 \text{ M}$
t, h	α_M	α_M	α_M
0.00	-16.3	-20.2	-24.4
6.00		-19.2	-23.4
6.25	-15.4		
8.25	-15.3		
24.00	-14.9	-18.5	-22.4
29.75	-14.7		
31.75	-14.6		
72.00		-16.9	-20.8
80.00		-16.7	-20.2
96.00		-16.1	-19.7
120.00		-15.5	-19.1

TABLA 4.2.3.1

ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA NO ENZIMATICA

ANALISIS METODO GLUCOSA-OXIDASA

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA

TEMPERATURA 40°C

	[F ₀]= 0.5 M	[F ₀]= 1.0 M	[F ₀]= 2.0 M
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.040563	0.082119	0.235197
0.25	0.043046	0.087417	
0.25	0.043046	0.088411	
0.50	0.045033	0.092384	
0.50	0.045033	0.092384	
0.75	0.047020	0.095033	0.250658
0.75	0.047351	0.096027	0.254605
1.00	0.049007	0.096689	0.260526
1.00	0.049669	0.097020	0.257566
1.25	0.050993	0.100662	0.266447
1.25	0.051656		0.266447
1.50	0.053974	0.101325	0.271382
1.50	0.054636	0.107285	0.272369

TABLA 4.2.3.2

ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA NO ENZIMATICA

ANALISIS METODO GLUCOSA-OXIDASA

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA

TEMPERATURA 50°C

	[F ₀]= 0.5 M	[F ₀]= 1.0 M	[F ₀]= 2.0 M
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.085333	0.152000	0.296000
0.25	0.097667	0.174000	0.343333
0.25	0.096667	0.173667	0.346667
0.50	0.101333	0.194000	0.384000
0.50	0.103000	0.196333	0.377333
0.75	0.108333	0.204000	0.430667
0.75	0.109000	0.205667	0.432000
0.00	0.094167	0.152000	0.349500
1.00	0.124333	0.226333	0.535000
1.00	0.123333	0.223667	0.536667
1.25	0.131333	0.253333	0.576667
1.25	0.132000	0.248000	0.603334
1.50	0.140000	0.274667	0.633334
1.50	0.140667	0.272000	0.633334

TABLA 4.2.3.3
 ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA NO ENZIMATICA
 ANALISIS METODO GLUCOSA-OXIDASA
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA
 TEMPERATURA 60°C

	[F ₀]= 0.5 M	[F ₀]= 1.0 M	[F ₀]= 2.0 M
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.033222	0.080705	0.369463
0.25	0.057383	0.130873	0.416946
0.25	0.057383	0.129754	0.418121
0.50	0.078859	0.188479	0.506208
0.50	0.079530	0.187920	0.552013
0.75	0.096644	0.248658	0.638255
0.75	0.097651	0.246644	0.642282
0.00	0.042785	0.091275	0.407383
1.00	0.129195	0.299329	0.852685
1.00	0.127181	0.297986	0.841611
1.25	0.151678	0.414430	0.993623
1.25	0.152013	0.389262	1.007719
1.50	0.171477	0.430873	1.064093
1.50	0.171141	0.432886	1.071141

4.3 Isomerización enzimática fructosa-glucosa.

En la Tablas 4.2.1 y 4.2.2 se muestran los resultados obtenidos en la isomerización fructosa->glucosa con la enzima glucosa isomerasa sin acondicionar, los experimentos se han realizado a la temperatura de 60°C con el tamaño de partícula especificado en la tabla, a velocidad de agitación constante y variando la concentración de enzima empleada en cada caso.

En las Tablas 4.2.4.1 y 4.2.4.2 se modificó el tamaño de la enzima glucosa isomerasa.

En las Tablas 4.2.5.1 a 4.2.5.4 se presentan las series de experimentos realizados manteniendo la concentración de sustrato constante y modificando la concentración de enzima a 2.0; 4.0; 6.0 y 12 g/L. Las concentraciones de sustrato empleadas han sido 0.1; 0.5; 1.0 y 2.0 M.

TABLA 4.2.1

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

ENZIMA SIN ACONDICIONAR

 $s_0 = 0.1 \text{ M}; \quad V_a = 200 \text{ rpm}; \quad 2.97 \cdot 10^{-4} \text{ m} < d_p < 4.20 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

	$e_0 = 2.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 4.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 6.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 12.0 \text{ g/L}$
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.030	0.030	0.030	0.030
1.00	0.171	0.292	0.435	0.900
1.00	0.173	0.293	0.430	0.900
2.00	0.287	0.516	0.777	1.553
2.00	0.282	0.515	0.765	1.484
3.00	0.394	0.681		
3.00	0.395	0.693		
4.75			1.461	
4.75			1.453	
5.50				3.225
5.50				2.988
5.75			1.674	
5.75			1.643	
6.00	0.695	1.132		
6.00	0.687	1.153		
6.50				3.465
6.50				3.435
6.75			1.901	
6.75			1.901	
7.00	0.795	1.490		
7.00	0.802	1.493		
8.00	0.888	1.581		4.292
8.00	0.891	1.605		4.274

TABLA 4.2.2

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

ENZIMA SIN ACONDICIONAR

$$s_0 = 0.1 \text{ M}; e_0 = 4.0 \text{ g/L}; 4.20 \cdot 10^{-4} \text{ m} < d_p < 5.90 \cdot 10^{-4} \text{ m}$$

	Va= 200 rpm	Va= 300 rpm	Va= 400 rpm	Va= 500 rpm
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0	0.030	0.030	0.030	0.030
1	0.313	0.318	0.332	0.317
1	0.315	0.343	0.333	0.317
2	0.537	0.554	0.552	0.549
2	0.538	0.550	0.560	0.554
3	0.728	0.741	0.754	0.720
3	0.713	0.748	0.751	0.732
6	1.269	1.299	1.296	1.287
6	1.246	1.305	1.322	1.304
7	1.430	1.463	1.501	1.440
7	1.415	1.470	1.508	1.440
8	1.603	1.612	1.700	1.628
8	1.595	1.619	1.693	1.643
9	1.747	1.794	1.874	1.810
9	1.751	1.817	1.874	1.819

TABLA 4.2.3

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

ENZIMA ACONDICIONADA CON ION COBALTO

$s_0 = 0.1 \text{ M}$; $V_a = 300 \text{ rpm}$; $4.20 \cdot 10^{-4} \text{ m} < d_p < 5.90 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

	$e_0 = 2.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 4.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 6.0 \text{ g/L}$
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.030	0.030	0.030
1.00	0.162	0.305	0.362
1.00	0.163	0.303	0.365
2.00	0.344		
2.00	0.350		
2.50		0.710	
2.50		0.716	
3.00	0.525		
3.00	0.534		
4.00			1.621
4.00			1.605
5.00			1.971
5.00			1.967
5.50		1.579	
5.50		1.582	
6.00	1.145		2.380
6.00	1.147		2.390
6.50		1.906	
6.50		1.909	
7.00	1.321		2.675
7.00	1.324		
7.50		2.145	
7.50		2.145	
8.00	1.558		
8.00	1.558		
8.50		2.446	
8.50		2.455	

TABLA 4.2.4.1

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTICULA

 $s_0 = 0.1 \text{ M}$; $e_0 = 2.0 \text{ g/L}$; $V_a = 300 \text{ rpm}$

	Fracción A	Fracción B	Fracción C
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0	0.030	0.030	0.030
1	0.188	0.170	0.187
1	0.189	0.172	0.186
2	0.382		
2	0.382		
3	0.592	0.589	0.571
3	0.610	0.596	0.581
4	0.792	0.752	0.787
4	0.800	0.762	0.800
6	1.150	1.158	1.142
6	1.166	1.169	1.169
7	1.396	1.355	1.364
7	1.418	1.338	1.400
8	1.585	1.529	1.533
8	1.580	1.544	1.564
9	1.714	1.691	1.707
9	1.748	1.703	1.724

TABLA 4.2.4.2

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTICULA

 $s_0 = 0.1 \text{ M}$; $e_0 = 2.0 \text{ g/L}$; $V_a = 300 \text{ rpm}$

t, h	Fracción D	Fracción E
	G, g/L	G, g/L
0	0.030	0.030
1	0.165	0.147
1	0.165	0.150
2	0.340	0.290
2	0.340	0.288
3	0.531	0.442
3	0.535	0.450
4	0.726	
4	0.726	
5		0.782
5		0.795
6	1.116	0.929
6	1.124	0.941
7	1.235	1.069
7	1.289	1.093
8	1.478	1.234
8	1.483	1.258
9	1.645	
9	1.680	

TABLA 4.2.5.1

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

 $s_0 = 0.1 \text{ M}; V_a = 300 \text{ rpm}; 5.3 \cdot 10^{-5} \text{ m} < d_p < 2.97 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

	$e_0 = 2.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 4.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 6.0 \text{ g/L}$	$e_0 = 12.0 \text{ g/L}$
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0.00	0.030	0.030	0.030	0.030
1.00	0.143	0.209	0.353	0.570
1.00	0.142	0.209	0.350	0.581
2.00	0.313	0.418	0.701	1.116
2.00	0.315	0.415	0.713	1.116
2.75				1.601
2.75				1.571
3.00	0.454	0.660	1.072	
3.00	0.454	0.660	1.077	
4.00	0.610		1.406	
4.00	0.610		1.433	
6.00	0.923	1.373	2.154	3.131
6.00	0.923	1.384	2.076	3.103
7.00	1.085	1.663	2.500	3.894
7.00	1.094	1.689	2.481	3.675
8.00	1.205	1.820	2.835	4.513
8.00	1.285	1.830	2.858	4.338
9.00	1.356	2.048	3.054	
9.00	1.361	2.059	3.038	

TABLA 4.2.5.2

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

 $S_0 = 0.5 \text{ M}; V_a = 300 \text{ rpm}; 5,3 \cdot 10^{-5} \text{ m} < d_p < 2,97 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

t, h	$e_0 = 2 \text{ g/L}$	$e_0 = 4 \text{ g/L}$	$e_0 = 6 \text{ g/L}$
	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0	0.151	0.149	0.147
1	0.641	1.076	1.411
1	0.643	1.079	1.413
2	1.297	2.096	2.716
2	1.278	2.109	2.756
3	1.840	3.302	4.077
3	1.930	3.241	4.281
4	2.471	4.358	5.693
4	2.617	4.625	5.957
6	4.124	7.387	9.233
6	4.232	7.647	9.179
7	4.528	8.204	9.904
7		8.486	10.511
8	5.054	9.230	
8	5.160	9.201	
9	6.369	9.581	11.442
9	5.947	9.863	11.645

TABLA 4.2.5.3

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

 $S_0 = 1 \text{ M}; V_a = 300 \text{ rpm}; 5,3 \cdot 10^{-5} \text{ m} < d_p < 2,97 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

t, h	$e_0 = 2 \text{ g/L}$	$e_0 = 4 \text{ g/L}$	$e_0 = 6 \text{ g/L}$
	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0	0.327	0.337	0.364
1	1.014	1.494	2.178
1	1.031	1.519	2.208
2	1.951	2.902	4.364
2	1.986	3.059	4.459
3	2.861	4.926	7.448
3	2.852	5.179	7.649
4	4.071	6.127	
4	3.884	6.607	
5			13.937
5			13.281
6	6.553	9.775	16.573
6	6.650		16.373
7	7.283	11.805	19.356
7	7.452	12.214	
8	8.010	13.042	22.736
8	8.245	13.209	21.831
9	9.124		
9	9.076		

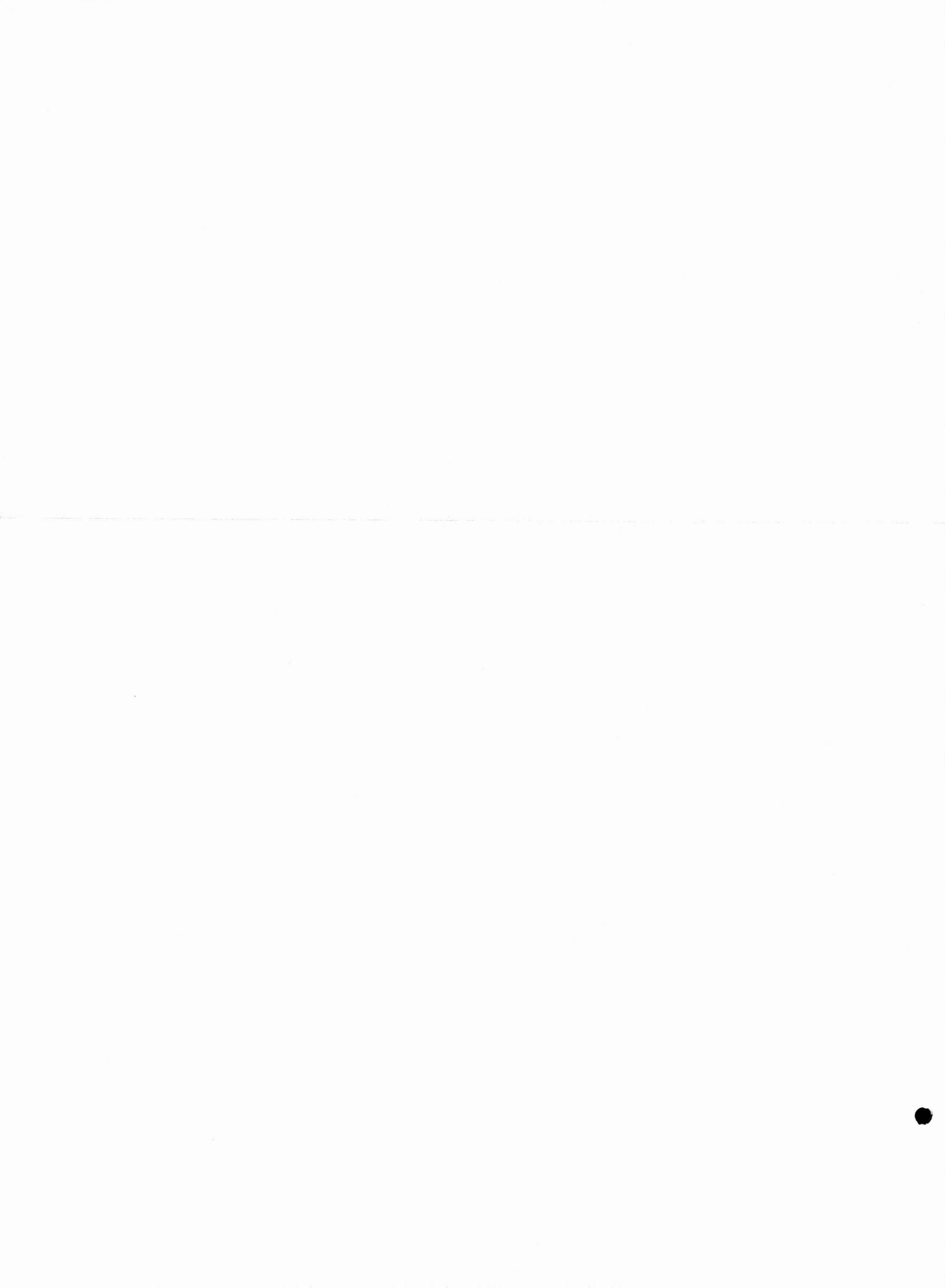
TABLA 4.2.5.4

ISOMERIZACION ENZIMATICA FRUCTOSA-GLUCOSA

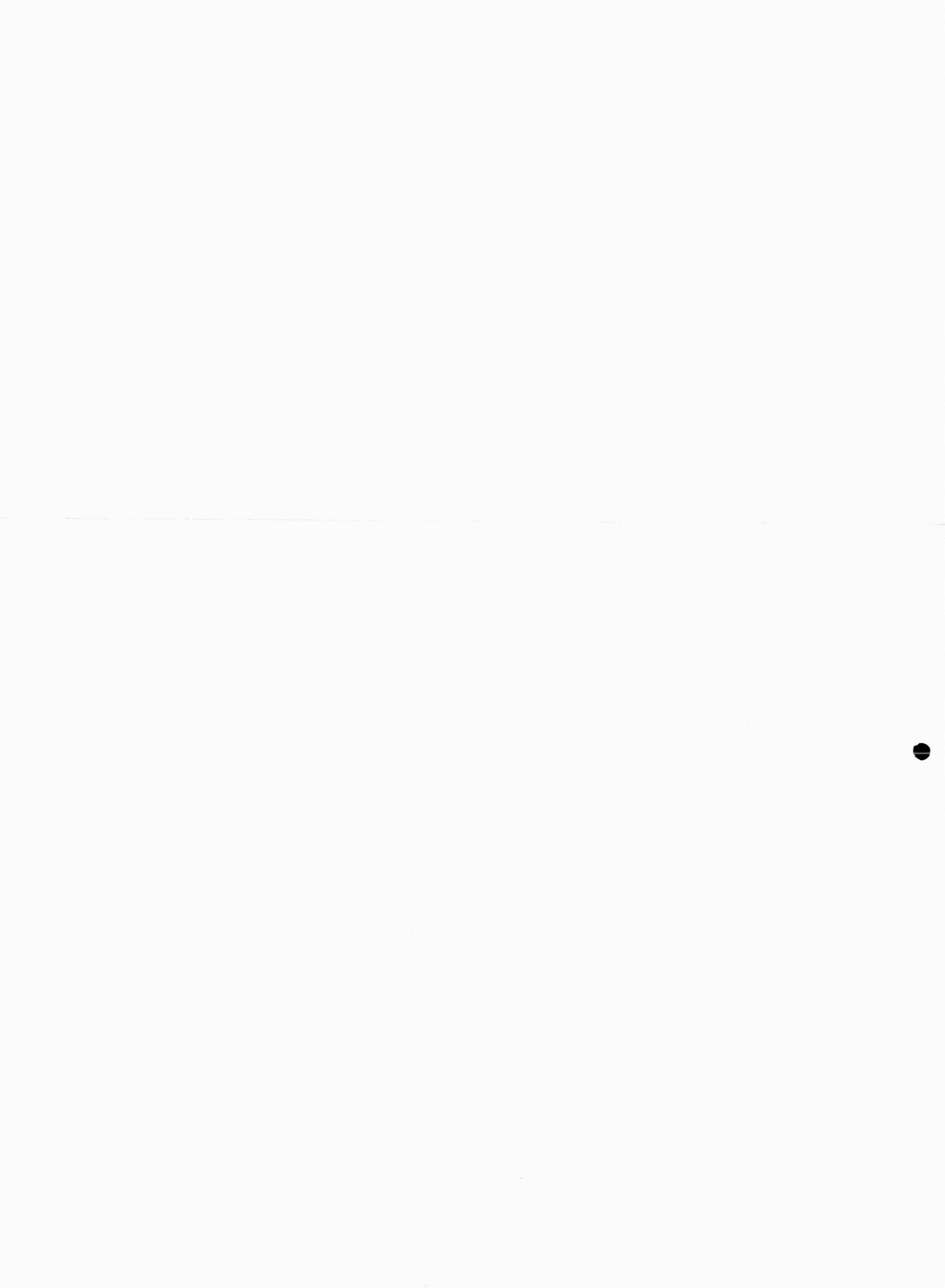
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

$S_0 = 2 \text{ M}$; $V_a = 300 \text{ rpm}$; $5,3 \cdot 10^{-5} \text{ m} < d_p < 2,97 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

	$e_0 = 2 \text{ g/L}$	$e_0 = 4 \text{ g/L}$	$e_0 = 6 \text{ g/L}$	$e_0 = 12 \text{ g/L}$
t, h	G, g/L	G, g/L	G, g/L	G, g/L
0	0.315	0.473	0.730	0.556
1	1.328	1.821	2.724	4.969
1	1.334	1.865	2.748	4.969
2	2.429	4.018	5.912	10.476
2	2.429	3.932	6.004	10.476
3	3.900	6.298	9.288	16.267
3	3.921	6.332	9.288	15.787
4		8.547		21.309
4		8.620		21.380
6	8.079	13.478	18.838	34.960
6	8.164	13.642	21.223	34.851
7	9.625		23.407	42.413
7	9.250			43.683
8		19.071		
8		19.071		
9	12.377	21.875	29.646	
9	12.409			

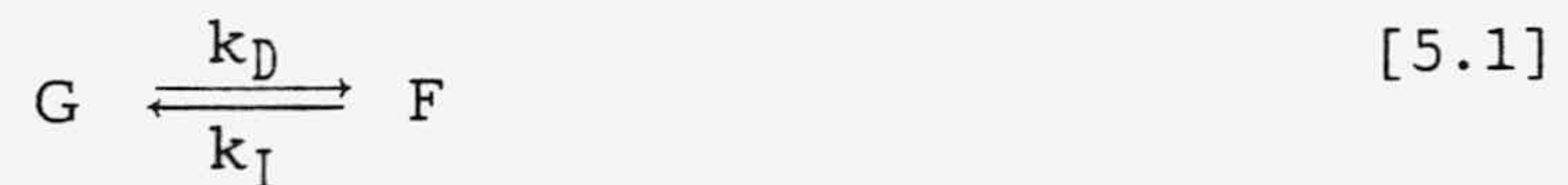


5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.



5.1 EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION

La isomerización enzimática glucosa-fructosa es una reacción reversible que puede expresarse como



Las condiciones del equilibrio de isomerización se determinaron experimentalmente a las temperaturas de 40, 50 y 60°C tal y como se ha indicado en el apartado 3.3 de esta memoria. En las figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se han representado los resultados experimentales obtenidos en forma de conversión de fructosa a glucosa, x , frente al tiempo de reacción. La conversión se calcula en función de la concentración total de hexosas, s_0 , teniendo en cuenta las ecuaciones 5.2, 5.3 y 5.4

$$[F] + [G] = s_0 \quad [5.2]$$

$$[F] = s_0(1-x) \quad [5.3]$$

$$x = \frac{[G]}{s_0} \quad [5.4]$$

Como se puede observar en estas figuras, la conversión de equilibrio, x_e , es alcanzada transcurridas unas ocho horas de reacción. La constante de equilibrio de la reacción de isomerización en función de las conversiones puede expresarse como

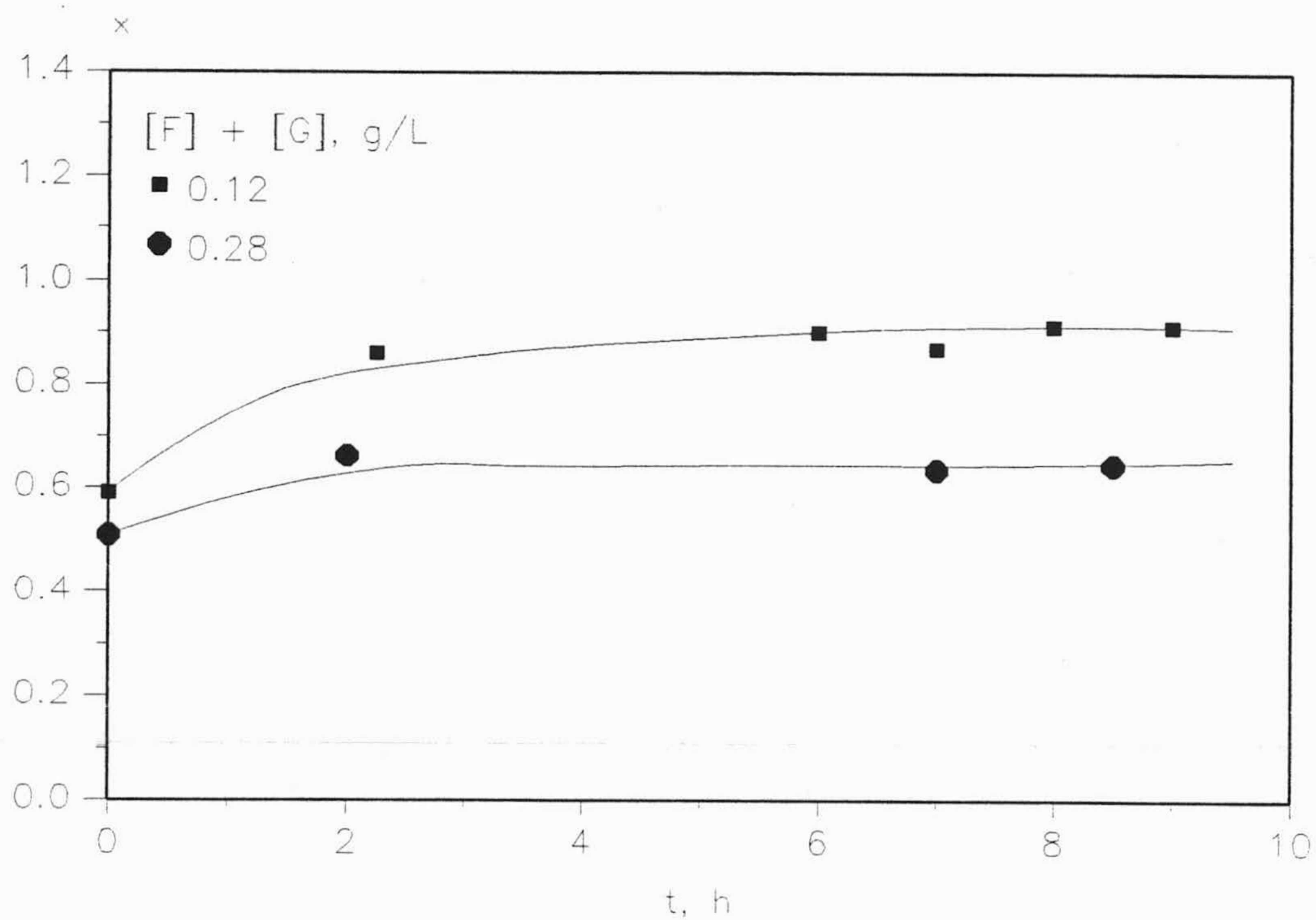


Figura 5.1. Equilibrio de isomerización $T=40^{\circ}\text{C}$

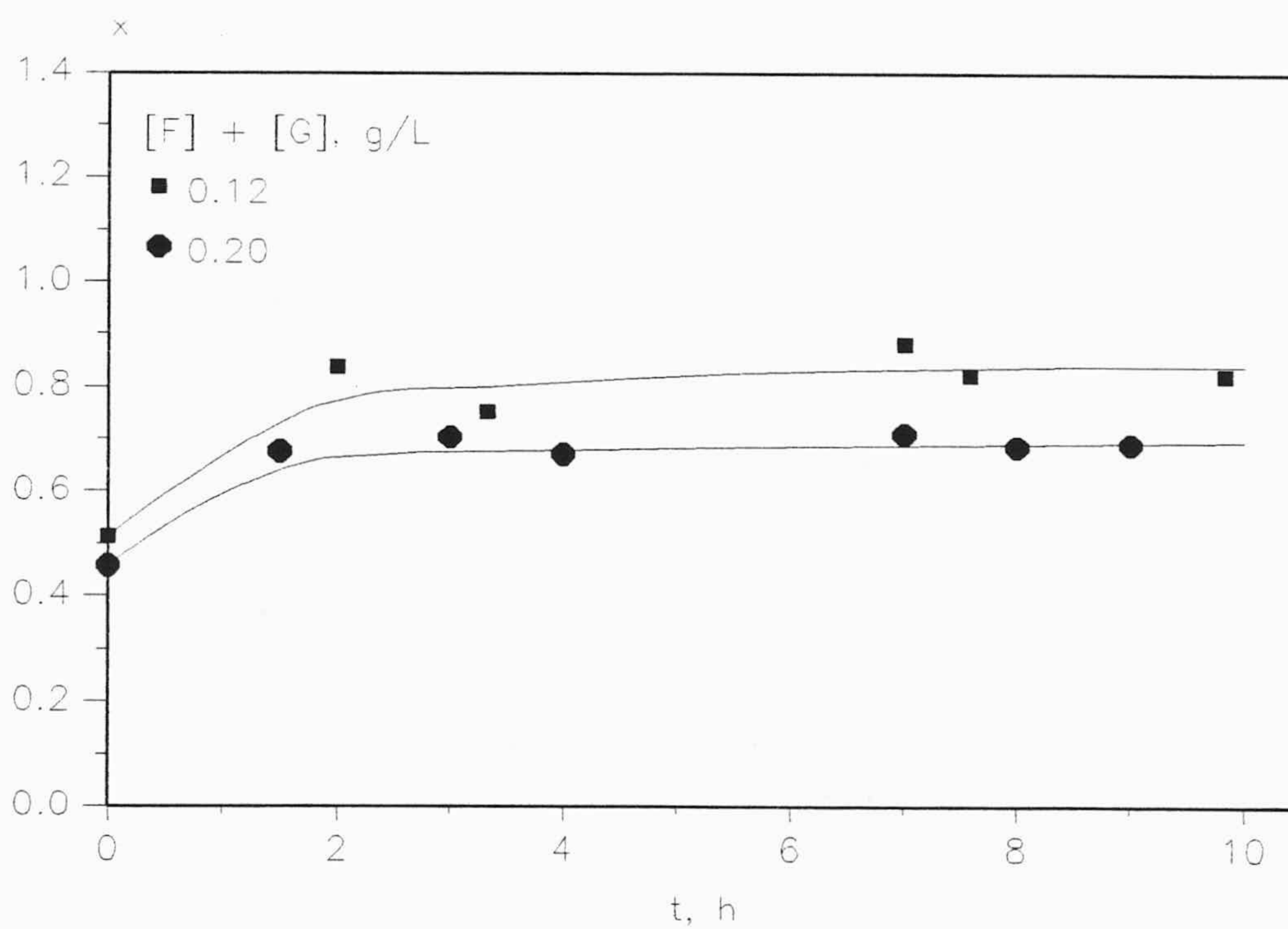


Figura 5.2. Equilibrio de isomerización $T= 50^{\circ}\text{C}$

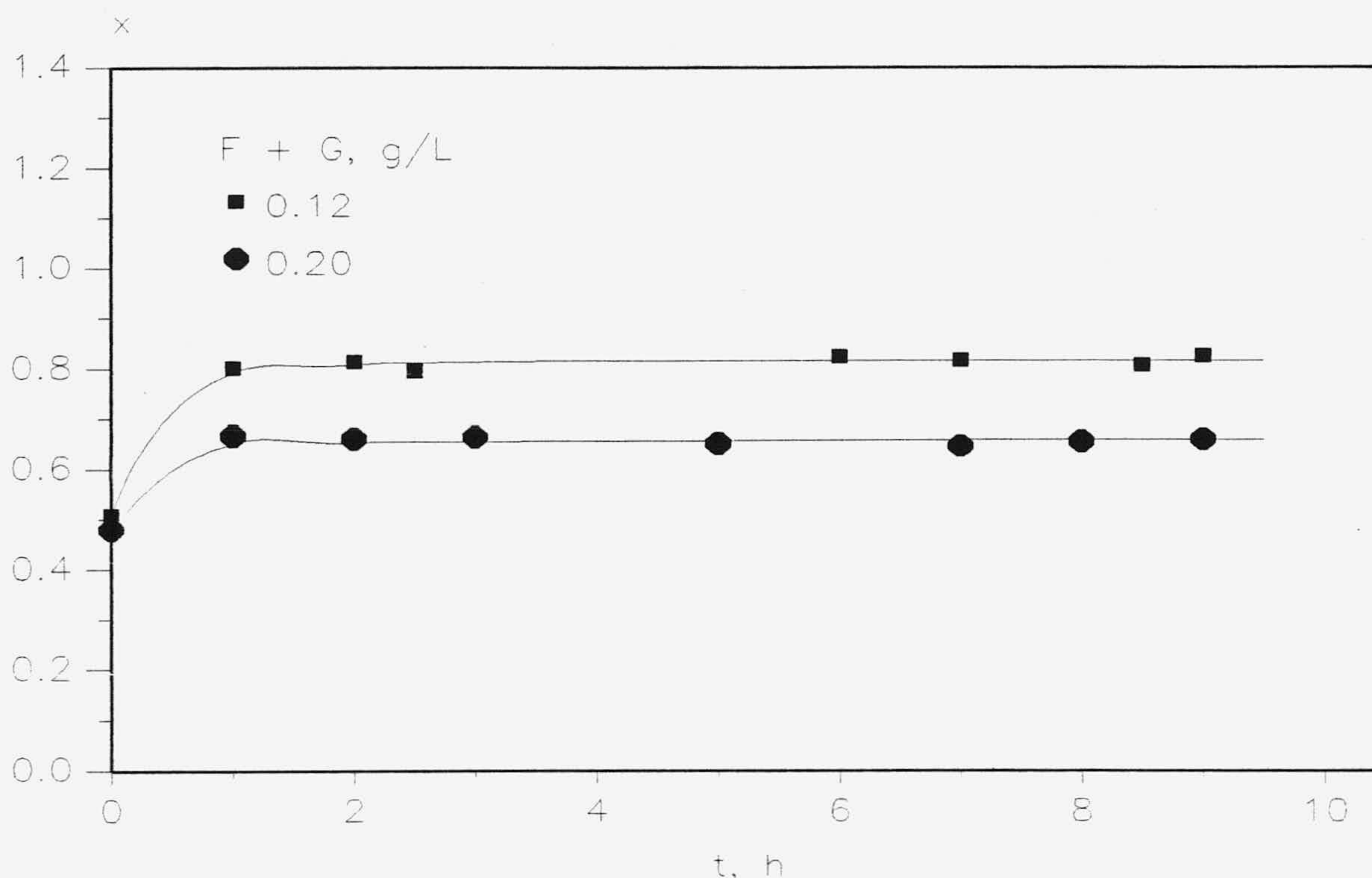


Figura 5.3. Equilibrio de isomerización T= 60°C

$$K_e = \frac{K_D}{K_I} = \frac{F_e}{G_e} = \frac{s_0(1-x_e)}{s_0x_e} = \frac{1-x_e}{x_e} \quad [5.5]$$

donde F_e y G_e son las concentraciones de fructosa y glucosa en el equilibrio.

Los valores de la constante de equilibrio, K_e , se han evaluado experimentalmente a partir de la ecuación [3.9] y a partir de ella y la ecuación deducida de la [5.5]

$$x_e = \frac{1}{1+K_e} \quad [5.6]$$

las conversiones de equilibrio correspondientes a las temperaturas de 40, 50 y 60°C. Estos valores se muestran en la tabla 5.1 junto con las constantes de equilibrio K_e y la concentración total de hexosas utilizada para la determinación experimental de K_e .

TABLA 5.1
EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION. pH=8.5

T, °C	s ₀ , M	K _e	x _e
40	0.0022	1.012	0.497
50	0.0018	1.100	0.476
60	0.0018	1.182	0.458

En la tabla 5.2 se indican los valores de K_e encontrados en la bibliografía y a la temperatura y concentración total de hexosas a los que ha sido determinado, cuando estos datos son indicados en la publicación correspondiente

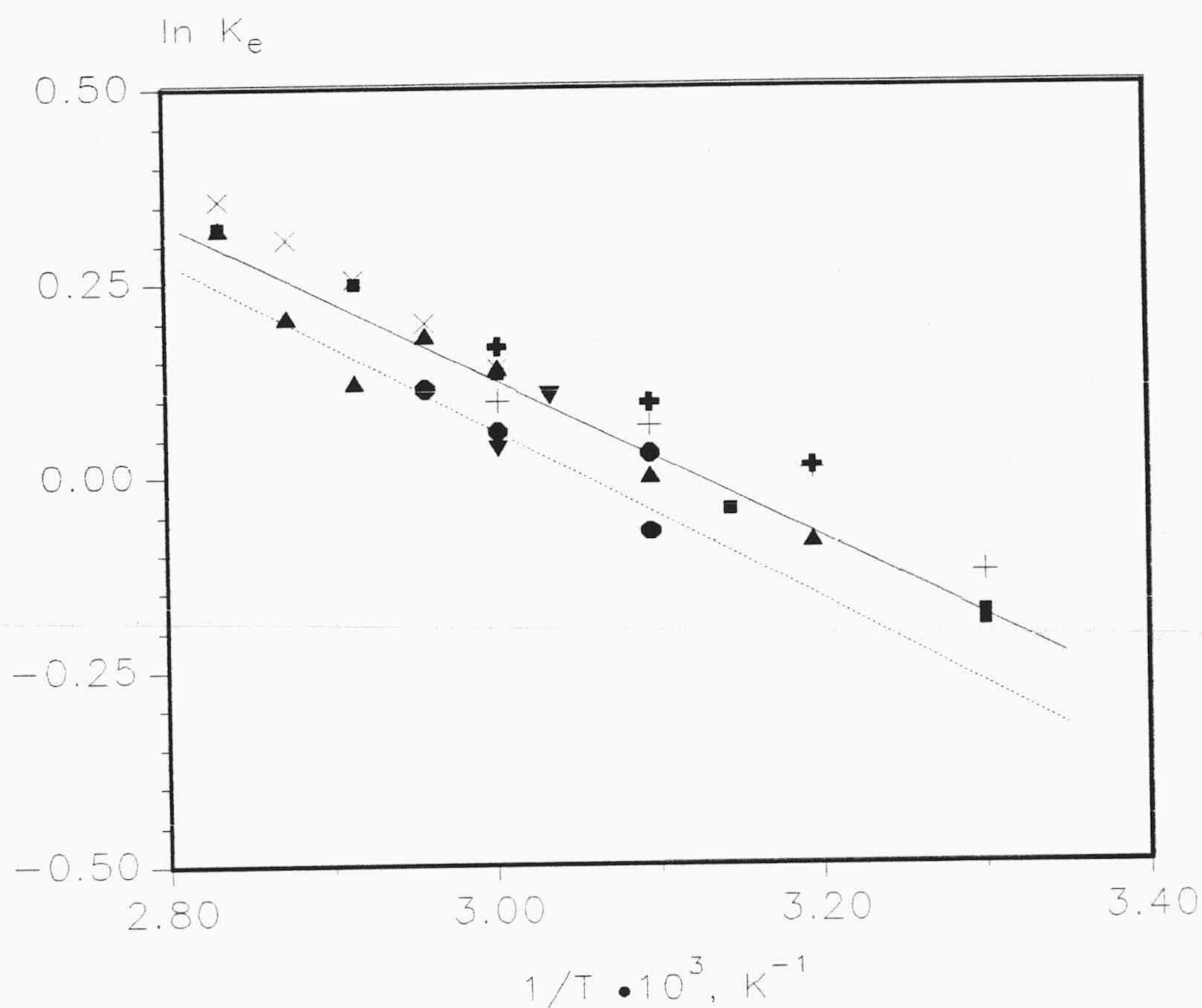
Aunque los valores de pH varían en el intervalo de 6.5 a 8.5 y la concentración total de hexosas desde dilución infinita hasta 3.4 M no se observa ninguna tendencia al variar la concentración total de hexosas o el pH; lo que parece lógico dado que los coeficientes de actividad de la glucosa y fructosa deben ser muy semejantes.

En la figura 5.4 se representan los valores de ln K_e indicados en las tablas 5.1 y 5.2 frente a la inversa de la temperatura absoluta, se ha representado también en trazo discontinuo la línea prevista por la ecuación de Roels y Van Tilburg (tomada de Vos et al. (1990)). Se observa en esta figura que aunque con cierta dispersión, la mayor parte de los resultados obtenidos se ajustan aceptablemente a la ecuación de Van't Hoff. Por regresión lineal, excluyendo aquellos datos que se apartan más del 5% de la ecuación resultante, se obtiene la ecuación

$$K_e = 24,52 \exp\left[-\frac{1022}{T}\right] \quad [5.7]$$

TABLA 5.2
CONSTANTES DEL EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA

T, °C	pH	s_0, M	K_e	Referencia
40			0.92	Takasaki et al. (1969)
50			1.00	
60			1.15	
65			1.20	
60		2.0	1.02	Havewala, Pitcher (1974)
70			1.06	
79.5			1.10	
50	7.0	0.0183-1.80	1.03	Lee et al. (1976)
30	7.0	0.02,0.16,1.6	0.828	Sproull et al. (1976)
45			0.957	
60			1.141	
70			1.283	
80			1.381	
50			0.88	Lloyd, Kheeluddin (1976)
60			1.00	
65			1.04	
60	8.3		1.15	Chen et al. (1980)
65			1.22	
70			1.29	
75			1.36	
80			1.43	
56.5	8.5	0.1;0.2	1.11	Park et al. (1981)
66.5			1.43	
71.5			1.60	
50	6.5	3.4	0.93	Kikkert et al. (1981)
60	8.0		1.06	
65	8.2		1.12	
60	8.2	1.0	0.763	Benaiges et al. (1986)
30	7.0	0.7	0.838	Visuri y Klivanov (1987)
60	8.25	2.0	0.99	Chen y Wu (1987)
65			1.02	
70			1.13	
75			1.23	
80			1.38	
60	7.5	3.0	1.037	Gram y Bang (1990)
70	7.0		0.94	Vasic-Racki et al. (1991)
30	7.5	0.002	0.882	Luzón (1993)
40			1.008	
50			1.068	
60			1.103	



- Lee et al.
- ▼ Park et al.
- Visuri et al.
- × Chen et al. (1980)
- ▲ Takasaki et al.
- Kikkert et al.
- ▼ Gram et al.
- ⊕ Esta investigación
- Sproull et al.
- ▲ Chen et al. (1987)
- + Luzón González (1993)
- ⋯ Roels y Van Tilburg

Figura 5.4. Constantes de equilibrio

que también se ha representado en la figura 5.4 en forma de línea continua. Esta ecuación indica una variación de entalpía de 8.5 KJ/mol para la transformación de glucosa a fructosa.

5.2 REACCION DE ISOMERIZACION NO ENZIMATICA

5.2.1 Método diferencial con análisis por polarimetría

La reacción de isomerización se ha llevado a cabo sin la enzima glucosa-isomerasa, en primer lugar partiendo de glucosa. La cinética de la reacción se ha seguido midiendo el grado de polarización en función del tiempo tal y como se ha descrito en el apartado 3 de esta Memoria.

El grado de polarización de la mezcla glucosa-fructosa, teniendo en cuenta las ecuaciones [3.3] y [5.2] puede ponerse en la forma

$$\alpha_M = K_G(s_0 - [F]) + K_F [F] = K_G s_0 - [F](K_G - K_F) \quad [5.8]$$

siendo K_G y K_F las constantes de calibrado del polarímetro para glucosa y fructosa respectivamente.

La concentración de fructosa a partir de la ecuación anterior será

$$[F] = \frac{K_G s_0 - \alpha_M}{K_G - K_F} \quad [5.9]$$

y la velocidad de reacción

$$\frac{d[F]}{dt} = - \frac{1}{K_G - K_F} \frac{d\alpha_M}{dt} = - \frac{d[G]}{dt} \quad [5.10]$$

Si se representa $\alpha_M/K_G - K_F$ para los experimentos recogidos en las tablas 4.2.1.1 y 4.2.1.2 en función del tiempo, Figuras 5.5 y 5.6, la pendiente dará la velocidad inicial de formación de fructosa r_{D0} . Sin embargo como puede observarse, inicialmente se aparta de la linealidad; este hecho puede ser debido al efecto de la mutarrotación, por lo que se ha eliminado el dato experimental correspondiente al tiempo cero y se han ajustado los restantes resultados experimentales. Los valores de r_{D0} para las distintas temperaturas y concentraciones total de hexosas, s_0 , ensayadas se muestran en la tabla 5.3.

De la misma forma se llevo también a cabo la reacción de isomerización partiendo de fructosa, determinando también el grado de polarización α_M , en este caso se determina la velocidad inicial de formación de glucosa, r_{I0} , si se representa $\alpha_M/K_G - K_F$ frente al tiempo de reacción para los experimentos mostrados en 4.2.2.1 y 4.2.2.2, Figuras (5.7 y 5.8), también en este caso se han suprimido los datos a tiempo cero para eliminar el efecto de la mutarro-tación.

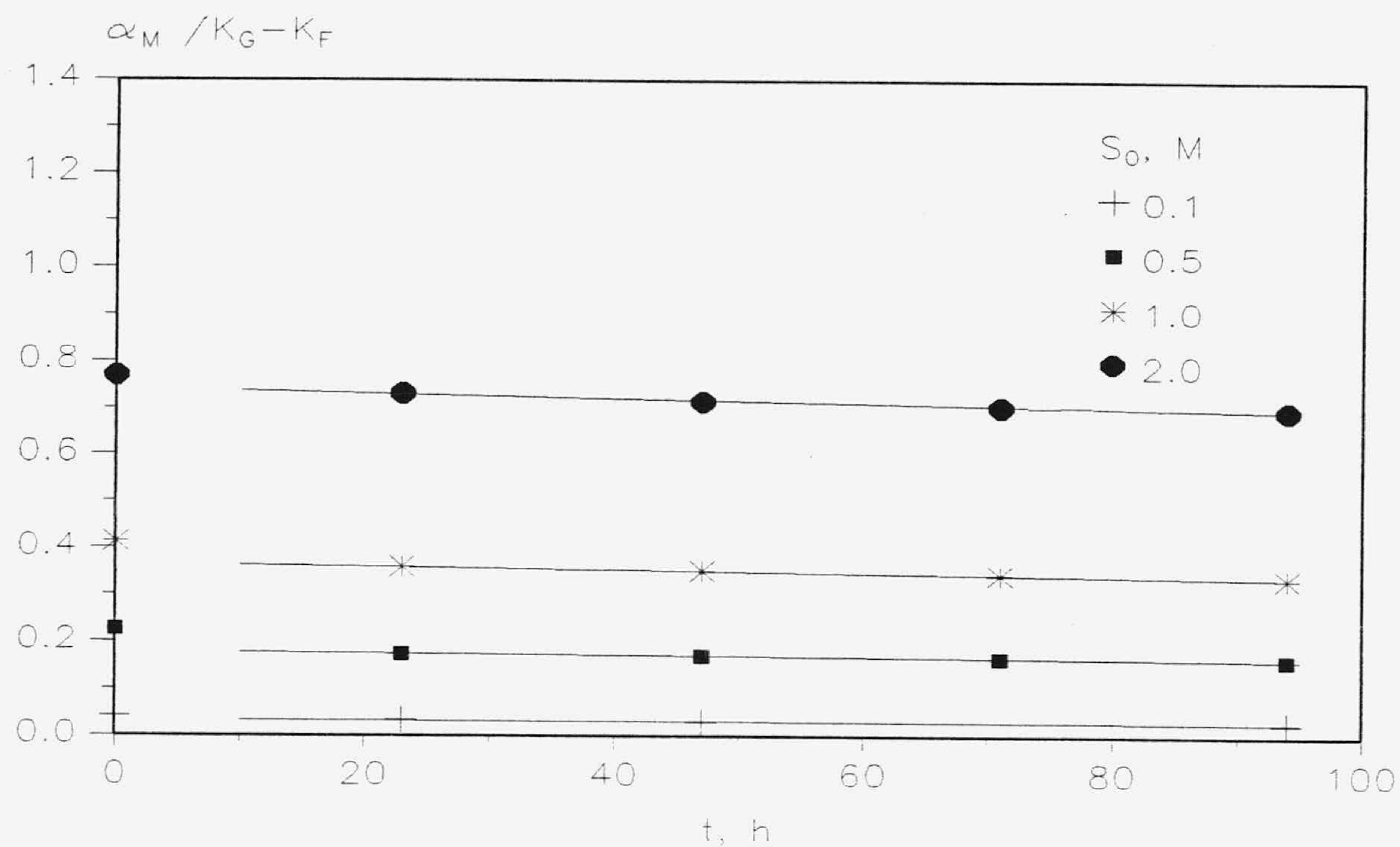


Figura 5.5. Isomerización no enzimática G \rightarrow F. Análisis polarimétrico $T = 50^\circ C$

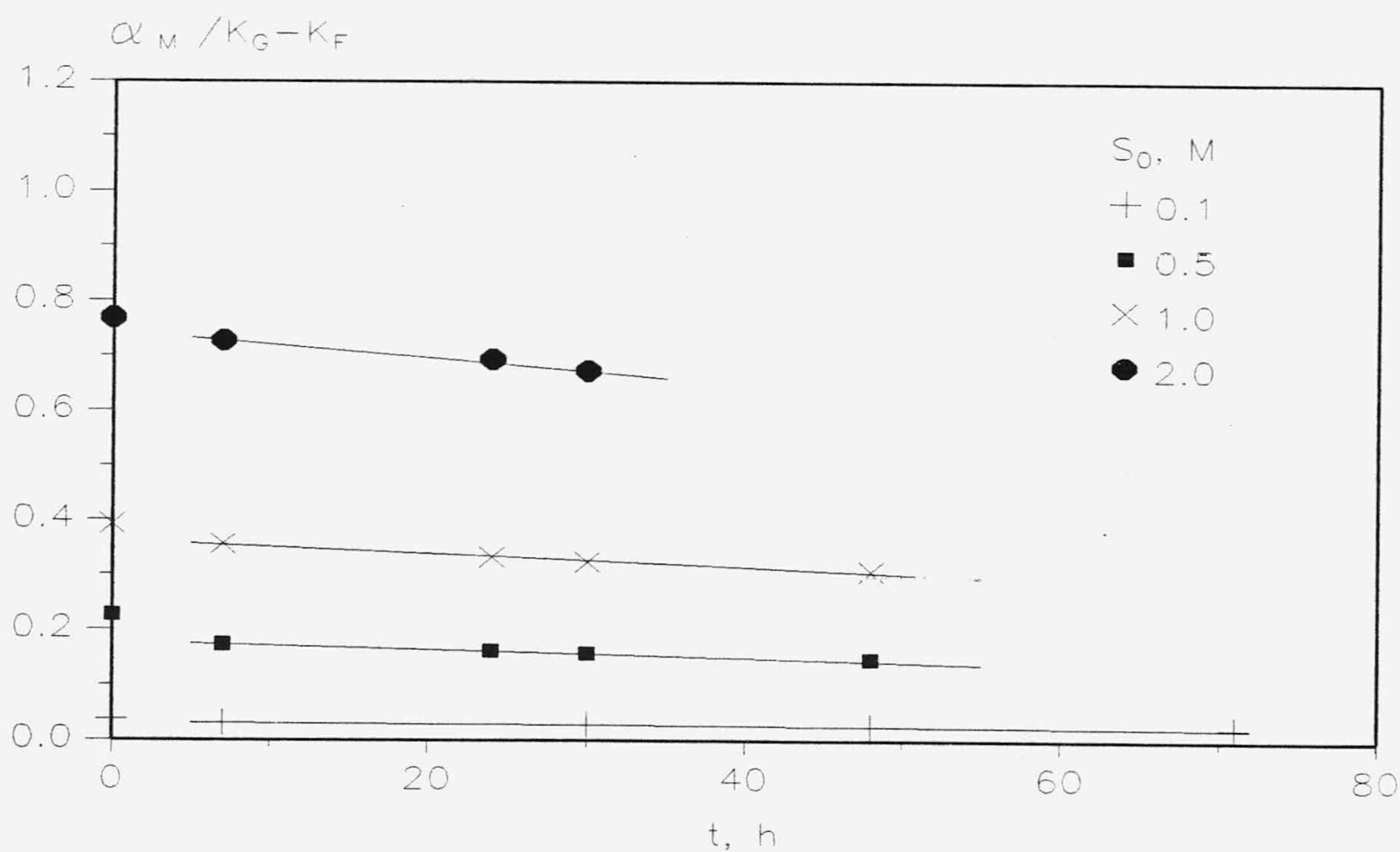


Figura 5.6. Isomerización no enzimática G \rightarrow F. Análisis polarimétrico $T = 60^\circ C$

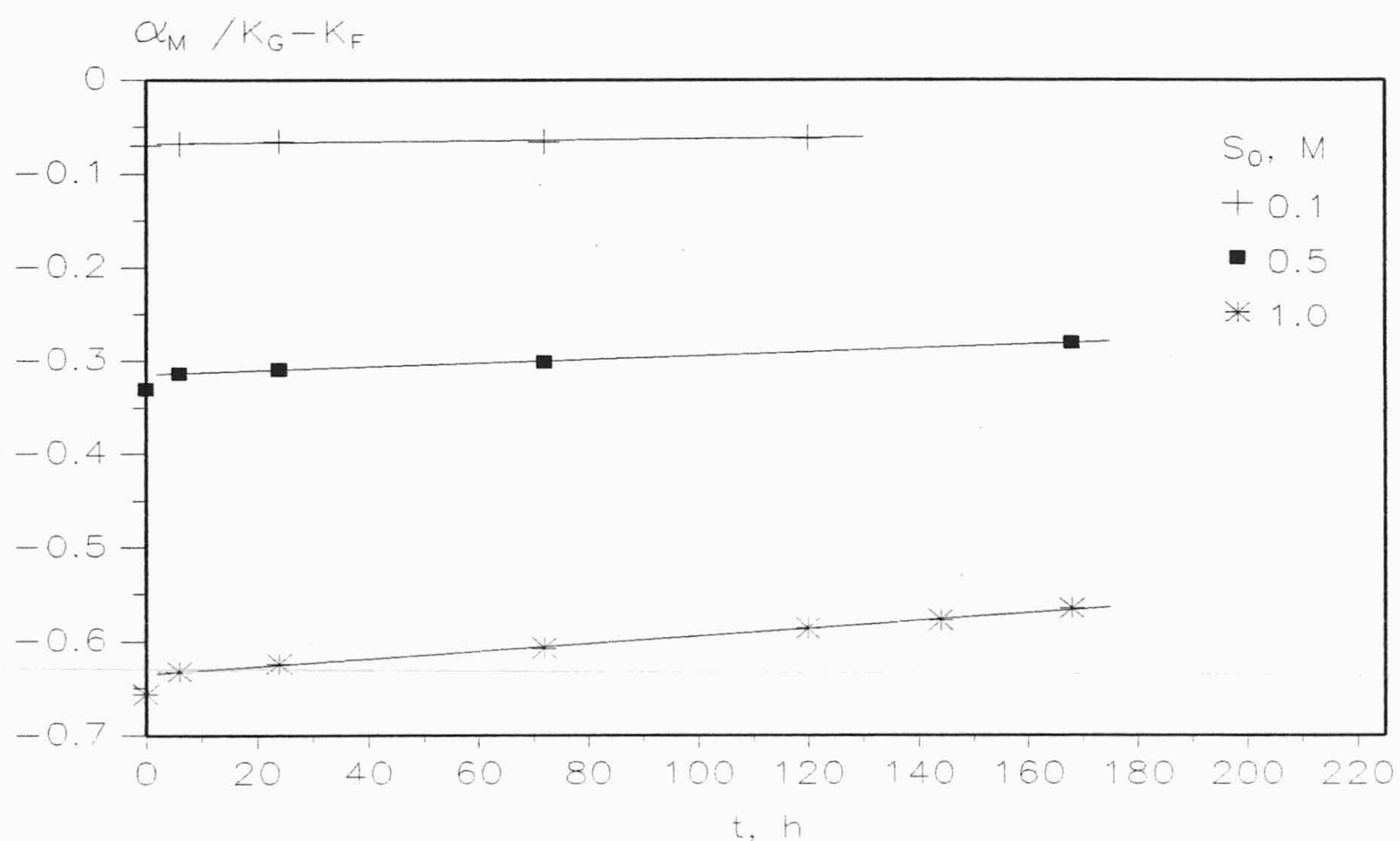


Figura 5.7. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis polarimétrico T= 50°C

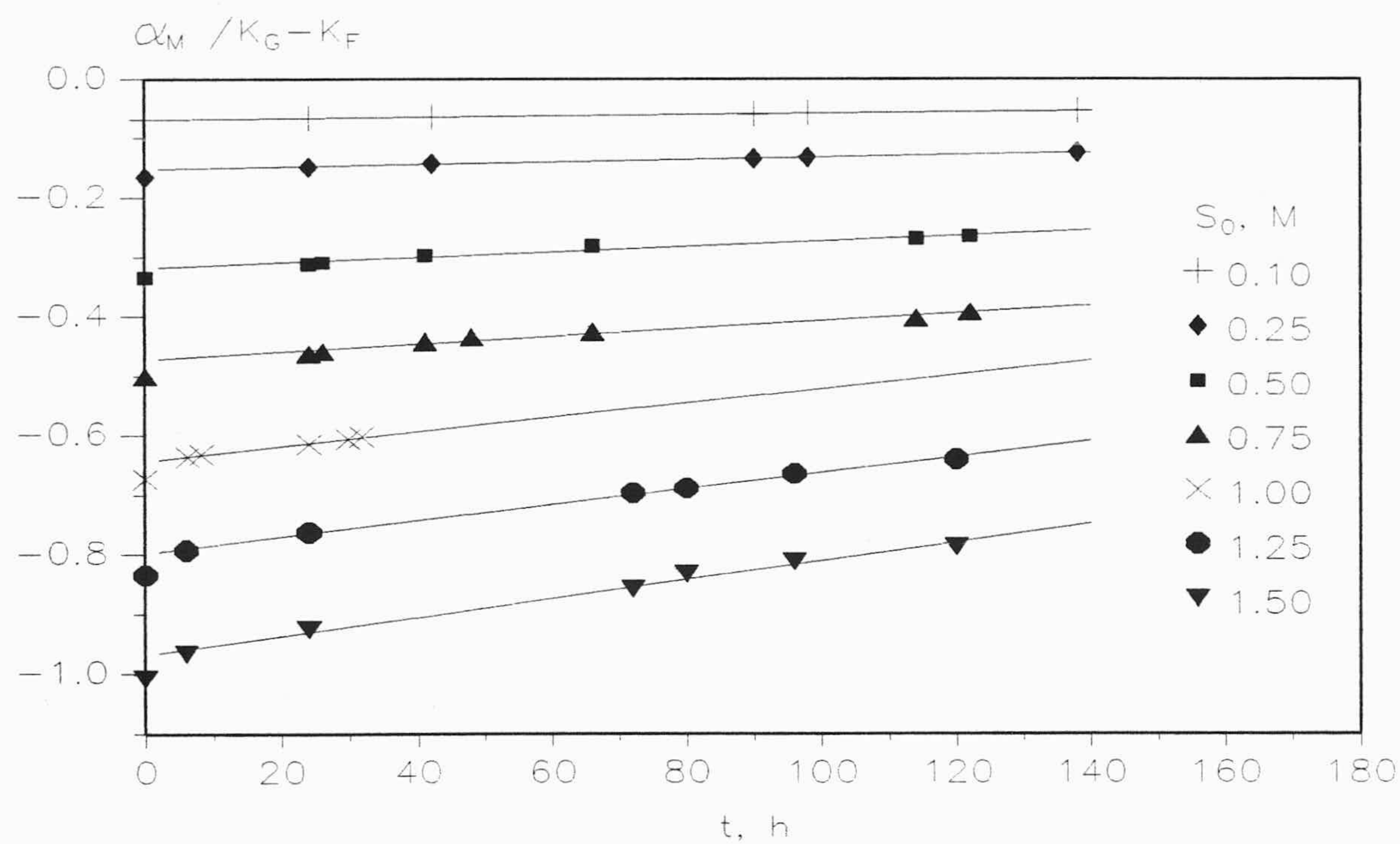


Figura 5.8. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis polarimétrico T= 60°C

En la tabla 5.3 se muestran las velocidades iniciales de reacción para las temperaturas y concentraciones, s_0 , ensayadas.

TABLA 5.3
VELOCIDADES INICIALES DE REACCION PARA LA FORMACION DE
FRUCTOSA Y GLUCOSA. ANALISIS POLARIMETRICO

T, °C	s_0, M	$r_{D0}, \text{mol/L.h}$	r^2	$r_{I0}, \text{mol/L.h}$	r^2
50	0.10	$3.588 \cdot 10^{-5}$	0.763	$4.600 \cdot 10^{-5}$	0.852
50	0.50	$1.743 \cdot 10^{-4}$	0.999	$2.020 \cdot 10^{-4}$	0.998
50	1.00	$3.485 \cdot 10^{-4}$	0.999	$3.980 \cdot 10^{-4}$	0.998
50	2.00	$5.235 \cdot 10^{-4}$	0.981		
60	0.10	$1.280 \cdot 10^{-4}$	0.971	$1.070 \cdot 10^{-4}$	0.991
60	0.25			$2.080 \cdot 10^{-4}$	0.991
60	0.50	$6.548 \cdot 10^{-4}$	0.995	$4.630 \cdot 10^{-4}$	0.955
60	0.75			$6.460 \cdot 10^{-4}$	0.965
60	1.00	$1.210 \cdot 10^{-3}$	0.982	$1.222 \cdot 10^{-3}$	0.993
60	1.25			$1.352 \cdot 10^{-3}$	0.997
60	1.50			$1.565 \cdot 10^{-3}$	0.989
60	2.00	$2.249 \cdot 10^{-3}$	0.981		

Si se tiene en cuenta que las velocidades iniciales de reacción para la formación de fructosa y glucosa r_{D0} y r_{I0} se pueden ajustar a cinéticas de primer orden ($n=1$) se deduce

$$r_{D0} = \left(\frac{d[F]}{dt} \right)_0 = K_D [G]_0^n \quad [5.11]$$

$$r_{I0} = \left(\frac{d[G]}{dt} \right)_0 = K_I [F]_0^n \quad [5.12]$$

por lo que representando $\ln r_{D0}$ ó $\ln r_{I0}$ frente al logaritmo neperiano de la concentración inicial de glucosa $[G]_0$ ó fructosa $[F]_0$ respectivamente, se obtendrían líneas de pendiente unidad. En las Figuras 5.9 y 5.10 se han realizado dichas representaciones y en la tabla 5.4 se muestran las pendientes obtenidas observándose que el orden de reacción es prácticamente la unidad.

TABLA 5.4

ORDEN DE REACCION PARA LA ISOMERIZACION GLUCOSA-FRUCTOSA.
ANALISIS POLARIMETRICO.

Reacción	T, °C	n
Glucosa-Fructosa	50	0.975
"	60	0.980
Fructosa-Glucosa	50	0.934
"	60	1.038

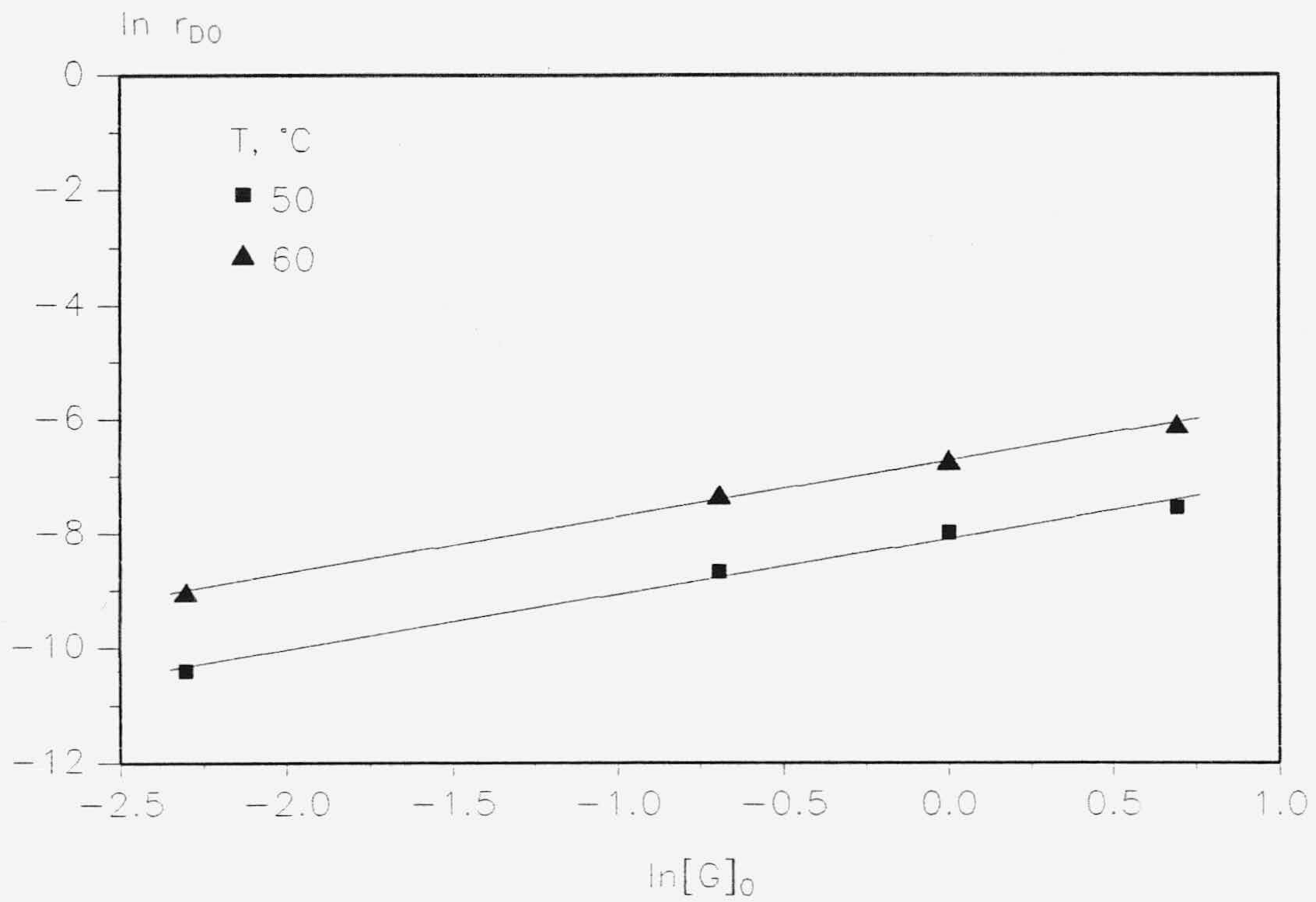


Figura 5.9. Representación ecuación [5.11]

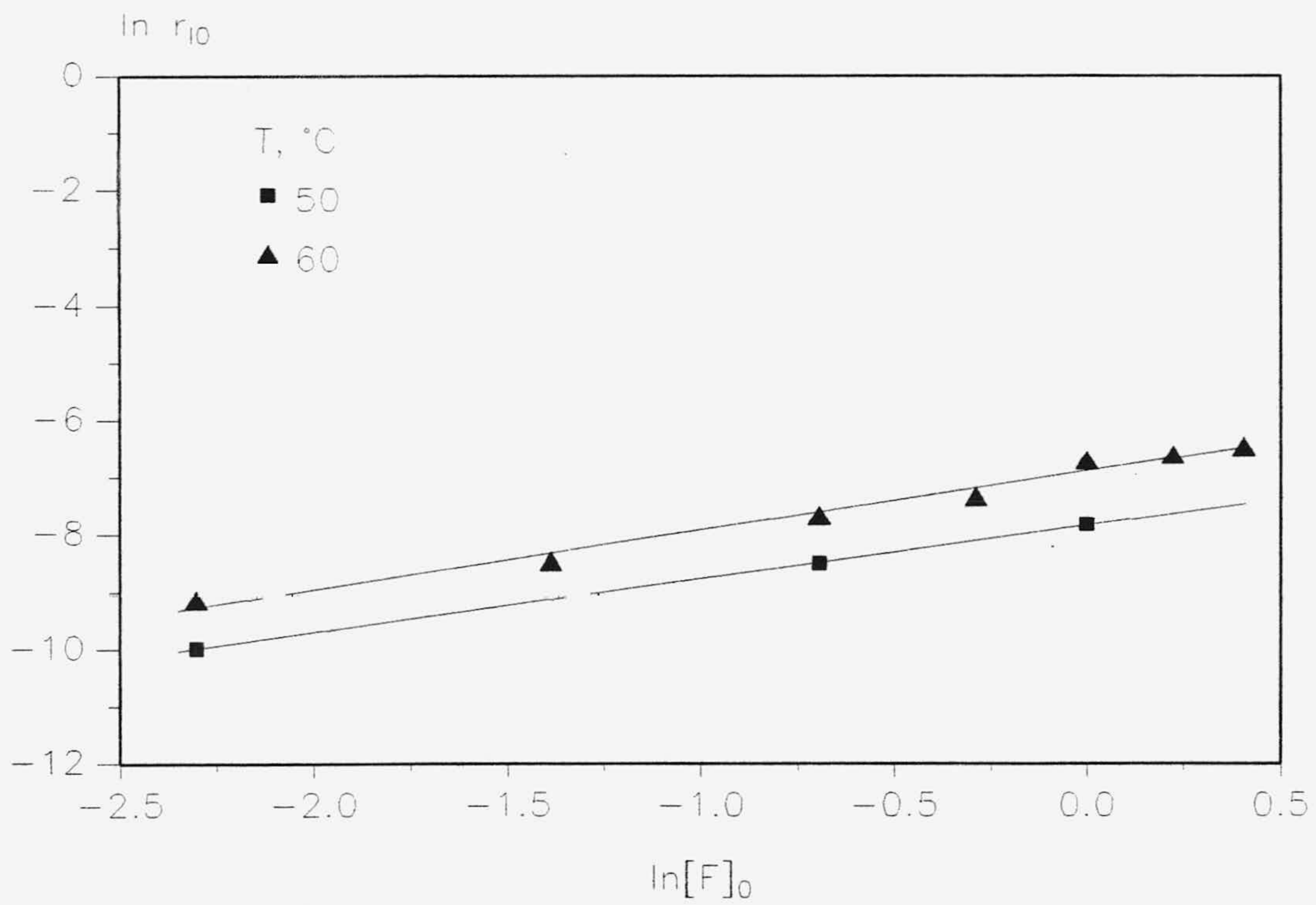


Figura 5.10. Representación ecuación [5.12]

5.2.2 Método diferencial con análisis enzimático.

La reacción de isomerización también se ha realizado sin la enzima glucosa-isomerasa, para la reacción fructosa \rightarrow glucosa pero analizando la glucosa en función del tiempo de forma enzimática, por el método de la glucosa-oxidasa (Werner et al., 1970).

En las Figuras 5.11 a 5.15 se representan los resultados experimentales de concentración de glucosa en función del tiempo, tabulados en las tablas 4.2.3.1 a 4.2.3.3 para las temperaturas 40 ;50 y 60 °C y distintas concentraciones iniciales de hexosas, 0.5; 1.0 y 2.0 M. Como puede observarse la concentración de glucosa aumenta con el tiempo de reacción de forma lineal siendo este incremento más acusado a medida que aumenta la temperatura y la concentración inicial de fructosa, como era de esperar.

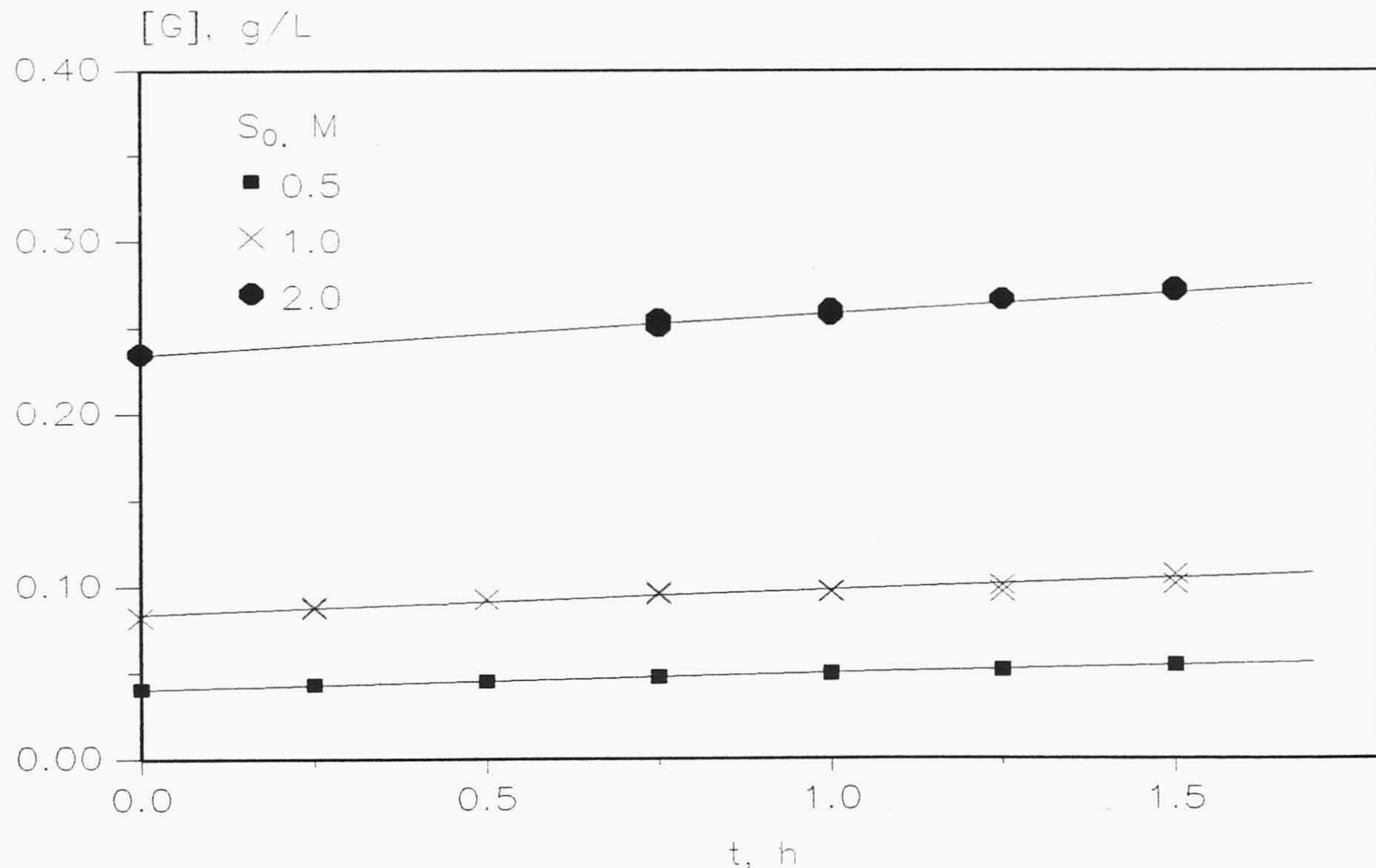


Figura 5.11. Isomerización no enzimática F \rightarrow G. Análisis enzimático T= 40°C

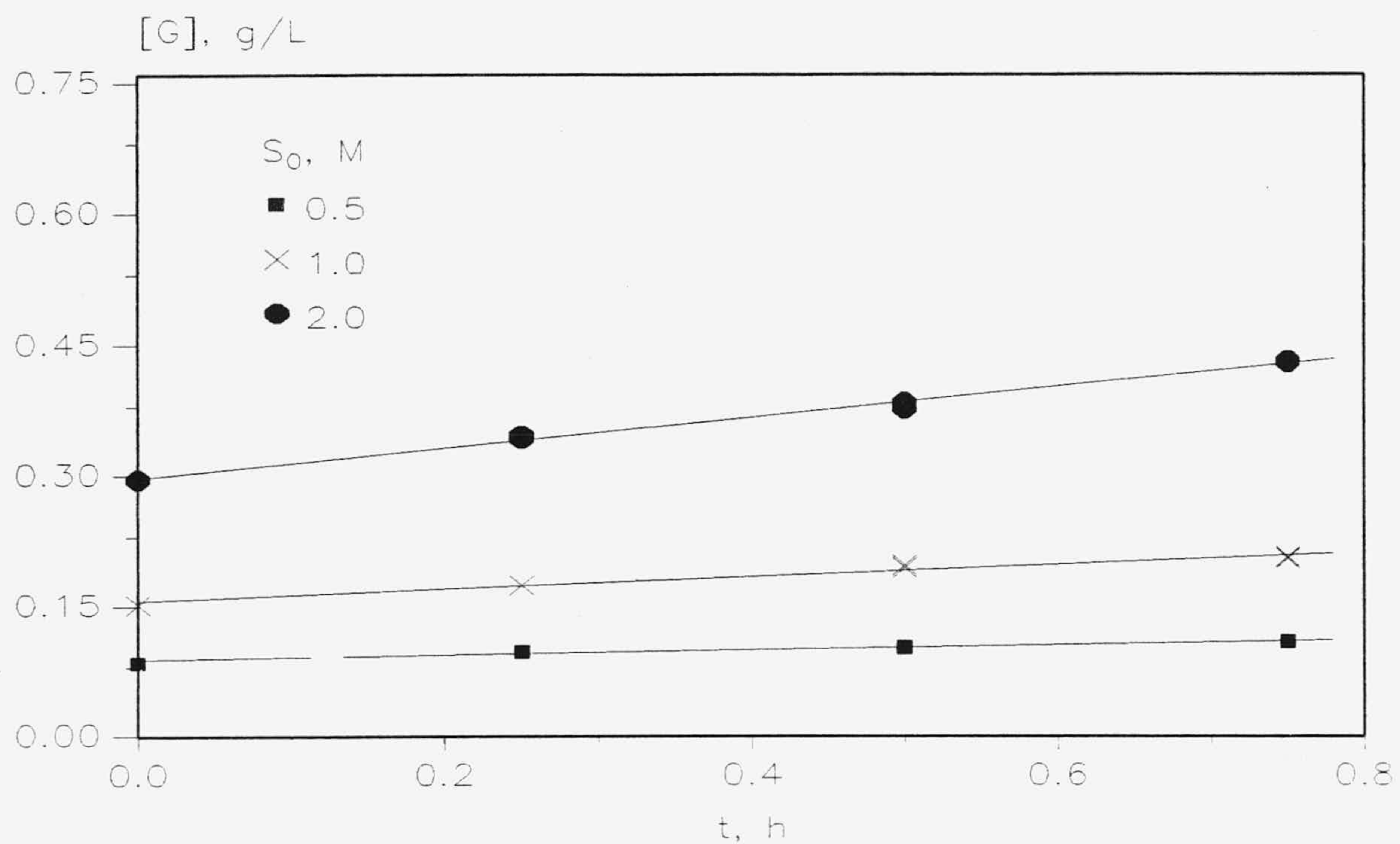


Figura 5.12. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis enzimático T= 50°C

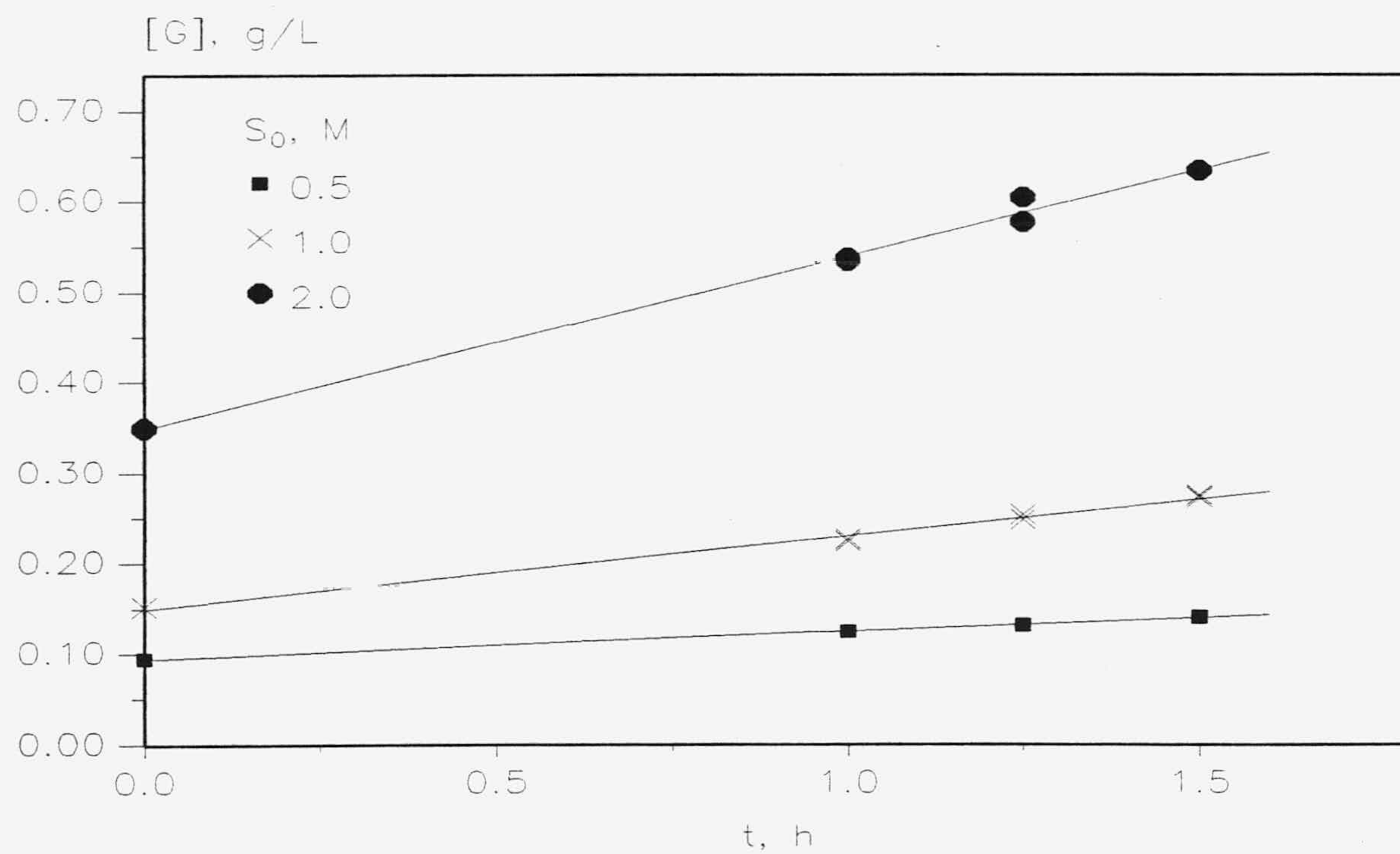


Figura 5.13. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis enzimático T= 50°C

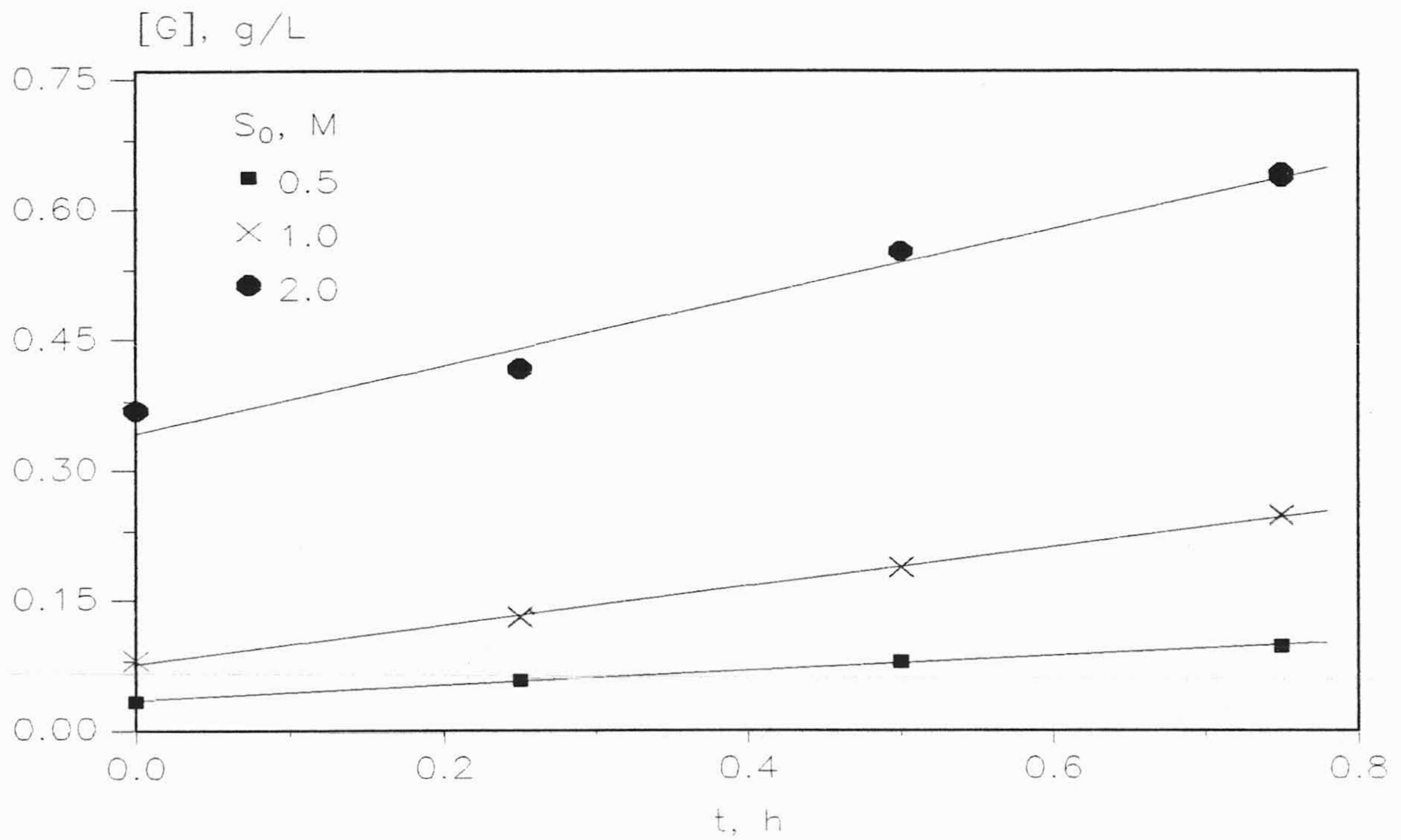


Figura 5.14. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis enzimático T= 60°C

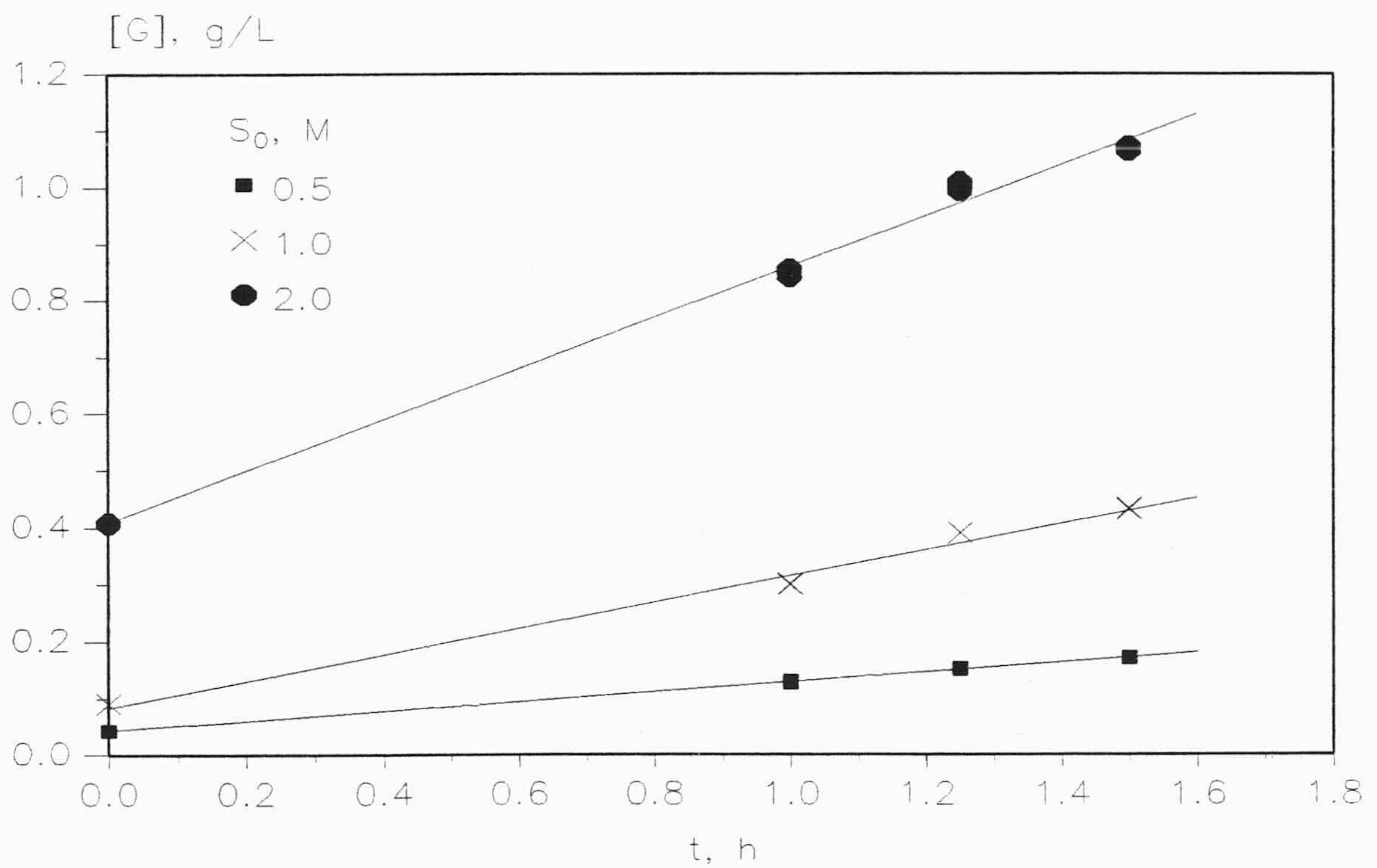


Figura 5.15. Isomerización no enzimática F --> G. Análisis enzimático T= 60°C

De la pendiente de estas representaciones se obtiene la velocidad inicial de reacción, r_{I0} , que se muestra en la tabla 5.5.

TABLA 5.5

VELOCIDADES INICIALES DE REACCION PARA LA FORMACION DE GLUCOSA

r_{I0} . ANALISIS ENZIMATICO.

T, °C	s_0, M	$r_{I0}, \text{mol/Lh}$	r^2
40	0.5	$4.917 \cdot 10^{-5}$	0.994
40	1.0	$8.077 \cdot 10^{-5}$	0.961
40	2.0	$1.382 \cdot 10^{-4}$	0.986
50	0.5	$1.576 \cdot 10^{-4}$	0.953
50	0.5	$1.702 \cdot 10^{-4}$	0.998
50	1.0	$3.866 \cdot 10^{-4}$	0.965
50	1.0	$4.499 \cdot 10^{-4}$	0.991
50	2.0	$9.755 \cdot 10^{-4}$	0.992
50	2.0	$1.057 \cdot 10^{-3}$	0.993
60	0.5	$4.667 \cdot 10^{-4}$	0.995
60	0.5	$4.782 \cdot 10^{-4}$	0.999
60	1.0	$1.255 \cdot 10^{-3}$	0.998
60	1.0	$1.277 \cdot 10^{-3}$	0.990
60	2.0	$2.177 \cdot 10^{-3}$	0.972
60	2.0	$2.497 \cdot 10^{-3}$	0.992

Si se tiene en cuenta la ecuación [5.12] el ajuste de $\ln r_{I0}$ frente a $\ln [F]_0$ daría líneas rectas de cuya pendiente se obtiene el orden de reacción. En las Figuras 5.16 a 5.18 se han realizado las correspondientes representaciones para las temperaturas de 40, 50 y 60 °C y en la tabla 5.6 se muestra el orden de la reacción obtenido.

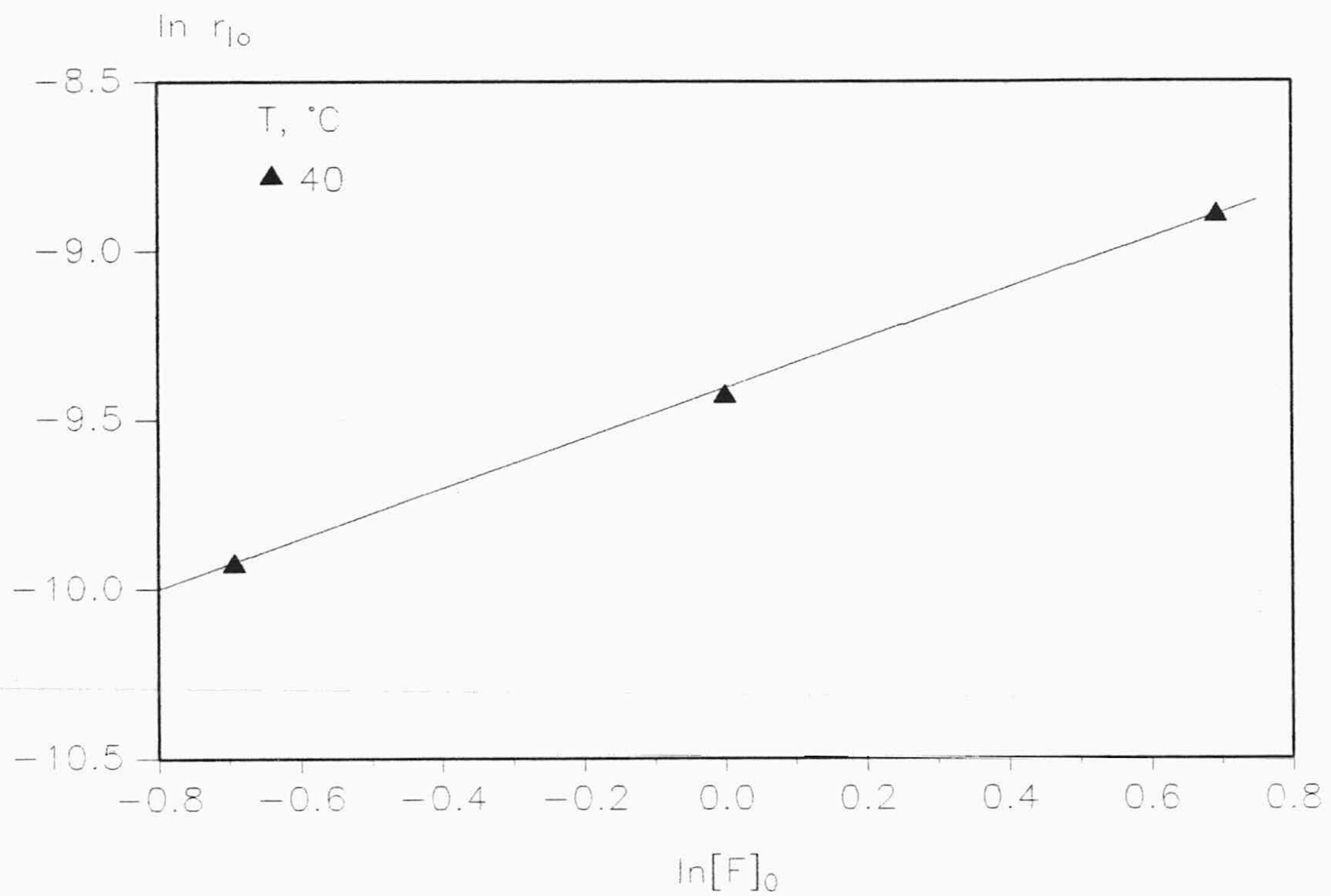


Figura 5.16. Representación ecuación [5.12]. $T = 40^\circ\text{C}$

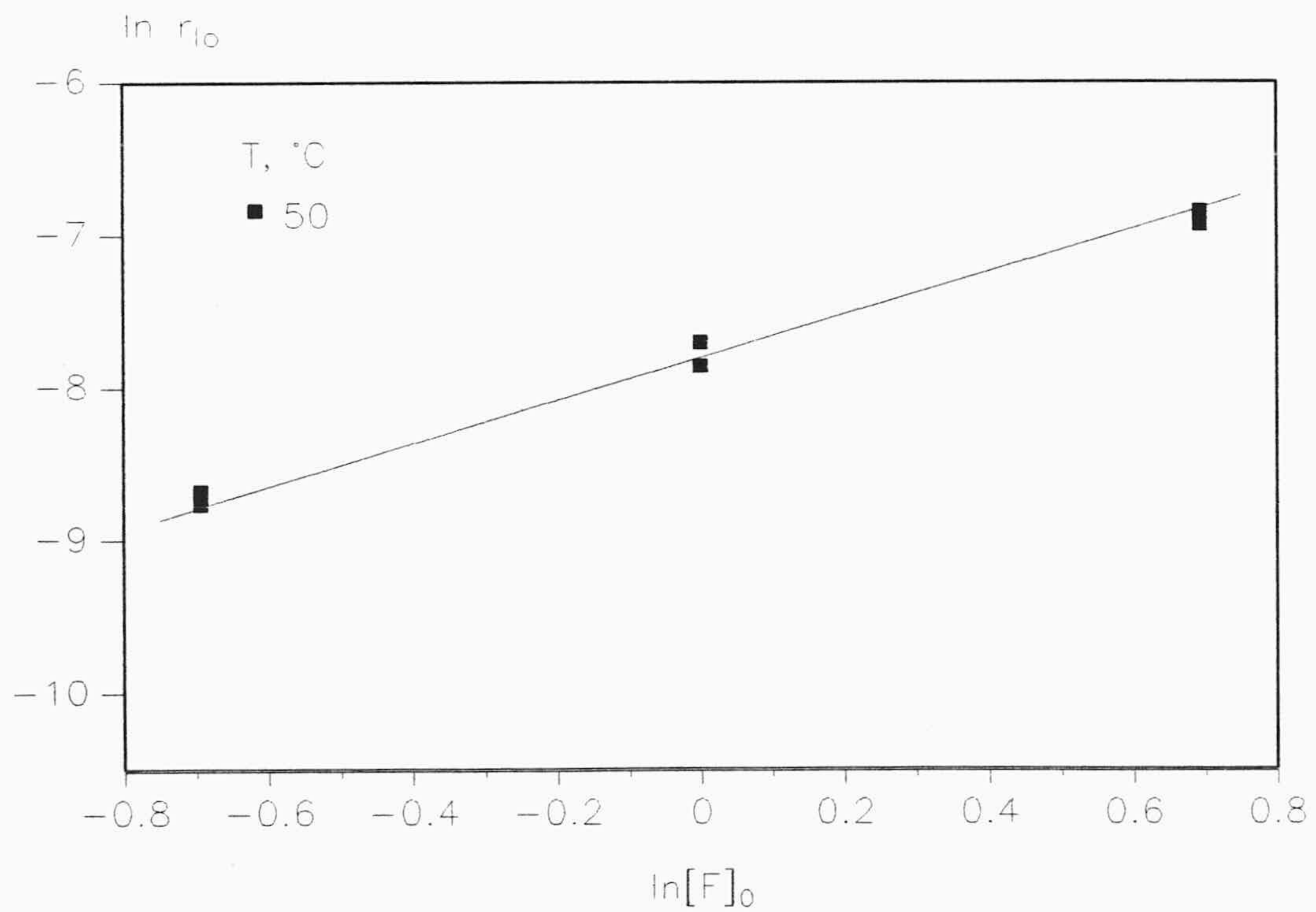


Figura 5.17. Representación ecuación [5.12]. $T = 50^\circ\text{C}$

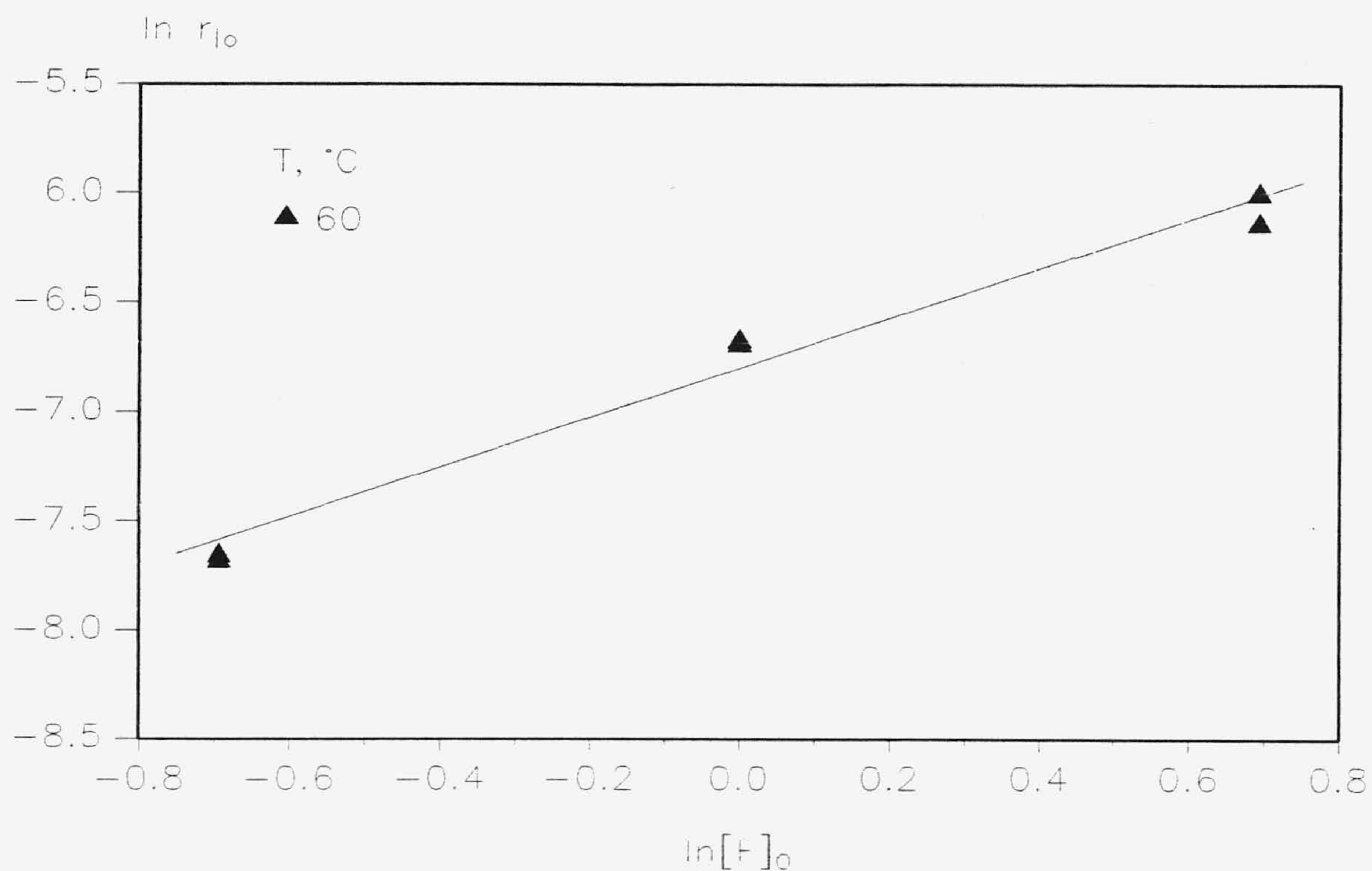


Figura 5.18. Representación ecuación [5.12]. T= 60°C

TABLA 5.6

ORDEN DE REACCION PARA LA ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA.
ANALISIS ENZIMATICO.

Reacción	T, °C	n	r ²
Fructosa-Glucosa	40	0.745	0.999
"	50	1.316	0.995
"	60	1.152	0.978

Como se puede observar el orden de reacción se encuentra en torno a la unidad aunque existe una mayor dispersión que para los valores establecidos mediante los experimentos con análisis polarimétrico, Tabla 5.4.

5.2.3 Método integral

Si se considera la reacción de isomerización Fructosa \rightleftharpoons Glucosa



la velocidad de aparición de glucosa será

$$\frac{d[G]}{dt} = K_I [F] - K_D [G] \quad [5.14]$$

si se tiene en cuenta la definición de la conversión, ecuación [5.4], y la constante de equilibrio, ecuación [5.5], la velocidad de reacción en función de las conversiones será

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K_I}{x_e} (x_e - x) \quad [5.15]$$

separando variables e integrando entre un tiempo de referencia (x_R, t_R) y cualquier tiempo (x, t) se tiene

$$\int_{x_R}^x \frac{dx}{x_e - x} = \int_{t_R}^t \frac{K_I}{x_e} dt \quad [5.16]$$

$$\ln \frac{x_e - x_R}{x_e - x} = \frac{K_I}{x_e} (t - t_R) \quad [5.17]$$

o lo que es igual

$$x_e \ln \frac{1}{x_e - x} = A + K_I t \quad [5.18]$$

Por otra parte, si se tiene en cuenta la definición del grado de polarización, ecuación [3.1], y la ecuación [5.2] α_M en función de la concentración de fructosa quedará como

$$\alpha_M = ([G_0] + [F_0])K_F + [G](K_G - K_F) \quad [5.19]$$

si se define

$$\alpha_N = \frac{\alpha_M}{[F_0] + [G_0]} \quad [5.20]$$

la ecuación [5.20] teniendo en cuenta [5.19] será

$$\alpha_N = K_F + \frac{[G]}{[G_0] + [F_0]}(K_G - K_F) \quad [5.21]$$

por lo tanto, la conversión

$$x = \frac{[G]}{[G_0] + [F_0]} = \frac{\alpha_N - K_F}{K_G - K_F} \quad [5.22]$$

y

$$x_e = \frac{\alpha_{N_e} - K_F}{K_G - K_F} \quad [5.23]$$

Por lo tanto, la ecuación [5.18], puede aplicarse tanto para los experimentos realizados analizando la glucosa de forma enzimática como para los experimentos con análisis polarimétrico, teniendo en cuenta la definición de x y x_e en función del grado de polarización ecuaciones [5.22] y [5.23]. También ha de tenerse en cuenta que para la reacción glucosa \rightarrow fructosa de forma análoga a la deducción de la ecuación [5.18] se obtiene

$$x_e \ln \frac{1}{x - x_e} = A + K_I t \quad [5.24]$$

Aplicando las ecuaciones [5.18] y [5.24] a todos los experimentos de isomerización realizados en ausencia de la enzima glucosa-isomerasa, la pendiente proporciona la constante K_I que se muestra en la tabla 5.7

TABLA 5.7
VALORES DE K_I

Reacción	Método	T, °C	s_0, M	K_I, h^{-1}
Glucosa-Fructosa	Polarimétrico	50	0.1	$4.007 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	0.5	$3.517 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	1.0	$3.430 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	2.0	$2.525 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	0.1	$1.353 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	0.5	$1.236 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.0	$1.118 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	2.0	$0.998 \cdot 10^{-3}$
Fructosa-Glucosa	"	50	0.5	$4.511 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	1.0	$4.378 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	0.1	$1.188 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	0.25	$1.060 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	0.5	$1.090 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	0.75	$1.031 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.0	$1.286 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.25	$1.275 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.5	$1.163 \cdot 10^{-3}$
Fructosa-Glucosa	Enzimático	40	0.5	$9.849 \cdot 10^{-5}$
"	"	40	1.0	$8.066 \cdot 10^{-5}$
"	"	40	2.0	$6.927 \cdot 10^{-5}$
"	"	50	0.5	$3.163 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	0.5	$3.412 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	1.0	$3.866 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	1.0	$4.503 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	2.0	$4.887 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	2.0	$5.296 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	0.5	$0.935 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	0.5	$0.959 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.0	$1.257 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	1.0	$1.281 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	2.0	$1.091 \cdot 10^{-3}$
"	"	60	2.0	$1.254 \cdot 10^{-3}$

Como se puede observar los valores de las constantes K_I oscilan alrededor de un valor medio, para cada temperatura, por todos los métodos de análisis utilizados. En la tabla 5.8 se muestran los valores medios de K_I obtenidos por los distintos métodos

TABLA 5.8
VALORES MEDIOS DE K_I

Método	Reacción	T, °C	K_I, h^{-1}
Polarimétrico	Glucosa-Fructosa	50	$3.370 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	$11.763 \cdot 10^{-4}$
"	Fructosa-Glucosa	50	$4.445 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	$11.561 \cdot 10^{-4}$
Enzimático	Fructosa-Glucosa	40	$0.828 \cdot 10^{-4}$
"	"	50	$4.188 \cdot 10^{-4}$
"	"	60	$11.297 \cdot 10^{-4}$

Tomando estos valores medios se han representado las ecuaciones [5.18] y [5.24] en las Figuras 5.19 a 5.28 observándose que ajustan aceptablemente los datos experimentales.

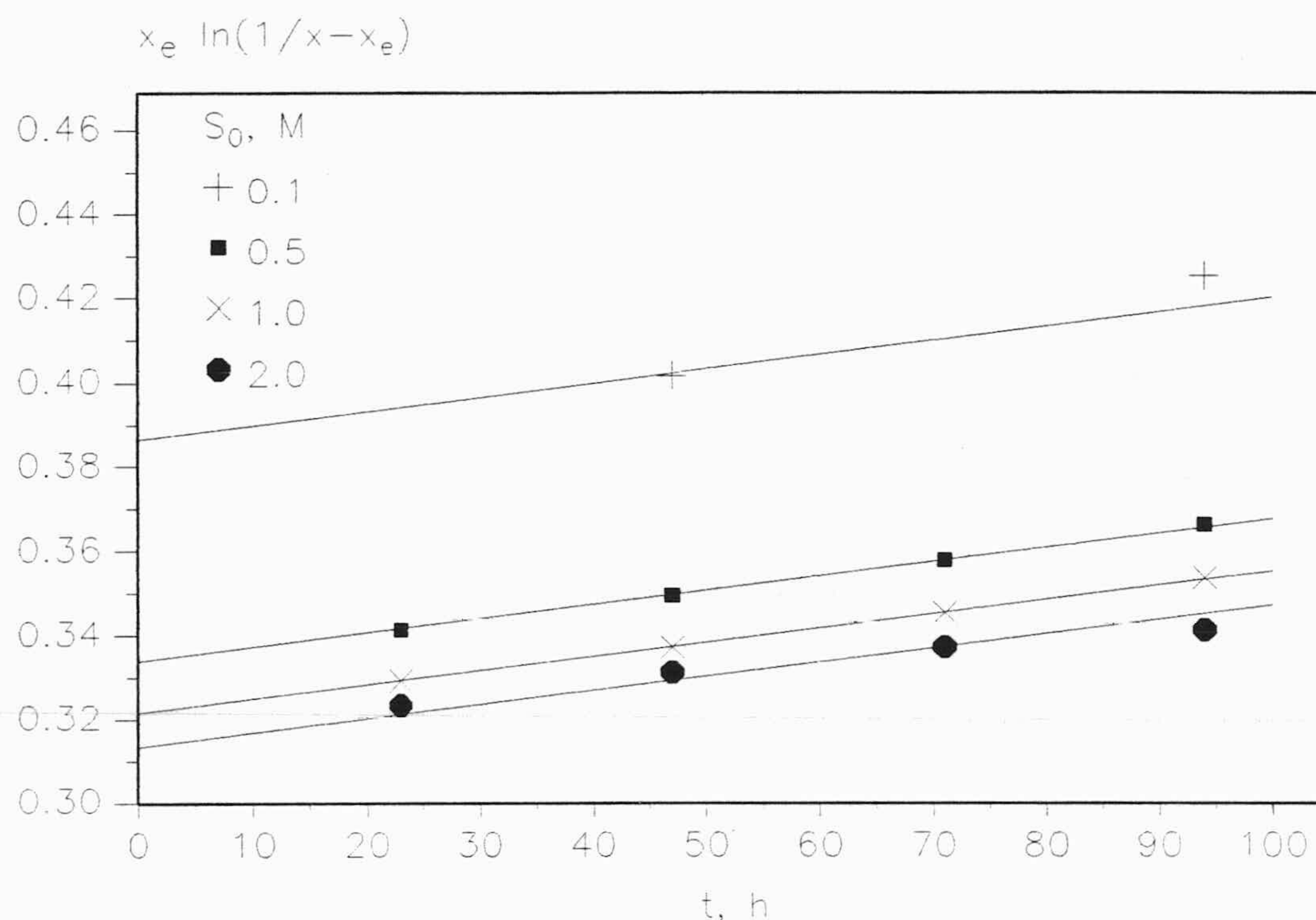


Figura 5.19. Representación ecuación [5.24]. Análisis polarimétrico. $T = 50^\circ\text{C}$

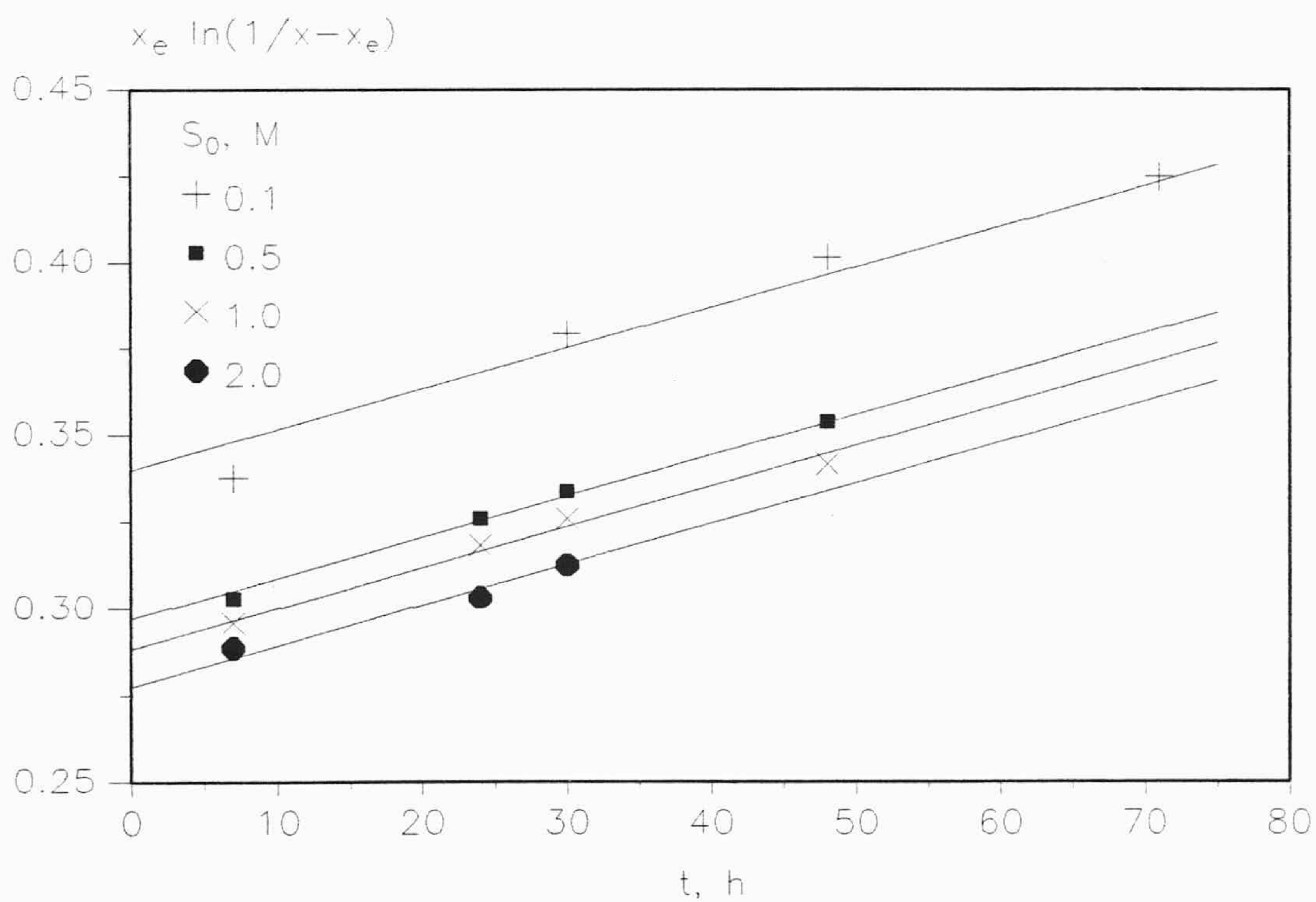


Figura 5.20. Representación ecuación [5.24]. Análisis polarimétrico. $T = 60^\circ\text{C}$

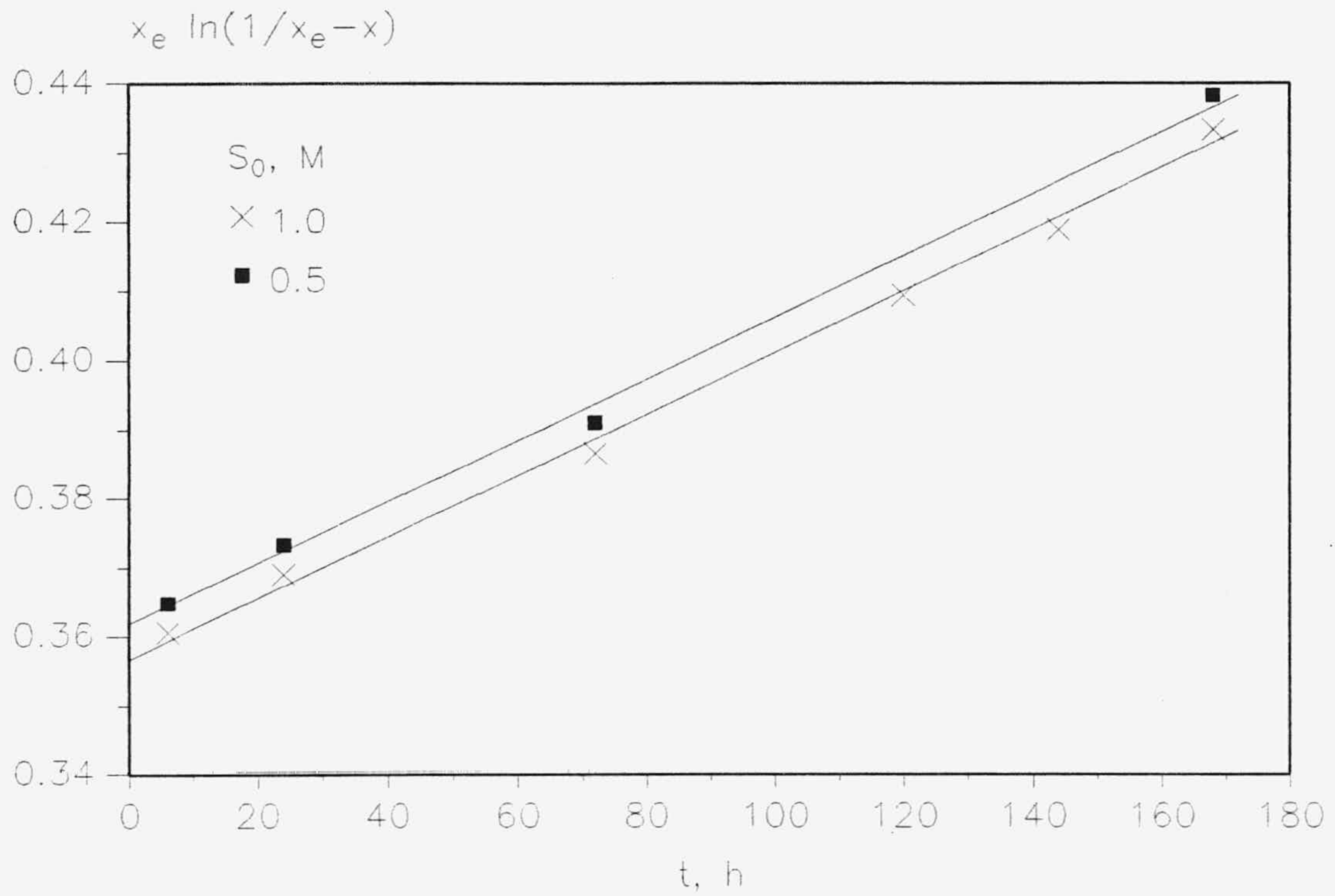


Figura 5.21. Representación ecuación [5.18]. Análisis polarimétrico. $T = 50^\circ\text{C}$

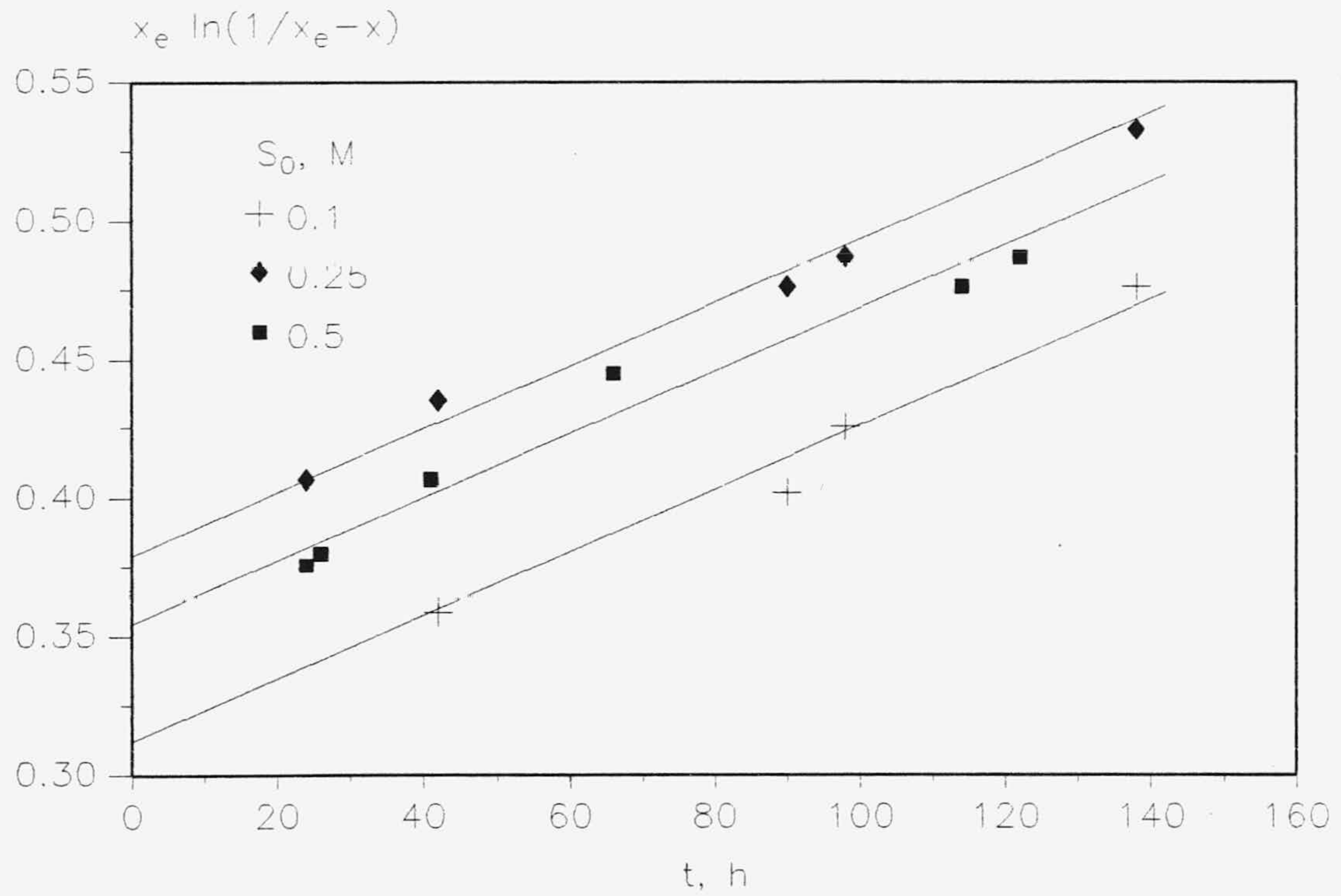


Figura 5.22. Representación ecuación [5.18]. Análisis polarimétrico. $T = 60^\circ\text{C}$

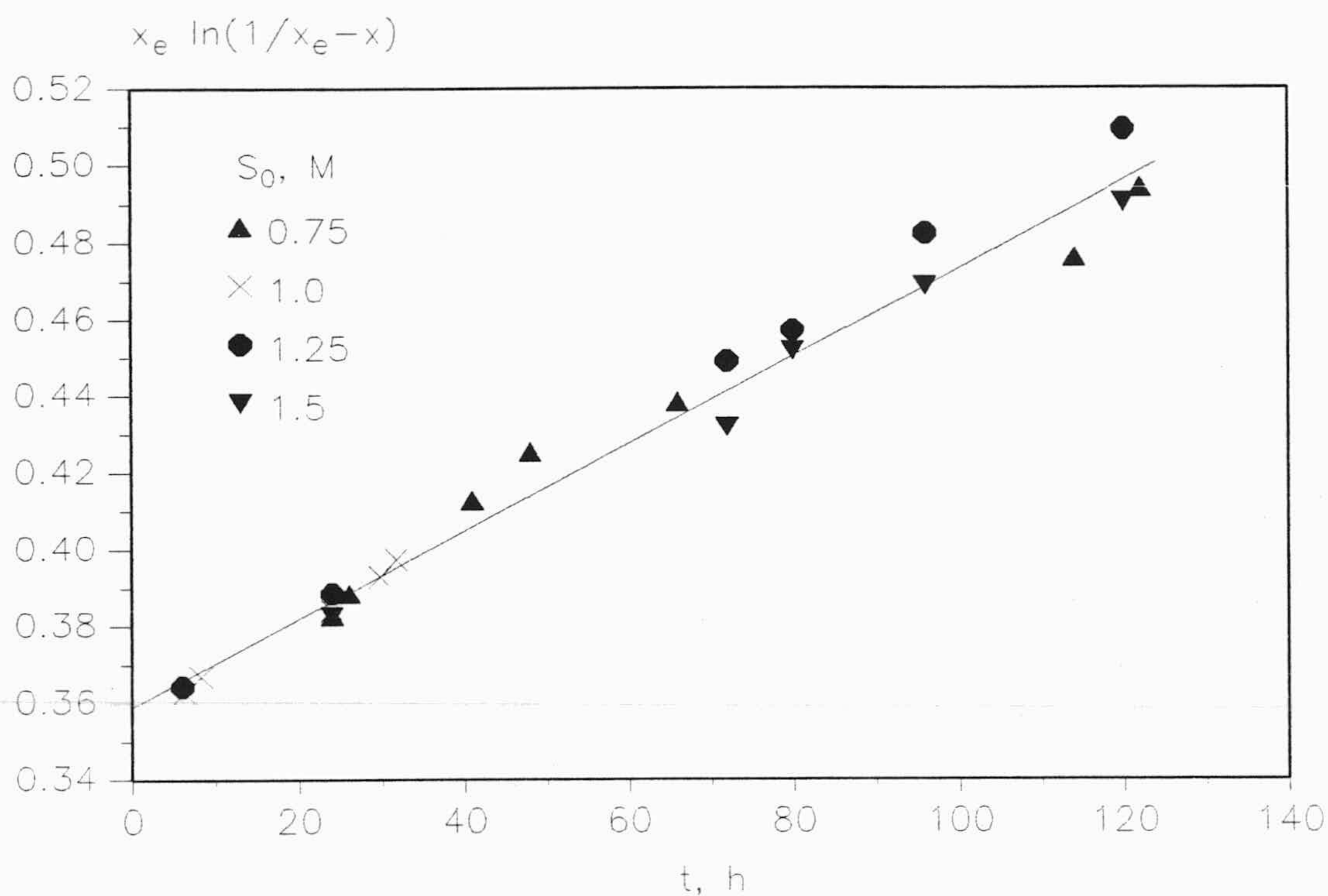


Figura 5.23. Representación ecuación [5.18]. Análisis polarimétrico. T= 60°C

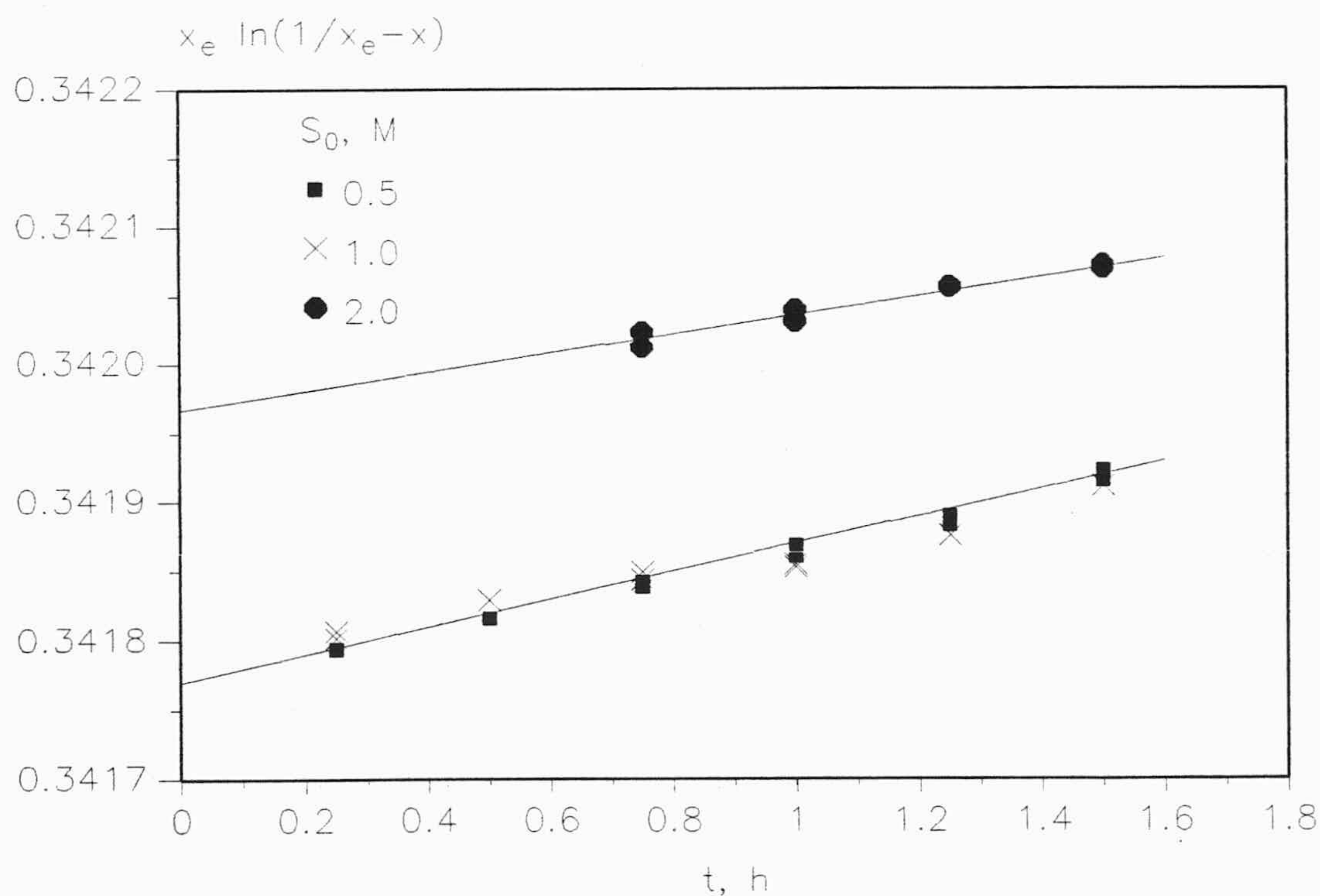


Figura 5.24. Representación ecuación [5.18]. Análisis enzimático. T= 40°C

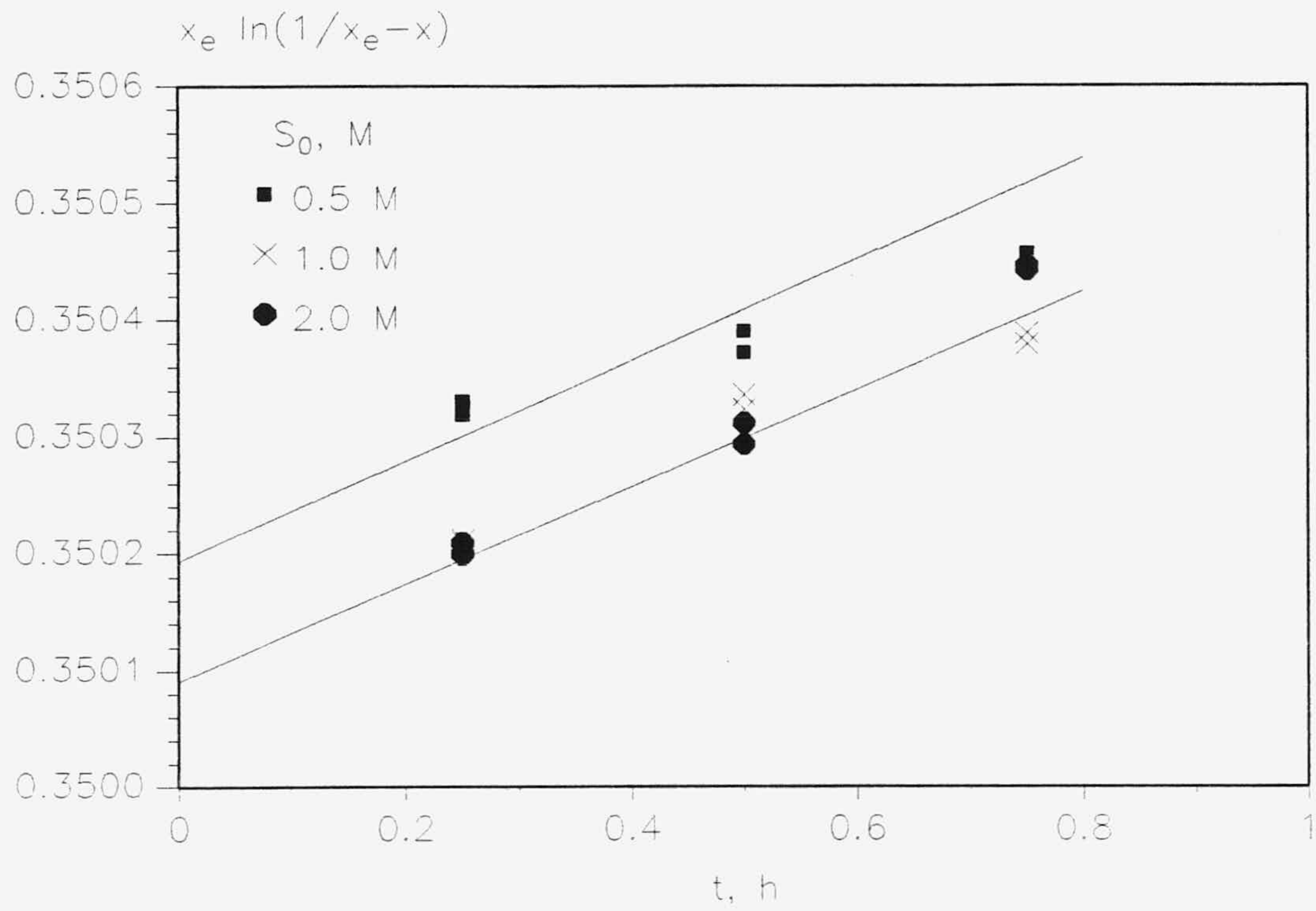


Figura 5.25. Representación ecuación [5.18]. Análisis enzimático. $T = 50^\circ\text{C}$

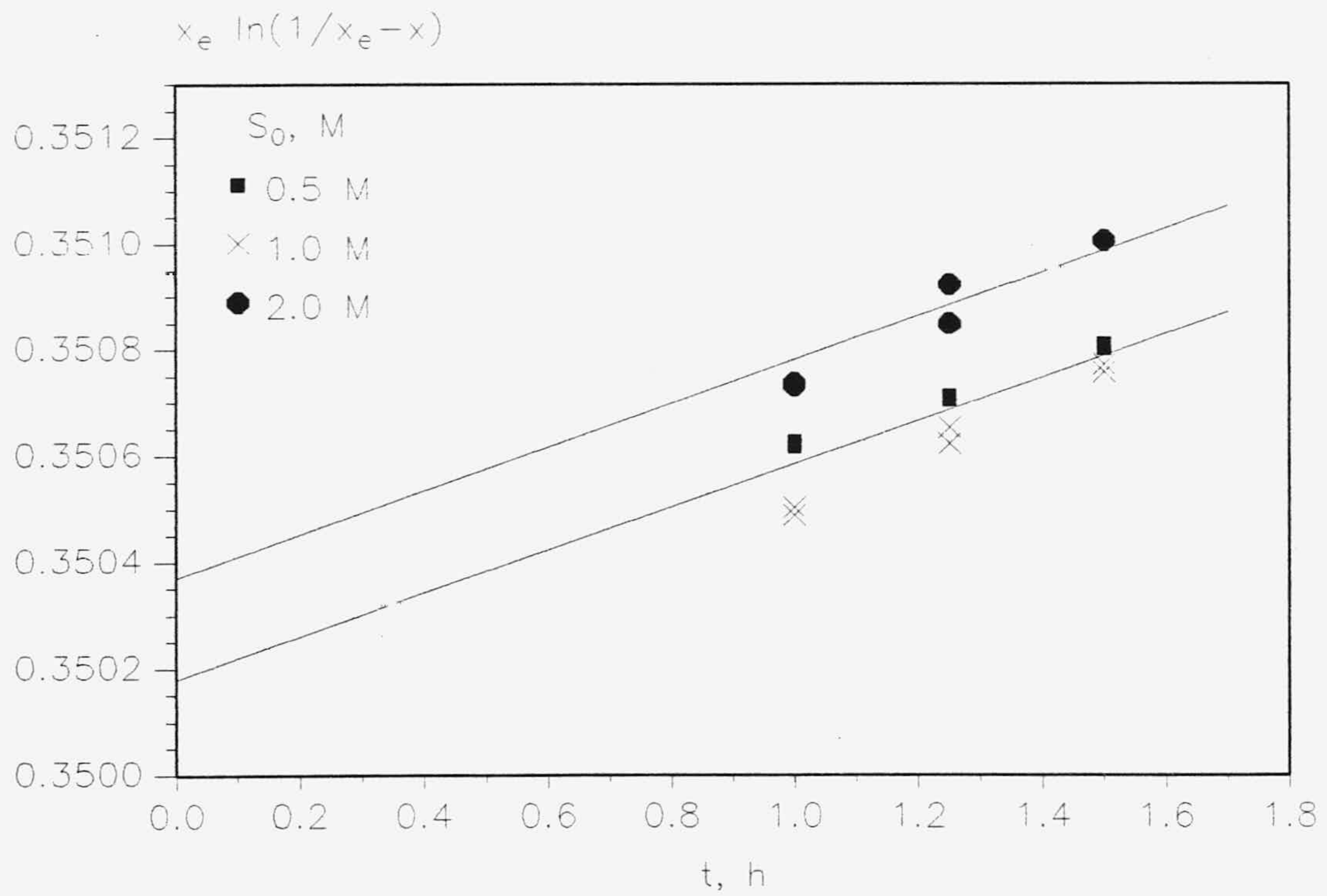


Figura 5.26. Representación ecuación [5.18]. Análisis enzimático. $T = 50^\circ\text{C}$

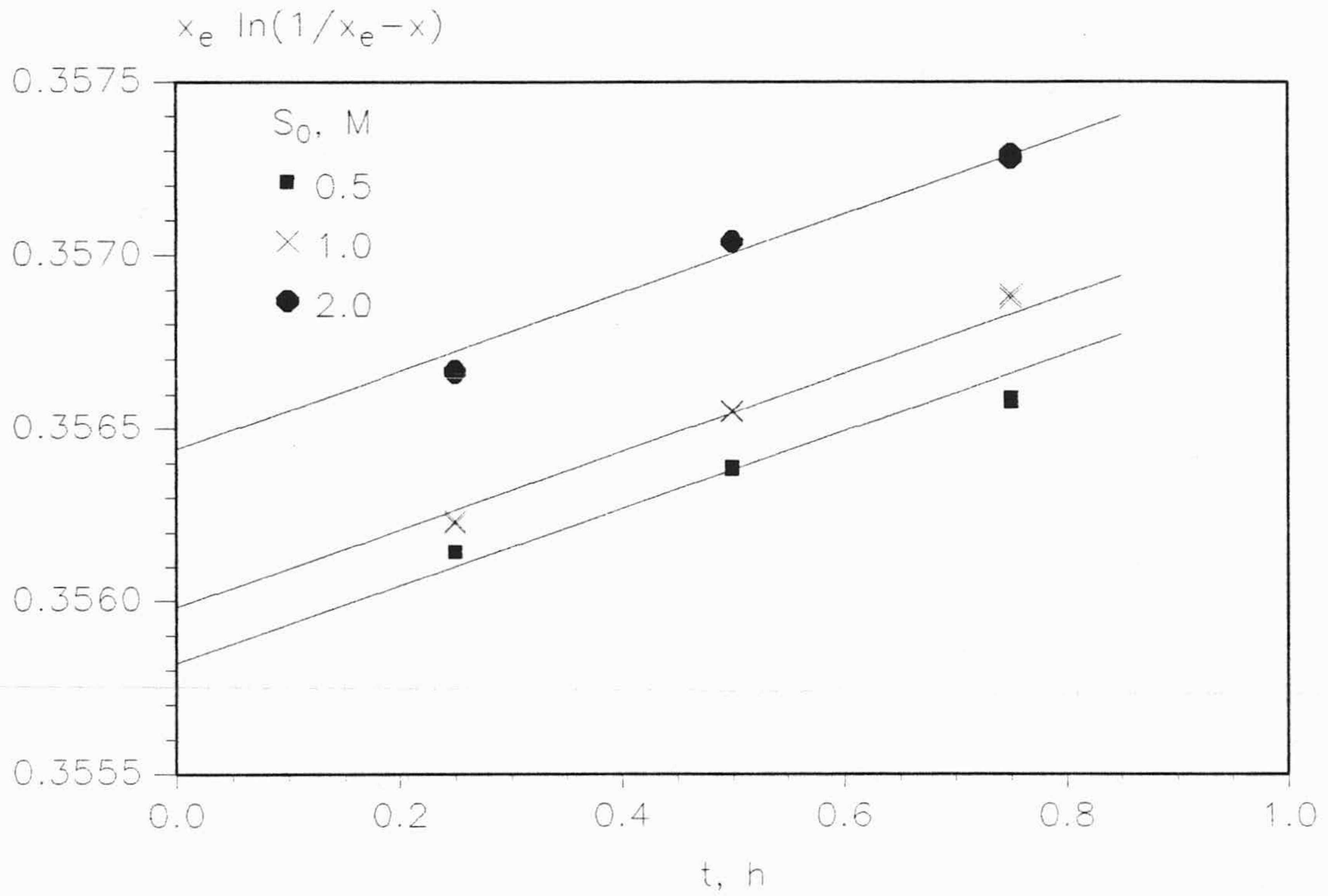


Figura 5.27. Representación ecuación [5.18]. Análisis enzimático. $T = 60^\circ C$

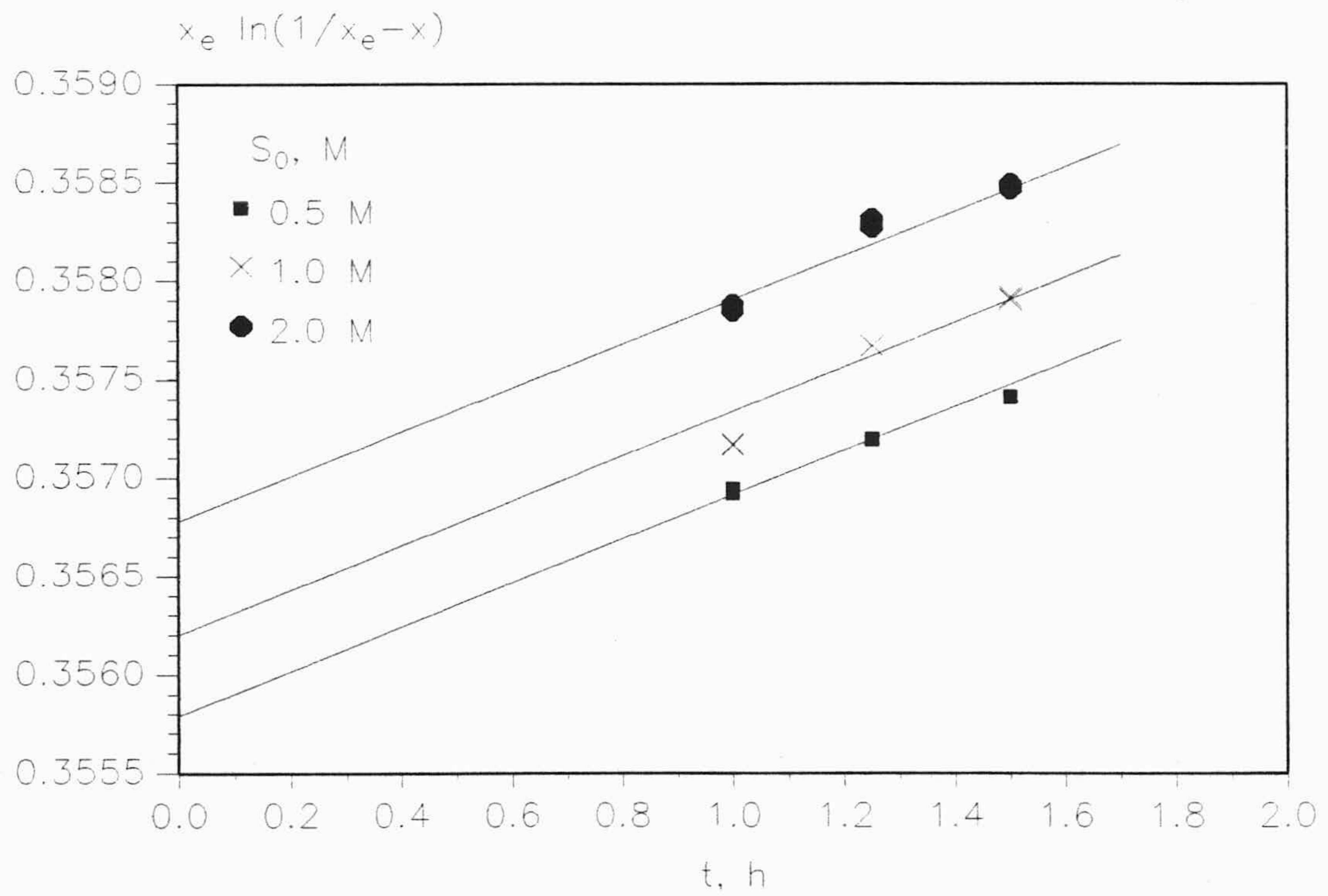


Figura 5.28. Representación ecuación [5.18]. Análisis enzimático. $T = 60^\circ C$

La constante cinética K_D se ha evaluado teniendo en cuenta la constante del equilibrio de isomerización K_e por la ecuación

$$K_e = \frac{K_D}{K_I} \quad [5.25]$$

y se ha representado conjuntamente con K_I en la forma que sugiere Arrhenius en la Figura 5.29, obteniéndose las siguientes ecuaciones en función de la temperatura

$$K_I = 2.05 \cdot 10^{14} \exp \left[\frac{-13207}{T} \right] \quad [5.26]$$

$$K_D = 5.02 \cdot 10^{15} \exp \left[\frac{-14229}{T} \right] \quad [5.27]$$

que indican unas energías de activación de 110 y 118 KJ/mol para las reacciones inversa y directa respectivamente.

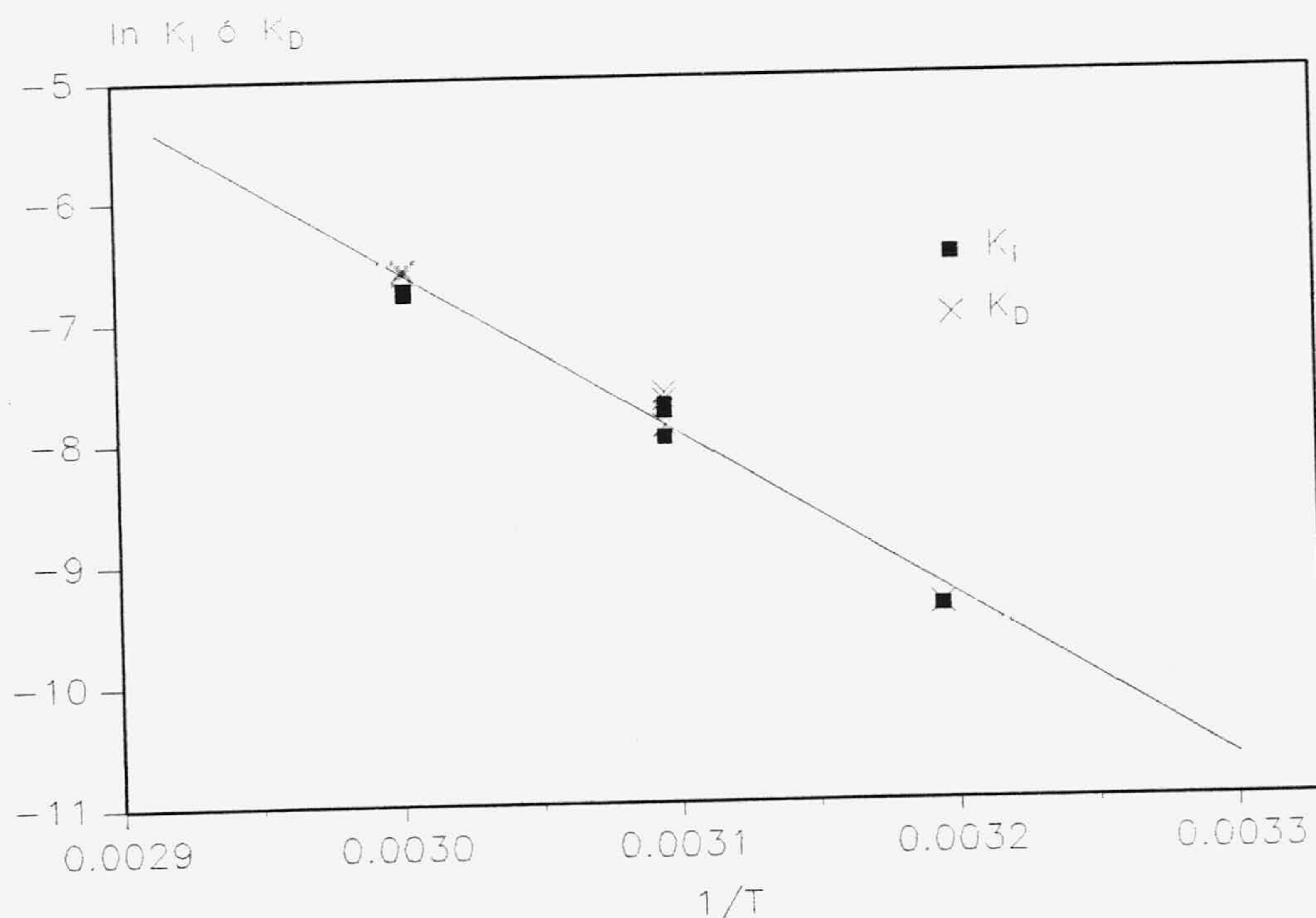


Figura 5.29. Representación de Arrhenius para K_I y K_D .

5.3 REACCION ENZIMATICA

La reacción de isomerización también se ha llevado a cabo en presencia de la enzima glucosa-isomerasa "Sweetzyme A" a la temperatura de 60 °C y partiendo siempre de fructosa. La reacción se seguía analizando la concentración de glucosa en función del tiempo por el método de la glucosa oxidasa. A partir de los resultados experimentales obtenidos y tabulados en el apartado 4, tablas de 4.3.1 a 4.3.5.4, se han calculado las conversiones alcanzadas aplicando la ecuación [5.4], y se han representado en las Figuras 5.30 hasta la 5.40.

En todos los casos puede observarse que existe una relación lineal entre la conversión alcanzada y el tiempo de reacción.

5.3.1 Influencia del transporte externo

En la Figura 5.30 se representan los resultados obtenidos de x frente a t para distintas velocidades de agitación dentro del reactor, 200; 300; 400 y 500 rpm, para estos experimentos se utilizó una concentración de fructosa 0.1 M y una concentración de enzima de 4 g/L. En la tabla 5.9 se muestran las velocidades iniciales de reacción para los distintos experimentos, observándose que a partir de 200 rpm puede despreciarse el efecto de la agitación dentro del tanque y por tanto la transferencia de materia externa es prácticamente despreciable no obstante los restantes experimentos cinéticos se realizaron a 300 rpm.

TABLA 5.9

VELOCIDADES INICIALES DE REACCION.

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION.

Va, rpm	r_0, h^{-1}	r^2
200	$9.90 \cdot 10^{-3}$	0.999
300	$1.01 \cdot 10^{-2}$	0.998
400	$1.06 \cdot 10^{-2}$	0.999
500	$1.02 \cdot 10^{-2}$	0.999

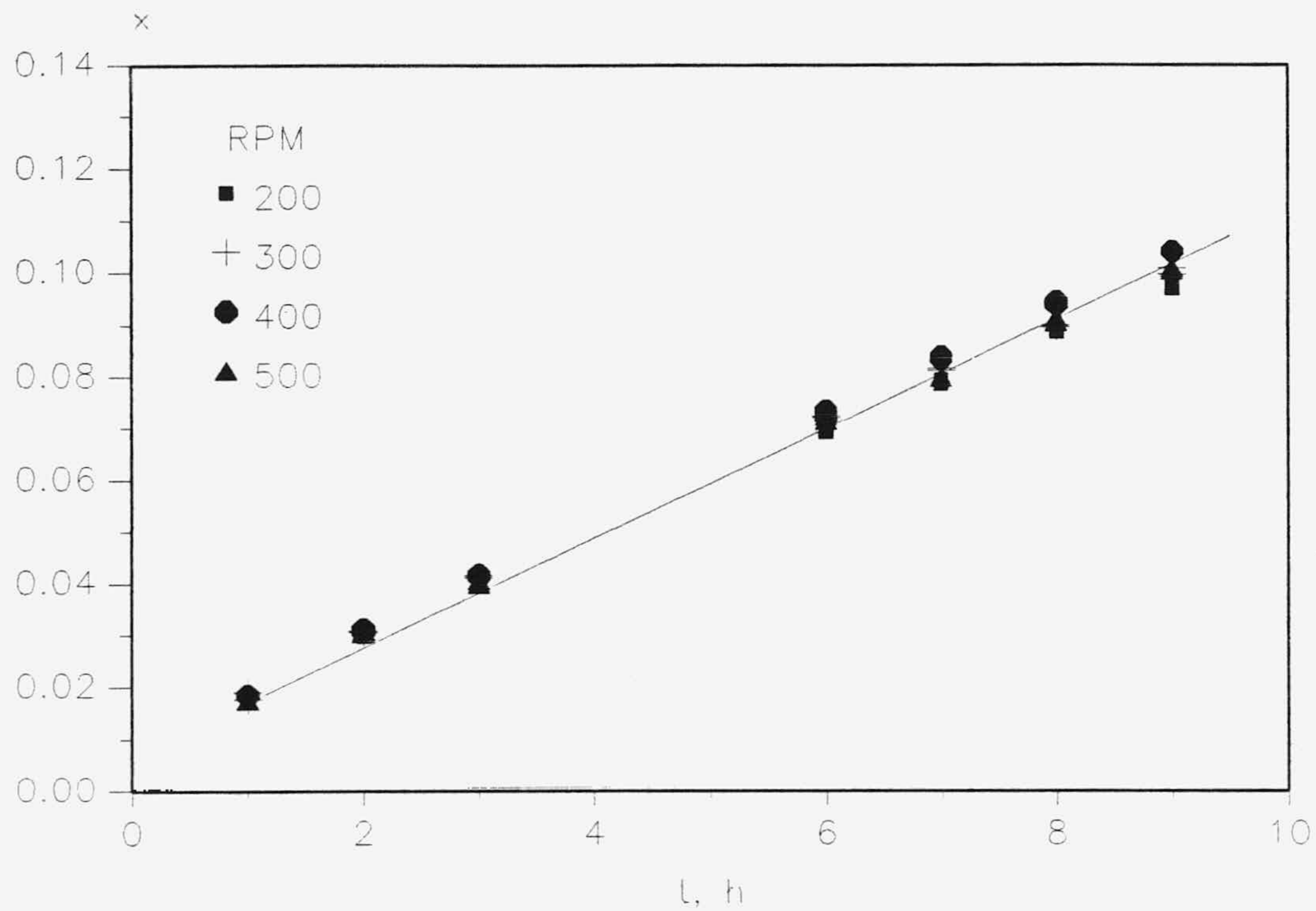


Figura 5.30. Influencia del transporte externo.

5.3.2 Influencia del acondicionamiento con ión Cobalto

En la Figura 5.31 se han representado los resultados obtenidos con la enzima sin acondicionar y distintas concentraciones enzimáticas 2, 4, 6 y 12 g/L y en la Figura 5.32 para la enzima acondicionada, y concentraciones 2, 4 y 6 g/L. En la tabla 5.10 se muestran las velocidades de reacción obtenidas para estos experimentos, observándose que éstas aumentan a medida que se incrementa la concentración enzimática utilizada

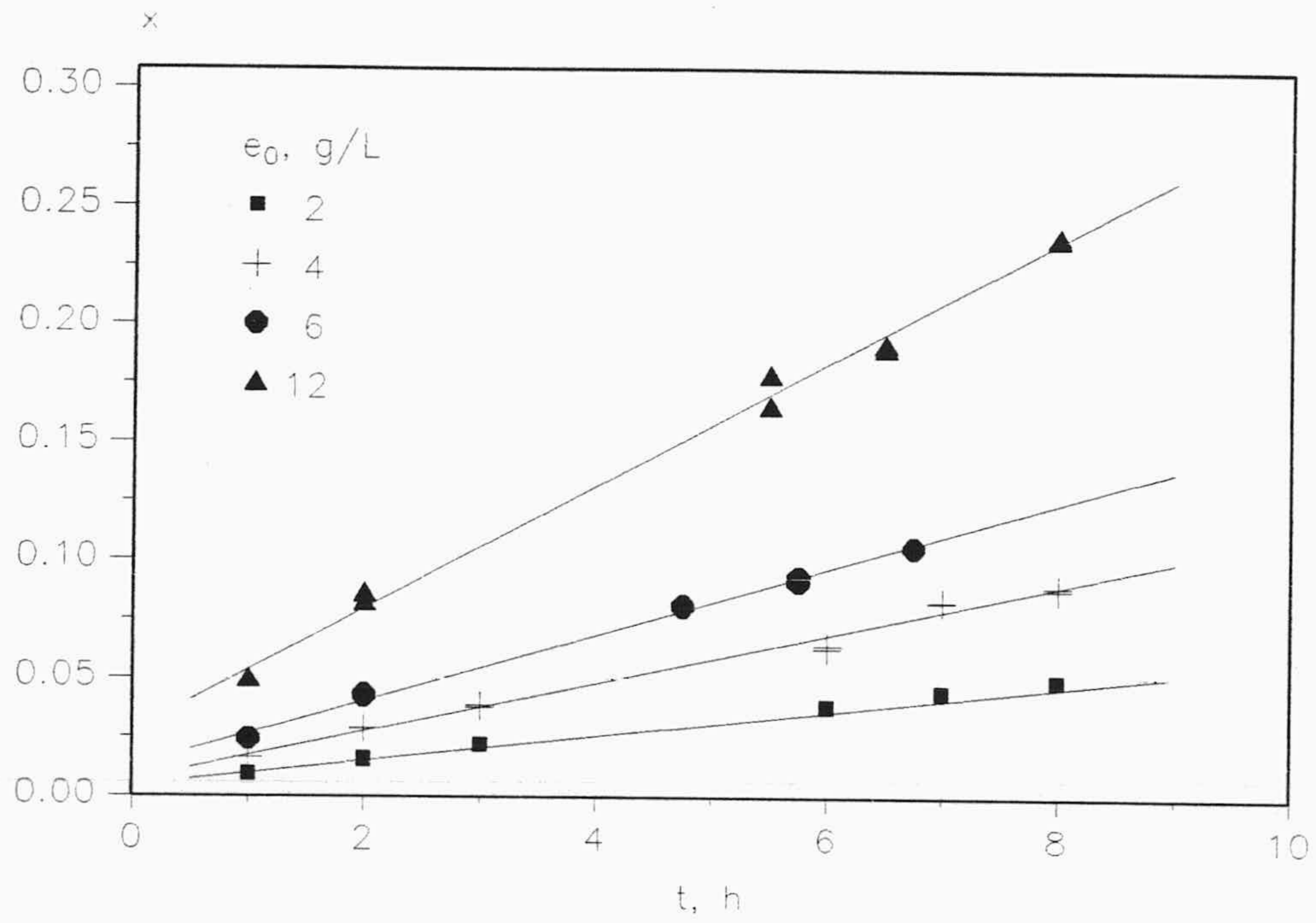


Figura 5.31. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima sin acondicionar.

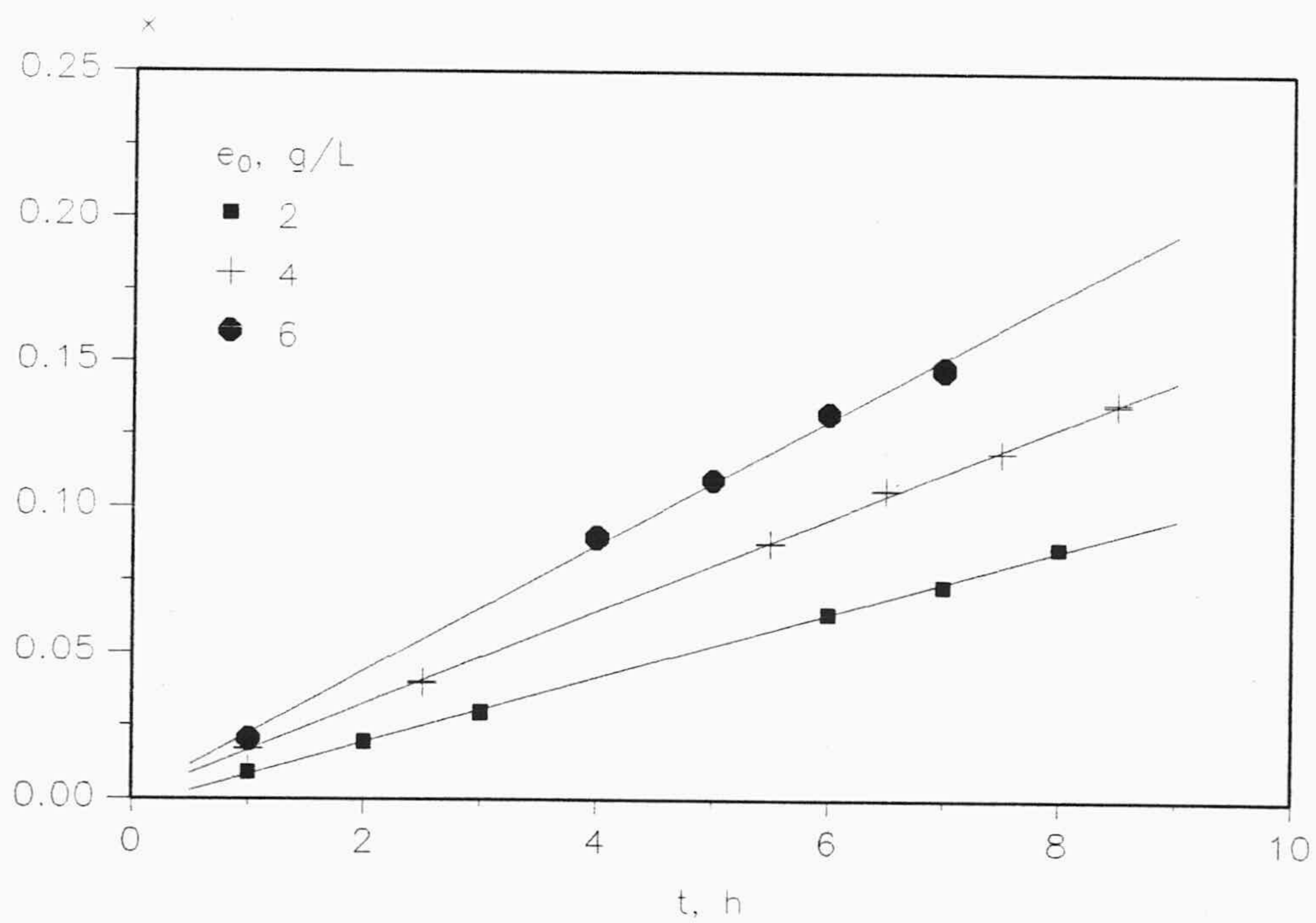


Figura 5.32. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima acondicionada.

TABLA 5.10
 VELOCIDADES INICIALES DE REACCION.
 INFLUENCIA DEL ACONDICIONAMIENTO CON ION COBALTO
 T= 60°C [F₀]= 0.1 M

e ₀ , g/L	Acondicionamiento	V _a , rpm	r ₀ , h ⁻¹	d _p , mm	r ²
2	No	200	5.67.10 ⁻³	0.297-0.420	0.999
4	"	"	1.03.10 ⁻²	"	0.990
6	"	"	1.39.10 ⁻²	"	0.996
12	"	"	2.56.10 ⁻²	"	0.995
2	Si	300	1.04.10 ⁻²	"	0.999
4	No	"	1.01.10 ⁻²	0.420-0.590	0.998
4	Si	"	1.59.10 ⁻²	"	0.999
6	"	"	2.16.10 ⁻²	"	0.997

En la Figura 5.33 y 5.34 y en la tabla 5.10 se presentan los resultados obtenidos para dos experimentos, realizados en las mismas condiciones pero utilizando enzima acondicionada y sin acondicionar. En ellas se observa el efecto positivo del acondicionamiento en cuanto que la velocidad inicial de reacción obtenida es mayor cuando se acondicionó la enzima con ión cobalto.

Por otra parte la actividad enzimática tras el acondicionamiento, Apartado 3, Tabla 3.11 y 3.12, permanece constante durante el tiempo de reacción, lo que no parece ocurrir cuando la enzima no se acondicionaba ya que la actividad enzimática disminuye con el tiempo de reacción, Tabla 3.10.

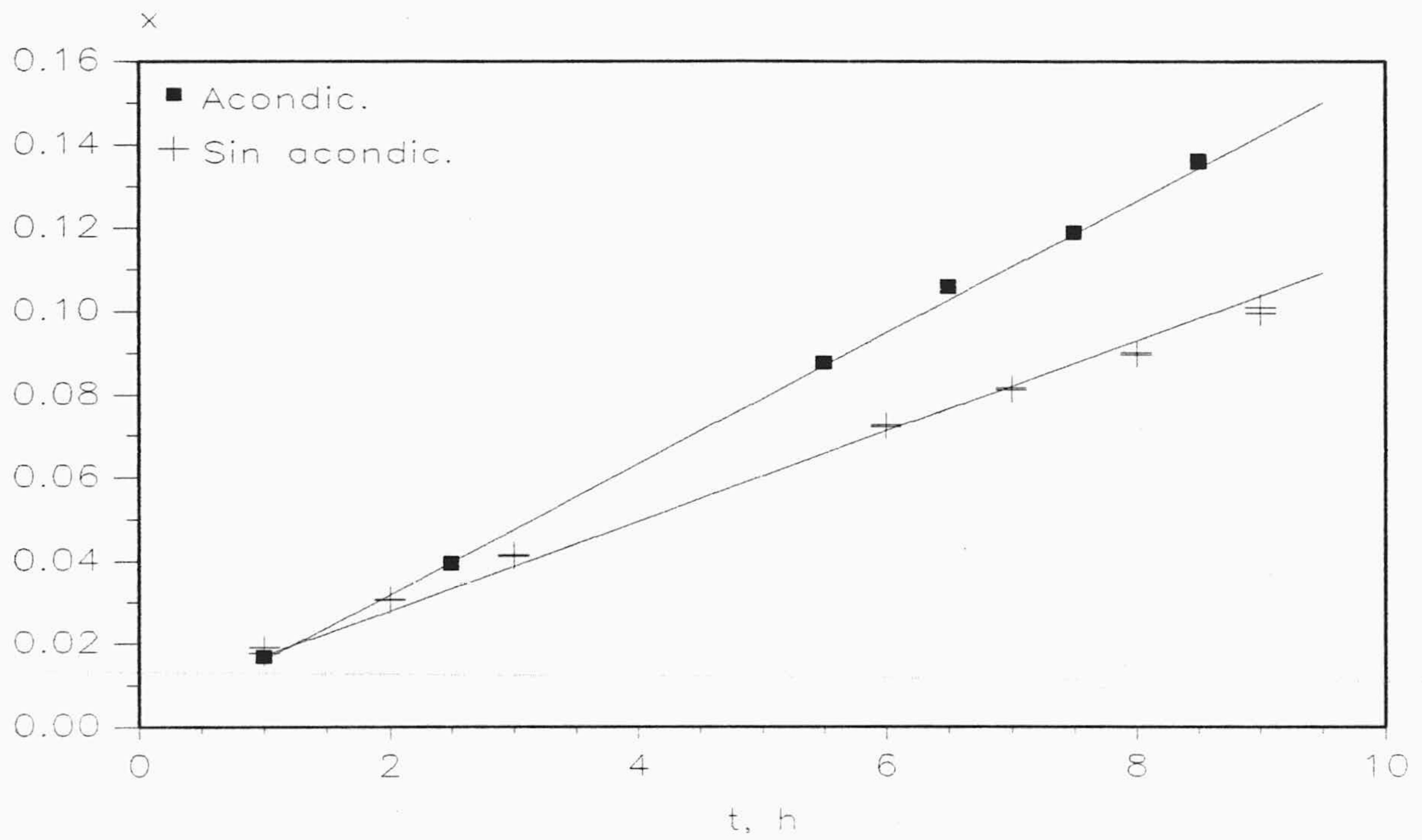


Figura 5.33. Influencia del acondicionamiento de la enzima con ión cobalto. $e_0 = 4 \text{ g/L}$. $[F_0] = 0.1 \text{ M}$. d_p entre 0-42 y 0.59 mm.

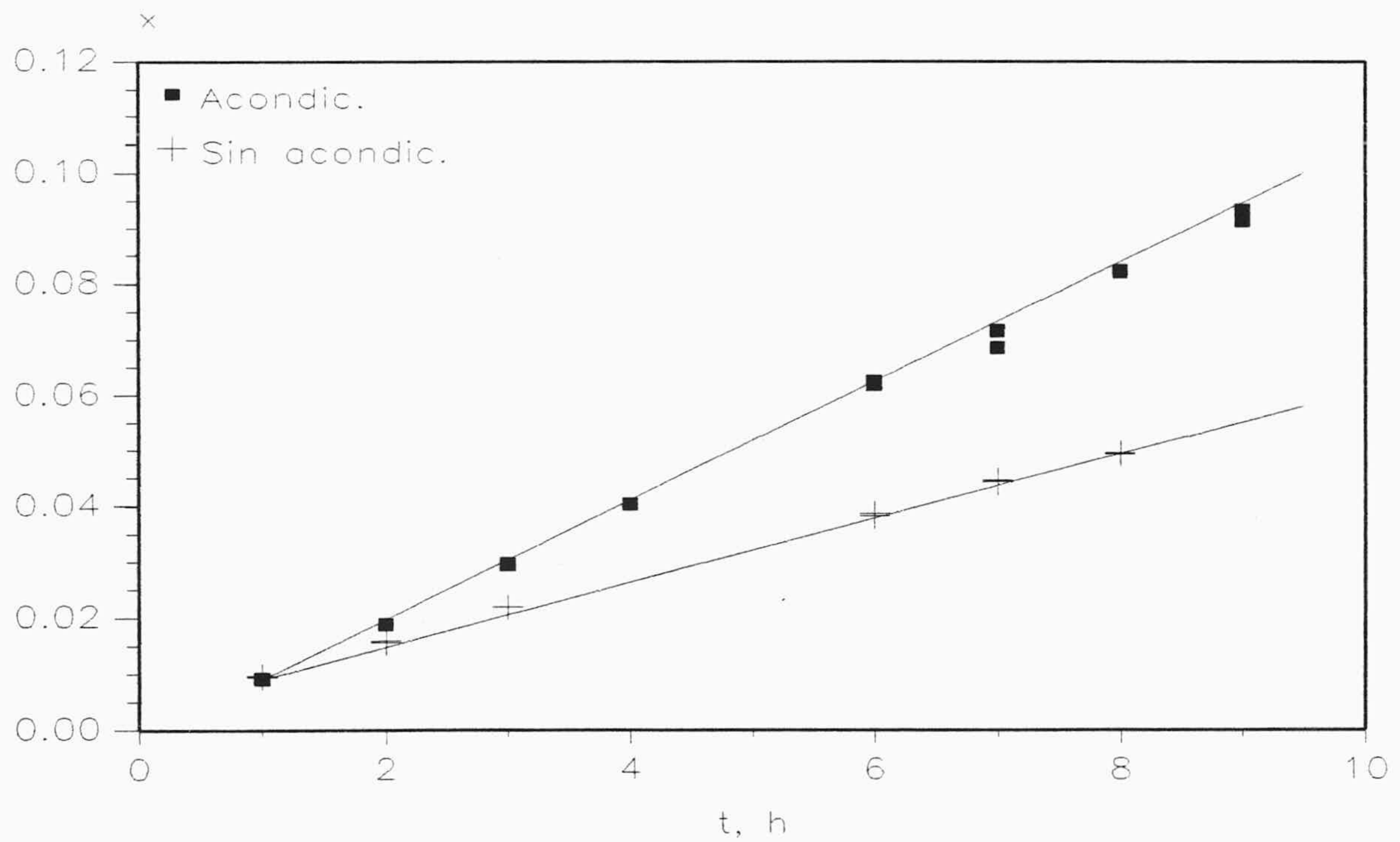


Figura 5.34. Influencia del acondicionamiento de la enzima con ión cobalto. $e_0 = 2 \text{ g/L}$. $[F_0] = 0.1 \text{ M}$. d_p entre 0.297 y 0.42 mm.

5.3.3 Influencia del transporte interno

En la Figura 5.35 se muestran los experimentos realizados utilizando enzima acondicionada a una concentración de 2 g/L, $T=60^{\circ}\text{C}$ y $[F_0]=0.1\text{ M}$, para distintos tamaños de las partículas de glucosa-isomerasa inmovilizada, y en la tabla 5.11 las velocidades iniciales de reacción. Como se puede observar por debajo del diámetro de partícula 0.297 mm el efecto del transporte interno parece ser despreciable no influyendo en la velocidad inicial de reacción el tamaño de partícula empleado.

TABLA 5.11

VELOCIDADES INICIALES DE REACCION.

INFLUENCIA DEL TRANSPORTE INTERNO.

 $e_i = 2\text{ g/L}$; $[F_0] = 0.1\text{ M}$; $T = 60^{\circ}\text{C}$; $V_a = 300\text{ rpm}$

d_p , mm	r_0 , h^{-1}	r^2
$0.420 < d_p < 0.590$	$8.78 \cdot 10^{-3}$	0.999
$0.297 < d_p < 0.420$	$1.04 \cdot 10^{-2}$	0.999
$0.177 < d_p < 0.297$	$1.07 \cdot 10^{-2}$	0.999
$0.125 < d_p < 0.177$	$1.06 \cdot 10^{-2}$	0.999
$0.053 < d_p < 0.088$	$1.09 \cdot 10^{-2}$	0.998
$0 < d_p < 0.297$	$9.74 \cdot 10^{-3}$	0.999

Se reunificaron los tamaños de partícula inferiores a 0.297 mm, ya que era la fracción mayoritaria y se realizó un nuevo experimento que queda recogido en la tabla 5.11. Sin embargo, la velocidad inicial de reacción obtenida es inferior a la de los experimentos realizados con d_p entre 0.053 y 0.297 mm, por lo que se excluyó la fracción de diámetro de partícula inferior a 0.053 mm que posiblemente corresponda parcialmente a restos del soporte utilizado y desprendido por efecto del tamizado, sin contenido en actividad enzimática.

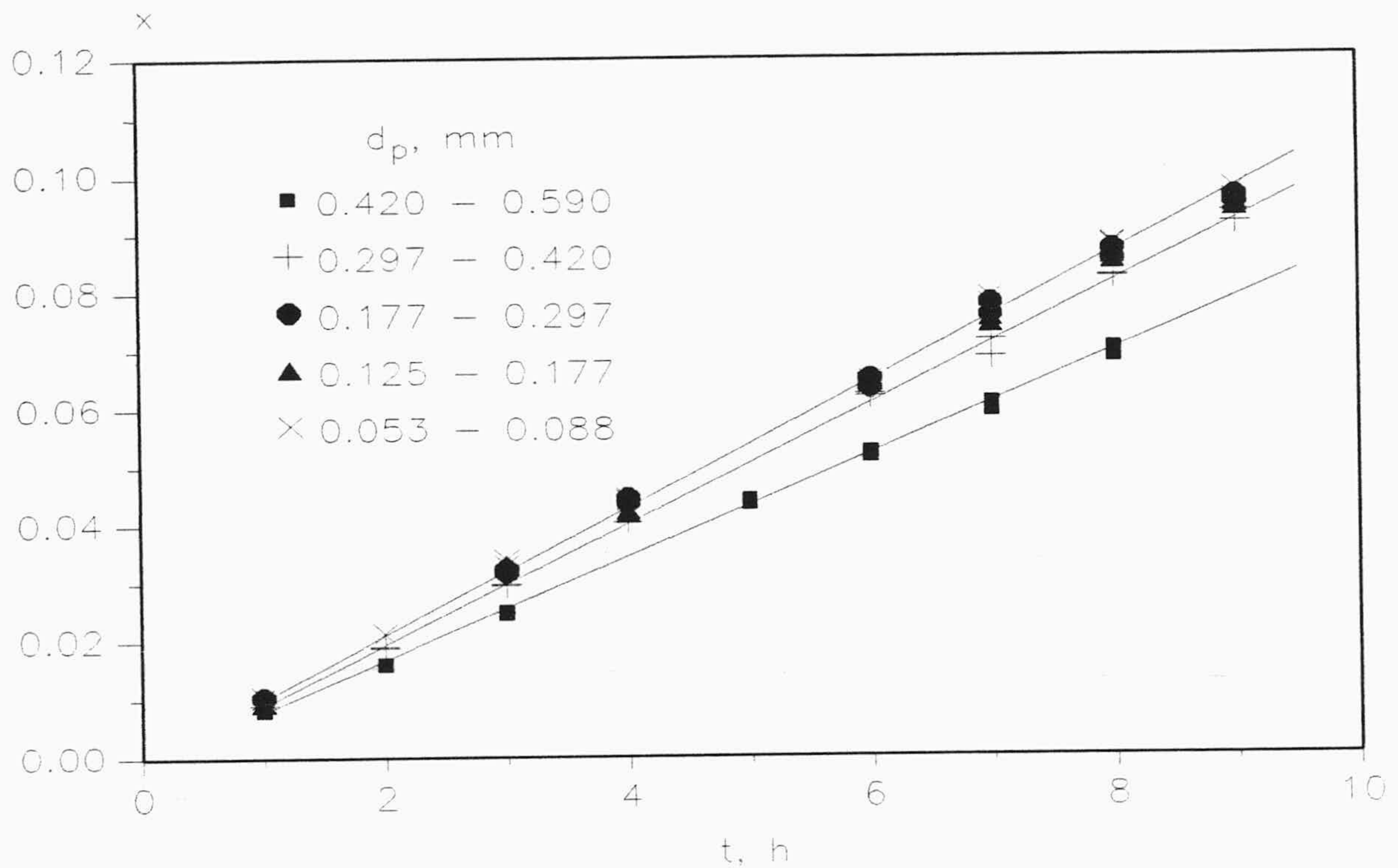


Figura 5.35. Influencia del transporte interno $e_0 = 2 \text{ g/L}$; $[F_0] = 0.1 \text{ M}$

Benaiges y col. (1986) utilizando la misma enzima consideran que existe transporte interno cuando utilizan fracciones de enzima comprendida entre $0.147 < d_p < 0.177$.

En consecuencia los experimentos cinéticos siguientes se realizarán con tamaño de partícula comprendido entre 0.053 y 0.297 mm a 300 rpm y con la enzima acondicionada con ión cobalto.

5.3.4 Experimentos cinéticos con enzima acondicionada.

En las Figuras 5.36 a 5.39 se representan los valores de conversión en función del tiempo de reacción para los experimentos cinéticos realizados a 300 rpm y con la fracción de glucosa-isomerasa comprendida entre $0.053 < d_p < 0.297$, por tanto libre de los efectos de transferencia de materia externa e interna. Como puede observarse para cada concentración inicial de fructosa (0.1; 0.5;

1.0 y 2.0 M), se varió la concentración de enzima (2; 4; 6 y 12 g/L). Como era de esperar la conversión alcanzada aumenta para una misma concentración de fructosa con el tiempo de isomerización y con la concentración enzimática empleada.

En la Figura 5.40 se ha representado a título de ejemplo para una concentración enzimática de 2 g/L la variación de la conversión con la concentración inicial de fructosa, observándose que disminuye para un mismo tiempo de reacción con la concentración total de hexosas empleada.

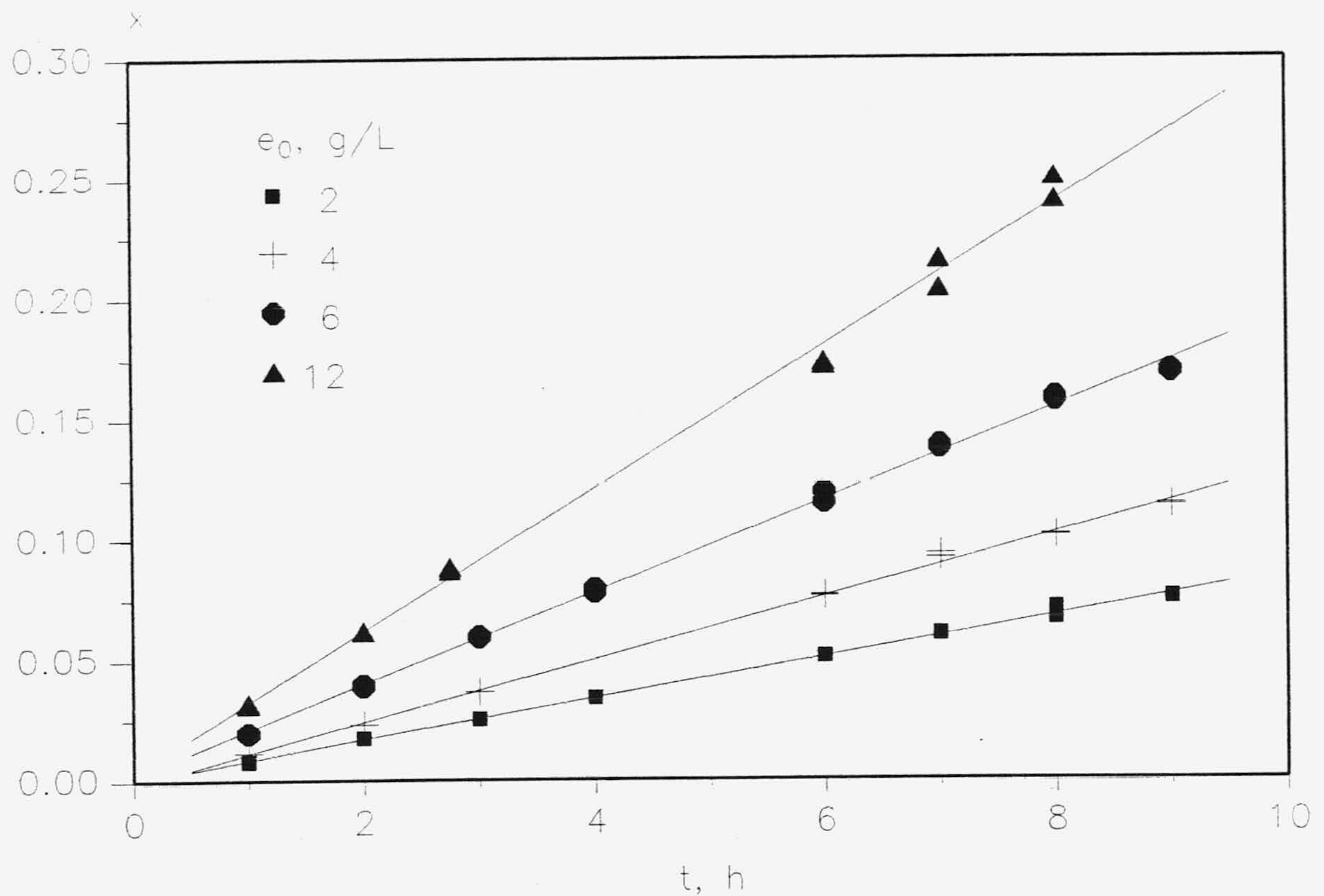


Figura 5.36. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1 M$

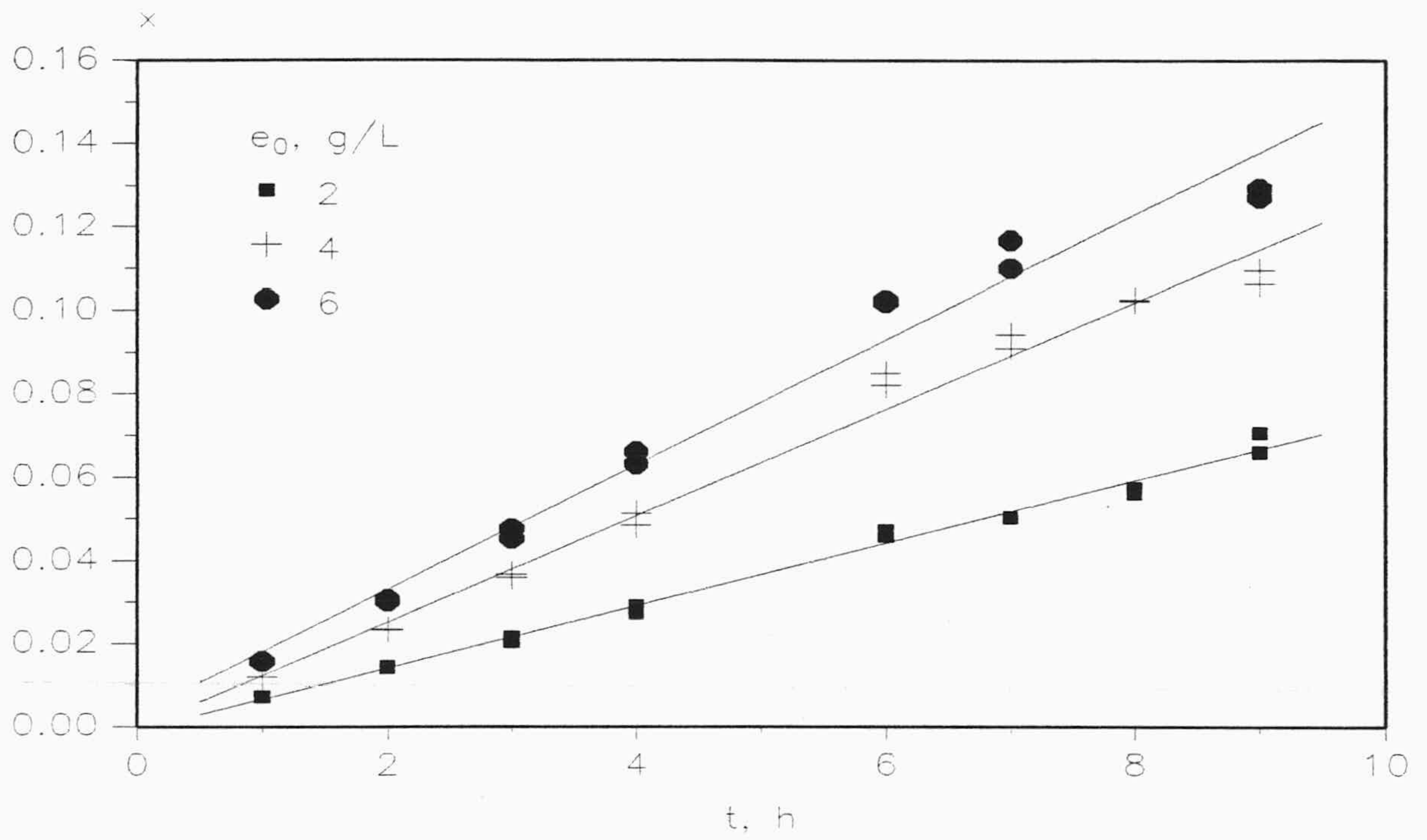


Figura 5.37. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.5 \text{ M}$

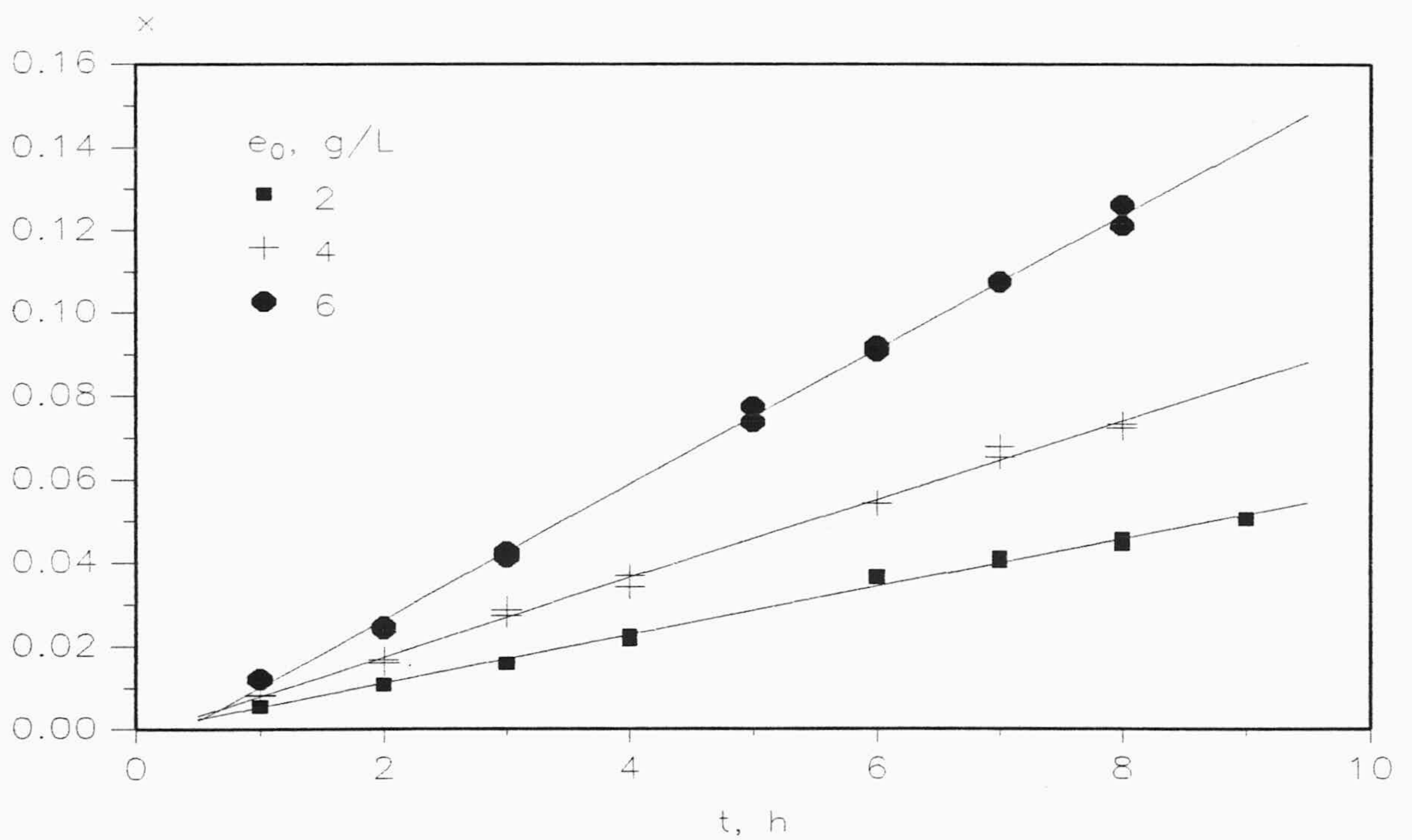


Figura 5.38. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima acondicionada. $s_0 = 1.0 \text{ M}$

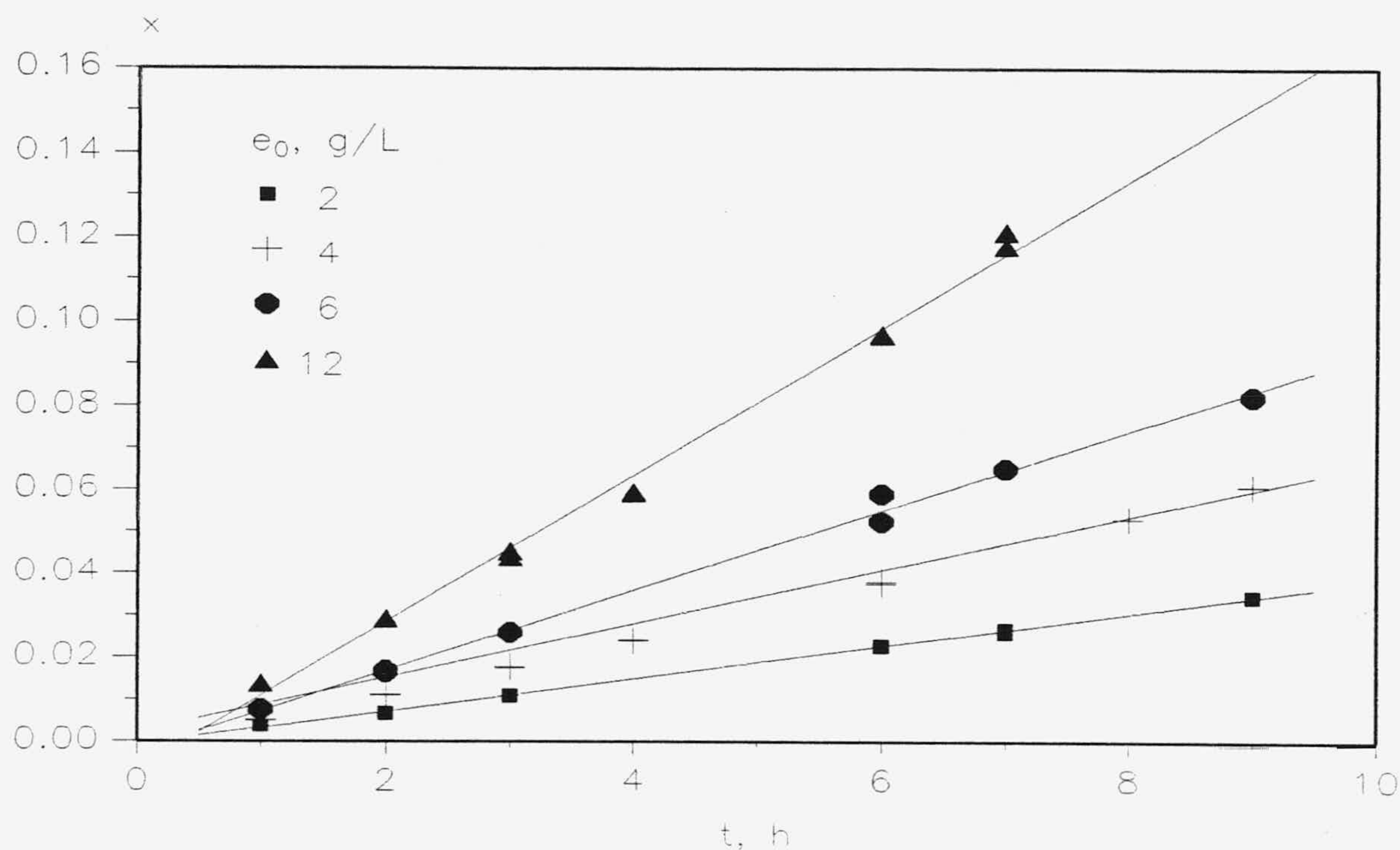


Figura 5.39. Variación de la conversión con el tiempo de isomerización. Enzima acondicionada. $s_0 = 2.0$ M

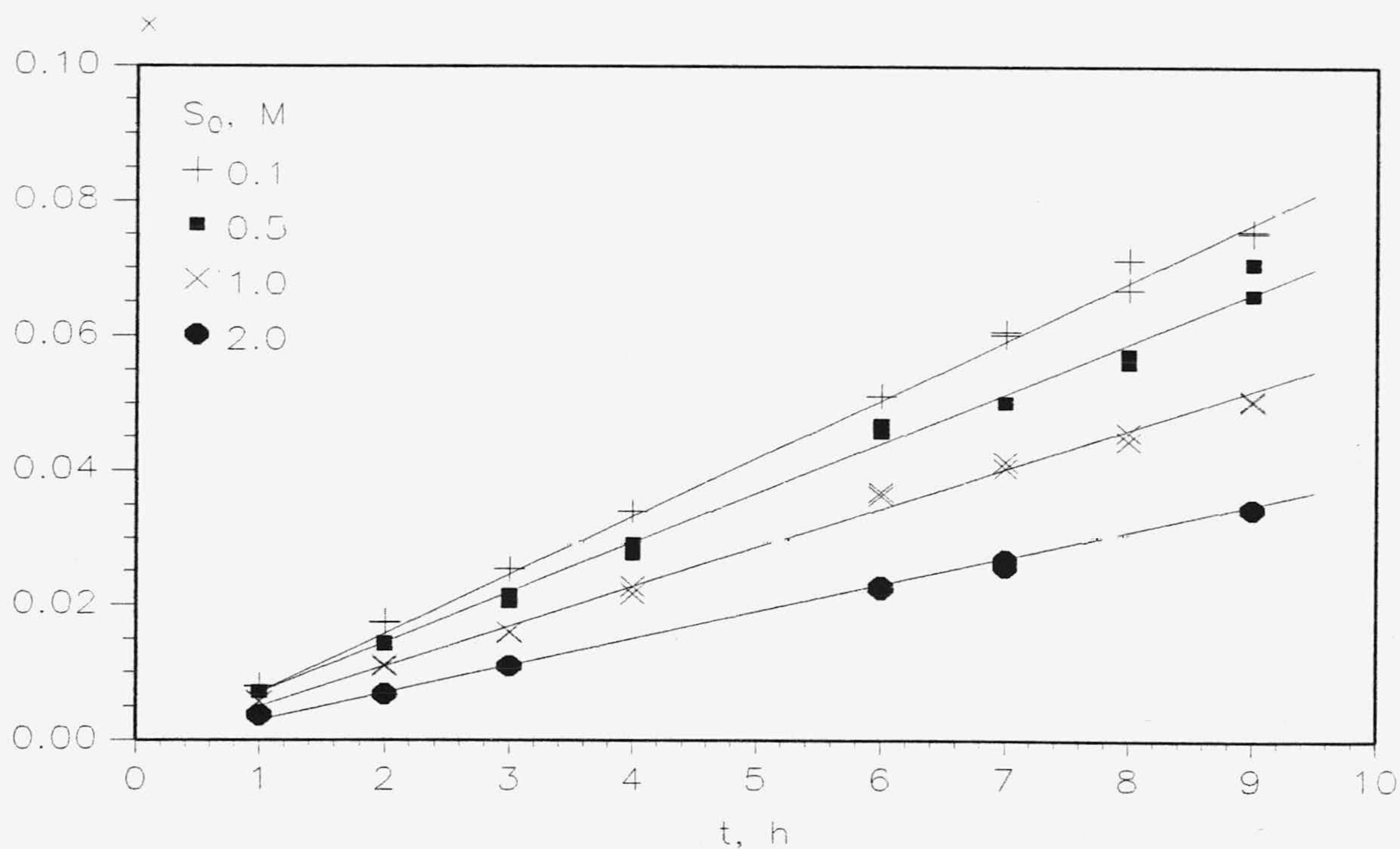


Figura 5.40. Influencia de la concentración de sustrato. $e_0 = 2$ g/L

5.4 MODELO CINETICO

Teniendo en cuenta el mecanismo establecido en la bibliografía para la isomerización Fructosa-Glucosa que se ha descrito en la parte 2 de esta Memoria, ecuaciones [2.1] a [2.11] despreciando la concentración del intermedio frente a la de productos estables e introduciendo la conversión, ecuaciones [5.2] y [5.4], la ecuación de velocidad de reacción Fructosa-Glucosa, ecuación [2.7], quedará

$$r_{FG} = \frac{V_{mf} s_0 (1 + K_e)(x_e - x)/K_{mf}}{(1 + s_0/K_{mf}) + [(s_0/K_{mg}) - (s_0/K_{mf})] x} \frac{\text{mol}}{\text{g}_{enzima} \text{ h}} \quad [5.29]$$

Se observa que aunque las constantes de Michaelis sean pequeñas con respecto a s_0 , concentración total de hexosas, si ambas son iguales o muy parecidas la cinética se ajustará a una reacción reversible de pseudoprimer orden.

Los valores de las constantes K_{mf} y K_{mg} encontrados en bibliografía se muestran en la tabla 5.12, como puede observarse K_{mf} y K_{mg} son siempre muy próximos y no se diferencian prácticamente, con las condiciones de operación en que han sido determinadas, T y pH, ni con el complejo enzimático utilizado, siendo unas veces mayor K_{mf} y otras K_{mg} sin relación con las variables indicadas.

En la Figura 5.41 se han representado los valores mostrados en la tabla 5.12, observándose bastantes resultados experimentales de K_{mf} y K_{mg} correspondientes a valores iguales o próximos de ambas constantes.

También es de destacar que en general siempre que se ha aplicado el método integral a experimentos de isomerización prolongados se encuentra que la reacción se ajusta a una cinética de pseudoprimer orden Havewala y Pitcher (1974), Tsuma e Ishikawa (1967), Straastma et al. (1983), Vos et al. (1990) y Jurado et al. (1994).

Este resultado indicaría que la afinidad de la enzima por ambas hexosas es prácticamente equivalente.

TABLA 5.12

VALORES DE K_{mf} Y K_{mg}

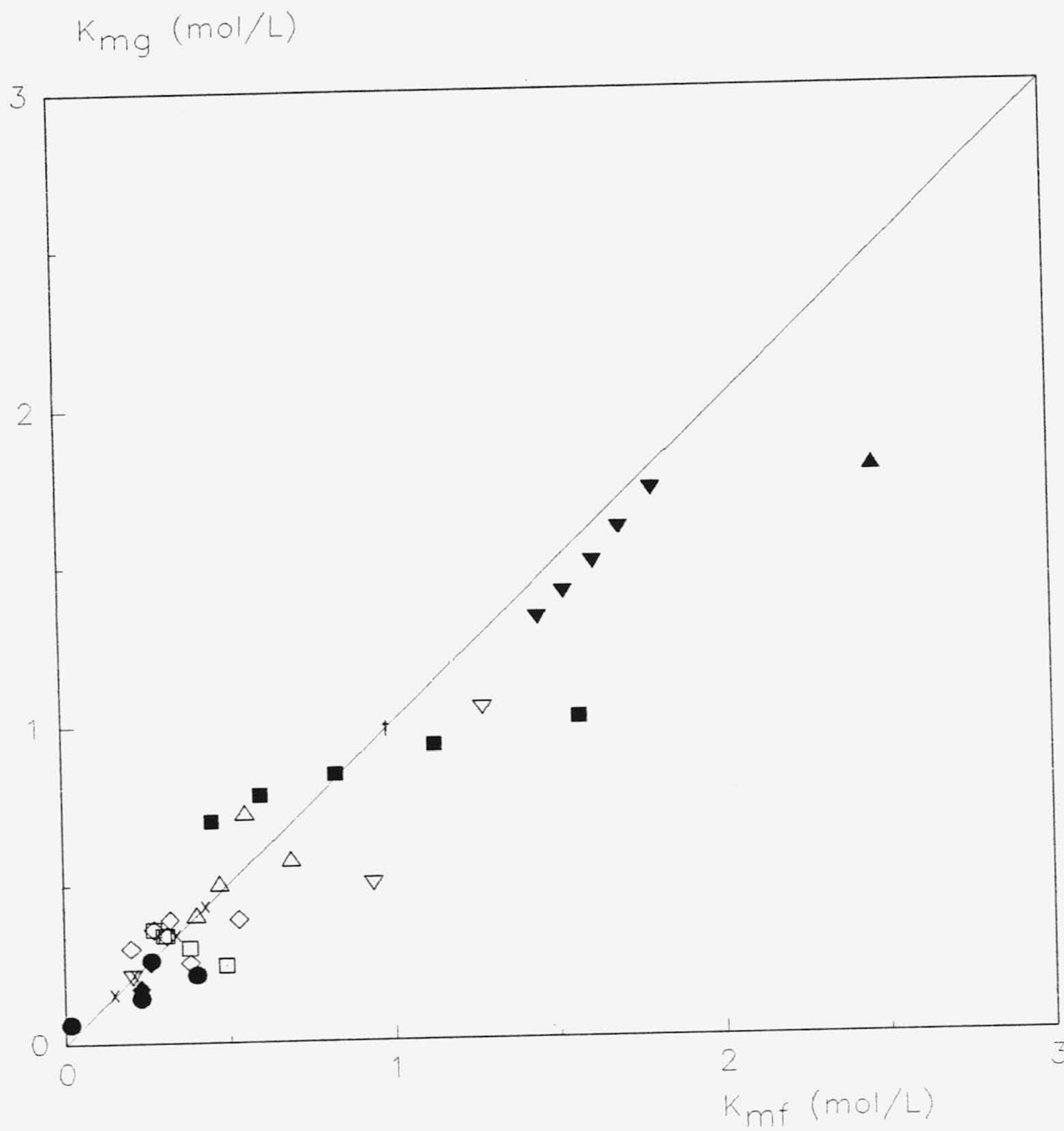
T, °C	pH	K_{mf}, M	K_{mg}, M	Tipo de sistema*	Referencia
25		0.016	0.062	1	Takasaki <i>et al.</i> (1969)
60		0.23	0.14		
70		0.94	0.50	3	Standard Brands Inc.
60		0.40	0.40	1	Krasnobajew y Böniger (1975)
70		0.25	0.38	4	Saini y Vieth (1975)
65		0.25	0.26	1	Lloyd y Khaleeluddin (1976)
65		0.17	0.23	2	
50	7.0	0.40	0.21	2	Lee <i>et al.</i> (1976)
40	7.0	0.691	0.572	3	Sproull <i>et al.</i> (1976)
60		0.472	0.498		
80		0.553	0.722		
70		0.24	0.49	3	Ryu <i>et al.</i> (1977)
70	7.5	2.47	1.79	2	Chen y Weng (1983)
60	8.3	1.80	1.73	2	Chen <i>et al.</i> (1983)
65		1.70	1.61		
70		1.62	1.50		
75		1.53	1.41		
80		1.45	1.33		
50	8.2	0.20	0.30	2	Kikkert <i>et al.</i> (1981)
60	8.2	0.27	0.36		
60	7.1	0.53	0.39		
60	8.0	0.31	0.34		
65	8.2	0.32	0.39		

TABLA 5.12 (Continuación)

VALORES DE K_{mf} Y K_{mg}

T, °C	pH	K_{mf}, M	K_{mg}, M	Tipo de sistema*	Referencia
60	7.9	0.380	0.300	3	Van Keulen <i>et al.</i> (1981)
60	7.9	0.300	0.340	4	
60		0.270	0.360	2	
60		0.310	0.340	2	
50	8.0	0.262	0.259	2	Adachi <i>et al.</i> (1981)
70	7.5	2.47	1.79	2	Chen <i>et al.</i> (1980)
60	7.0	1.28	1.05	2	Ching y Ho (1984)
70	8.5	0.205	0.211	2	
60	8.2	3.643	0.466	2	Benaiges <i>et al.</i> (1986)
60	7.0	0.45	0.70	2	Chen y Wu (1987)
65		0.60	0.78		
70		0.83	0.84		
75		1.13	0.93		
80		1.57	1.01		
70	7.0	0.44	0.38	4	Vasic-Racki <i>et al.</i> (1991)
30	7.5	0.137	0.137	2	Luzón (1993)
40		0.190	0.190		
50		0.423	0.423		
60		0.313	0.313		

* 1) Glucosa isomerasa aislada, no inmovilizada; 2) glucosa isomerasa aislada, inmovilizada; 3) conjunto de células no inmovilizadas; 4) conjunto de células inmovilizadas.



- Takasaki et al. (1969)
- △ Krasnobajev y Böeniger (1975)
- ◇ Saini y Vieth (1975)
- Lee et al. (1976)
- ◆ Lloyd y Khaleeluddin (1976)
- △ Sproull et al. (1976)
- Ryu et al. (1977)
- ▼ Chen et al. (1980)
- Adachi et al. (1981)
- ◇ Kikkert et al. (1981)
- Van Keulen et al. (1981)
- ▲ Chen et al. (1983)
- ▽ Chin y Ho (1984)
- Chen y Wu (1987)
- ▽ Standard Brands Inc.
- x Luzón (1993)
- Esta investigación.

Figura 5.41. Representación de K_{mf} frente a K_{mg}

Suponiendo cinética de pseudoprimer orden la velocidad volumétrica de reacción será

$$r = e_0 r_{FG} = s_0 \frac{dx}{dt} = e_0 K_A s_0 (1 + K_e)(x_e - x) \frac{\text{mol}}{\text{L h}} \quad [5.29]$$

siendo e_0 la concentración enzimática utilizada en g/L y K_A la constante cinética de pseudoprimer orden que viene dada por

$$K_A = \frac{V_{mf}}{K_{mf} + s_0}, \frac{\text{L}}{\text{g h}} \quad [5.30]$$

Si se tiene en cuenta la definición de conversión de equilibrio, ecuación [5.6], la ecuación cinética de la isomerización será

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K_A}{x_e} e_0 (x_e - x) \quad [5.31]$$

separando variables e integrando entre un tiempo de referencia (t_R, x_R) y cualquier tiempo (t, x) quedaría

$$x_e \ln \frac{1}{x_e - x} = A' + e_0 K_A t \quad [5.32]$$

por tanto de ser ciertas las hipótesis realizadas anteriormente la representación de $x_e \ln 1/x_e - x$ en función del tiempo de isomerización, t , conduciría a líneas rectas de cuya pendiente se obtendría el valor de K_A . Cabe resaltar que bajo la hipótesis de reacción reversible de pseudoprimer orden la dependencia de $x_e \ln 1/x_e - x$ con el tiempo resulta lógicamente análoga a la correspondiente a la reacción no enzimática, ecuación [5.18].

En las Figuras 5.42 a 5.48 se efectúan las representaciones correspondientes a la ecuación [5.32] para todos los experimentos realizados, en la Figura 5.42 para la enzima sin acondicionar, en la Figura 5.43 para los experimentos realizados con distintos tamaños de partícula de enzima y en las Figuras 5.44 a 5.48 los experimentos realizados con la enzima acondicionada con ión cobalto. En la tabla 5.13 se muestran los valores de la constante K_A obtenidos.

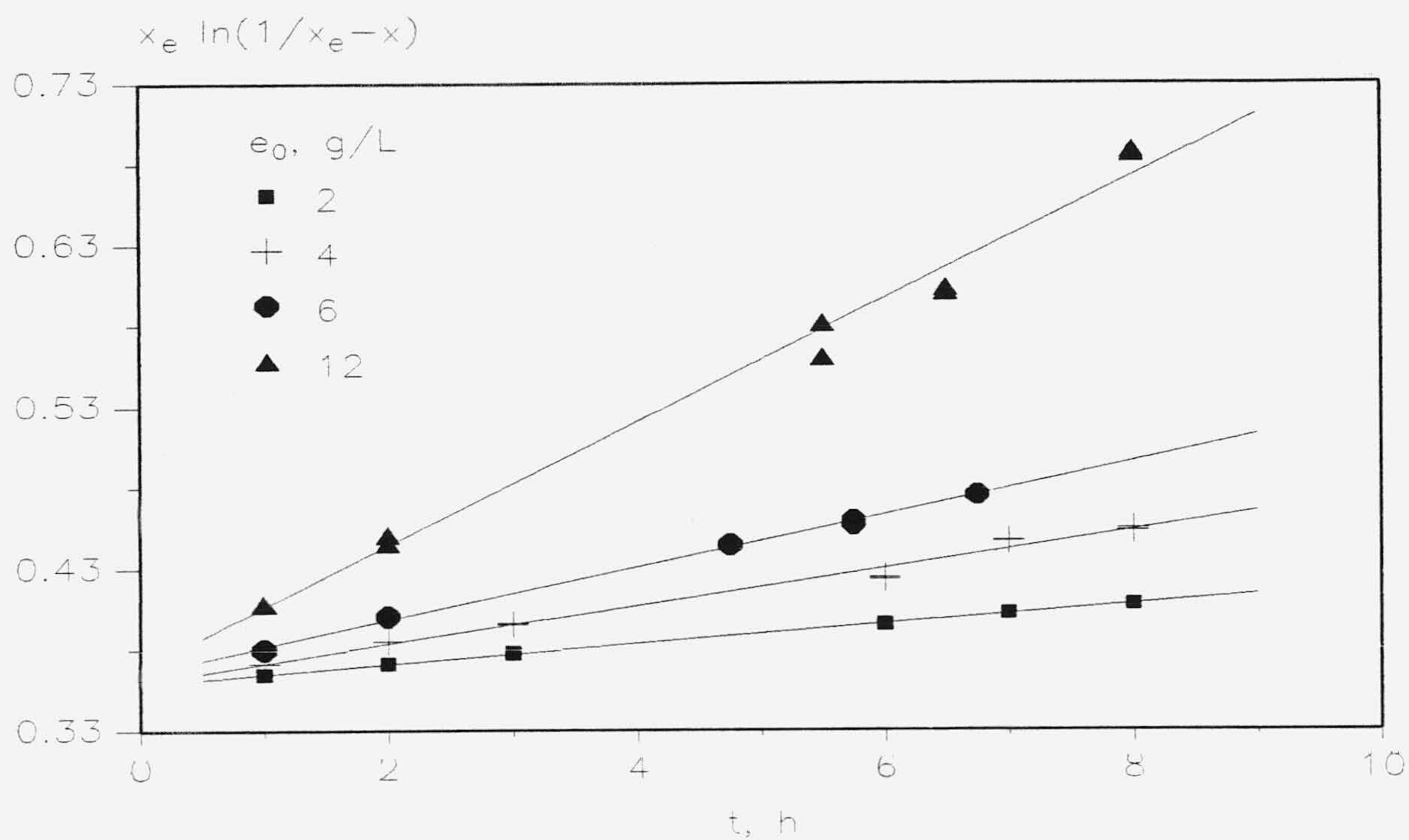


Figura 5.42. Representación ecuación [5.32]. Enzima sin acondicionar. $s_0 = 0.1$ M

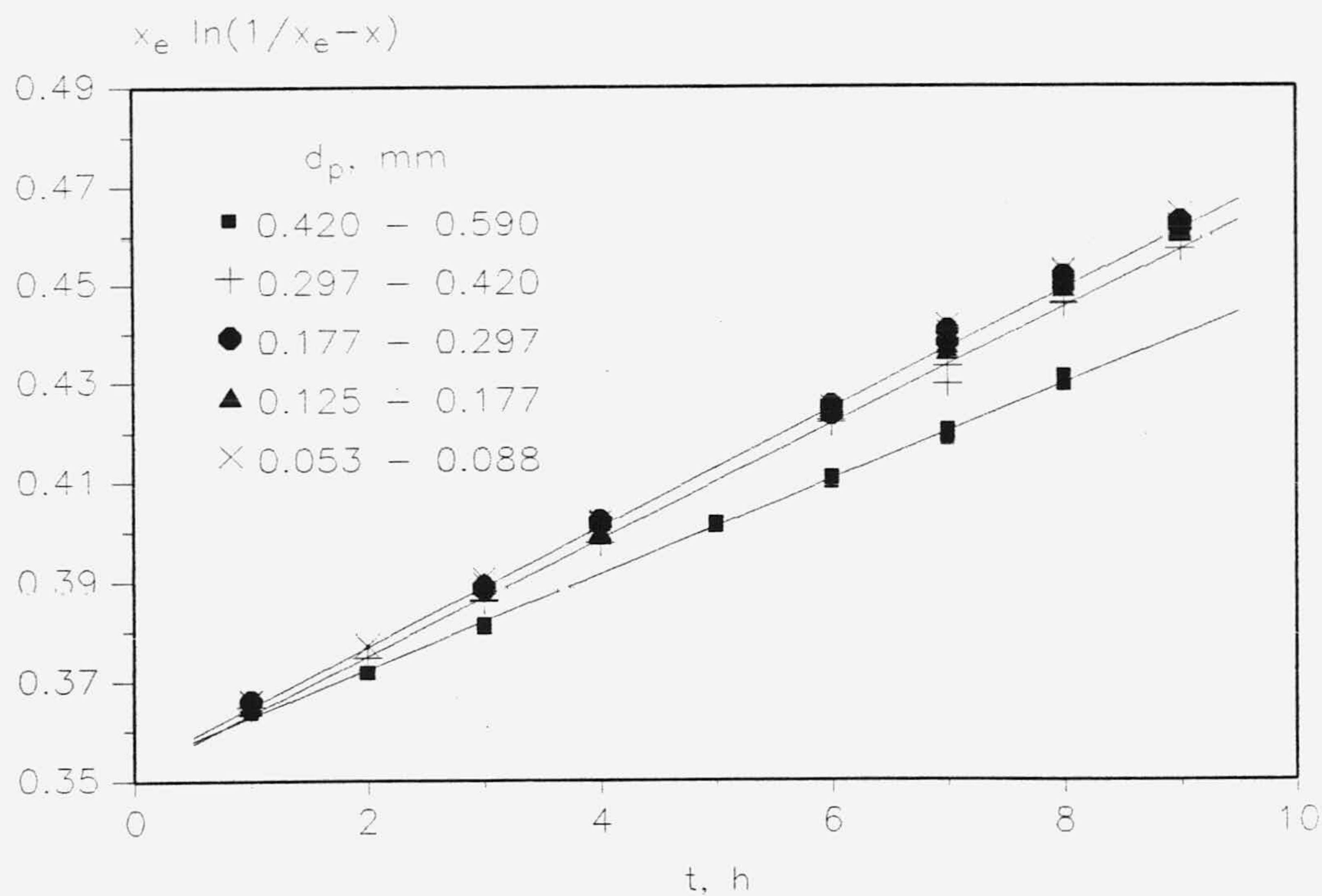


Figura 5.43. Representación ecuación [5.32]. Influencia diámetro de partícula. $s_0 = 0.1$ M. $e_0 = 2$ g/L

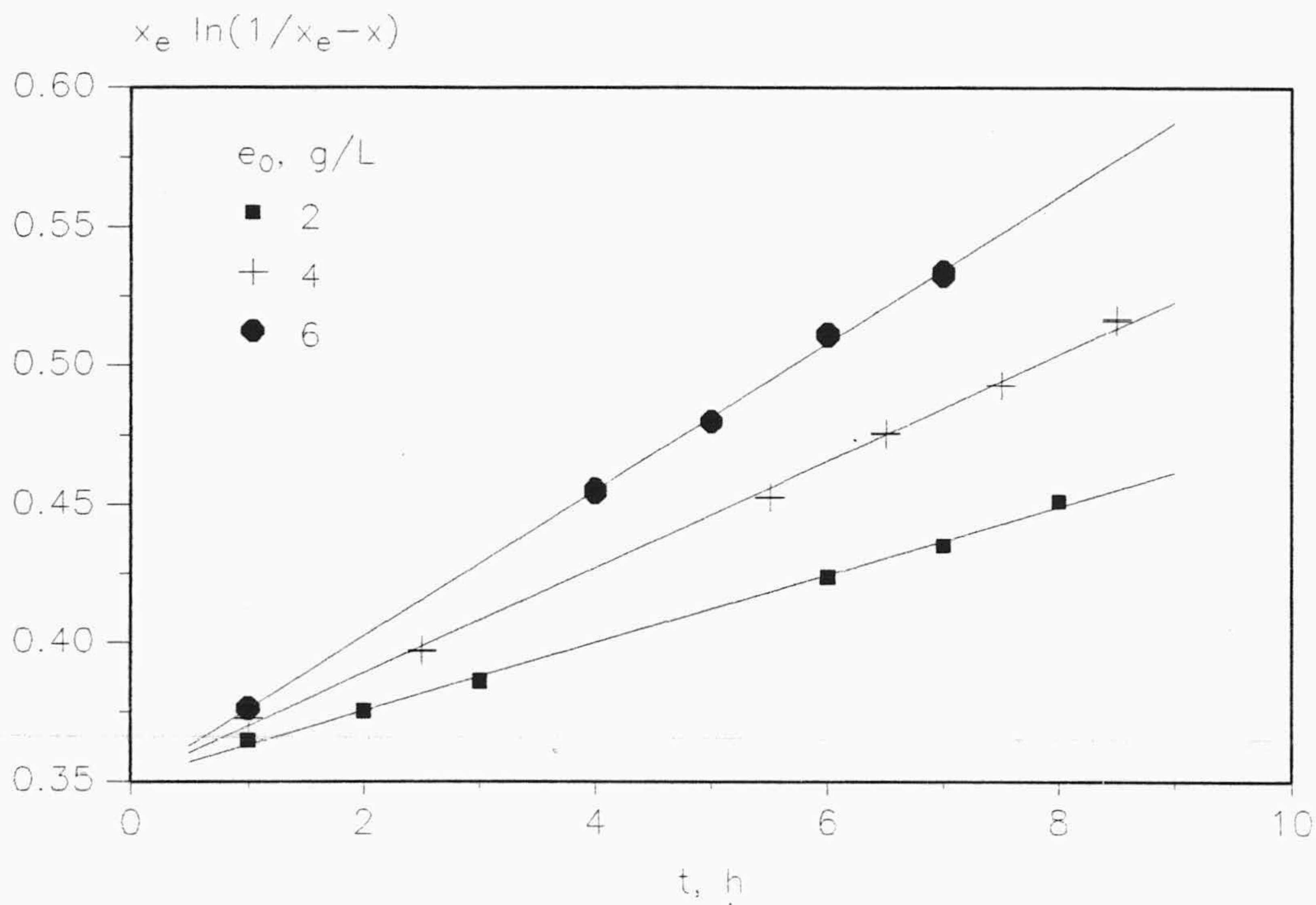


Figura 5.44. Representación ecuación [5.32]. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1$ M. d_p entre 0.42 y 0.59 mm.

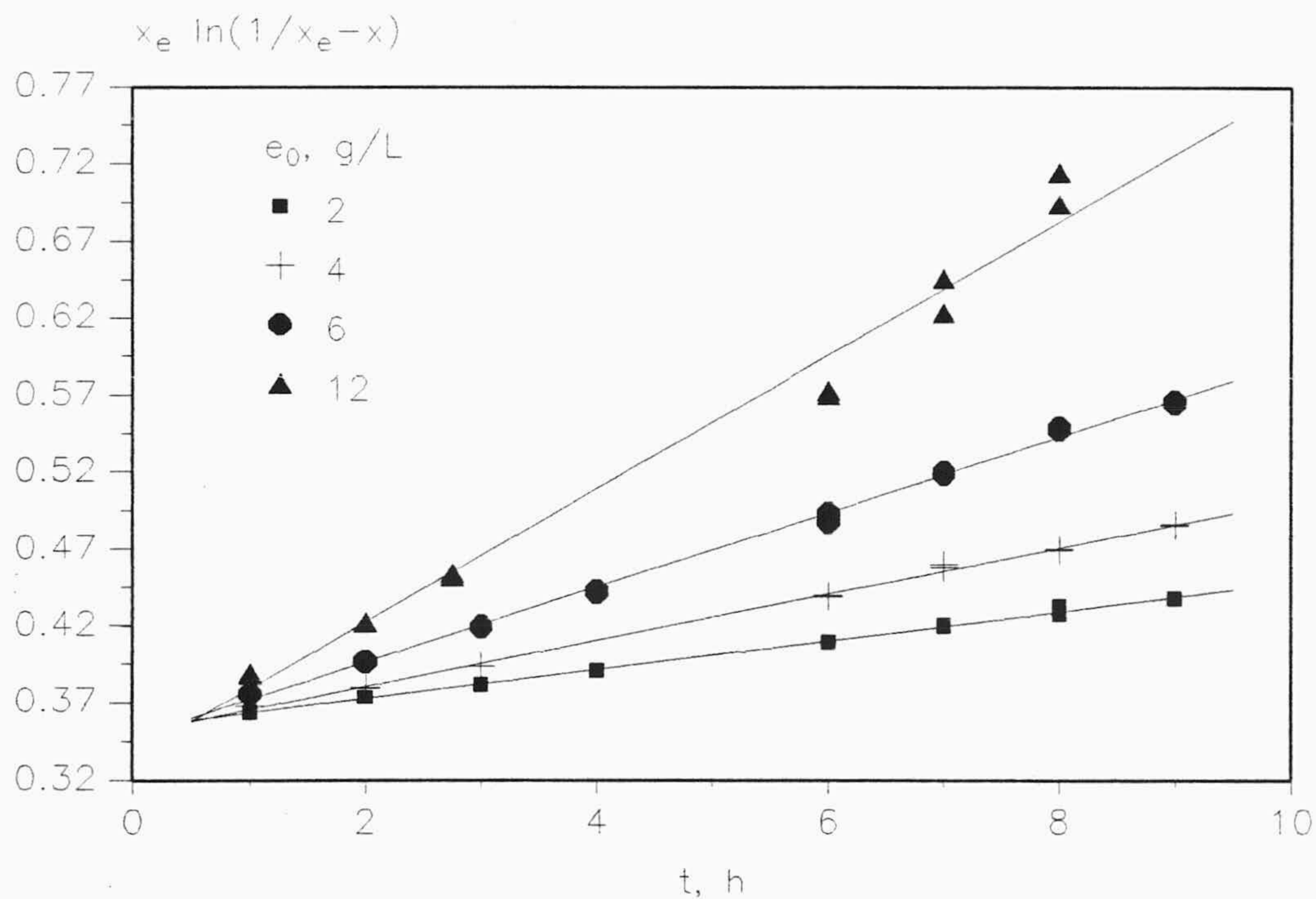


Figura 5.45. Representación ecuación [5.32]. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1$ M. d_p entre 0.053 y 0.297 mm.

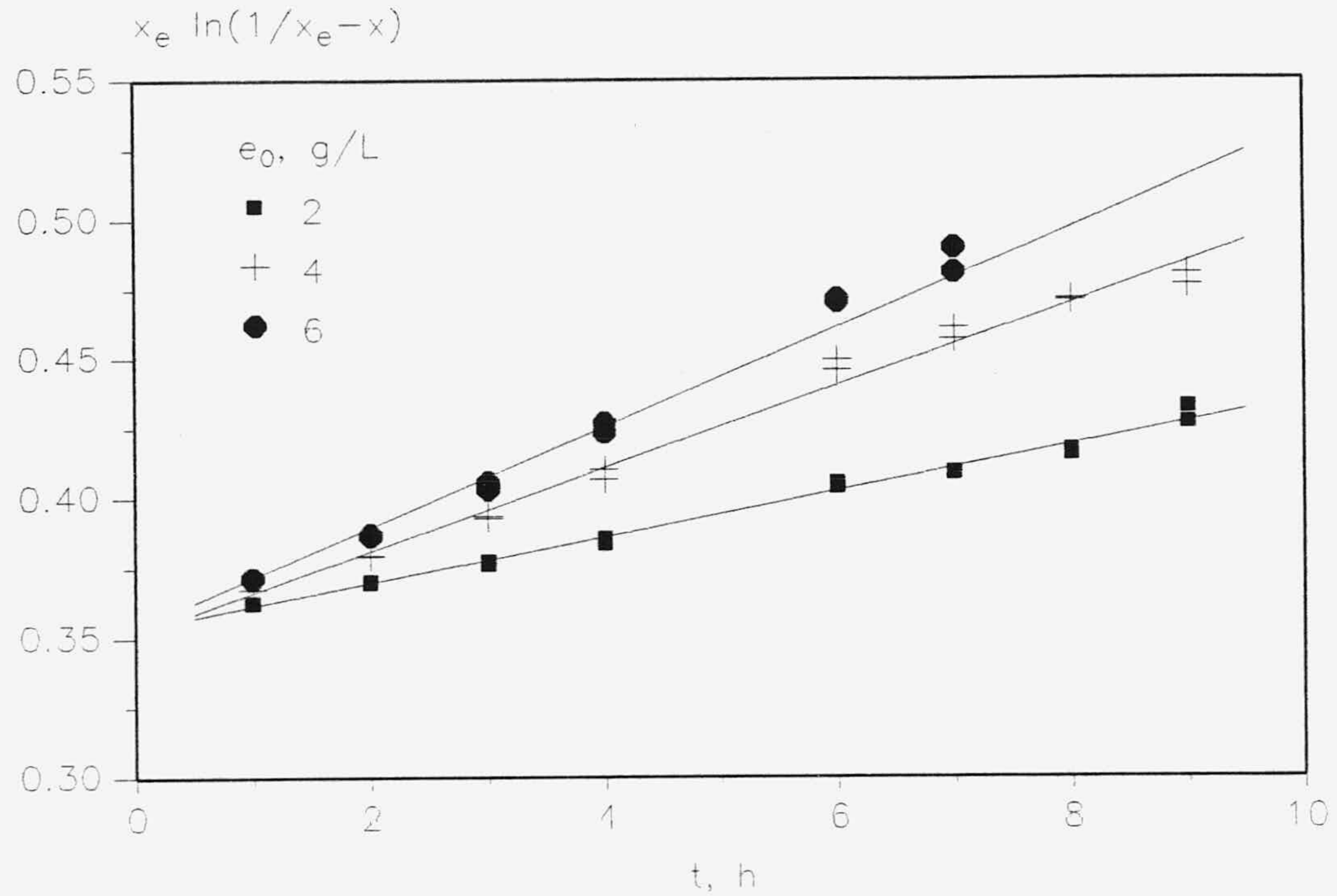


Figura 5.46. Representación ecuación [5.32]. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.5$ M. d_p entre 0.053 y 0.297 mm.

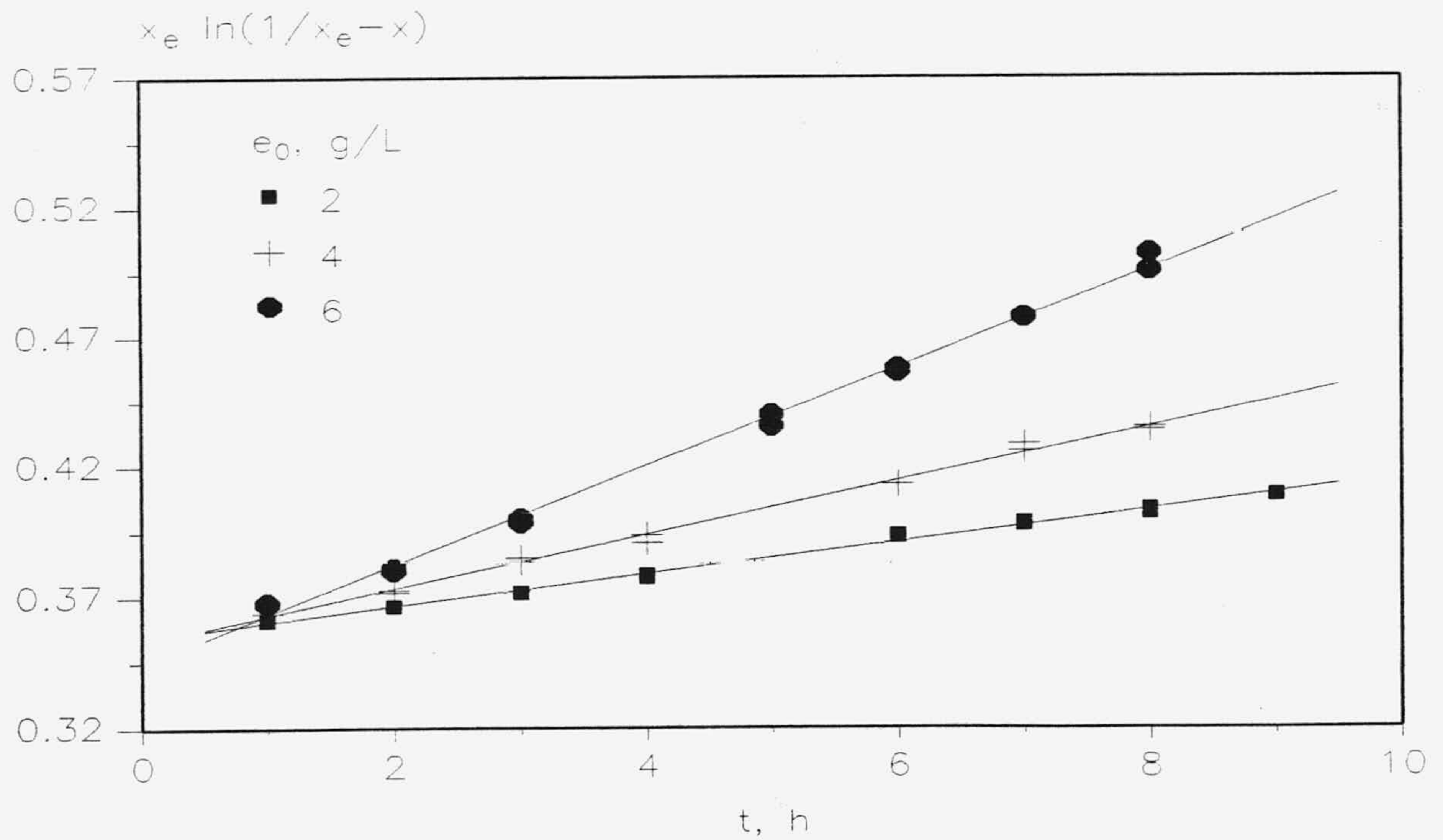


Figura 5.47. Representación ecuación [5.32]. Enzima acondicionada. $s_0 = 1.0$ M. d_p entre 0.053 y 0.297 mm.

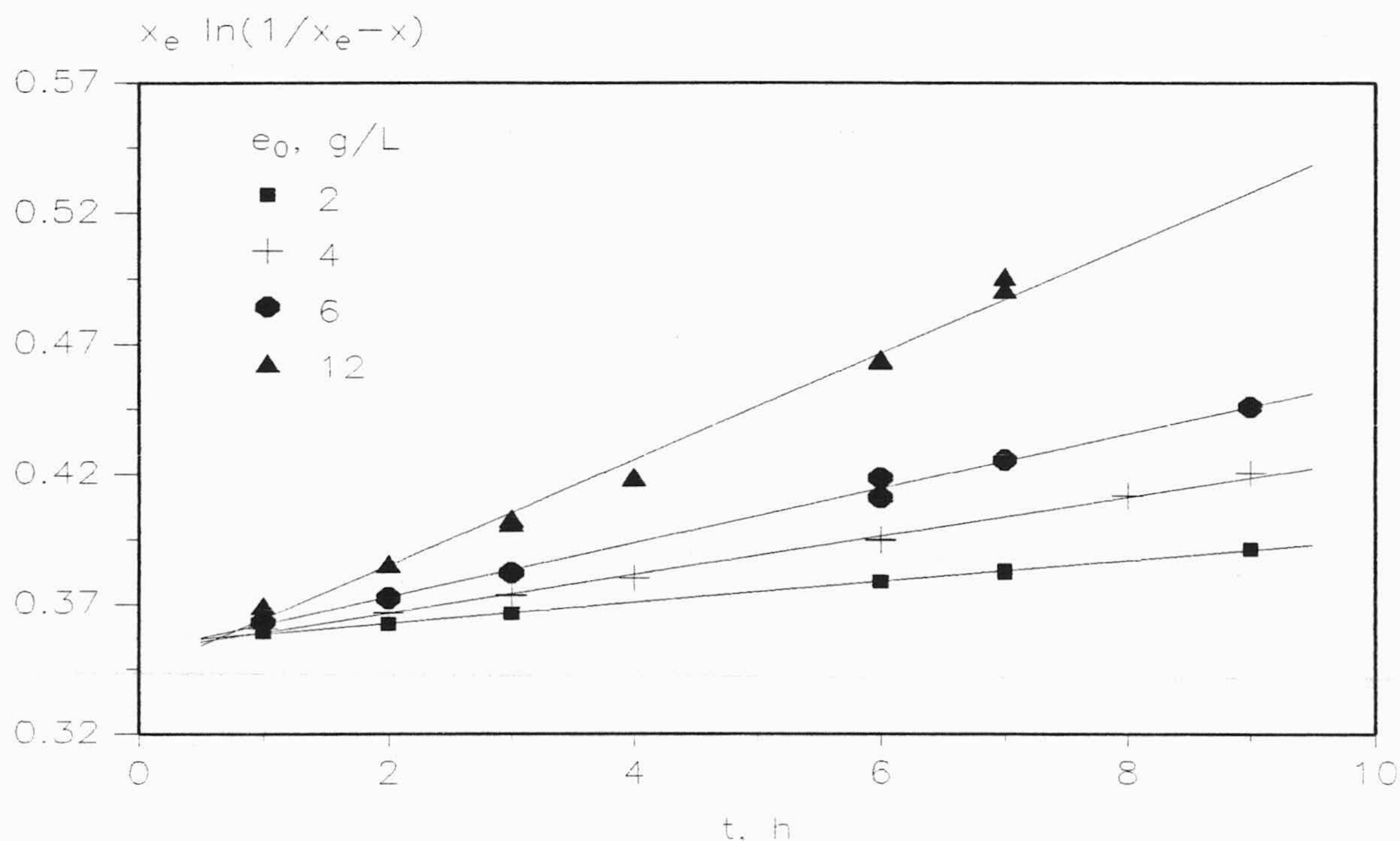


Figura 5.48. Representación ecuación [5.32]. Enzima acondicionada. $s_0 = 2.0$ M. d_p entre 0.053 y 0.297 mm.

La ecuación [5.31] indica que la pendiente de la representación x frente a t debe variar con la conversión, x , alcanzada en la isomerización, sin embargo las Figuras 5.36 a 5.39 indican que dicha pendiente permanece practicamente constante dentro del intervalo de conversión alcanzado. Si se calcula la constante K'_A tomando una fuerza impulsora media " $x_e - \bar{x}$ " a partir de la expresión

$$K'_A = \frac{dx}{dt} \frac{x_e}{e_0 (x_e - \bar{x})} \quad [5.33]$$

donde \bar{x} es la conversión media alcanzada en los experimentos de isomerización y se compara con la obtenida a partir de la ecuación [5.32] puede observarse, tabla 5.13, que son prácticamente coincidentes. Este hecho indica que en todos los experimentos realizados puede considerarse desde el punto de vista cinético un valor medio de la conversión durante el tiempo de reacción empleado.

TABLA 5.13
CONSTANTE CINETICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN

ei, g/L	Acondic.	d_p , mm	s_0 , M	K_A , L/g.h	K'_A , L/g.h
2	No	$0.297 < d_p < 0.420$	0.1	$3.03 \cdot 10^{-3}$	$3.03 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$2.90 \cdot 10^{-3}$	$2.89 \cdot 10^{-3}$
6	"	"	"	$2.70 \cdot 10^{-3}$	$2.73 \cdot 10^{-3}$
12	"	"	"	$2.93 \cdot 10^{-3}$	$2.91 \cdot 10^{-3}$
2	Si	$0.420 < d_p < 0.590$	0.1	$6.15 \cdot 10^{-3}$	$6.13 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$4.78 \cdot 10^{-3}$	$4.86 \cdot 10^{-3}$
6	"	"	"	$4.40 \cdot 10^{-3}$	$4.57 \cdot 10^{-3}$
2	Si	$0.053 < d_p < 0.297$	0.1	$4.71 \cdot 10^{-3}$	$4.70 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$3.78 \cdot 10^{-3}$	$3.79 \cdot 10^{-3}$
6	"	"	"	$4.07 \cdot 10^{-3}$	$4.04 \cdot 10^{-3}$
12	"	"	"	$3.33 \cdot 10^{-3}$	$3.18 \cdot 10^{-3}$
2	Si	$0.053 < d_p < 0.297$	0.5	$4.08 \cdot 10^{-3}$	$4.06 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$3.70 \cdot 10^{-3}$	$3.70 \cdot 10^{-3}$
6	"	"	"	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$2.95 \cdot 10^{-3}$
2	Si	$0.053 < d_p < 0.297$	1.0	$3.08 \cdot 10^{-3}$	$3.07 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$2.59 \cdot 10^{-3}$	$2.57 \cdot 10^{-3}$
2	Si	$0.053 < d_p < 0.297$	2.0	$2.01 \cdot 10^{-3}$	$2.01 \cdot 10^{-3}$
4	"	"	"	$1.86 \cdot 10^{-3}$	$1.84 \cdot 10^{-3}$
6	"	"	"	$1.74 \cdot 10^{-3}$	$1.72 \cdot 10^{-3}$
12	"	"	"	$1.57 \cdot 10^{-3}$	$1.54 \cdot 10^{-3}$

De la observación de la tabla 5.13 se deduce que K_A parece disminuir en general con la concentración de enzima utilizada hecho que indicaría una desactivación enzimática; también con el aumento del diametro de partícula utilizado disminuye pero permaneciendo constante hasta el diametro de partícula 0.297 mm; diametro de partícula por debajo del cual podría considerarse que no existe influencia de transporte interno.

La constante K_A también disminuye cuando se aumenta la concentración de sustrato tal y como se predice con la ecuación [5.30].

5.5 DESACTIVACION ENZIMATICA

Para comprobar si existe desactivación enzimática en los experimentos realizados, se ha efectuado la representación correspondiente a la ecuación [5.32] en la forma en que se indica en las Figuras 5.49 a 5.54 donde se ha eliminado el efecto de la ordenada en el origen por si los efectos iniciales influyen en los resultados obtenidos.

Como puede observarse, las representaciones no conducen a líneas comunes para todas las concentraciones enzimáticas ensayadas en experimentos de igual temperatura y concentración de sustrato, sino que la pendiente de la representación disminuye en general con la concentración de enzima, hecho que indica desactivación enzimática.

En la Figura 5.49 donde se representan los resultados obtenidos con enzima sin acondicionar se observa una ligera curvatura de los experimentos en función del tiempo, no observándose esta tendencia para los realizados con la enzima acondicionada, estos hechos ponen de manifiesto en la misma forma en que se indico en el apartado 3, tabla 3.10 y 3.11, un distinto comportamiento entre los experimentos realizados con enzima sin acondicionar donde la actividad disminuía con el tiempo de reacción y los que se efectuaban con enzima acondicionada con ión cobalto donde sólo se aprecia la desactivación al variar la concentración de enzima.

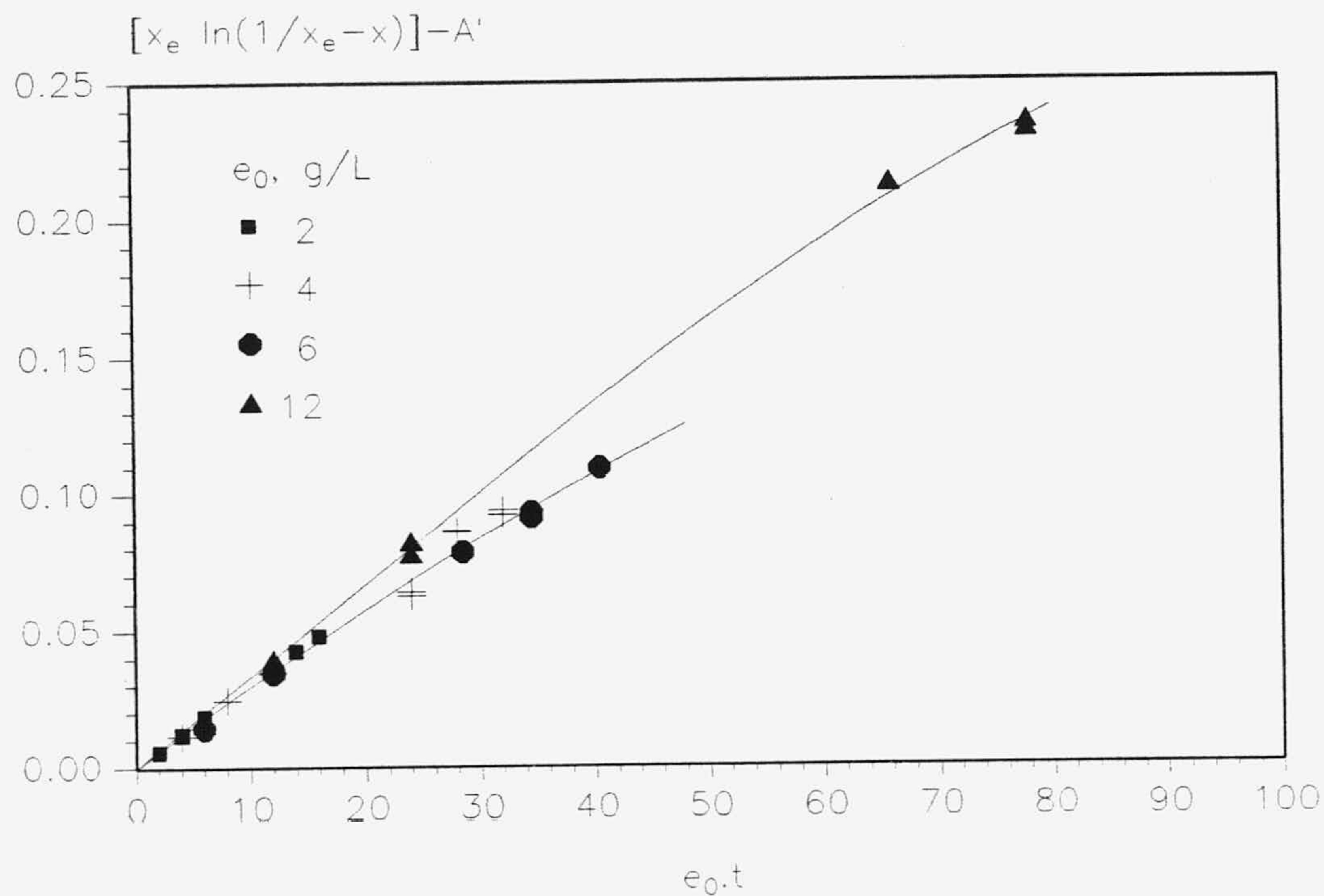


Figura 5.49. Desactivación enzimática. Enzima sin acondicionar. $s_0 = 0.1$ M. d_p entre 0.297 y 0.420 mm.

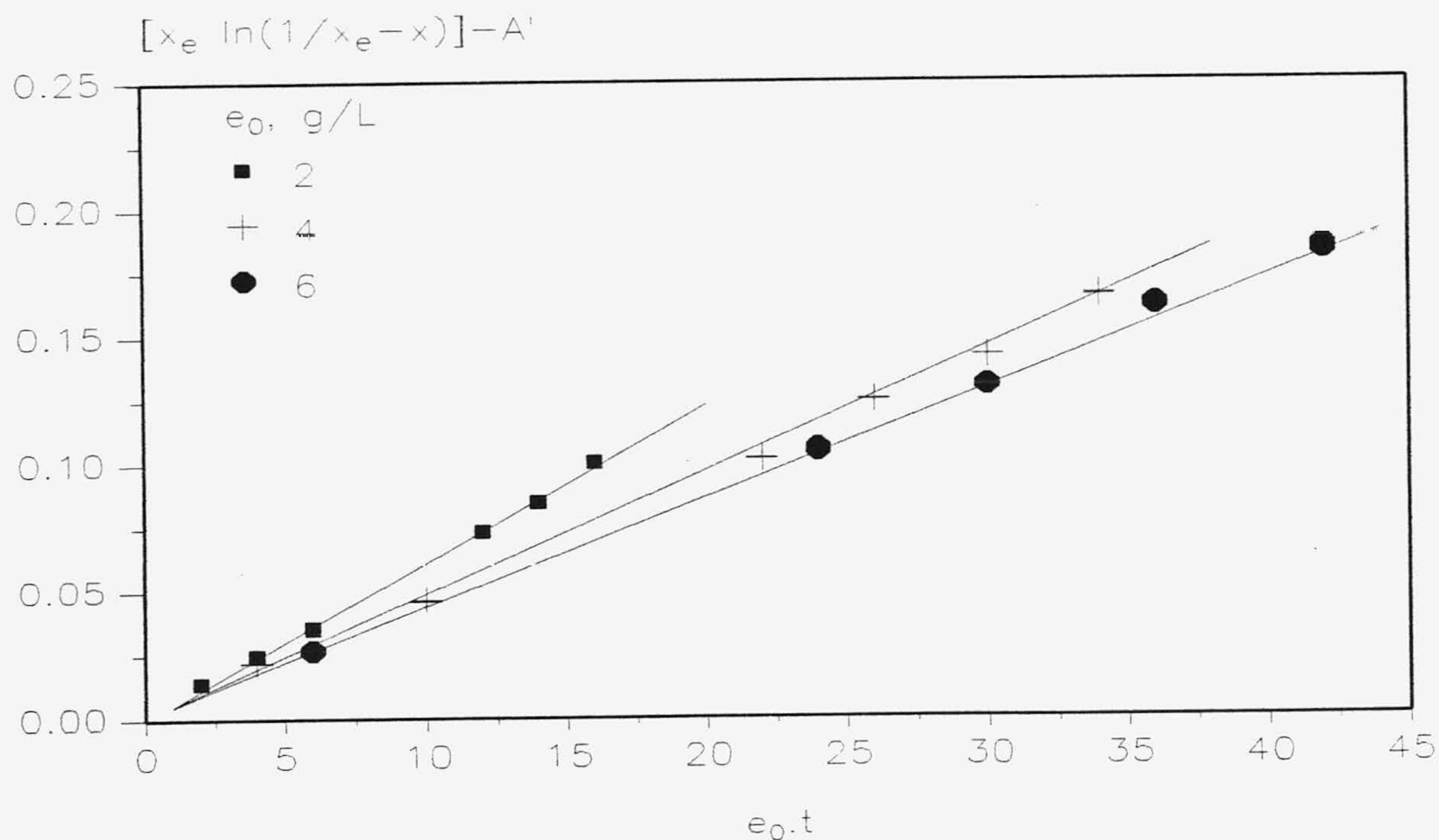


Figura 5.50. Desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1$ M. d_p entre 0.42 y 0.59 mm.

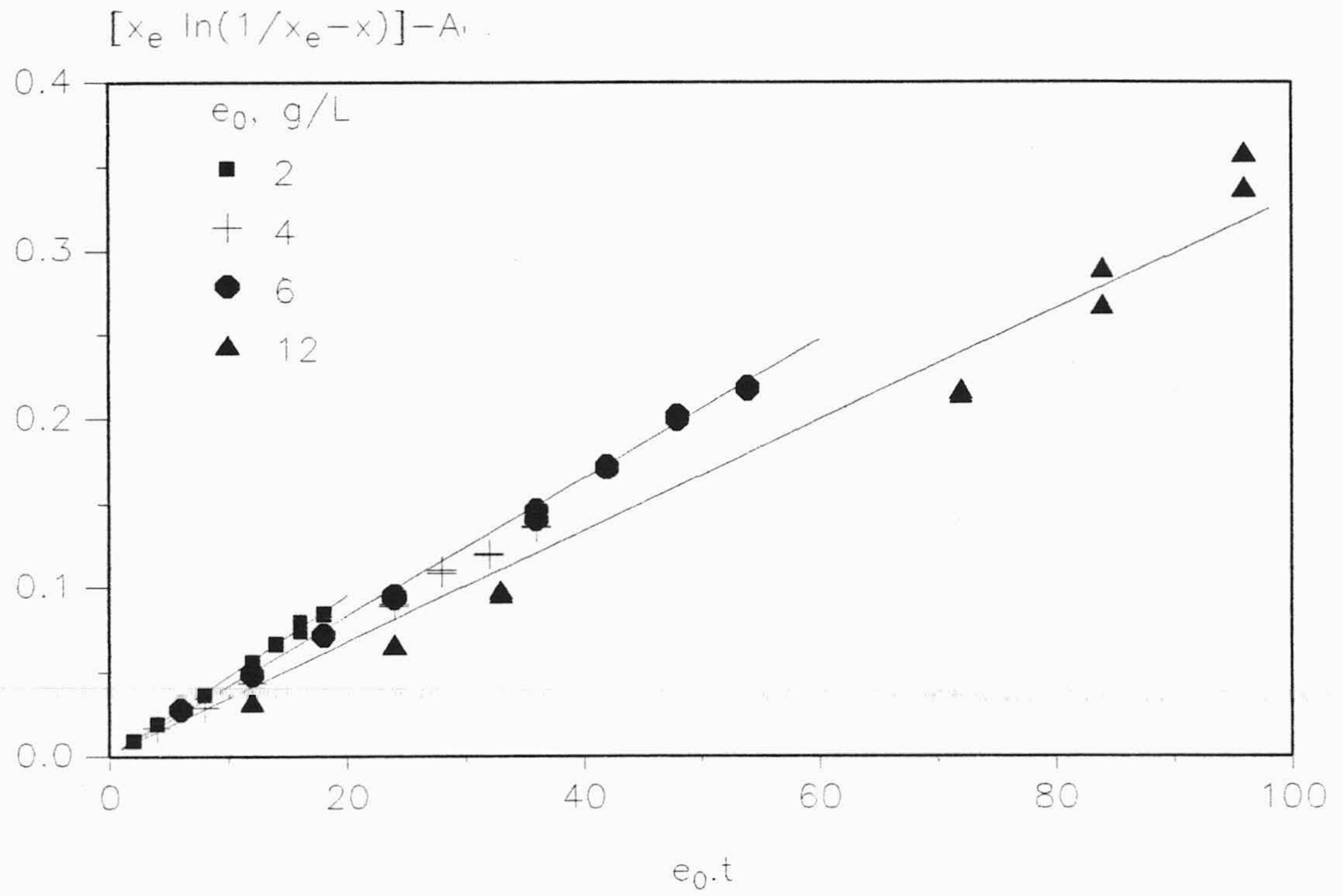


Figura 5.51. Desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1 \text{ M}$

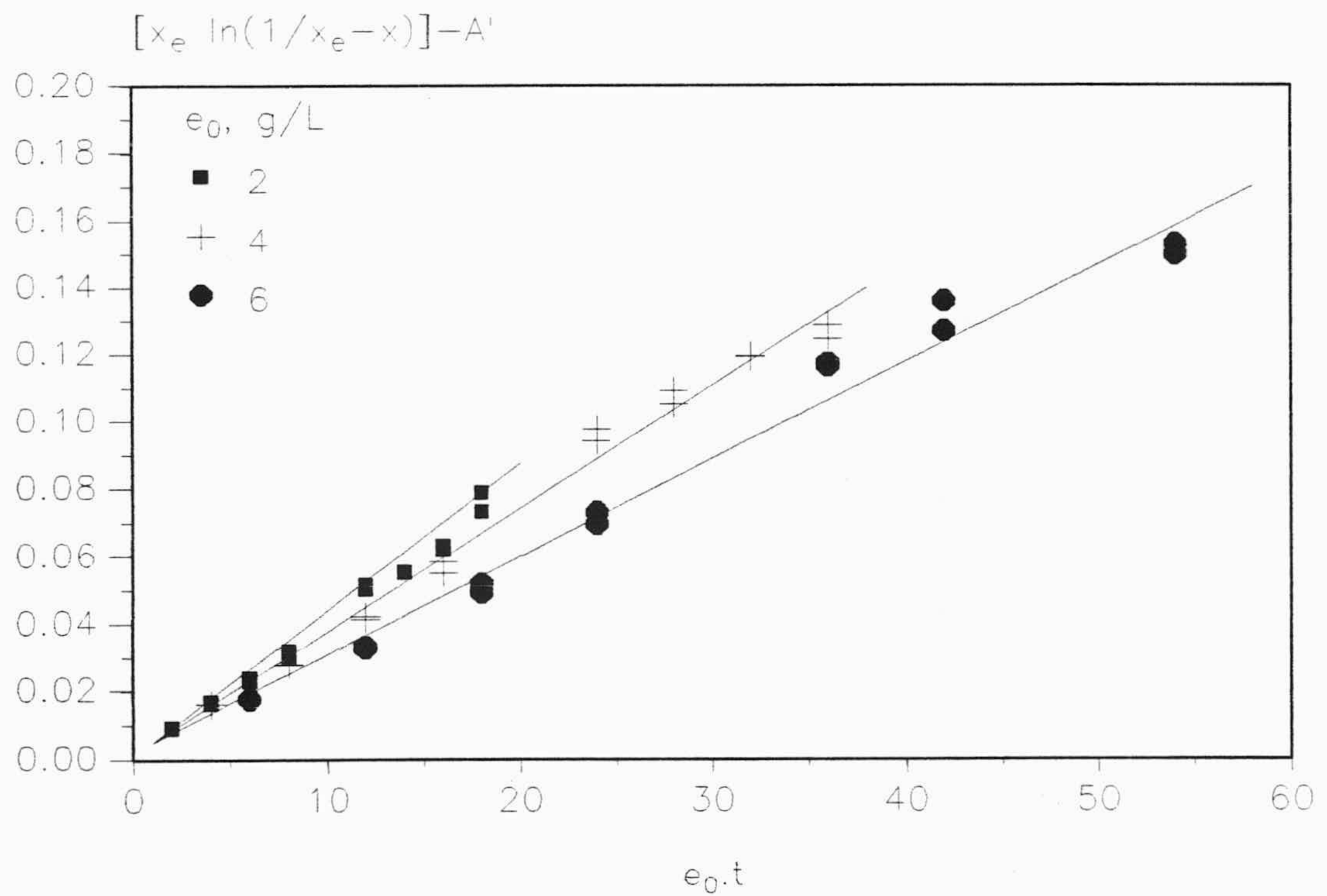


Figura 5.52. Desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.5 \text{ M}$

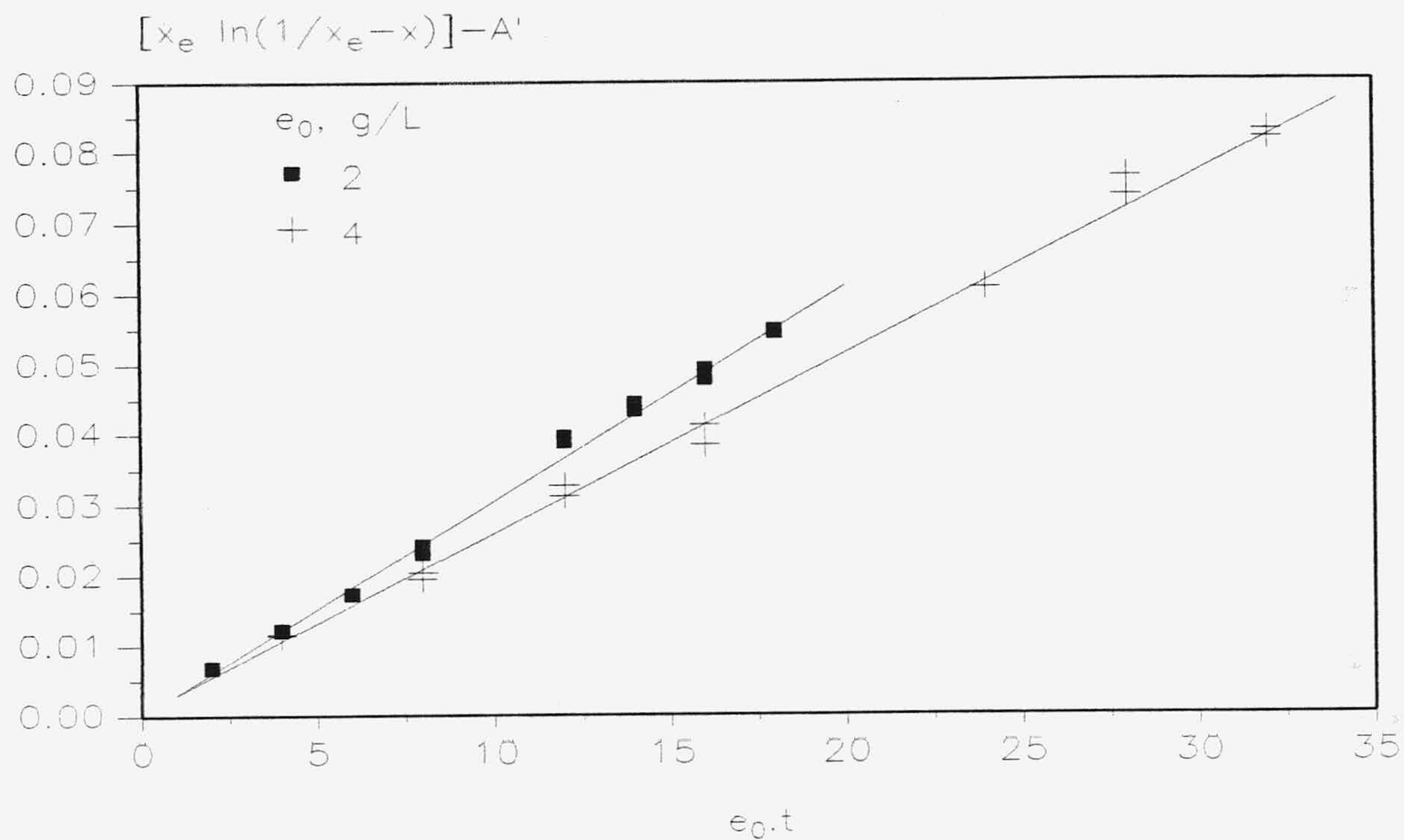


Figura 5.53. Desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 1.0$ M

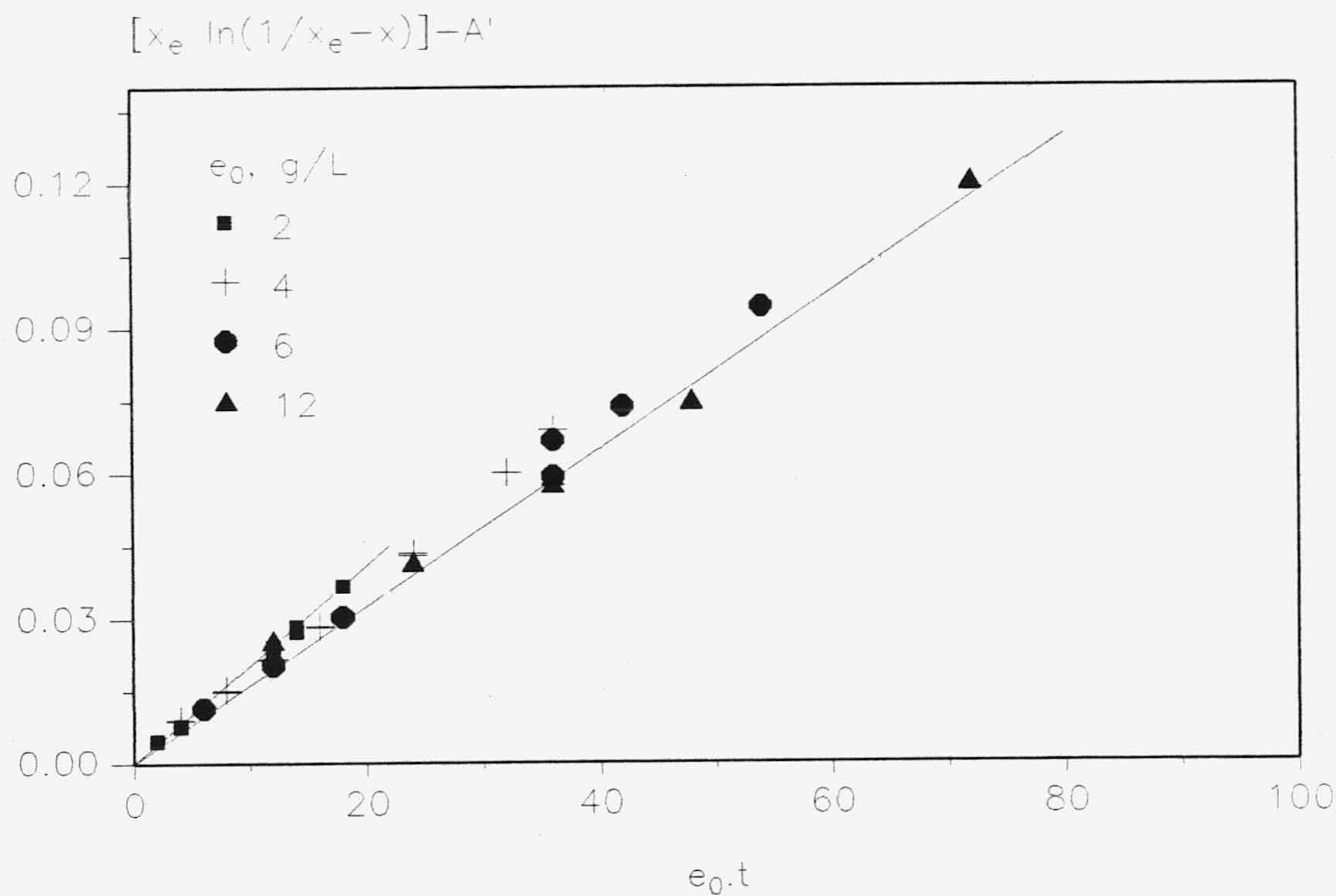


Figura 5.54. Desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 2.0$ M

5.5.1 Experimentos con enzima sin acondicionar

A partir del modelo de desactivación general propuesto por Henley y Sedana (1985), apartado 2, la actividad enzimática normalizada puede expresarse a partir de la ecuación

$$\frac{e}{e_0} = D_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + D_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + \dots + D_n \cdot e^{-\lambda_n \cdot t} \quad [5.34]$$

donde cada término exponencial representa una forma activa de enzima diferente que a su vez se desactiva, siendo $D_1 \dots D_n$ constantes de integración función de las constantes cinéticas del modelo propuesto ecuación [2.@@] que deben de cumplir que

$$D_1 + D_2 + \dots + D_n = 1 \quad [5.35]$$

por tanto

$$e = e_0 \left(D_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + D_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + \dots + D_{n-1} \cdot e^{-\lambda_{n-1} \cdot t} + \left(1 - \sum_{i=1}^{i=n-1} D_i \right) \cdot e^{-\lambda_n \cdot t} \right) \quad [5.36]$$

$$e = e_0 \left[D_1 \left(e^{-\lambda_1 \cdot t} + e^{-\lambda_n \cdot t} \right) + \dots + D_{n-1} \cdot \left(e^{-\lambda_{n-1} \cdot t} - e^{-\lambda_n \cdot t} \right) + e^{-\lambda_n \cdot t} \right] \quad [5.37]$$

Cuando existe desactivación, en la integración de la ecuación [5.32] habrá que considerar la variación de la concentración de enzima con el tiempo, o sea habrá que resolver las integrales

$$\int_0^t e \cdot dt = \int_{x_0}^x \frac{K_A}{x_e} (x_e - x) \quad [5.38]$$

si se denomina

$$y = \int_0^t e \cdot dt \quad [5.39]$$

y se tiene en cuenta el modelo de desactivación propuesto por Henley y Sedana

$$y = e_0 \left[D_1 \left(\frac{1 - e^{-\lambda_1 \cdot t}}{\lambda_1} - \frac{1 - e^{-\lambda_n \cdot t}}{\lambda_n} \right) + \dots + D_{n-1} \left(\frac{1 - e^{-\lambda_{n-1} \cdot t}}{\lambda_{n-1}} - \frac{1 - e^{-\lambda_n \cdot t}}{\lambda_n} \right) + \frac{1 - e^{-\lambda_n \cdot t}}{\lambda_n} \right] \quad [5.40]$$

si se supone sólo dos formas enzimáticas que se desactivan la ecuación [5.40] se reduce a

$$y = e_0 \left(D_1 \frac{1 - e^{-\lambda_1 \cdot t}}{\lambda_1} + \frac{1 - e^{-\lambda_2 \cdot t}}{\lambda_2} (1 - D_1) \right) \quad [5.41]$$

ecuación que indica una desactivación enzimática función del tiempo de reacción.

Esta ecuación se ha aplicado para cada serie de experimentos realizados con la misma concentración de sustrato y diferentes cantidades de enzima sin acondicionar, experimentos en donde se ha apreciado variación de la actividad en función del tiempo, se ha calculado el valor de "y" a partir de la ecuación [5.41] optimizando los valores de los parámetros D_1 , λ_1 y λ_2 .

Se ha elegido como valores óptimos de estos parámetros aquellos que hacen mínimo

$$\sum (x_i - x_c)^2 \quad [5.42]$$

donde x_i representa la conversión a cada tiempo "i" menos la ordenada en el origen de la representación x frente a t para eliminar los efectos iniciales y x_c la conversión calculada por regresión lineal de los datos (x_i, y) con la ecuación

$$x_c = \frac{\sum x_i \cdot y}{\sum y^2} y \quad [5.43]$$

Al aplicar la ecuación [5.41] a los experimentos realizados sin enzima acondicionada se observó que las desviaciones mínimas eran conseguidas cuando λ_1 era aproximadamente cero por lo que el límite de la ecuación [5.41] cuando $\lambda_1 \rightarrow 0$ sería

$$y = e_0 \left(D_1 \cdot t + \frac{1 - e^{-\lambda_2 \cdot t}}{\lambda_2} (1 - D_1) \right) \quad [5.44]$$

ecuación que conduce a las desviaciones mínimas calculadas cuando $D_1=0$, por lo que finalmente la ecuación que ajusta la desactivación enzimática sería

$$y = e_0 \frac{1 - e^{-\lambda_2 \cdot t}}{\lambda_2} \quad [5.45]$$

lo que supondría la existencia de una sola forma enzimática que se desactiva, siendo el valor del parámetro λ_2 con el que se consigue las desviaciones mínimas de @@@@, este resultado realmente indica que sería aceptable una desactivación de primer orden.

En la Figura 5.55 se efectúa la representación correspondiente a la ecuación [5.32] en función de "y" observándose que todos los puntos se agrupan en una sola línea de cuya pendiente se obtiene el valor de K_A corregido con el efecto de la desactivación para una concentración de fructosa 0.1 M, $T=60^\circ\text{C}$ y enzima sin acondicionar, siendo $K_A=0.00326$

Al aplicar el modelo de Henley y Sedana a los experimentos realizados con enzima acondicionada los resultados obtenidos no eran consistentes; hecho explicable si se tiene en cuenta que al acondicionar la enzima con ión cobalto la actividad enzimática permanece constante con el tiempo de reacción y sólo parece depender de la concentración enzimática utilizada.

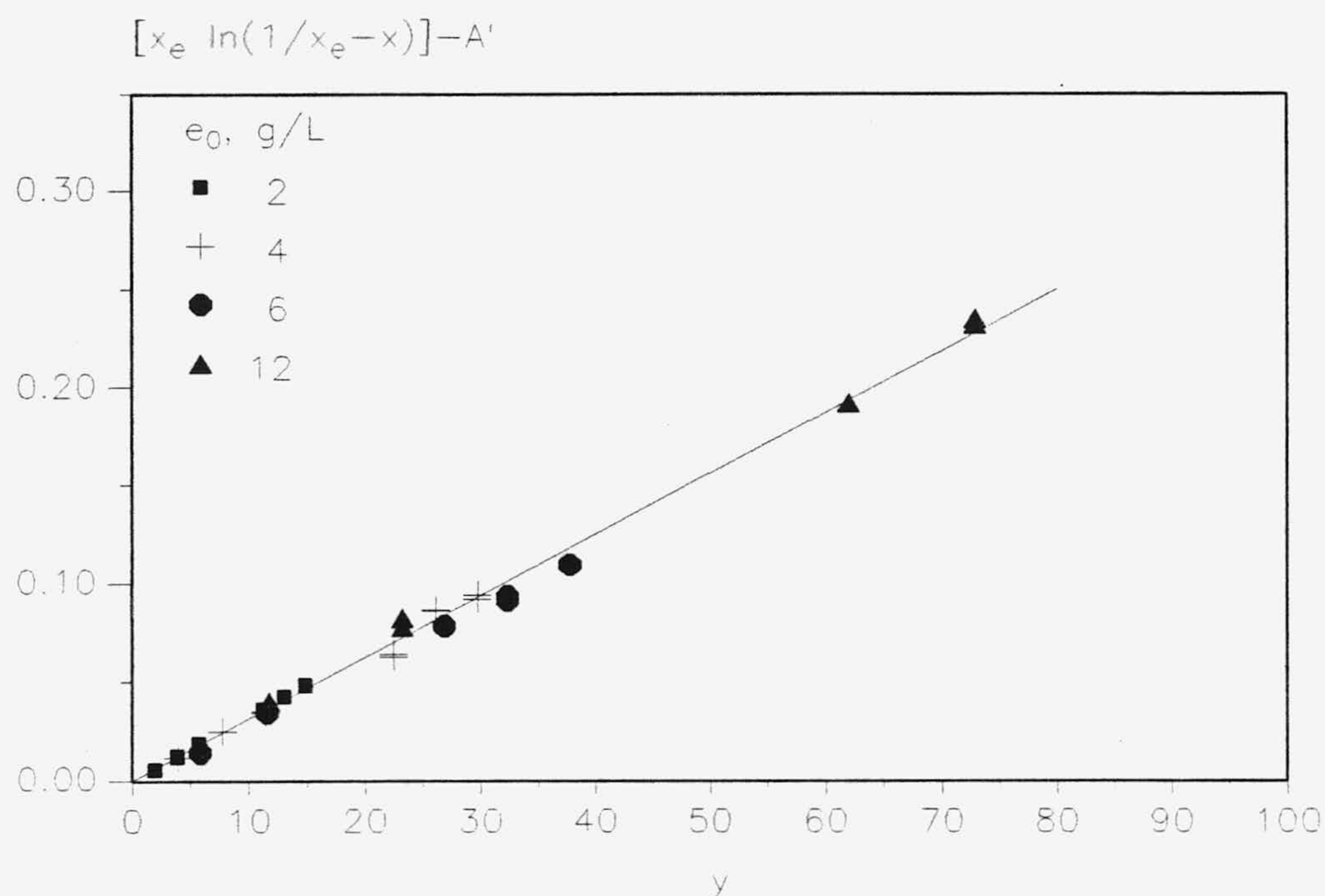


Figura 5.55. Representación de la ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. Enzima no acondicionada. $s_0 = 1$ M.

5.5.2 Experimentos con enzima acondicionada con ión cobalto

Los experimentos realizados con la enzima acondicionada con ión cobalto cuyos datos experimentales se muestran en las tablas 4.2.3 y 4.2.5.1 a 4.2.5.4, no parecen presentar disminución de la actividad enzimática con el tiempo de reacción; como se puso de manifiesto en el apartado 3 al evaluar la actividad enzimática tabla 3.11. Sin embargo las constantes K_A obtenidas aplicando la ecuación [5.32], tabla 5.13 disminuyen con la concentración de enzima empleada en el experimento, lo que indicaría también una desactivación enzimática.

En la Figura 5.56 se representa para cada experimento realizado con una misma concentración de fructosa al cociente entre la velocidad de reacción, r_0 , y la concentración inicial de enzima, e_0 , frente a e_0 , observándose una disminución de r_0/e_0 a medida que aumenta e_0 .

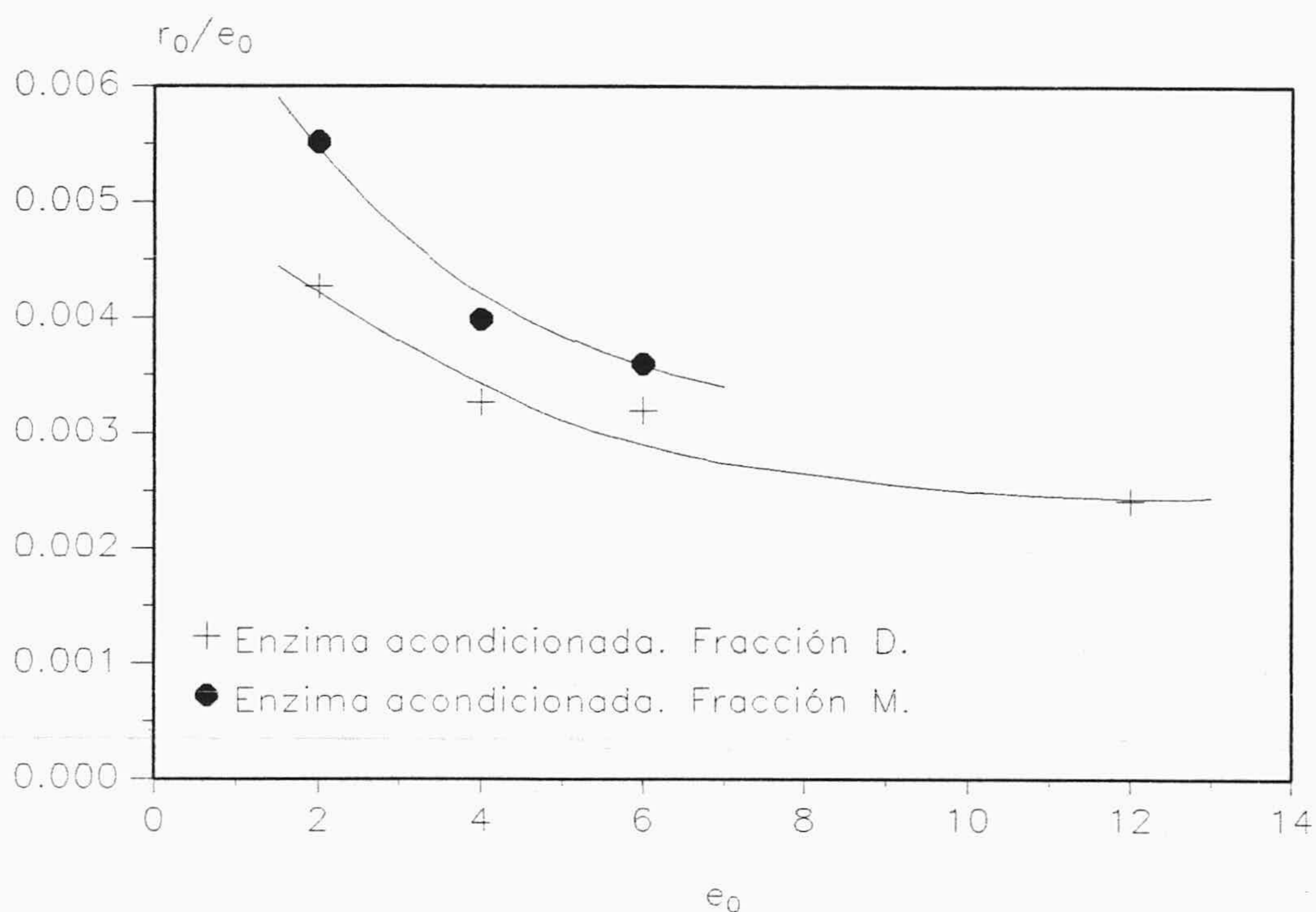


Figura 5.56. Representación ecuación [5.47]

Se han ensayado distintas expresiones para relacionar estas variables siendo la ecuación

$$\frac{e_0}{r_0} = B + H \cdot e_0 \quad [5.46]$$

la que mejor reproduce los resultados experimentales, el valor de las constantes B y H se muestran en la tabla 5.15 en ella se observa que el valor de B parece ser función de s_0 mientras que H parece no depender de esta variable.

Se ha tomado para H el valor medio de los experimentos realizados con mayor número de concentraciones enzimáticas, siendo igual a $H=18.5$, con este valor medio se ha recalculado el valor de B que se muestra en la tabla 5.15, y que aumenta con la concentración de sustrato, s_0 , siendo por tanto la ecuación que reproduce los resultados experimentales

TABLA 5.15
CONSTANTES DE LA ECUACION 5.46

s_0, M	d_p, mm	H	B	r^2	$B_{recalc.}$
0.1	$0.053 < d_p < 0.297$	16.82	216.2	0.951	206.1
0.5	$0.053 < d_p < 0.297$	33.51	192.6	0.969	255.6
1.0	$0.053 < d_p < 0.297$	38.84	268.6	*	329.6
2.0	$0.053 < d_p < 0.297$	20.20	492.1	0.973	502.3

* sólo se dispone de dos valores.

$$\frac{e_0}{r_0} = B + 18.5 e_0 \quad [5.47]$$

Si se define un factor de eficacia, Y, para considerar la desactivación enzimática, como

$$Y = \frac{r_0 \text{ con desactivación}}{r_0 \text{ sin desactivación}} \quad [5.48]$$

y tenemos en cuenta que la velocidad inicial (r_0) sin desactivación se evalúa a partir de la ecuación [5.47] cuando e_0 es igual a cero ($e_0=0$) tendremos que

$$Y = \frac{B}{\left(\frac{e_0}{r_0}\right)_{desac.}} = \frac{B}{B + H \cdot e_0} \quad [5.49]$$

el factor, Y, para cada concentración de sustrato y enzima se ha calculado y se muestra en la tabla 5.16

Teniendo en cuenta el factor de eficacia, Y, se han corregido los experimentos realizados con enzima acondicionada y diametro de partícula ($0.053 < d_p < 0.297$), tomando $Y \cdot e_0 \cdot t$ como variable intensiva de tratamiento.

TABLA 5.16
FACTOR DE EFICACIA, Y.

s_0 , M	e_0 , g/L	Y
0.1	2	0.831
	4	0.716
	6	0.622
	12	0.481
0.5	2	0.872
	4	0.773
	6	0.695
1.0	2	0.899
	4	0.817
2.0	2	0.931
	4	0.872
	6	0.819
	12	0.693

En la Figuras 5.57 a 5.60 se realiza la representación correspondiente a la ecuación 5.32 teniendo en cuenta la desactivación enzimática mediante el factor de eficacia, Y, observándose que todos los experimentos confluyen en una recta única de cuya pendiente se obtiene el valor de la constante cinética de pseudoprimer orden, K_A , tabla 5.17, una vez eliminado el efecto de la desactivación enzimática.

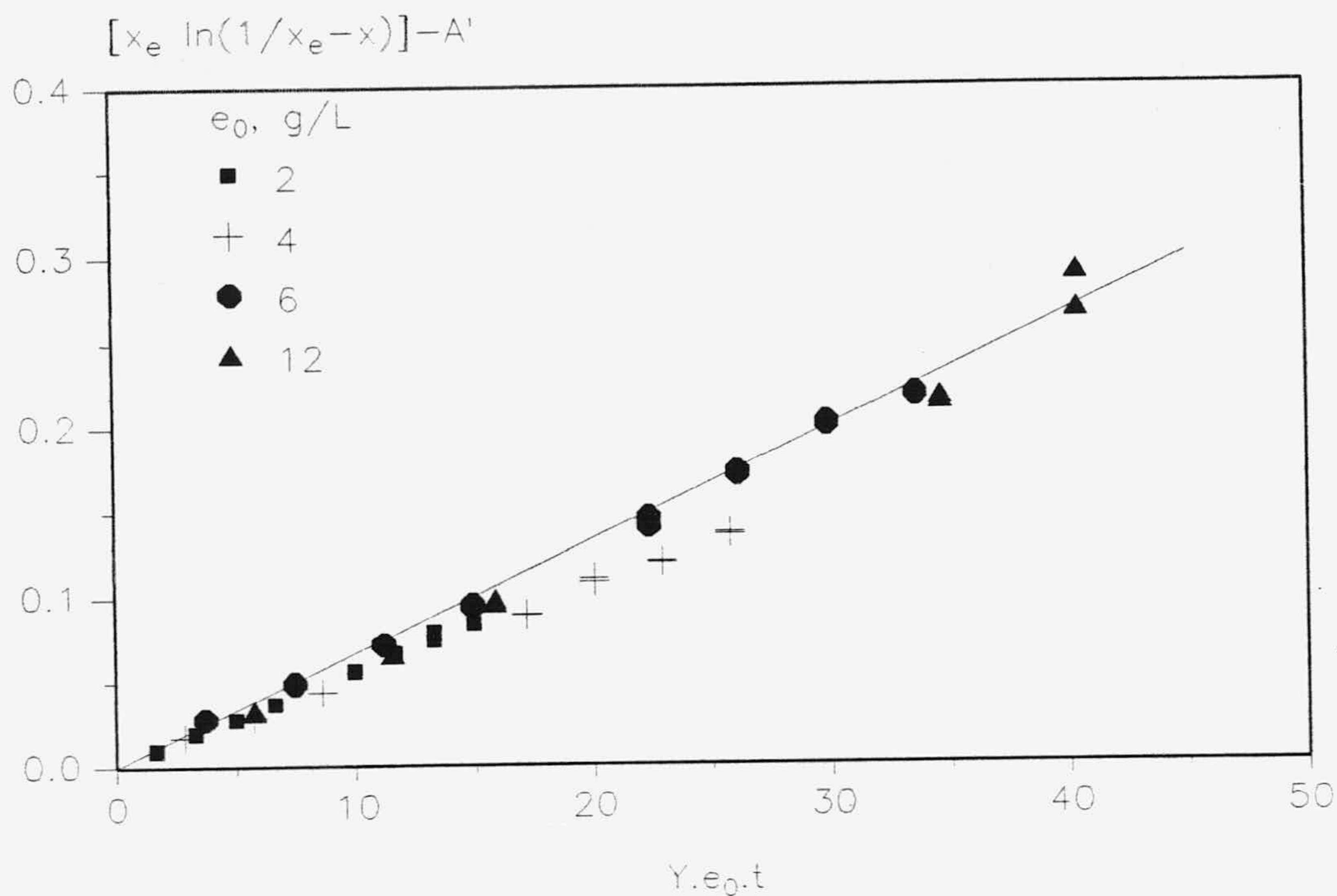


Figura 5.57. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. $s_0 = 0.1 \text{ M}$

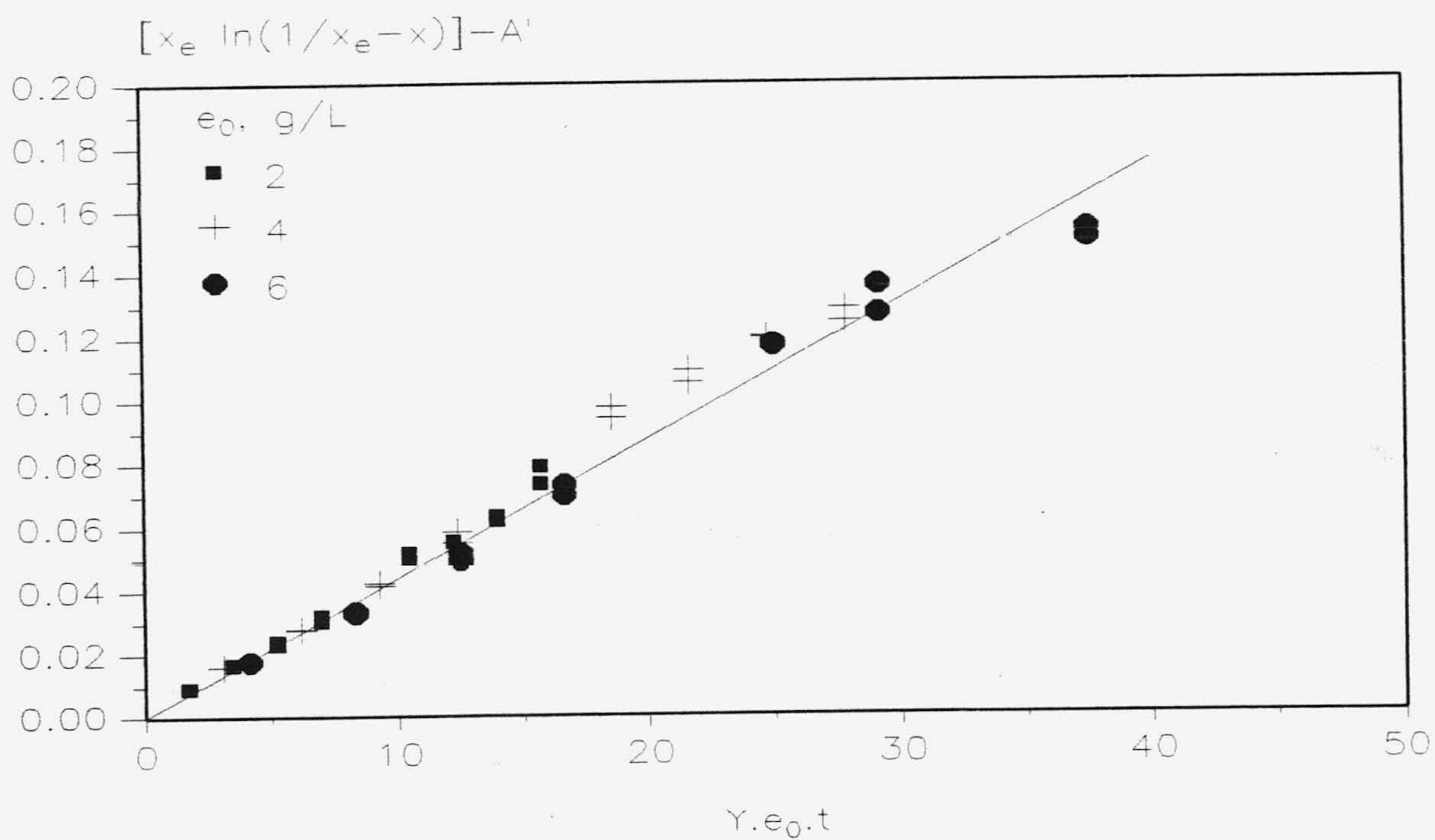


Figura 5.58. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. $s_0 = 0.5 \text{ M}$

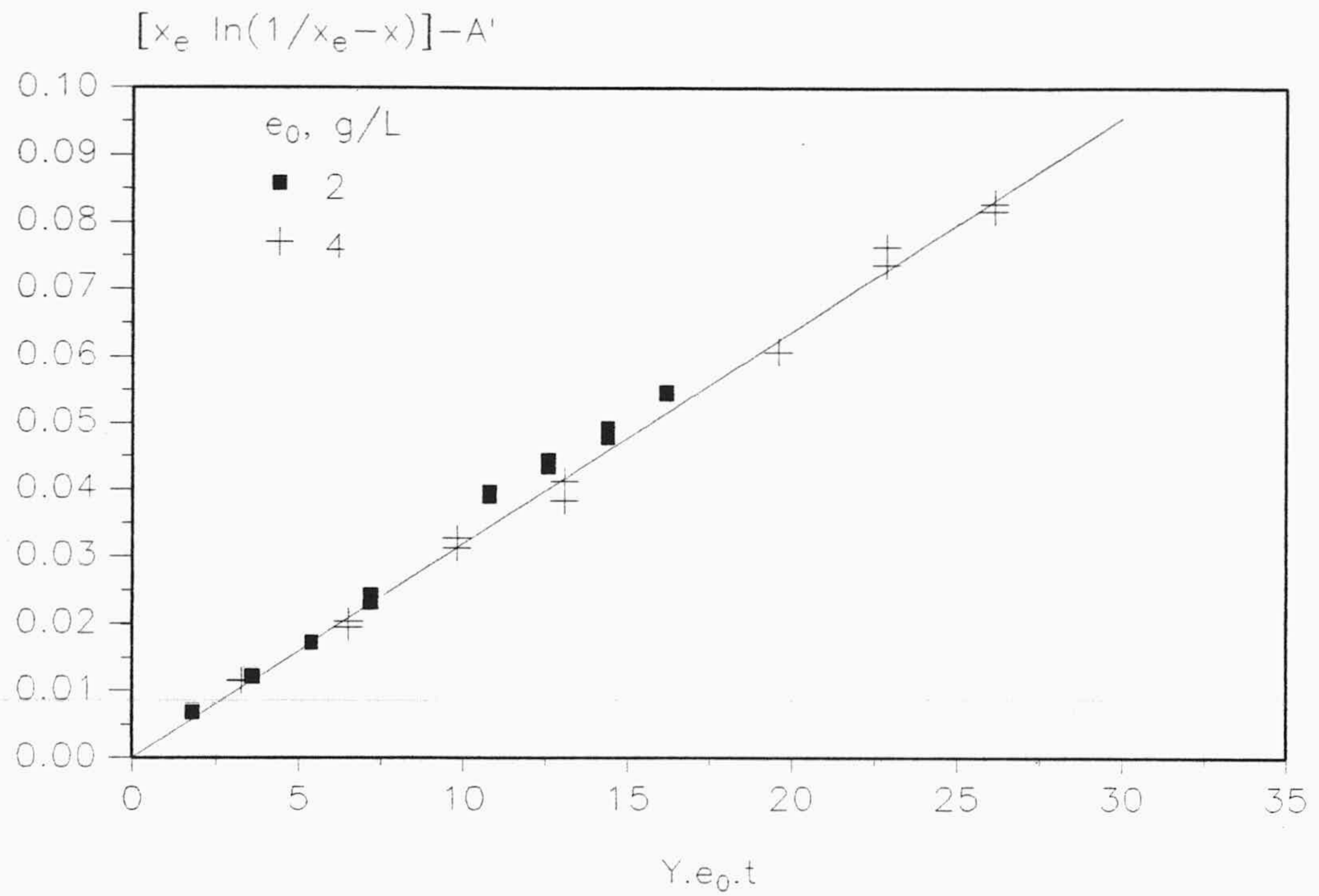


Figura 5.59. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. $s_0 = 1.0 \text{ M}$

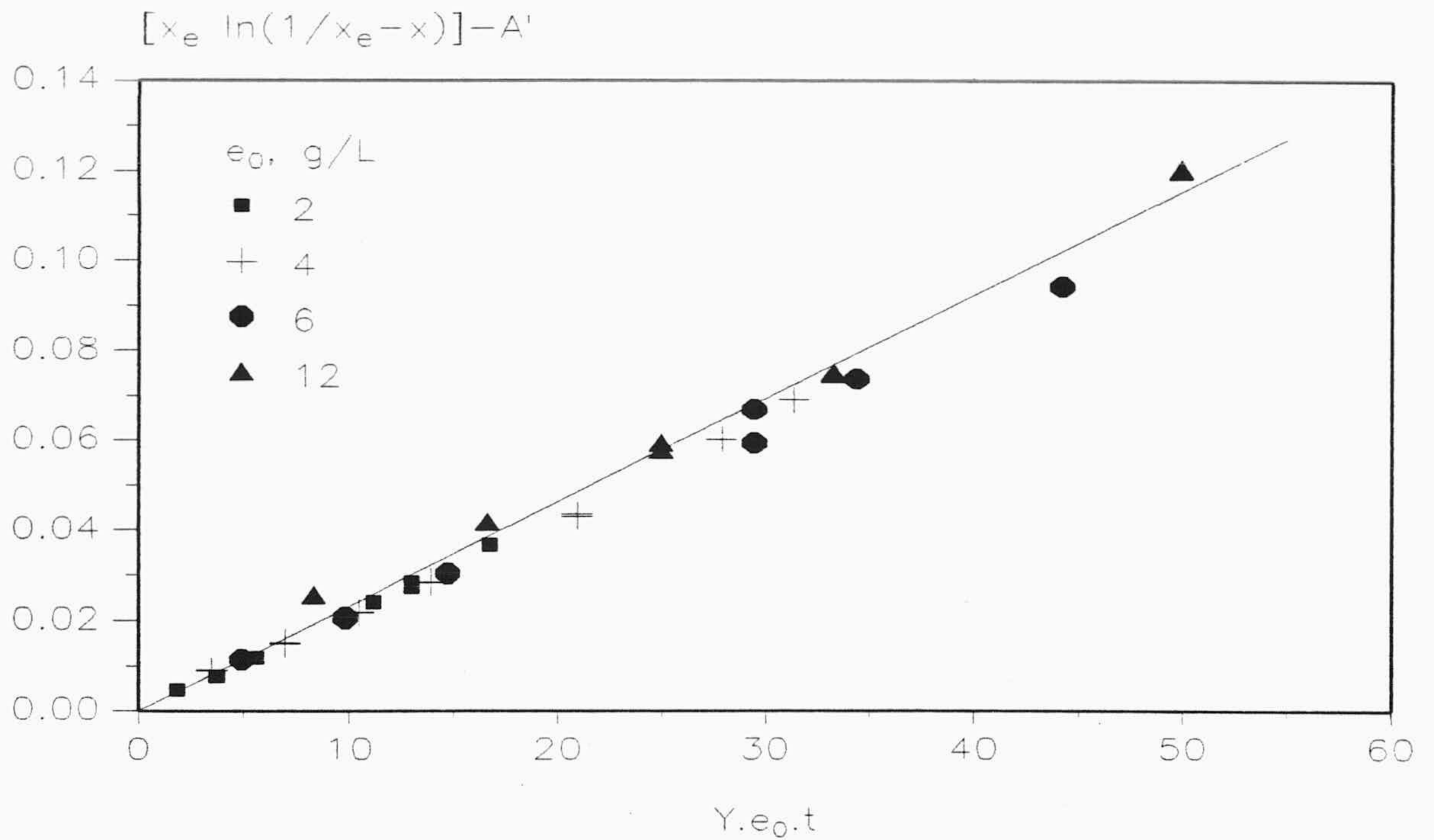


Figura 5.60. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. $s_0 = 2.0 \text{ M}$

TABLA 5.17
 CONSTANTE CINETICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN, K_A ,
 PARA LA ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA,
 ELIMINANDO EL EFECTO DE LA DESACTIVACION

T= 60°C Fracción - M Enzima acondicionada con ión Co^{2+}

S_0 , M	K_A , L/g.h
0.1	0.00652
0.5	0.00443
1.0	0.00319
2.0	0.00227

5.6 CONSTANTES CINETICAS DE ISOMERIZACION

Si se tiene en cuenta la relación existente entre K_A y s_0 , ecuación [5.30], se puede expresar

$$\frac{1}{K_A} = \frac{K_{mf}}{V_{mf}} + \frac{s_0}{V_{mf}} \quad [5.50]$$

Si se representa la inversa de K_A frente a la concentración de sustrato, s_0 , para los experimentos realizados a 300 rpm y $0.053 < d_p < 0.297$ se debería obtener una línea recta de cuya pendiente y ordenada se determinan K_{mf} y V_{mf} , en la Figura 5.61 se ha realizado esta representación obteniendo para V_{mf} el valor de 0.0067 mol/g.h y para K_{mf} el valor de 0.988, este valor esta de acuerdo con los encontrados en bibliografía a 60°C, Tabla 5.12, para la reacción de isomerización glucosa-→fructosa y evaluado en distintas condiciones experimentales.

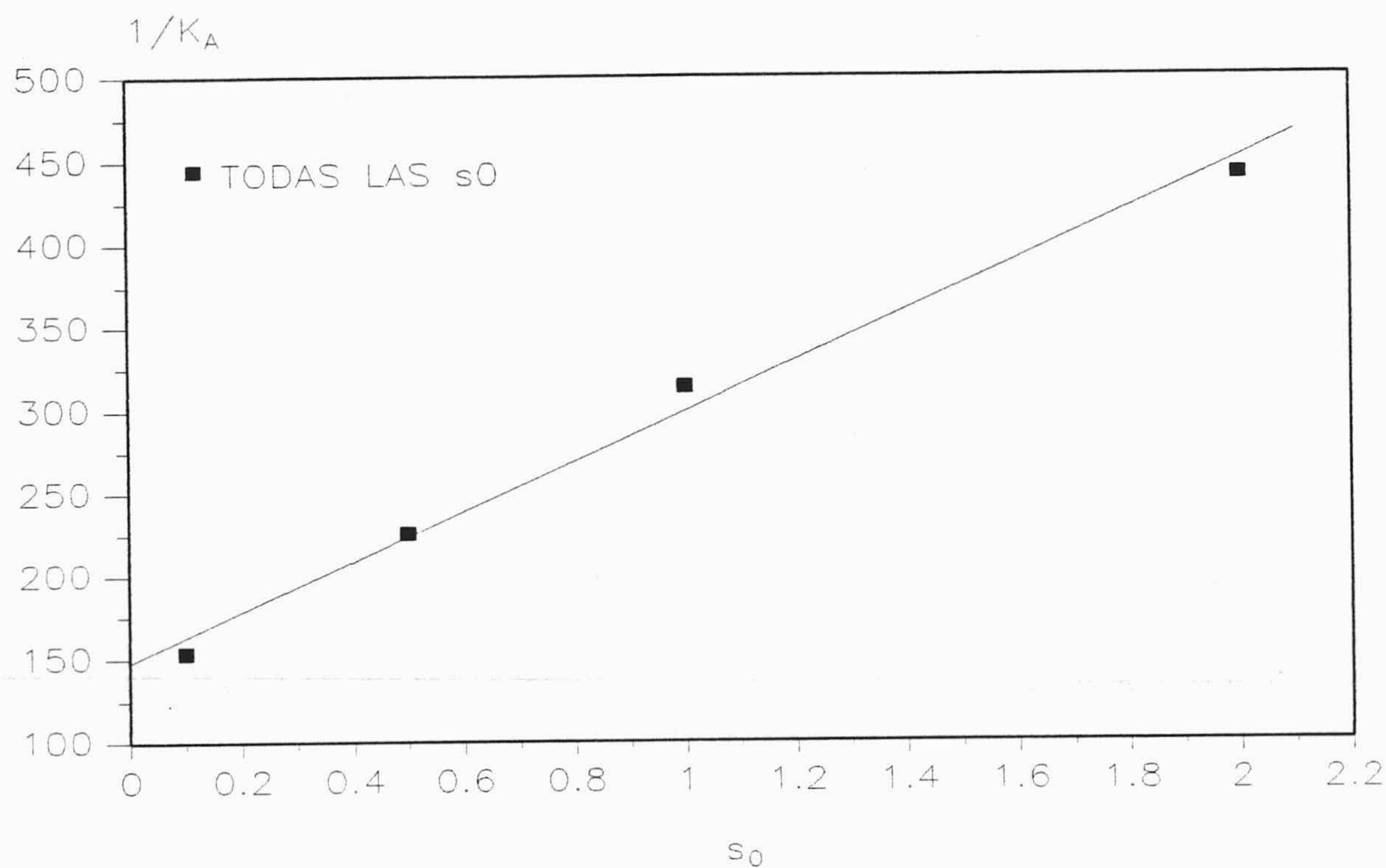


Figura 5.61. Representación de la ecuación [5.50]

5.7 TRANSPORTE INTERNO

Los efectos difusionales externos han sido eliminados como se puso de manifiesto en el apartado 5.3.1 al utilizar una velocidad de agitación superior a 200 rpm. El efecto del transporte interno hay que evaluarlo para comprobar si es este efecto significativo en la velocidad global del proceso una vez que se han corregido los efectos de la desactivación enzimática.

Supuesta la partícula esférica la ecuación de continuidad de la fructosa (para la transformación fructosa-glucosa) sería

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(D_e r^2 \frac{d[F]}{dr} \right) - \rho_p r_{FG} = 0 \quad [5.51]$$

con las condiciones límites

$$r = R \quad [F] = [F]_s \quad [5.52]$$

$$r = 0 \quad \frac{d[F]}{dr} = 0 \quad [5.53]$$

Donde D_e es la difusividad efectiva en las partículas de enzima que puede calcularse a partir de la difusividad molecular, D_M , de la porosidad de las partículas, ϵ , y el factor de tortuosidad, τ , por la expresión

$$D_e = D_M \frac{\epsilon}{\tau} \quad [5.54]$$

Admitiendo D_e constante y teniendo en cuenta que la velocidad de reacción es de pseudoprimer orden, ecuación [5.30] e introduciendo la conversión

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dx}{dr} \right) + \frac{K_A \rho_p}{x_e D_e} (x_e - x) = 0 \quad [5.55]$$

$$r = R \quad x = x_e \quad [5.56]$$

$$r = 0 \quad \frac{dx}{dr} = 0 \quad [5.57]$$

La solución del sistema suministra el perfil de la conversión en el interior de la partícula

$$x = f(r) \quad [5.58]$$

A partir de este perfil es posible determinar los moles transformados en la partícula por unidad de tiempo, R_{FG} , bien evaluando los que penetran por su superficie externa

$$R_{FG} = 4 \pi R^2 \left(-D_e s_0 \left(\frac{dx}{dr} \right)_R \right) \quad [5.59]$$

o evaluando los que se consumen en el interior de la partícula

$$R_{FG} = \int_0^R \left(\rho_p \frac{K_A}{x_e} s_0 (x_e - x) \right) 4 \pi r^2 dr \quad [5.60]$$

Si todo el interior de la partícula estuviera sometido a las concentraciones existentes en la superficie externa los moles transformados por unidad de tiempo, R_{FG}^* , en la misma vendrían dados por

$$R_{FG}^* = \rho_p \frac{K_A}{x_e} s_0 (x_e - x_s) \frac{4}{3} \pi R^3 \quad [5.61]$$

El sistema [5.55] a [5.57] puede ponerse en forma adimensional mediante las nuevas variables

$$z = \frac{r}{R} \quad [5.62]$$

$$A = \frac{x_e - x}{x_e - x_s} \quad [5.63]$$

con lo que se transforma en

$$\frac{1}{z^2} \frac{d}{dz} \left(z^2 \frac{dA}{dz} \right) - \frac{R^2 \frac{k_A}{x_e} \rho_p}{D_e} A = 0 \quad [5.64]$$

$$z = 1 \quad A = 1 \quad [5.65]$$

$$z = 0 \quad \frac{dA}{dz} = 0 \quad [5.66]$$

La ecuación diferencial [5.64] puede resolverse analíticamente mediante el cambio de variable

$$\alpha = A z \quad [5.67]$$

con lo que queda en la forma

$$\frac{d^2 \alpha}{dz^2} - 9 \phi^2 \alpha = 0 \quad [5.68]$$

siendo ϕ_1 el módulo de Thiele que viene dado por

$$\phi_1 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{K_A}{x_e} \frac{\rho_p}{D_e}} \quad [5.69]$$

La solución general de [5.68] es

$$\alpha = cte_1 \exp(3 \phi z) + cte_2 \exp(-3 \phi z) \quad [5.70]$$

Deshaciendo el cambio de variable y aplicando las condiciones límite [5.65] y [5.66]

$$A = \frac{1}{z} \frac{\sinh(3 \phi z)}{\sinh(3 \phi)} \quad [5.71]$$

Teniendo en cuenta la ecuación [5.71], la ecuación [5.59] queda de la forma

$$R_{FG} = 4\pi R D_e s_0 (x_e - x_s) \left(\frac{3 \phi}{\operatorname{tgh}(3 \phi)} - 1 \right) \quad [5.72]$$

y la ecuación [5.61] para la cinética de pseudoprimer orden

$$R_{FG}^* = \frac{4}{3} \pi R^3 \frac{K_A^*}{x_e} \rho_p s_0 (x_e - x_s) \quad [5.73]$$

Siendo el factor de efectividad por tanto

$$\eta_1 = \frac{R_{FG}}{R_{FG}^*} = \frac{1}{\phi} \left(\frac{1}{\operatorname{tgh}(3\phi)} - \frac{1}{3\phi} \right) = \frac{K_A}{K_A^*} \quad [5.74]$$

donde K_A es la constante de pseudoprimer orden experimental y K_A^* es la constante cinética sin el efecto del transporte interno.

Si se consideran los experimentos realizados para comprobar la existencia de transporte interno Tabla 5.18 para una concentración de sustrato 0.1 M, $e_0 = 2$ g/L y distintos tamaños de partícula. Estos experimentos se han corregido teniendo en cuenta el efecto de la desactivación enzimática utilizando un factor de eficacia $Y = 0.831$, Figura 5.62 obteniéndose los valores de K_A indicados en la Tabla 5.18.

Como se puede observar el valor de K_A es prácticamente el mismo para tamaños de partículas comprendidas entre $0.053 < d_p < 0.297$ siendo para estos tamaños $\bar{K}_A = 0.00731$ L/g.h, no existiendo para ellos influencia del transporte interno; para diámetros de partícula superiores, si existe, siendo el factor de efectividad menor que la unidad.

Figura 5.62. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. Influencia del tamaño de enzima. $s_0 = 0.1$ M; $e_0 = 2$ g/L.

TABLA 5.18
 CONSTANTES CINÉTICAS DE PSEUDOPRIMER ORDEN, K_A ,
 PARA LA ISOMERIZACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA,
 ELIMINANDO EL EFECTO DE LA DESACTIVACIÓN.

d_p, mm	$K_A, \text{L/g}\cdot\text{h}$	η
$0.053 < d_p < 0.088$	0.00741	} 1
$0.125 < d_p < 0.177$	0.00723	
$0.177 < d_p < 0.297$	0.00729	
$0.297 < d_p < 0.420$	0.00704	0.964
$0.420 < d_p < 0.590$	0.00576	0.788

Teniendo en cuenta las constantes cinéticas obtenidas para las fracciones D y E, se ha evaluado el factor de efectividad, el módulo de Thiele y D_e aplicando la ecuación [5.69]

TABLA 5.19

FACTOR DE EFECTIVIDAD, MODULO DE THIELE Y DIFUSIVIDAD EFECTIVA

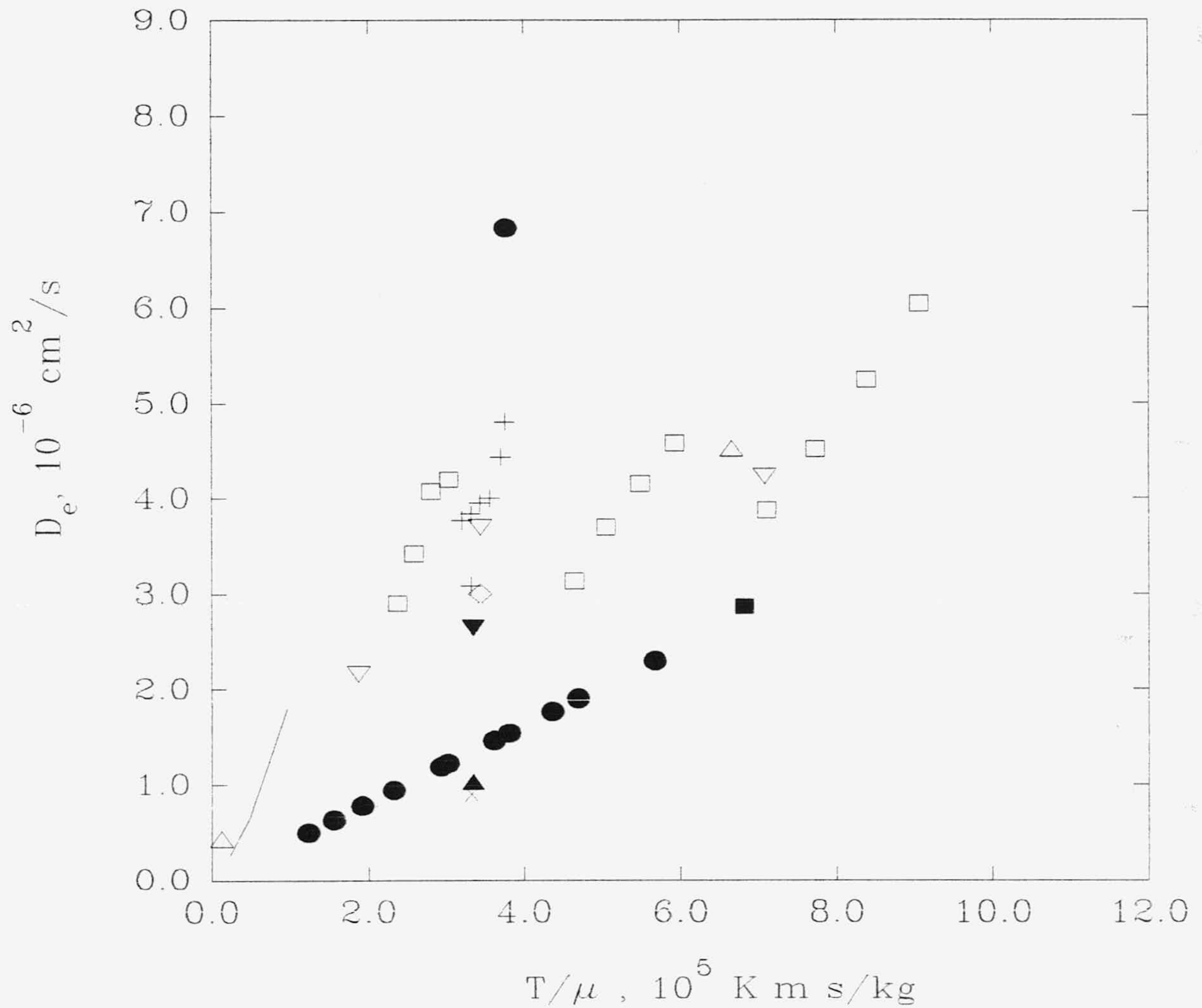
$$S_0 = 0.1 \text{ M}; e_0 = 2 \text{ g/L}; \rho_{ph} = 1240 \text{ g/L}$$

Fracción	d_{ph} , cm	η		D_e , $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
D	0.0436	0.9636	0.25295	4.54E-06
E	0.062	0.7877	0.70966	1.17E-06

El valor medio de difusividad efectiva obtenida se han representado, Figura 5.63, junto con los encontrados en bibliografía para la difusividad efectiva de glucosa obtenida con diferentes enzimas. Como se puede observar la D_e media obtenida esta dentro del rango establecido, y es próxima a las obtenidas por Houngh et al. (1993) y Luzón et al. obtenidos con una enzima inmovilizada en la matriz de un gel, procedimiento de inmovilización utilizado para la enzima de esta investigación, los valores de la viscosidad de fructosa se han estimado a partir de los datos encontrados en bibliografía, Weast y Astle (1980).

5.8 INFLUENCIA DEL ACONDICIONAMIENTO CON COBALTO

Los experimentos realizados para $s_0 = 0.1 \text{ M}$, con la enzima sin acondicionar, y el diametro de enzima correspondiente a la fracción D, $0.297 < d_p < 0.420$, se han corregido con el efecto de la desactivación enzimática, Figura 5.55, resultando para ellos un valor de la constante cinética $K_A = 0.00326$.



- ▲ Satterfield *et al.* (1973). Solido poroso, $\epsilon_p = 0.44$
- △ Chen *et al.* (1980). Gel.
- ▼ Adachi *et al.* (1891). Gel.
- ◇ Siroti *et al.* (1983). Solido poroso, $\epsilon_p = 0.70$.
- Straatsma *et al.* (1983).
- ▽ Nakamura *et al.* (1984). Gel.
- Tanaka *et al.* (1984). Gel.
- + Nguyen and Luong (1986). Gel.
- × Nguyen and Luong (1986). Gel concentrado.
- Houng *et al.* (1993). Gel.
- Luzón *et al.* (1993).on. Gel.
- Esta investigación.

Figura 5.63. Difusividades efectivas de glucosa encontradas por distintos autores y diferentes enzimas inmovilizadas.

Los experimentos realizados con la enzima acondicionada con ión Co^{++} y realizados con la fracción E, $0.420 < d_p < 0.590$, a distintas concentraciones de enzima 2, 4 y 6 g/L y $s_0 = 0.1$ M se han corregido con el efecto de la desactivación enzimática mediante el factor Y mostrado en la Tabla 5.16 para las concentraciones enzimáticas empleadas. En la Figura 5.64 se han representado aplicando la ecuación [5.32] e incorporando el efecto de la desactivación enzimática, determinando un valor para la constante cinética K_A de 0.00683. Si se tiene en cuenta además el transporte interno mediante el factor de efectividad obtenido para cada fracción de enzima utilizada, las constantes cinéticas ya corregidas son las indicadas en la tabla 5.20.

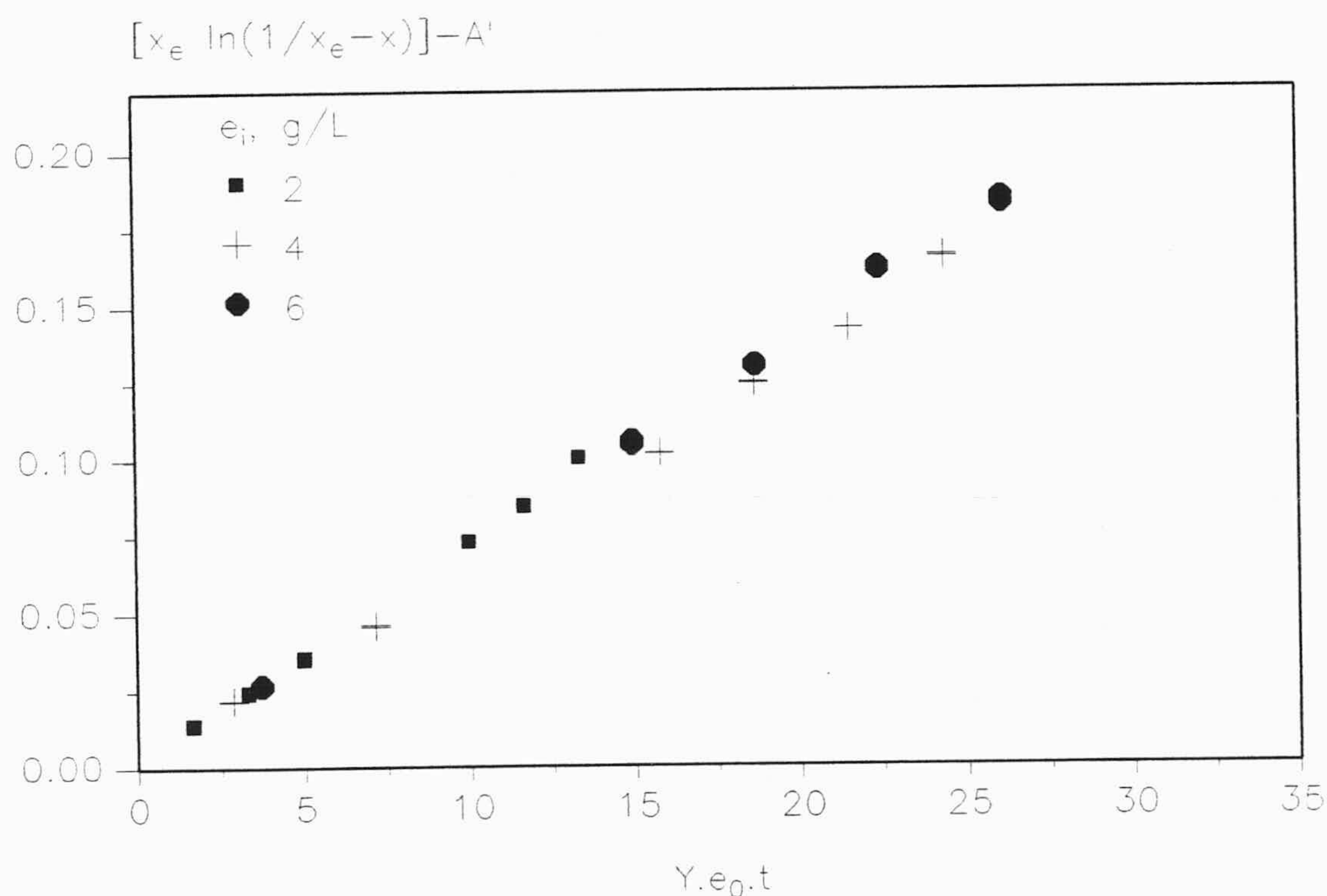


Figura 5.64. Representación ecuación [5.32], incorporando la desactivación enzimática. Enzima acondicionada. $s_0 = 0.1$ M. d_p entre 0.053 y 0.297 mm.

TABLA 5.20

CONSTANTES CINÉTICAS DE PSEUDOPRIMER ORDEN, K_A , CORREGIDAS CON EL EFECTO DE LA DESACTIVACION Y EL TRANSPORTE INTERNO

$T = 60^\circ\text{C}$; $s_0 = 0.1 \text{ M}$

Acondicionamiento	d_p , mm	K_A corregido, L/g.h
No	$0.297 < d_p < 0.420$	0.00339
Si	$0.420 < d_p < 0.590$	0.00867

Como puede observarse el efecto del acondicionamiento con ión Co^{++} es positivo en cuanto que aumenta de forma considerable la velocidad de reacción y se consigue que la actividad enzimática no varíe durante el tiempo de isomerización.

6. CONCLUSIONES.



Como resultado de la presente investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- Se ha determinado la constante del equilibrio de isomerización glucosa->fructosa a distintas concentraciones totales de hexosas, s_0 , en el intervalo de 40-60°C; su comparación con los resultados publicados en la Bibliografía pone de manifiesto que los valores de K_e son prácticamente coincidentes un intervalo de pH de 6.5 a 8.5 y hasta concentración total de hexosas de 3.4 M. Su variación con la temperatura viene dada por

$$K_e = 24.52 \exp \left(-\frac{1022}{T} \right)$$

que reproduce también aceptablemente la mayor parte de los valores publicados en el intervalo de 30 a 80°C.

2.- La variación de la constante del equilibrio de isomerización glucosa->fructosa con la temperatura determina una variación de entalpía de 8.5 KJ/mol indicando que la reacción de transformación G -> F es una reacción endotérmica.

3.- Las velocidades iniciales de reacción para las transformaciones G -> F y F -> G cuando la reacción transcurre en ausencia de la enzima glucosa isomerasa pueden ajustarse a cinéticas de orden 1, hecho que se ha comprobado aplicando el método diferencial e integral y siguiendo la cinética de reacción

tanto por análisis polarimétrico como enzimático. Las constantes cinéticas para la reacción han resultado ser

T, °C	k_I, h^{-1}	k_D, h^{-1}
40	$8.28 \cdot 10^{-5}$	$7.35 \cdot 10^{-5}$
50	$4.00 \cdot 10^{-4}$	$4.15 \cdot 10^{-4}$
60	$1.15 \cdot 10^{-3}$	$1.31 \cdot 10^{-3}$

que determinan unas energías de activación de 110 y 118 KJ/mol para las reacciones inversa y directa, respectivamente.

4.- Se ha comprobado experimentalmente para la reacción fructosa→glucosa utilizando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada sweetzyme A y un reactor homogéneo perfectamente agitado, que la velocidad de reacción es independiente de la agitación dentro del reactor para el intervalo utilizado: 200 a 500 rpm. Hecho que pone de manifiesto que a partir de 200 rpm la influencia del transporte externo sobre la velocidad de reacción puede considerarse despreciable.

5.- El acondicionamiento de la enzima sweetzyme A con ión cobalto ha puesto de manifiesto, por un lado, un aumento considerable de la velocidad de reacción, siendo la constante cinética de pseudoprimer orden para la reacción de isomerización fructosa→glucosa 0.00339 y 0.00867 L/g.h respectivamente, antes y después del acondicionamiento una vez se han eliminado el efecto de la desactivación enzimática y el transporte interno. Por otro lado, el acondicionamiento de la enzima produce una estabilización de ésta en cuanto que su actividad permanece constante durante el tiempo de isomerización después del acondicionamiento.

6.- La interpretación de los experimentos cinéticos cuando se llevaba a cabo la reacción con la enzima glucosa isomerasa conduce a que la reacción se ajusta, de la misma forma que en la reacción no enzimática, a un proceso reversible de pseudoprimer orden, lo que indica que las constantes de Michaelis-Menten en ambos sentidos son prácticamente iguales y por tanto que la afinidad de ambos isómeros por la enzima es muy próxima.

7.- Los experimentos cinéticos para la reacción enzimática con distintos tamaños de partícula de enzima inmovilizada han puesto de manifiesto la existencia de efectos difusionales internos para tamaños de partícula superiores a 0.297 mm, lo que ha permitido determinar, a partir del factor de efectividad y el módulo de Thiele para una reacción de pseudoprimer orden, la difusividad efectiva de la fructosa en las partículas de la enzima sweetzyme A que ha resultado ser $3.36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, valor que está de acuerdo con los obtenidos para la glucosa por distintos autores, cuando se utiliza enzimas inmovilizadas en la matriz de un gel, procedimiento utilizado para la enzima sweetzyme A.

8.- Las medidas de actividad realizadas con sweetzyme A han puesto de manifiesto que ésta se desactiva con el tiempo de almacenamiento, permaneciendo su actividad prácticamente constante si se almacena a 4°C durante un mes aproximadamente.

9.- Los experimentos cinéticos realizados variando la concentración de enzima indican que ésta se desactiva con el tiempo de isomerización y con la concentración de enzima utilizada cuando no está acondicionada, siguiendo la desactivación una cinética de primer orden. Cuando la enzima está acondicionada con ión cobalto la desactivación enzimática parece ser sólo función de la concentración de enzima utilizada. En ambos casos se evalúan factores de

eficacia que permiten eliminar el efecto de esta desactivación y determinar las constantes cinéticas de pseudoprimer orden para la isomerización fructosa->glucosa libre de estos efectos, a la temperatura de 60°C.

7. NOMENCLATURA.

α	grado de polarización
α_F	grado de polarización para fructosa
α_{FG}	grado de polarización de la mezcla fructosa-glucosa
α_G	grado de polarización para glucosa
α_M	grado de polarización de la mezcla
ϵ_p	porosidad de las partículas
η	factor de efectividad para el transporte interno
η_i	factor de efectividad para una reacción de primer orden
ρ_p	densidad de las partículas, g/cm ³
Ψ	esfericidad
A	variable adimensional, ecuación [5.18]
A'	variable adimensional, ecuación [5.32]
B	constante de la ecuación [5.46]
c_E	concentración del complejo enzimático, g/L
D_e	difusividad efectiva de las partículas de enzima, cm ² /s
D_M	difusividad molecular, cm ² /s
d_p	diametro de partícula, mm
d_{ph}	diametro de las partículas húmedas
E	enzima
E'	enzima desactivada
e_0	concentración enzimática, g/L

e_T	concentración de enzima activa por g. de enzima inmovilizado, mol/g
f	factor de hinchamiento
F	concentración de fructosa, mol/L
F_0	concentración inicial de fructosa, M
F_e	concentración de fructosa en el equilibrio, M
F_I	concentración inicial de fructosa antes de comenzar el experimento, M
G	concentración de glucosa, mol/L
G_0	concentración inicial de glucosa, M
G_e	concentración de glucosa en el equilibrio, M
G_E	concentración de glucosa en la enzima, M
G_i	concentración de glucosa inicial en las mezclas glucosa-fructosa, M
G_I	concentración inicial de glucosa antes de comenzar el experimento, M
H	constante de la ecuación [5.46]
K'_A	constante cinética de pseudoprimer orde, ecuación [5.33], L/g.h
k_{-f}, k_{-g}	constantes cinéticas de isomerización, 1/h
k_a	constante de pseudoprimer orden, $m^3/s \cdot kg_{cat}$.
k_A	constante cinética de pseudoprimer orden, L/g.h
k_D	constante cinética de la reacción glucosa \rightarrow fructosa, h^{-1}
K_e	constante de equilibrio
K_F	constante de calibrado para disolución de fructosa
k_f, k_g	constantes cinéticas de isomerización, L/mol.h
K_G	constante de calibrado para disolución de glucosa
k_I	constante cinética de la reacción fructosa \rightarrow glucosa, h^{-1}
K_{mf}	constante de Michaelis-Menten para fructosa, M

K_{mg}	constante de Michaelis-Menten para glucosa, M
n	orden de la reacción de isomerización
P	perimetro de la partícula
P	proteasa
P'	proteasa desactivada
r	radio de poro, m
r_{D0}	velocidad inicial de formación de fructosa, mol/L.h
r_{FG}	velocidad de reacción en el sentido fructosa->glucosa, mol/g.h
r_{GF}	velocidad de reacción en el sentido glucosa->fructosa, mol/g.h
r_{I0}	velocidad inicial de formación de glucosa, mol/L.h
s_0	concentración total de hexosas, M
S_p	superficie de la partícula
t	tiempo de reacción, h
T	temperatura, °C
t_R	tiempo de referencia, h
V_a	velocidad de agitación, rpm
V_{mf}	velocidad máxima de reacción para fructosa, mol/g.h
V_{mg}	velocidad máxima de reacción para glucosa, mol/g.h
V_p	volumen de la partícula
x	conversión
x_c	conversión calculada por regresión lineal
x_e	conversión de equilibrio
x_i	conversión al tiempo "i"
x_R	conversión de referencia

Y factor de eficacia

9. BIBLIOGRAFIA.

ADACHI, S., HASHIMOTO, K., KUROME, H., KAMIKUBO, T." *Biotechnol. Bioeng.*" **23**, (1981).

BECK, M.; KIESSER, T.; PERRIER, M. y BAUER, W." *Can. J. Chem. Eng.*" **64**, (1986).

BENAIGES, M.D. y SOLA, C. "*Chem. Tech. Biotechnol.*" **36**, 480. (1986).

BERMAN, H.W.; RUBIN, B.H.; CARRELL, H. y GLUSKER, J.P. "*Journal of Biological Chemistry.*" **249**, 3983. (1974).

BISCHOFF, K.B." *AIChE Journal*". **11**, 351 (1965).

BREEN J.J." *De Landbouwkundige en Industriële Betekenis van de Aardpeer N.U. Van Markens, Drukkerij Vennootschap, Delft.*" (1964).

BUCKE, C." *Developments in Sweeteners 1*". 43-68. Ed. Hough, c.a.m., Parker, K.J. y VLITOS, A.J., Applied Science Publishers, L.T.D., Londres (1979).

BUKI, K.; SZENTIRMAL, A.; TOLGYESI, L.; HEGYALJAI, K.G. y IIA, L. "*Patente Húngara*". **12**, 415. (1976).

CATALOGO NOVO.

HAVEWALA, N.B. y PITCHER, W.H." *Enzyme Engineering.*" Ed. Pye. E.K. y Wingard, L.B." Jr. Plenum Press, New York". **2**, 315-328. (1974).

CHEN, K.C.; SUGA, K. y TAGUCHI, H.J. " **Ferment. Technol.**" **58**, 439. (19-80).

CHEN, F.S.; WENG, H.S. y LAI, C.L. " **Biotechnol. Bioeng.**" **25**, 725 (1983).

CHEN, K.C. y WU, J.Y. " **Biotechnol. Bioeng.**" **30**, 817-824. (1987).

CHIBATA, I.; TSOA, T. y SATO, T. " **Appl. Microbiol.**" **27**, 878. (1979).

CHING, C.B. y HO, Y.Y. " **Appl. Microbiol. Biotechnol.**" **20**, 303. (1984).

CHUBEY B.B.; y DORREL, D.G. " **Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.**" **10**, 331 (1977).

DANNO, G. " **Agr. Biol. Chem.**" **35**, 997. (1971).

DUCROO, P. " **Ind. Aliment. Agric.**" **99**, 401. (1982).

DUTCH PAT. 7,004,989 TO Standard Brands Inc.

FINK Y RODWELL. " **Biotechnol. Bioeng.**" **17**, 1029 (1975).

GONDO, S.; ISAYAMA, S. y KUSUNOKI, K. J. " **Chem. Eng. Japan**" **7**, 64 (1974).

GRAM, J. y DE BANG, M. " **Chem. Eng. Sci.**" **45** (4), 1031. (1990).

HOGGE-ANGELETTI, R.A. " **Journal of Biological Chemistry**" **250**, 7814 (1975).

HORECKER, B.L. " *Methods of Enzymatic Analysis*". 1371, Elsevier Amsterdam (1974).

-
- ICHIMURA, M.; HIROSE, Y.; KATSUYARA, N. y YAMADA, K. " **Journal of the Agricultural Chemical Society Japan**" **39**, 291.(1965).
- JOGLEKAR, R.; CLERMAN, R.; OUELETTE, R.P. y CHERMISINOFF, P.N.-
" *Biotechnology in Industries*".73-97. Ed. Ann Arbor Science Publishers,
L.T.D., Londres (1979).
- KENT, C.A.; y EMERY, A.N." **Journal of Applied Chemistry and Biotechno-
logy**" **23**, 689.(1973).
- KIKKERT, A.; VELLENGA, K.; DE WILT, H.G.J. y JOOSTEN, G.E.H." **Bio-
technol. Bioeng.**" **23**, 1087-1101 (1981).
- KOBAYASHI, T.; y MOO-YOUNG, M." **Can. J. Chem. Eng.**" **50**, 162 (1972).
- KOBAYASHI, T.; OHMIYA, K. y SHIMIZU, S.J. " **Ferment. Technol.**" **54** (4),
260. (1976).
- KOLTHOFF, I.M., SANDELL, E.B., MEEHAN, E.J., BRUCKENSTEIN, S.
" *Análisis Químico Cuantitativo*" Ed. Nigar, 4ª Ed. (1972).
- KRASNOBAEV, V. AND BÖENIGER, R." *Chimia*".**29**, 123 (1975).
- LEE, Y.Y.; FRATZKE, A.R.; WUN, K. y TSAO, G.T. " **Biotechnol. Bioeng.**"
18, 389. (1976).
- LÓPEZ, J.; SOLÁ, C. y LEMA, J.M. " **Biotechnol. Bioeng.**" **24**, 2741.(1982).
- LUZÓN, G. **Tesis Doctoral**. Granada. (1993).
- LLOYD, N.E. y KHALEELUDDIN, M.D." **Chemical Engineering**" **53**, 270 (1976).

- MARSHALL, R. O.; y KOOI, E. R." *Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose.*" *Science* 125, 648 (1957).
- MERCIER, C. " *Ind. Aliment. Agric.*" 99, 10.(1982).
- MORI, T.; TOSA, T. y CHIBATA, I. " *Biochem. Biophys. Acta*" 321, 653 (1973).
- MOUSAN, P.; COMBES, D. y ALEMZADEH, I. " *Biotechnol. Bioeng.*" 26, 658 (1984).
- MOUSAN, P. y COMBES, D." *Biotechnol. Bioeng.*" 26, 347. (1984).
- NAKAMURA, K.; KUMAGAI, H. y YANO, Y. " *Agric. Biol. Chem.*" 48 (5), 1131. (1984).
- NATAKE, M. y YOSHIMURAS, S. " *Agric. Biol. Chem.*" 27, 342. (1963).
- NATAKE, M. " *Agric. Biol. Chem.*" 30, 887. (1966).
- NELSON, J.M. y GRIFFIN, E.G." *J. Am. Chem. Soc.*" 38, 1109. (1916).
- PARK, S.H.; LEE, S.B. y RYU, D.Y." *Biotechnol. Bioeng.*".23, 1237 (1981).
- PREDHOME, J. " *Ind. Aliment. Agric.*" 101, 885. (1984).
- REILLY, P.J. " *Food Science Technol.*" 14, 101-142 (1985).
- RODRÍGUEZ, M.L. *Tesis doctoral.* Madrid (1991).
- RONY, P.R." *J. Am. Chem. Soc.*".94, 8247 (1972).

-
- RYU, D.Y.; CHUNG, S.H. y KATOH, K. "Biotechnol. Bioeng." 19, 159 (1977).
- SAINI, T. y VIETH, W.R. "J. Appl. Chem. Biotechnol" 25, 115 (1975).
- SHIBATA, I.; TSOA, T. y SATO, T. "Appl. Microbiol." 27, 878 (1979).
- SLOTT, S.; MADSEN, G. y NORMAN, B.E. "Enzyme Engineering, II. 343-350. Ed. Pye, E.K. y Wingard, L.B., Jr. Plenum Press, New York (1974).
- SPROULL, S.D.; LIM, H.C. y SCHNEIDER, D.R. "Biotechnol. Bioeng." 18, 633. (1976).
- STANLEY, W.L.; WATTERS, G.C. y KELLY, S.H. "Biotechnol. Bioeng." (1976).
- STRAATSMA, J.; VELLENGA, K. y DE WILT, H.G.J. "Ind. Eng. Chem. Process Des Dev." 22, 356. (1983).
- STRANDBERG, G.W.; y SMILEY, K.L. "Biotechnol. Bioeng." 14, 509-513 (1972).
- TAKASAKI, Y.; y TANABE, O. "Agr. Biol. Chem." 28, 740. (1964).
- TAKASAKI, Y.; y TANABE, O. "Agr. Biol. Chem." 30, 209. (1967).
- TAKASAKI, Y.; KOSUGI, Y. y KANBAYASHI, A. "Fermentation Advances". 561, (1969).
- TAKASAKI, Y.; KOSUGI, Y. y KANBAYASHI, A. "Agr. Biol. Chem." 33, 1527. (1969).

THIBANET, P. " **Ind. Aliment. Agric.**" 101, 885. (1984).

TSMURA, N. E ISHIKAWA, M." *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*".14, 539
(1967).

TSUMIRA, N.; y SATO, T. " **Agr. Biol. Chem.**" 29, 1123. (1965).

VALLAT, I.; MONSAN, P. y RIBA, J.P. " **Biotechnol. Bioeng.**" 28, 151
(1986).

VAN KEULEN, M.A.; VELLENGA, K. y JOOSTEN, G.E.H. " **Biotechnol.
Bioeng.**" 23, 1437. (1981).

VASIC-RACKI, N.; PAVLOVIC, N.; CIZMEK, S.; DRAZIC, M. y HUSADZIC,
B. " **Bioproc. Eng.**" 7, 183. (1991).

VIAN ORTUÑO, A." *Curso de Introducción a la Química Industrial*".402, Ed.
Alhambra. Madrid (1976).

VISURI, K.; y KLIVANOV, A.M. " **Biotechnol. Bioeng.**" 30, 917. (1987).

VOLKIN, V.B.; y KLIBANOV, A.M. " **Biotechnol. Bioeng.**" 33, 1104.(1989).

VOS, H.J.; ZOMERDIJK, M.; GROEN, D.J. y LUYBEN, K.VH.A.M. " **Bio-
technol. Bioeng.**" 36, 377. (1990).

WEAST, R.C. y ASTLE, M.J. Editores." *Handbook of Chemistry and Phisics.*"
61 Ed. (1980).

WERNER, W.; REY, H.G. y WIELINGER, H." *Analyt. Chem.*" **252**, 224 (1970).

WILKE, C.R. y CHANG, P." *Am. Inst. Chem. Eng. J.*" **1**, 264, (1955).

YAMAHAKA, K. " *Agr. Biol. Chem.*" **27**, 265-271. (1963).

YAMANAKA, K. " *Japanese Patent.*" **20**, 230. (1965).

ZITTAN, L.; POULSEN, P.B. y HEMMINGSEN, St.H. " *Dië Stärke*" **27**, 236
(1975).

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. FERNANDO CAMACHO RUBIO
- D. MANUEL GALAN VALLEJO
- D. LEOPOLDO MARTINEZ NIETO
- D. JOSÉ RIVERA UTRILLA
- D.^a M.^a EUGENIA MARTINEZ SANCHO

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don NICOLÁS CRUZ PÉREZ

se acordó por UNANIMIDAD otorgar la calificación de APTO "CUM LAUDE"

y para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 30 de junio de 1995

El Secretario,

M.^a Eugenia Martínez

M.^a EUGENIA MARTINEZ SANCHO

El Presidente,

F. Camacho

FERNANDO CAMACHO RUBIO

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Leopoldo Martínez Nieto

Leopoldo Martínez Nieto

Manuel Galán Vallejo

MANUEL GALAN VALLEJO

José Rivera Utrilla

José Rivera Utrilla