

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para  
inmovilización de invertasa grado industrial

Trabajo de graduación presentado por  
Gabriela Estefanía Pineda Ramírez  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en  
Biotecnología Industrial

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para  
inmovilización de invertasa grado industrial

Trabajo de graduación presentado por  
Gabriela Estefanía Pineda Ramírez  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en  
Biotecnología Industrial

Guatemala,

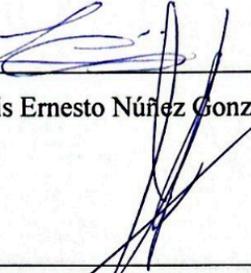
2024

Vo. Bo.:

(f)   
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Tribunal Examinador:

(f)   
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

(f)   
Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

(f)   
Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A.

Fecha de aprobación: Guatemala 4 de enero de 2024

## PREFACIO

El presente trabajo de graduación surge de mi interés por los biocatalizadores. A lo largo de mi carrera, aprendí sobre la variedad de aplicaciones industriales que tienen las enzimas. Sin embargo, también aprendí que su uso se puede ver limitado por las condiciones a las cuales se llevan a cabo los procesos industriales, ya que estas tienen un rango limitado de operación. Debido a esto, surge mi interés por buscar una manera de aumentar la resistencia de las enzimas, mediante su inmovilización. Al realizar una investigación sobre el tema, noté la falta de información existente sobre la invertasa, su uso en la generación de jarabes invertidos y su inmovilización, motivándome así a evaluar su comportamiento para hidrolizar sacarosa en su estado libre y a inmovilizarla utilizando distintos soportes catalíticos, para aportar información a este tema que no está tan estudiado actualmente.

Agradezco a mi asesor, Ing. Luis Ernesto Núñez González, MBA & M. Sc., por el apoyo, orientación, motivación y enseñanzas que me brindó durante la realización de este trabajo y a mi director de carrera, Ing. Gamaliel Zambrano, M. Sc., por su confianza, apoyo, orientación brindada a lo largo de la carrera. Agradezco al Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso por su apoyo en la realización de este trabajo de graduación. Agradezco a mis padres, Luis y Laura, y a mi hermana, Alejandra, por su sacrificio, amor y apoyo incondicional, y por darme la oportunidad de estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala. Finalmente, agradezco a mis amigas, Deyanira, Zarina y Frida por el apoyo y ayuda que me brindaron a lo largo de mi carrera y en la elaboración de este trabajo de graduación.

## ÍNDICE

PREFACIO.....	v
LISTADO DE CUADROS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ECUACIONES .....	xix
RESUMEN .....	xx
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	3
A. GENERAL.....	3
B. ESPECÍFICOS.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
A. ENZIMAS .....	5
B. AZÚCARES .....	21
C. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS .....	24
D. REFRACTOMETRÍA .....	29
V. ANTEDECENTES .....	31
VI. METODOLOGÍA .....	34
A. OBTENCIÓN DE LA INVERTASA.....	34
B. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA REFRACTOMETRÍA .....	34
C. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE OPERACIÓN DE LA ENZIMA LIBRE.	36
D. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR ADSORCIÓN CON CARBÓN ACTIVADO.....	38
E. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR ATRAPAMIENTO CON ALGINATO DE SODIO .....	39
F. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR UNIÓN COVALENTE CON PHA FUNCIONALIZADO .....	40

G. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE OPERACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	40
H. DETERMINACIÓN DE ENZIMA SIN INMOVILIZAR.....	42
I. ANÁLISIS CINÉTICO .....	43
VII. RESULTADOS.....	45
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	85
IX. CONCLUSIONES.....	101
X. RECOMENDACIONES.....	102
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	103
XII. ANEXOS .....	107
A. DATOS ORIGINALES.....	107
B. DATOS CALCULADOS.....	122
C. MUESTRAS DE CÁLCULOS .....	172
D. ANÁLISIS DE ERROR .....	175
E. CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	177
F. MODELOS CINÉTICOS.....	183
G. BALANCES DE MASA .....	215
H. DATOS DE REACTIVOS.....	218
I. DATOS DE EQUIPO.....	220
J. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA .....	221
XIII. GLOSARIO .....	228

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Constantes cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de la enzima libre.....	31
Cuadro 2. Constantes cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de la enzima inmovilizada con alginato de sodio.....	33
Cuadro 3. Diseño experimental de la determinación de condiciones de operación de la invertasa...	45
Cuadro 4. Rendimientos de inmovilización con los distintos soportes utilizados.....	52
Cuadro 5. Parámetros cinéticos obtenidos para cada corrida utilizando el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa.....	73
Cuadro 6. Parámetros cinéticos obtenidos para cada corrida utilizando el modelo general con inhibición de la hidrólisis de sacarosa con invertasa.....	75
Cuadro 7. Análisis de varianza (ANOVA).....	81
Cuadro 8. Comparación entre soportes de inmovilización.....	82
Cuadro 9. Energía de activación para el modelo sin inhibición.....	82
Cuadro 10. Concentraciones e índices de refracción de las curvas de calibración del índice de refracción vs concentración de sacarosa, y fructosa y glucosa.....	107
Cuadro 11. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima libre.....	108
Cuadro 12. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima libre.....	109
Cuadro 13. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima libre.....	110
Cuadro 14. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con carbón activado.....	112
Cuadro 15. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con carbón activado.....	113
Cuadro 16. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con carbón activado.....	114
Cuadro 17. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado.....	115
Cuadro 18. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado.....	116
Cuadro 19. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado.....	117

Cuadro 20. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con alginato de sodio.....	118
Cuadro 21. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con alginato de sodio .....	119
Cuadro 22. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con alginato de sodio .....	120
Cuadro 23. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima sin inmovilizar.....	121
Cuadro 24. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima libre .....	122
Cuadro 25. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima libre .....	125
Cuadro 26. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima libre .....	129
Cuadro 27. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con carbón activado .....	133
Cuadro 28. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con carbón activado .....	136
Cuadro 29. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con carbón activado.....	140
Cuadro 30. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado .....	145
Cuadro 31. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado .....	148
Cuadro 32. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado .....	152
Cuadro 33. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con alginato de sodio .....	157
Cuadro 34. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con alginato de sodio.....	160
Cuadro 35. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con alginato de sodio.....	164
Cuadro 36. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas para determinar la concentración de enzima sin inmovilizar .....	169
Cuadro 37. Eficiencia catalítica .....	171
Cuadro 38. Pendientes e interceptos de las curvas de calibración de índice de refracción vs concentración de sacarosa y, glucosa y fructosa.....	171
Cuadro 39. Parámetros cinéticos obtenidos para la determinación de enzima sin inmovilizar cada corrida utilizando el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa.....	172
Cuadro 40. Datos de la invertasa utilizada durante la experimentación .....	218

Cuadro 41. Datos de la sacarosa utilizada durante la experimentación .....	218
Cuadro 42. Datos de la glucosa utilizada durante la experimentación .....	218
Cuadro 43. Datos de la fructosa utilizada durante la experimentación.....	219
Cuadro 44. Datos del cloruro de calcio utilizado durante la experimentación .....	219
Cuadro 45. Datos del acetato de calcio utilizado durante la experimentación .....	219
Cuadro 46. Datos del carbón activado utilizado durante la experimentación.....	219
Cuadro 47. Datos del alginato de sodio utilizado durante la experimentación.....	219
Cuadro 48. Datos del hidróxido de sodio utilizado durante la experimentación .....	219
Cuadro 49. Datos del ácido acético utilizado durante la experimentación .....	220
Cuadro 50. Datos del glutaraldehído utilizado durante la experimentación .....	220
Cuadro 51. Datos de la balanza de laboratorio .....	220
Cuadro 52. Datos de la balanza analítica .....	220
Cuadro 53. Datos del potenciómetro.....	220
Cuadro 54. Datos del baño térmico.....	221
Cuadro 55. Datos del refractómetro.....	221
Cuadro 56. Datos del microscopio electrónico de barrido.....	221

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de estructura proteica.....	6
Figura 2. Representación visual de un complejo enzima-sustrato .....	8
Figura 3. Modelo energético de una reacción .....	10
Figura 4. Curva de actividad enzimática.....	11
Figura 5. Tipos de inhibición .....	12
Figura 6. Inhibición por sustrato .....	12
Figura 7. Inhibición por retroalimentación .....	13
Figura 8. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática .....	15
Figura 9. Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática .....	15
Figura 10. Efecto de la concentración de enzima y sustrato en la velocidad de reacción enzimática	16
Figura 11. Diagrama de Lineweaver-Burk .....	18
Figura 12. Estructura tridimensional de la invertasa.....	19
Figura 13. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de sacarosa .....	20
Figura 14. Molécula de glucosa .....	21
Figura 15. Molécula de fructosa .....	22
Figura 16. Proceso de inmovilización enzimática con alginato de sodio .....	25
Figura 17. Esquema de inmovilización de invertasa con alginato de sodio .....	25
Figura 18. Proceso de inmovilización enzimática con carbón activado .....	26
Figura 19. Esquema de inmovilización de invertasa con carbón activado .....	27
Figura 20. Proceso de inmovilización enzimática con un material funcionalizado.....	27
Figura 21. Esquema de inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado .....	28
Figura 22. Célula bacteriana con gránulos de PHA.....	29
Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la invertasa libre e inmovilizada .....	31
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la invertasa libre .....	32
Figura 25. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática a diferentes concentraciones de invertasa libre .....	32
Figura 26. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática a diferentes concentraciones de invertasa inmovilizada con alginato de sodio.....	33

Figura 27. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	46
Figura 28. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	46
Figura 29. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	47
Figura 30. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	47
Figura 31. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $\text{pH } 3 \pm 0.005$ .....	48
Figura 32. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $\text{pH } 6 \pm 0.005$ .....	48
Figura 33. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $\text{pH } 7 \pm 0.005$ .....	49
Figura 34. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a $\text{pH } 9 \pm 0.005$ .....	49
Figura 35. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	50
Figura 36. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	50
Figura 37. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	51
Figura 38. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	51
Figura 39. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	52
Figura 40. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	53
Figura 41. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	53
Figura 42. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	54
Figura 43. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	54
Figura 44. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $\text{pH } 3 \pm 0.005$ .....	55
Figura 45. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $\text{pH } 6 \pm 0.005$ .....	55
Figura 46. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a $\text{pH } 7 \pm 0.005$ .....	56

Figura 47. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH $9 \pm 0.005$ .....	56
Figura 48. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005$ g/mL..	57
Figura 49. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.15 \pm 0.0005$ g/mL..	57
Figura 50. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005$ g/mL..	58
Figura 51. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa 1 inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL..	58
Figura 52. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa 1 inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL..	59
Figura 53. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a $40 \pm 0.5^\circ$ C.....	59
Figura 54. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a $50 \pm 0.5^\circ$ C.....	60
Figura 55. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a $60 \pm 0.5^\circ$ C.....	60
Figura 56. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a $70 \pm 0.5^\circ$ C.....	61
Figura 57. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $3 \pm 0.005$ .....	61
Figura 58. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $6 \pm 0.005$ .....	62
Figura 59. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $7 \pm 0.005$ .....	62
Figura 60. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $9 \pm 0.005$ .....	63
Figura 61. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005$ g/mL .....	63
Figura 62. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.15 \pm 0.0005$ g/mL .....	64
Figura 63. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005$ g/mL .....	64
Figura 64. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa 1 inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL .....	65

Figura 65. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada en PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL .....	65
Figura 66. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $40 \pm 0.5^\circ$ C .....	66
Figura 67. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $50 \pm 0.5^\circ$ C .....	66
Figura 68. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $60 \pm 0.5^\circ$ C .....	67
Figura 69. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $70 \pm 0.5^\circ$ C .....	67
Figura 70. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $\text{pH } 3 \pm 0.005$ .....	68
Figura 71. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $\text{pH } 6 \pm 0.005$ .....	68
Figura 72. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $\text{pH } 7 \pm 0.005$ .....	69
Figura 73. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a $\text{pH } 9 \pm 0.005$ .....	69
Figura 74. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005$ g/mL 70	
Figura 75. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.15 \pm 0.0005$ g/mL 70	
Figura 76. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005$ g/mL 71	
Figura 77. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa 1 inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL 71	
Figura 78. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada en alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL..	72
Figura 79. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa libre .....	76
Figura 80. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con carbón activado .....	77
Figura 81. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado .....	78
Figura 82. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con alginato de sodio.....	79
Figura 83. Eficiencia catalítica para la variación de temperatura .....	80
Figura 84. Eficiencia catalítica para la variación de pH .....	80
Figura 85. Eficiencia catalítica para la variación de concentración inicial de sustrato .....	81

Figura 86. Inmovilización de invertasa con carbón activado.....	83
Figura 87. Inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado .....	83
Figura 88. Inmovilización de invertasa con alginato de sodio.....	84
Figura 89. Curva de calibración de la sacarosa para $0.05 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	177
Figura 90. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.05 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	177
Figura 91. Curva de calibración de la sacarosa para $0.10 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	178
Figura 92. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.10 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	178
Figura 93. Curva de calibración de la sacarosa para $0.15 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	179
Figura 94. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.15 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	179
Figura 95. Curva de calibración de la sacarosa para $0.20 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	180
Figura 96. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.20 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	180
Figura 97. Curva de calibración de la sacarosa para $0.40 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	181
Figura 98. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.40 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	181
Figura 99. Curva de calibración de la sacarosa para $0.60 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	182
Figura 100. Curva de calibración de glucosa y fructosa para $0.60 \pm 0.0005$ g/mL de sacarosa.....	182
Figura 101. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura $40 \pm 0.5^\circ$ C.....	183
Figura 102. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura $50 \pm 0.5^\circ$ C.....	183
Figura 103. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura $60 \pm 0.5^\circ$ C.....	184
Figura 104. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura $70 \pm 0.5^\circ$ C.....	185
Figura 105. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH $3 \pm 0.005$ ....	185
Figura 106. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH $6 \pm 0.005$ ....	186
Figura 107. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH $7 \pm 0.005$ ....	187
Figura 108. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH $9 \pm 0.005$ ....	187
Figura 109. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005$ g/mL.....	188
Figura 110. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005$ g/mL.....	189
Figura 111. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL.....	189
Figura 112. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL.....	190
Figura 113. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura $40 \pm 0.5^\circ$ C.....	191

Figura 114. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	191
Figura 115. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	192
Figura 116. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	193
Figura 117. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH $3 \pm 0.005$ .....	193
Figura 118. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH $6 \pm 0.005$ .....	194
Figura 119. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH $7 \pm 0.005$ .....	195
Figura 120. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH $9 \pm 0.005$ .....	195
Figura 121. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	196
Figura 122. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	197
Figura 123. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	197
Figura 124. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	198
Figura 125. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	199
Figura 126. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	199
Figura 127. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	200
Figura 128. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .....	201
Figura 129. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $3 \pm 0.005$ .....	201
Figura 130. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $6 \pm 0.005$ .....	202
Figura 131. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $7 \pm 0.005$ .....	203
Figura 132. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH $9 \pm 0.005$ .....	203
Figura 133. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .....	204

Figura 134. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.20 \pm 0.0005$ g/mL .....	205
Figura 135. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL .....	205
Figura 136. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL .....	206
Figura 137. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura $40 \pm 0.5^\circ$ C .....	207
Figura 138. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura $50 \pm 0.5^\circ$ C .....	207
Figura 139. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura $60 \pm 0.5^\circ$ C .....	208
Figura 140. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura $70 \pm 0.5^\circ$ C .....	209
Figura 141. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH $3 \pm 0.005$ .....	209
Figura 142. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH $6 \pm 0.005$ .....	210
Figura 143. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH $7 \pm 0.005$ .....	211
Figura 144. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH $9 \pm 0.005$ .....	211
Figura 145. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.10 \pm 0.0005$ g/mL .....	212
Figura 146. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.15 \pm 0.0005$ g/mL .....	213
Figura 147. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.40 \pm 0.0005$ g/mL .....	213
Figura 148. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de $0.60 \pm 0.0005$ g/mL .....	214
Figura 149. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre .....	215
Figura 150. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con carbón activado .....	215
Figura 151. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado .....	216
Figura 152. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado .....	216
Figura 153. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado .....	217
Figura 154. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con alginato de sodio .....	217
Figura 155. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio .....	218

Figura 156. Invertasa utilizada durante la experimentación .....	221
Figura 157. Acetato de calcio utilizado para preparar el buffer utilizado durante la experimentación .....	222
Figura 158. Cloruro de calcio utilizado para la inmovilización por atrapamiento con alginato de sodio .....	222
Figura 159. Alginato de sodio utilizado para la inmovilización por atrapamiento.....	222
Figura 160. Carbón activado utilizado para la inmovilización por adsorción .....	223
Figura 161. Hidróxido de sodio utilizado para la funcionalización del PHA.....	223
Figura 162. Glutaraldehído utilizado para la funcionalización del PHA.....	223
Figura 163. Ácido acético utilizado para ajustar el pH del buffer de acetato de calcio durante la experimentación .....	224
Figura 164. Balanza de laboratorio utilizada durante la experimentación.....	224
Figura 165. Balanza de laboratorio utilizada durante la experimentación.....	224
Figura 166. Baño térmico utilizado durante la experimentación .....	225
Figura 167. Refractómetro utilizado durante la experimentación.....	225
Figura 168. Microscopio electrónico de barrido del Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso .....	225
Figura 169. Cristalería utilizada para las inmovilizaciones enzimáticas .....	226
Figura 170. Proceso de inmovilización de invertasa con alginato de sodio .....	226
Figura 171. Inmovilización de invertasa con carbón activado.....	226
Figura 172. Inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado .....	227
Figura 173. Inmovilización de invertasa con alginato de sodio.....	227
Figura 174. Muestra de la inmovilización con PHA funcionalizado al ser analizada con el microscopio electrónico de barrido.....	227

## LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación 1. Mecanismo de reacción para reacciones enzimáticas .....	14
Ecuación 2. Ecuación de Michaelis-Menten.....	14
Ecuación 3. Mecanismo para una reacción enzimática inhibida por sustrato.....	16
Ecuación 4. Ecuación de Haldane.....	17
Ecuación 5. Expresión recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten.....	17
Ecuación 6. Ecuación de Arrhenius .....	18
Ecuación 7. Linealización de la ecuación de Arrhenius .....	18
Ecuación 8. Modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa .....	72
Ecuación 9. Modelo general con inhibición por sustrato de la hidrólisis de sacarosa con invertasa.....	73
Ecuación 10. Propagación de error de multiplicación y división .....	175
Ecuación 11. Desviación estándar .....	176

## RESUMEN

La invertasa es una enzima usada en la elaboración del jarabe invertido, muy usado en la industria alimentaria y en la licorera. Por lo tanto, este trabajo de graduación pretende realizar una evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial, utilizando tres métodos de inmovilización. Para el efecto, primero se determinan las condiciones de operación de la enzima libre, llevando a cabo la hidrólisis de sacarosa a diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración inicial de sacarosa, donde se obtuvo la tendencia esperada de disminución de sustrato y aumento de producto para una cinética tipo Michaelis-Menten. Posteriormente se realiza la inmovilización de la invertasa por medio de alginato de sodio, carbón activado y PHA funcionalizado, se determinan los rendimientos de inmovilización de los tres métodos, que fueron  $26.38 \pm 0.006\%$  para el carbón activado,  $31.45 \pm 0.006\%$  para el PHA funcionalizado y  $69.75 \pm 0.007\%$  para el alginato de sodio, por lo que el alginato de sodio es el más efectivo a escala laboratorio. Finalmente se evaluaron las condiciones de operación para la enzima inmovilizada con los tres soportes, donde se observa la tendencia cinética de Michaelis-Menten, pero con comportamientos más lentos en condiciones en donde no existe desnaturalización por temperatura o pH, o inhibición por sustrato. Se recomienda evaluar otras matrices o técnicas de inmovilización enzimática y su efecto sobre la eficiencia catalítica de la invertasa en la hidrólisis de sacarosa.

# I. INTRODUCCIÓN

Los crecientes avances industriales han aumentado el uso de compuestos tóxicos, lo que ha llevado a la contaminación ambiental. Debido a esto, los biocatalizadores industriales aparecieron como una solución potencial, incrementando la demanda de enzimas, para sustituir a los químicos. Sin embargo, la mayoría de las enzimas comerciales disponibles son de origen mesófilo, por lo que tienen una actividad óptima en rangos limitados de pH y temperatura. Esto limita su aplicación y se requieren grandes cantidades para compensar la pérdida de actividad (Espina et al., 2022).

A raíz de esto, se están buscando métodos para aumentar la resistencia de las enzimas a cambios de condiciones de operación, con el fin de mejorar su uso en la industria. La inmovilización enzimática, que consiste en confinarlas en un soporte que limita su movimiento, sin afectar su poder catalítico, hace que su estructura terciaria sea más rígida, permitiendo que resista la desactivación térmica y química (Flores, 2011). Esto, además, aumenta su estabilidad, por lo que estas se mantienen de forma insoluble y pueden reutilizadas (El-Sayed et al., 2015). Esto resulta en un aumento en su disponibilidad y rendimiento por ciclos de operación en diversos sectores industriales (Meneau, Borrego, & Liva, 2021)

Sin embargo, la inmovilización enzimática puede presentar desventajas. Entre estas se encuentra la disminución de la actividad específica de los biocatalizadores en comparación con la enzima libre. Además, se presenta un aumento en los costos iniciales debido a los equipos y reactivos necesarios para llevar a cabo el proceso de inmovilización, y que estas suelen tener un bajo rendimiento. También, se limita la difusión de sustratos hacia la enzima, lo que puede disminuir la velocidad de reacción y la eficiencia del proceso. Pese a que, a corto plazo, la estabilidad de la enzima mejora, a largo plazo esta puede disminuir debido a contaminación, degradación o desnaturalización debido a su unión al soporte. La inmovilización tiende a tener bajos rendimientos Finalmente, el encontrar el soporte adecuado para el proceso puede ser un reto, ya distintas enzimas pueden reaccionar de manera distinta a diferentes soportes y condiciones de inmovilización (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

Los azúcares invertidos se obtienen al descomponer la sacarosa en sus dos elementos básicos, mediante una reacción enzimática o una hidrólisis ácida (Balandin, 2016). Estos

tienen un poder edulcorante 30% mayor que la sacarosa y aceleran los procesos fermentativos. Estos usualmente se obtienen mediante el uso de invertasa, que es una hidrolasa que permite descomponer la sacarosa en glucosa y fructosa. Debido a esto, se utilizan ampliamente en la industria de alimentos, especialmente en la panadería y repostería, pues permiten disminuir costos, al poder utilizarse en una menor cantidad que la sacarosa. La presencia de fructosa y glucosa, que son sacáridos fermentables, como resultado de la inversión de la sacarosa, permite que se usen en la elaboración de cerveza y licores. El proceso de fermentación se vuelve más eficiente, pues las levaduras digieren mejor estos monosacáridos por separado, que la sacarosa (Lelia, 2017).

Debido a su amplio uso en la industria y que esta, actualmente no se puede reutilizar y es vulnerable a cambios de temperatura y pH, se ha desarrollado un interés por la inmovilización de la invertasa. En este trabajo se presenta un estudio de la inmovilización enzimática, en donde se encontrará a través de las diferentes secciones información sobre sus condiciones de operación en estado libre, los rendimientos de inmovilización que se obtienen al utilizar tres soportes catalíticos y sus condiciones de operación luego de las distintas inmovilizaciones.

## II. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Realizar una evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial, utilizando tres métodos de inmovilización.

### B. ESPECÍFICOS

1. Estudiar el comportamiento de la invertasa libre para hidrolizar sacarosa en las principales condiciones que afecten su funcionalidad, para establecer su rango de operación.
2. Comparar el rendimiento del proceso de inmovilización con tres métodos y soportes distintos para determinar la efectividad del proceso a escala laboratorio.
3. Estudiar el comportamiento de la invertasa inmovilizada, para hidrolizar sacarosa, con tres distintos métodos y soportes, para establecer su rango de operación, y compararlo con el de la enzima libre.

### III. JUSTIFICACIÓN

El mercado global de estas ha alcanzado los \$8.63 mil millones anuales para el 2019 y se espera que este alcance los \$14.5 mil millones para el 2027 (Espina et al., 2022). Actualmente se producen más de 500 toneladas de enzimas inmovilizadas para uso industrial, anualmente (Basso & Serban, 2019). La biocatálisis ha permitido la aplicación de las enzimas en un rango amplio de industrias. Uno de sus principales objetivos es la reducción del uso de compuestos químicos y lograr la fabricación sostenible de productos de consumo. Además, el uso de enzimas presenta ventajas sobre los catalizadores inorgánicos tradicionales por su elevada especificidad y estereoselectividad. Sin embargo, el uso de estos biocatalizadores no es tan amplio en la industria debido a su limitada estabilidad y lo complicada que puede ser su separación de los sustratos y productos de la reacción (Arroyo, Acebal, & Mata, 2014).

En Guatemala, se producen entre 57 y 58 millones de quintales de azúcar al año, siendo el tercer país con mayor productividad a nivel mundial (Asazgua, 2021). Además, se produce melaza en grandes cantidades. Se exportan 250,000 toneladas métricas al año, lo que equivale al 45% de la producción total. El otro 55% se destina al consumo local (Noack, 2022). Los ingenios de Guatemala producen 55 millones de galones de alcohol al año, teniendo los jarabes y la melaza invertida como materia prima (Asazgua, 2021). La elaboración de los azúcares invertidos se realiza mediante la invertasa, una enzima muy usada industria alimentaria y en la licorera, pues se usa en degradación de azúcares que se fermentarán, para producir etanol. Esta es la encargada de catalizar la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa (Sainz-Polo, Ramírez, & Lafraya, 2013).

Actualmente, al utilizar la invertasa en el proceso de producción de jarabe invertido, no existe una forma de recuperarla y esta se va en el producto terminado. Las enzimas grado industrial suelen tener un precio alto, por lo que el no poder reutilizarlas, representa un alto costo para los ingenios. Una posible solución es utilizar un soporte catalítico para inmovilizar la invertasa y de esta manera, recuperarla y utilizarla en varios ciclos. Sin embargo, no se encontraron estudios previos que den el soporte a la introducción de matrices y la inmovilización adecuada de esta enzima. Por esta razón, en este trabajo de graduación se hace un estudio en donde se pretende encontrar el rendimiento del proceso de inmovilización enzimática y las condiciones de operación que permiten trabajar con tres matrices distintas. Esto pretende ser un primer avance para poder posteriormente analizar el escalamiento el proceso, realizar pruebas con otras matrices de inmovilización o abrir brecha para que se planteen otros estudios para el mejoramiento del uso industrial de la invertasa.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. ENZIMAS

Las proteínas son biomoléculas formadas por carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno. La mayoría también contienen azufre y algunas pueden tener fósforo, cobre, zinc, hierro, etc. Son polímeros de aminoácidos, compuestos por un grupo amino y otro carboxilo o ácido unidos a un carbono  $\alpha$ . Este carbono tiene una estructura tetraédrica por lo que sus otras dos valencias se completan con un átomo de hidrógeno y un grupo químico variable. Para formar las proteínas, los aminoácidos se deben unir linealmente por enlaces peptídicos, formados por la reacción de síntesis entre el grupo carboxilo del primer aminoácido y el grupo amino del segundo y así, sucesivamente hasta formar una cadena larga (Luque, 2017).

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica. Se caracterizan por su alta especificidad y requieren condiciones idóneas para poder llevar a cabo su función (El-Sayed et al., 2015). Estas determinan los patrones de las transformaciones químicas que ocurren en sistemas biológicos y aceleran las reacciones. Tienen un sitio activo, la región complementaria a la estructura del sustrato y cuando se unen que aumenta la velocidad con la que se forma el producto. Se pueden desnaturalizar por una variedad de factores como calor, ácidos fuertes, metales pesados y detergentes. Son solubles en agua, por lo que luego no se pueden separar con facilidad y no se pueden volver a usar. Por estas razones, no son usadas frecuentemente en la industria (Martínez & Morales, 2007).

#### 1. Estructura

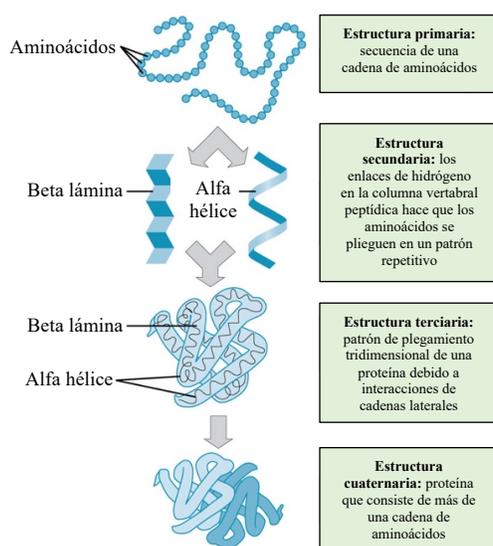
Todas las proteínas tienen la misma estructura química central que consiste en una cadena de aminoácidos. Sin embargo, la secuencia de estos cambia, permitiendo que se diferencien entre sí. Esta secuencia es la estructura primaria, el número de aminoácidos y el orden en el que estos se enlazan covalentemente por enlaces peptídicos. Se da por la variación en la que se unen los 20 aminoácidos existentes y en base a esto, se determina la función que esta tendrá. La comprensión de la estructura primaria también da entendimiento a algunas enfermedades que pueden ser causadas por una anomalía en la secuencia que evita que esta lleve a cabo su función correctamente. Esta se codifica en el ADN y usualmente se necesitan entre 80 y 300 aminoácidos para una proteína (Luque, 2017).

Su estructura secundaria es el plegamiento de la cadena polipeptídica debido a los puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Estos se establecen entre los grupos -CO- y -NH- del enlace, de forma que la cadena puede adoptar conformaciones de menor energía libre que son más estables. Existen diversos tipos, como las alfa hélice en donde esta se enrolla en espiral sobre sí misma debido a los giros producidos en torno al carbono alfa de cada aminoácido. También están las hojas beta, cuando la cadena se estira al máximo que permiten sus enlaces covalentes. Las láminas beta son regiones que adaptan una estructura en zigzag y se asocian entre sí mediante enlaces de hidrógeno intercatenarios que les brindan gran estabilidad (Luque, 2017).

La disposición tridimensional de todos los átomos que componen a las proteínas se conoce como estructura terciaria. Esta es la responsable directa de las propiedades biológicas, ya que la disposición espacial de los distintos grupos funcionales determina cómo va a interactuar con los diversos ligandos. Hay dos tipos, la fibrosa en las que la que los elementos de la estructura secundaria no deben incurrir en grandes modificaciones, solo ligeras torciones, y las globulares que tienen una estructura esférica. Las fuerzas que se encargan de estabilizar estas estructuras se establecen entre las distintas cadenas laterales de los aminoácidos que la componen y pueden ser covalentes o no covalentes (Luque, 2017).

Cuando esta se conforma de más de una cadena polipeptídica, o es una proteína oligomérica, tiene estructura cuaternaria. Esta se deriva de la conjunción de las cadenas, que posee propiedades distintas a la de cada componente y se unen por enlaces no covalentes. Esta modula la actividad biológica de la proteína y cuando se separan sus subunidades, resulta en la pérdida de su funcionalidad. Las mismas fuerzas que estabilizan la estructura terciaria se encargan de mantener unidas las cadenas (Luque, 2017).

Figura 1. Niveles de estructura proteica



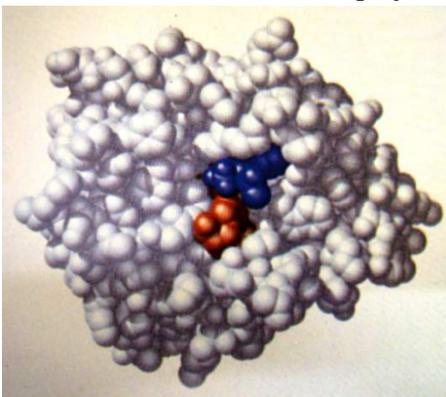
Fuente: Boudless (2022).

Las enzimas son proteínas globulares, que se forman a partir de una o más cadenas de polipéptidos, plegadas. Estas presentan todos los rasgos estructurales de este tipo de biomoléculas. La conformación tridimensional nativa intacta le permite realizar su función. Estas presentan un centro activo mediante el cual interactúan con las moléculas del ligando, también conocido como sustrato. Las superficies de ambos tienen formas complementarias, lo que permite un acoplamiento espacial, y tienen grupos funcionales complementarios que establecen interacciones débiles entre sí, por lo que también hay una unión química. Es esta interacción específica entre ambos la que permite que la actividad catalítica y el alto grado de especificidad de las enzimas, se hagan presentes (Porto, 2014).

El centro activo es una cavidad en la superficie de la enzima recubierta por aminoácidos. Estos no se encuentran contiguos a la cadena polipeptídica, sino que ocupan posiciones alejadas de esta. Los aminoácidos coinciden próximos entre sí, cerca del centro activo debido al plegamiento característico de la cadena, es decir, su estructura terciaria. Existen dos categorías de estos. Los primeros son aminoácidos catalíticos, cuyas cadenas laterales R poseen cualidades químicas que les permiten desarrollar una función catalítica. Luego, están los de unión, cuyas cadenas laterales R poseen grupos funcionales que pueden establecer interacciones débiles con los complementarios de la molécula de sustrato. Se encargan de fijar el sustrato al centro activo en la posición adecuada para que los catalíticos puedan actuar. El resto de los aminoácidos en la cadena polipeptídica de la enzima no forman parte del centro activo, pero se encargan de mantener intacta su conformación tridimensional sin la que se perderían las propiedades de esta proteína (Porto, 2014).

La configuración tridimensional del centro activo se complementa con la del sustrato y tienen una distribución complementaria de sus cargas sobre la superficie de unión. Por lo tanto, si una región del sustrato tiene una carga positiva, su zona correspondiente en el sitio activo debe tener una carga negativa y viceversa. Son pocos los aminoácidos implicados en el centro activo y la proximidad entre estos se determina por la estructura terciaria, aunque se pueden encontrar en posiciones adyacentes de su estructura primaria. Cuando una enzima tiene estructura cuaternaria, los aminoácidos del centro activo pueden estar en distintas cadenas. A continuación, se puede observar la representación de una enzima con un sustrato, color azul, unida al centro activo con un aminoácido clave complementario del sitio activo, que representa de color rojo (Lera, 2011).

Figura 2. Representación visual de un complejo enzima-sustrato



Fuente: Lera (2011).

## 2. Propiedades

Las enzimas logran catalizar reacciones con velocidades de reacción altamente elevadas. Al ser un catalizador, disminuyen la energía de activación que requiere la reacción. La forma y distribución de su sitio activo limitan los movimientos y conformaciones permitidas del sustrato, orientándolo de forma óptima. Esto resulta en que el complejo enzima-sustrato se convierta en producto y en energía libre sin requerimiento de la alta energía del estado de transición. Estas se caracterizan por lo alterar el equilibrio de la reacción, sino que aumentan la velocidad hacia el equilibrio (McKee & McKee, 2013).

Otra característica importante es su alta especificidad, ya que, a diferencia de los catalizadores inorgánicos, solo llevan a cabo una reacción y rara vez producen productos secundarios. Originalmente, esta se explicaba mediante el modelo de llave y cerradura, propuesto por Emil Fischer en 1890. Este establece que cada enzima se une a un tipo específico de sustrato debido a que el sitio activo y el ligando poseen estructuras complementarias. Otro modelo, propuesto por Daniel Koshland, conocido como modelo del ajuste inducido considera que la estructura de las proteínas es flexible, por lo que las interacciones no covalentes entre ambos modifican la estructura tridimensional del sitio activo, conformando la forma de este con la del sustrato (McKee & McKee, 2013).

Además, estas tienen estructuras relativamente grandes, por lo que pueden regularse. Los ajustes de velocidad de las reacciones que estas catalizan permiten a las células responder de manera eficiente a los cambios en el ambiente. Los organismos controlan directamente las actividades enzimáticas, principalmente mediante la unión de activadores o inhibidores, o indirectamente, regulando la síntesis de estas proteínas. Esta propiedad es muy importante en los seres vivos, pues estos deben conservar energía y materias primas (McKee & McKee, 2013)

### 3. Funciones

La Unión Internacional de Bioquímica (UBI) instituyó un esquema de denominación sistemática para las enzimas. En esta, se clasifican y se nombran en base a la clase de reacción que cataliza. A cada una se le asigna una clasificación de cuatro números y un nombre sistemático que consiste de dos partes. Dentro de esta, hay seis categorías principales. La primera son las oxidoreductasas que catalizan reacciones redox en las cuales se cambia el estado de oxidación de uno o más átomos de una molécula. Esto implica reacciones de transferencia de electrones y una compensación que ocurre mediante el cambio de oxígenos e hidrógeno (McKee & McKee, 2013)

Otra, son las transferasas, que transfieren grupos moleculares, como amino, carboxilo y carbonilo, de una molécula donadora a una aceptora. Las hidrolasas, catalizan reacciones en las que se adiciona agua y esto genera la ruptura de enlaces, como el carbono-oxígeno y el carbono-nitrógeno. La cuarta clasificación es la de las liasas, que catalizan reacciones en las que se eliminan grupos para forman un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Las isomerasas catalizan varios tipos de reordenamientos intramoleculares. Entre estas se encuentran las epimerasas, que catalizan la inversión de átomos de carbono asimétricos y las mutasas, que lo hacen con la transferencia de grupos intramoleculares. Finalmente, están las ligasas, que catalizan la formación de enlaces entre dos moléculas de sustrato (McKee & McKee, 2013).

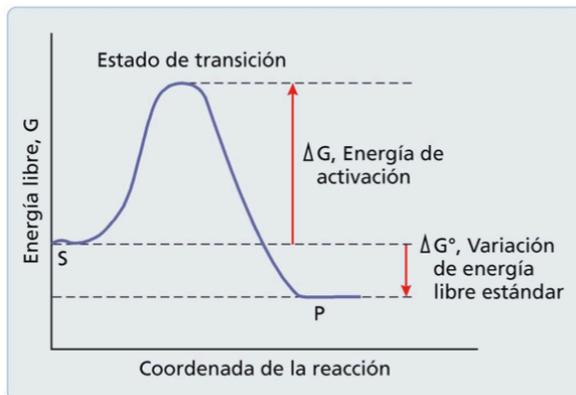
### 4. Actividad enzimática

La acción de las enzimas es necesaria para los seres vivos, ya que las reacciones sin catalizadores suelen ser lentas. Además, las moléculas no suelen cambiar en ambientes estables, como el medio biológico, por lo que estas proteínas permiten contrarrestar la lentitud al realizar el cambio. Las reacciones dependen de las leyes de la termodinámica, entre ellas, la deducción de si esta se desarrollará de manera espontánea o no, dependiendo del cambio en la energía de Gibbs, que viene de la segunda ley de la termodinámica. Para que se lleve a cabo la transformación de un sustrato a un producto, la energía debe ser negativa, lo que implica que la energía libre del producto debe ser menor (Merino & Noriega, 2011).

En una reacción química, la conversión de sustrato en producto requiere de un estado de transición, que es una situación energética intermedia. La diferencia entre el nivel de energía basal y el del estado de transición se conoce como energía de activación. Entre mayor sea esta, menor será la velocidad de reacción. Por lo tanto, la función de las enzimas es disminuir esta energía, para aumentar la velocidad con la que se lleva a cabo la transformación del sustrato a producto. Sin embargo, este cambio no genera una modificación en el equilibrio, que sigue las leyes de la termodinámica independientemente de si hay un catalizador presente o no (Merino & Noriega, 2011). Estas no cambian si durante la reacción se absorbe o se libera

energía en general, ya que no afectan la energía libre de los reactivos y productos. La energía que disminuyen es la del estado de transición, que es un estado que atraviesan los reactivos para convertirse en productos (Lera, 2011)

Figura 3. Modelo energético de una reacción

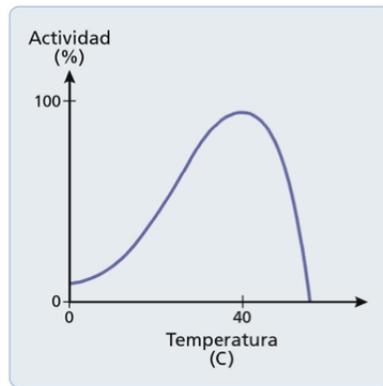


Fuente: Merino & Noriega (2011).

Estas son proteínas que funcionan en un medio determinado, que puede ser intra o extracelular. Por lo tanto, variaciones en las condiciones pueden afectar el nivel de actividad de la molécula. Entre estas condiciones se encuentra el pH, ya que, dependiendo de este, el medio en el que se encuentren puede o no tener una carga positiva o negativa. Estas sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína, ya que este se conforma de aminoácidos con grupos radicales ionizables. Por lo tanto, cuando este cambia, también se modifica la estructura de la enzima, y esto puede llevar a la desnaturalización de la misma, que resulta en la pérdida de su actividad. Por lo tanto, dependiendo del medio en el que deba realizar la catálisis, esta tendrá un pH óptimo en el cual tendrá una actividad máxima; valores inferiores o superiores a este causan una disminución en su capacidad catalítica (Merino & Noriega, 2011).

La temperatura presenta dos efectos en estas, ya que un aumento produce un aumento en la velocidad de cualquier reacción química. Sin embargo, al superar determinada temperatura, las enzimas presentan una desnaturalización y pérdida de actividad. Por lo tanto, determinar el valor óptimo suele ser complicado y las curvas de actividad presentan un incremento inicial de actividad más pronunciado, pero luego al experimentar desnaturalización, decrece la actividad enzimática (Merino & Noriega, 2011).

Figura 4. Curva de actividad enzimática



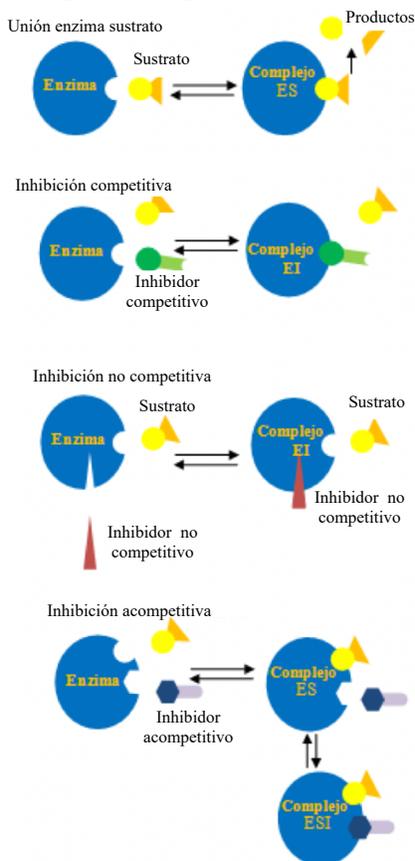
Fuente: Merino & Noriega (2011).

## 5. Inhibición

Los inhibidores disminuyen o anulan la velocidad de las reacciones que catalizan las enzimas. La inhibición puede ser reversible o irreversible, dependiendo del efecto que se tenga sobre la enzima. Existen tres tipos de inhibidores reversibles, siendo el primero la inhibición competitiva. Algunos compuestos inhiben la actividad enzimática ocupando de manera temporal el centro activo de la enzima. Esta se conoce como competitiva porque el inhibidor es un compuesto similar al sustrato, por lo que estos compiten por unirse al centro activo. El resultado de esta depende de la cantidad de moléculas de sustrato e inhibidor que están presentes (Lera, 2011).

Otro tipo es la inhibición no competitiva, en la que el inhibidor no se parece al sustrato, sino que se une a la enzima en un sitio distinto al centro activo. Esta unión no bloquea la fijación del sustrato, sin embargo, inactiva la enzima sin importar que este esté presente o no. Esta acción también es reversible. La inhibición acompetitiva o incompetitiva implica que el inhibidor se fija en un sitio distinto al centro activo, pero únicamente cuando ya se ha formado el complejo enzima-sustrato. Por otra parte, algunos inhiben a las enzimas de manera irreversible, ya que se unen permanentemente a los grupos funcionales del centro activo o desnaturalizan a la proteína. Estos inhibidores, conocidos como “inactivadores basados en el mecanismo”, son compuestos que al inicio dejan que la reacción enzimática ocurra normalmente, pero al ser transformados, se convierten en compuestos altamente reactivos que se combinan irreversiblemente con la enzima (Lera, 2011).

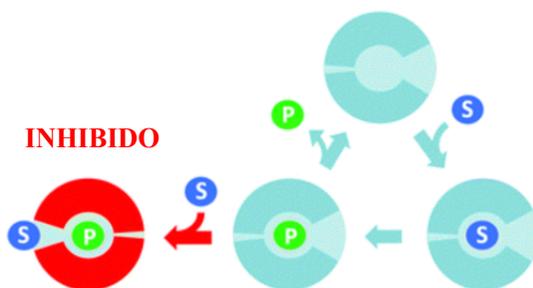
Figura 5. Tipos de inhibición



Fuente: Lera (2011).

La inhibición por sustrato es un fenómeno común que afecta a alrededor del 25% de las enzimas conocidas. En este, en lugar de alcanzar un equilibrio de estado estacionario a la velocidad máxima de reacción, el exceso de sustrato presente en el medio comienza a inhibir la reacción. El modelo de Haldane propone que esto ocurre debido a la presencia de dos sitios de unión al sustrato, de los cuales, solo uno es catalítico. La unión del sustrato en el otro sitio de unión ya sea en la enzima vacía o en el complejo enzima-sustrato forma un complejo inhibitorio en el que la reacción catalizada se vuelve muy lenta (Kakkonen et al., 2021).

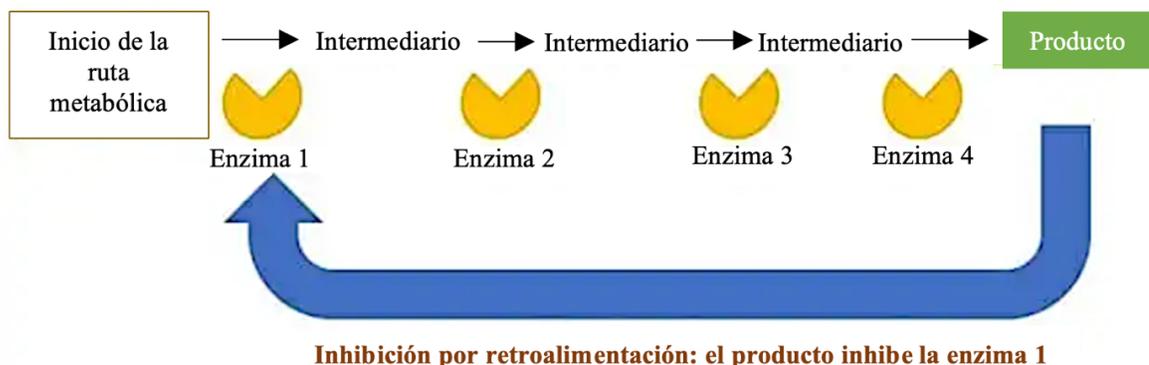
Figura 6. Inhibición por sustrato



Fuente: Kakkonen et al. (2021).

La inhibición por retroalimentación es un mecanismo en el que la actividad enzimática es inhibida por el producto final de la reacción. Es común en procesos bioquímicos complejos de varios pasos, que requieren múltiples reacciones catalizadas por enzimas para pasar del sustrato inicial al producto. Normalmente, la inhibición actúa sobre la primera enzima de esta vía (Mira, 2021).

Figura 7. Inhibición por retroalimentación



Fuente: Mira (2012).

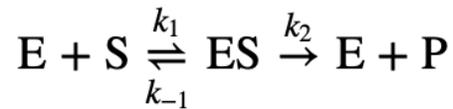
## 6. Cinética enzimática

Es el estudio cuantitativo de la catálisis enzimática y proporciona información sobre las velocidades de reacción. También mide la afinidad de las enzimas por los sustratos y los inhibidores, además de proporcionar indicios sobre los mecanismos de reacción. Este ayuda a entender las fuerzas que regulan las vías metabólicas. Un término que se utiliza para describir una reacción es su orden, que se determina de forma empírica y se define como la suma de los exponentes de los términos de concentración en la expresión de la velocidad. Esta proporciona información sobre el mecanismo de reacción. Por ejemplo, una que sigue la cinética de primer orden, tiene una velocidad que depende del primer poder de la concentración de un único reactante y sugiere que el paso que limita la velocidad es una reacción unimolecular. Cuando la adición de un reactante no altera la velocidad de reacción, esta es de orden cero (McKee & McKee, 2013).

### a. Modelo de Michaelis-Menten

En 1913, Leonor Michaelis y Maude Menten propusieron un mecanismo para reacciones catalizadas por enzimas. En este, E es la enzima, S es el sustrato y P es el producto. En el primer paso, el sustrato se une al sitio activo de la enzima, formando un complejo enzima-sustrato (ES). En el segundo paso, el sustrato se convierte en producto y se libera la enzima (Tuckerman, 2022)

Ecuación 1. Mecanismo de reacción para reacciones enzimáticas



Fuente: Tuckerman (2022).

El modelo Michaelis-Menten define la velocidad de una reacción en términos de la concentración de enzima y sustrato. En este, se introdujo la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), que se determina por medios experimentales y es característica de cada enzima y sustrato, en condiciones específicas. Esta refleja la afinidad de la enzima por el sustrato. También, se definió una velocidad máxima que puede alcanzar la reacción ( $V_{max}$ ). Utilizando estos dos términos, se desarrolló la ecuación de Michaelis-Menten, que permite definir distintos aspectos del comportamiento enzimático (McKee & McKee, 2013).

Ecuación 2. Ecuación de Michaelis-Menten

$$r_0 = \frac{r_{max} [S]}{[S] + K_M} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + K_M}$$

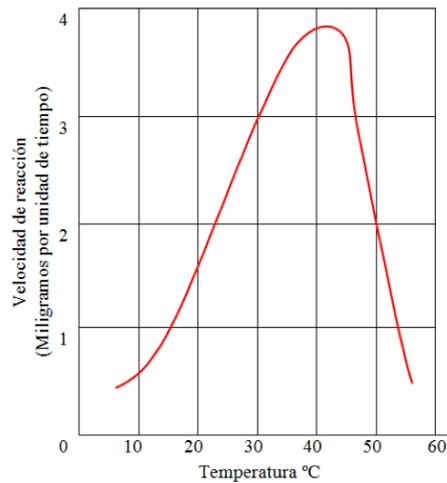
Fuente: McKee & McKee (2013).

En donde  $r_0$  es la velocidad de reacción a través del tiempo,  $r_{max}$  es la velocidad máxima de reacción,  $[S]$  es la concentración de sustrato,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten,  $k_2$  es la constante de velocidad y  $[E]_0$  es la concentración de enzima. El valor de  $k_2[E]_0$  representa la  $r_{max}$  a la que puede suceder la reacción (McKee & McKee, 2013).

b. Factores que afectan la velocidad de reacción

La temperatura y pH son factores que también afectan la velocidad de reacción. Cada enzima tiene una temperatura óptima de operación, por lo que por debajo o encima de esta, se ralentiza la velocidad de reacción. Generalmente, las enzimas presentan un aumento en la velocidad de reacción hasta que se alcanzan los 40° C y luego, esta cae rápidamente. Este aumento se produce porque a mayor temperatura, hay más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar y la posterior disminución se da debido a la desnaturalización de la enzima, ya que la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de los 60-70 °C (Lera, 2011).

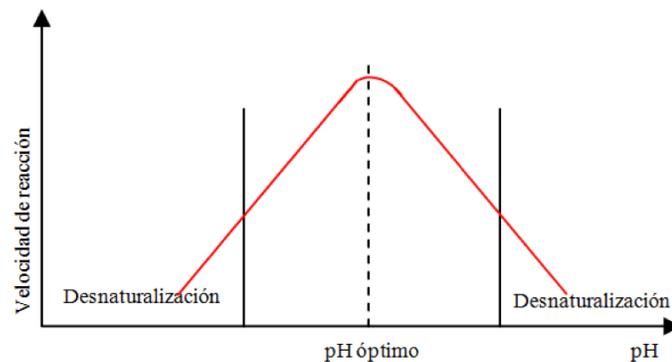
Figura 8. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática



Fuente: Lera (2011).

En cuanto al pH, cuando este varía, se altera la conformación de la enzima, produciendo un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo y este deja de ser funcional. La conformación de la enzima depende de las atracciones y repulsiones entre aminoácidos cargados negativamente y los que están cargados positivamente. Al representar gráficamente el efecto del pH sobre la velocidad de reacción existen dos tipos de curvas, una en la que la actividad enzimática es en pico, por lo que se necesita un control riguroso de pH, ya que el 100% de la actividad se encuentra en un rango pequeño y en los extremos, esta se desnatura. La segunda opción es que la enzima sea capaz de mantener una actividad superior al 75% alrededor de su pH óptimo (Lera, 2011).

Figura 9. Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática



Fuente: Lera (2011).

Otros factores que pueden limitar la actividad enzimática es la concentración de enzima, de sustrato y la disponibilidad de cofactores. Los cofactores son determinados iones minerales, como magnesio, zinc, cobre, etc. que forman enlaces con los radicales de ciertos aminoácidos y ayudan a mantener la estructura terciaria o estabilizar la estructura cuaternaria



La ecuación cinética correspondiente al modelo propuesto es análoga a la de Michaelis-Menten, pero contiene un término adicional en el denominador para explicar el complejo enzima sustrato que se forma, que es catalíticamente inactivo ( $ES_2$ ). Este tiene un efecto dramático en la forma de la curva de velocidad, debido a las altas concentraciones de sustrato, ya que la actividad disminuye debido a la formación del estado  $ES_2$  (Morrison, 2016).

Ecuación 4. Ecuación de Haldane

$$r_0 = \frac{r_{max} [S]}{[S] + K_M + \frac{[S]^2}{K_I}} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + K_M + \frac{[S]^2}{K_I}}$$

Fuente: Morrison (2016).

En donde  $r_0$  es la velocidad de reacción a través del tiempo,  $r_{max}$  es la velocidad máxima de reacción,  $[S]$  es la concentración de sustrato,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten,  $k_2$  es la constante de velocidad y  $[E]_0$  es la concentración de enzima. El valor de  $k_2[E]_0$  representa la  $r_{max}$  a la que puede suceder la reacción. Se incluye una nueva constante,  $K_I$  que surge de la formación del estado catalíticamente inactivo (Morrison, 2016).

#### d. Linealización de Lineweaver-Burk

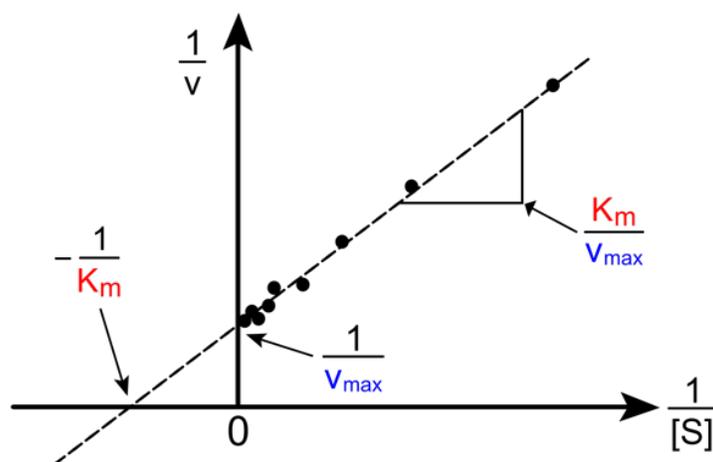
Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de la enzima se determinan midiendo las velocidades iniciales de reacción a varias concentraciones de sustrato. La ecuación de Michaelis-Menten tiene una gráfica con forma hiperbólica. Los valores aproximados de la  $K_m$  y  $V_{max}$  se pueden obtener con una transformación algebraica de los datos, reordenando la ecuación, para obtener su expresión recíproca. Se pueden trazar los recíprocos de las velocidades iniciales contra los recíprocos de las concentraciones de sustrato. El diagrama de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk permite realizar una linealización donde la pendiente de la recta es  $K_m/V_{max}$  (McKee & McKee, 2013)

Ecuación 5. Expresión recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Fuente: McKee & McKee (2013).

Figura 11. Diagrama de Lineweaver-Burk



Fuente: McKee & McKee (2013).

e. Ecuación de Arrhenius

De acuerdo con la teoría cinético-molecular de la materia, se sabe que un aumento en la temperatura causa un aumento en la energía cinética de las moléculas. Además, conforme aumenta la velocidad de las moléculas, también aumentará el número de choques entre ellas por unidad de tiempo, y por consiguiente, también lo hará con la velocidad. La ecuación de Arrhenius permite ligar la constante cinética de las reacciones químicas con la temperatura (Ripoll, 2013).

Ecuación 6. Ecuación de Arrhenius

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Fuente: Ripoll (2013).

Donde  $k$  es la constante cinética de la reacción,  $A$  es un factor de frecuencia que representa qué tan frecuentemente se presentan las colisiones,  $E_a$  es la energía de activación mínima que deben tener las moléculas para que se produzca la reacción,  $T$  es la temperatura y  $R$  es la constante de los gases ideales (Ripoll, 2013).

Ecuación 7. Linealización de la ecuación de Arrhenius

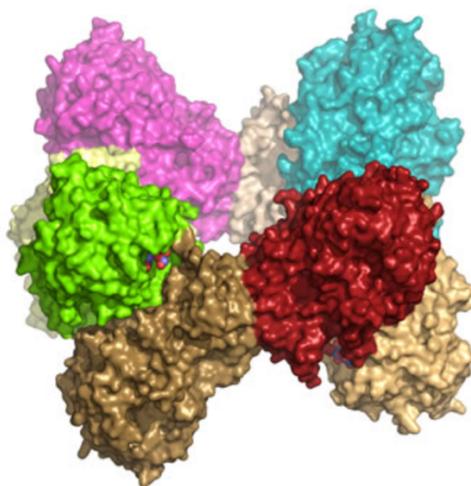
$$\ln k = -\frac{E_a}{R} * \frac{1}{T} + \ln A$$

Fuente: Ripoll (2013).

## 7. Invertasa

Esta también se conoce como  $\beta$ -D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) y es una enzima que hidroliza los restos terminales no reductores  $\beta$ -D-fructofuranosídicos de los fructofuranósidos. Entre los sustratos más comunes en los que se utiliza está la sacarosa, por lo que también se le puede denominar “sacarasa” y se obtiene como producto, un azúcar invertido, de donde viene su nombre más común, “invertasa”. En esta reacción, la sacarosa, que es dextrorrotatoria, se transforma en una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, que es levorrotatorio, lo que genera un cambio de signo en su valor de rotación óptica y adquiere el nombre de azúcar invertido. La invertasa se encuentra presente en microorganismos, plantas y animales, llevando a cabo un papel importante en el metabolismo de fructanos como la sacarosa, especialmente en organismos que la utilizan como fuente de carbono y energía (Tena & Jorrín, 2020). La invertasa intracelular tiene un peso molecular de 135,000 Daltons, mientras que el de la extracelular es de 270,000 Daltons (Buitrago, Prada, & Velázquez, 2015).

Figura 12. Estructura tridimensional de la invertasa



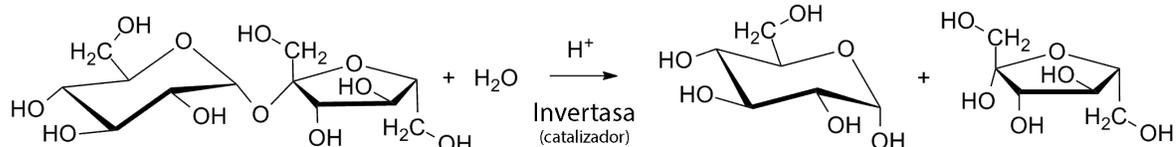
Fuente: Sainz-Polo, Ramírez & Lafraya (2013).

En 1842, Mitscherlich describió la existencia de una sustancia en la levadura que era capaz de convertir el azúcar de caña en un azúcar levorrotatorio, que, en 1847, se identificó como una mezcla de glucosa y fructosa. En 1860, Berthelot llevó a cabo el aislamiento de la invertasa. Se descubrió que esta estaba íntimamente asociada con las células de levadura, ya que para purificarla, se debían preparar extractos de levadura y esto llevó a que se creyera que esta es una proteína intracelular. Sin embargo, se descubrió que esta enzima es secretada por las levaduras y que la hidrólisis de la sacarosa ocurre extracelularmente (Sainz-Polo, Ramírez, & Lafraya, 2013).

Esta se clasifica dentro de la familia de las hidrolasas de glúcidos. Estas actúan mediante un mecanismo de retención en el que un aspartato que se ubica cerca del terminal N actúa

como el nucleófilo catalítico y un glutamato actúa como el catalizador general de ácido/base. La reacción ocurre por la unión del nucleófilo de aspartato a una unidad fructosilo del sustrato. El fructosilo luego se libera por hidrólisis o es transferido a un azúcar aceptor (Sainz-Polo, Ramírez, & Lafraya, 2013). Cuando se lleva a cabo una hidrólisis ácida, se logra una conversión del 50% a azúcares invertidos. Sin embargo, cuando se utiliza la invertasa, se logra reducirla completamente sin que se generen subproductos. El mecanismo de reacción de la hidrólisis se presenta a continuación (Nadaroglu & Setid, 2022).

Figura 13. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de sacarosa



Fuente: Nadaroglu & Setid (2022).

La invertasa se extrae de microorganismos, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae* para su uso comercial. Esta generalmente tiene una actividad óptima en un pH de entre 4.6 y 5.0, y a una temperatura de entre 45°C y 50°C. Además, suele funcionar mejor cuando se utiliza una concentración inicial de sustrato de 120 mM. Por encima de este valor, la concentración de sacarosa hace que la viscosidad del medio aumente demasiado, reduciendo la actividad enzimática en presencia de agua. (Ferreira et al., 2018). Valores de pH por encima de 7.6 ocasionan cambios en el punto isoeléctrico de la enzima e inhiben su capacidad catalítica. En cuanto a la temperatura, esta se inactiva reversiblemente por debajo de los 25°C, pero se desnaturaliza de manera irreversible por encima de los 55°C. La presencia de ciertos inhibidores, como el mercurio o las sales de mercurio, alteran su conformación estructural, inactivándola permanentemente. Otros potenciales inhibidores son las aminas aromáticas y los iones metálicos, que interactúan con los grupos reactivos de la enzima (Martínez & Morales, 2007).

A parte de su importancia en diversos estudios bioquímicos a lo largo de la historia, la invertasa tiene diversas aplicaciones industriales. Es una de las enzimas más utilizadas en la elaboración de dulces y durante la fermentación de la melaza de caña en etanol. Una nueva posible aplicación industrial es en la síntesis de fructooligosacáridos prebióticos en alimentos funcionales y en formulaciones farmacéuticas (Sainz-Polo, Ramírez, & Lafraya, 2013). También se utiliza para la elaboración de mieles artificiales, agentes plastificantes y productos cosméticos. Además, se utiliza en la industria de papel, como un biosensor para la detección de sacarosa (Ilyina & Aguilar, 2016).

## B. AZÚCARES

Los glúcidos, carbohidratos o azúcares son moléculas compuestas por cetonas o aldehídos polihidroxílicos, o derivados de estos debido a reacciones de oxidación, reducción, polimerización o sustitución. Estos llevan a cabo una variedad de funciones en los organismos, como una fuente energética, como material estructural de membranas, entre otros. Debido a la variedad de tareas que pueden llevar a cabo, se consideran moléculas muy versátiles. Dependiendo de su estructura estas se pueden dividir en categorías (Ramírez, 2018).

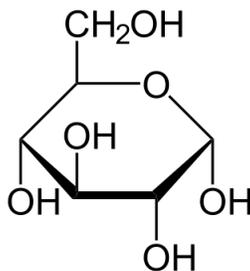
### 1. Monosacáridos

Estos pueden tener una función de aldehído cuando el grupo funcional carbonilo se encuentra en el primer carbón primario, o de cetona, cuando este está en el carbón secundario. Dependiendo de la longitud de su cadena, estos pueden ser aldo o cetotriosas, tetrasas, pentosas, etc. Las triosas son las moléculas más pequeñas que se consideran monosacáridos. Según su estructura, pueden presentar diferentes isomerías. Entre los monosacáridos principales se encuentran la glucosa, galactosa, manosa y fructosa (Ramírez, 2018).

#### a. Glucosa

Es una molécula no ionizada compuesta de 6 carbonos, 12 hidrógenos y 6 oxígenos ( $C_6H_{12}O_6$ ). Esta es una hexosa y es el monosacárido más abundante en la naturaleza. Es un polvo blanco y cristalino, que tiene un sabor dulce. Es altamente soluble en agua, su masa molar es de 180.16 g/mol y su punto de ebullición es de 150° C. Se encuentra naturalmente en frutas, pero está presente en varios alimentos, como los cereales procesados y es usada como endulzante. El cuerpo humano debe eliminar el exceso de glucosa, por lo que se usa en procesos metabólicos. El primero, es la glucólisis, en el cuál esta se degrada y se convierte en piruvato, que es el punto de partida para otros procesos de respiración celular. Estos procesos también permiten la generación de energía, por medio de la conversión de ADP en ATP (López & González, 2020)

Figura 14. Molécula de glucosa

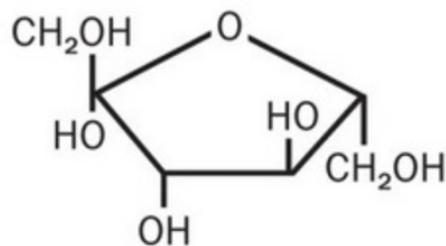


Fuente López & González (2020).

## b. Fructosa

Es un azúcar que se encuentra naturalmente en frutas, jugos de fruta, algunas verduras y en la miel. Al igual que la glucosa, se compone de 6 carbonos, 12 hidrógenos y 6 oxígenos ( $C_6H_{12}O_6$ ). Su punto de ebullición es de  $440^\circ C$  y tiene una masa molar de  $180.16 \text{ g/mol}$ . De todos los carbohidratos naturales, este es el más dulce. En el cuerpo, esta se digiere en el hígado, principalmente para producir glucosa y pequeñas cantidades de glucógeno, lactato y ácidos grasos. El alto consumo de fructosa puede causar cambios en el metabolismo energético del cuerpo. Esta proporciona energía por encima de las necesidades normales del cuerpo, lo que provoca un aumento de lípidos en la sangre (Eufic, 2020).

Figura 15. Molécula de fructosa



Fuente López & González (2020).

## 2. Oligosacáridos

Son polímeros de monosacáridos, cuando estos tienen diez o menos unidades. Los más comunes son los disacáridos. Estos tienen propiedades reductoras cuando uno de los hidroxilos anoméricos tiene un enlace glucosídico. Algunos ejemplos de oligosacáridos son la lactosa, sacarosa y maltosa (Ramírez, 2018).

### a. Sacarosa

La sacarosa o azúcar común es un disacárido formado por una molécula de alfa-glucosa y una de beta-fructosa. Esta se compone de 12 carbonos, 22 hidrógenos y 11 oxígenos ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ). Es un sólido, compuesto por cristales blancos y su punto de ebullición es de  $102^\circ C$ . Esta no es un azúcar reductor y es el edulcorante más utilizado para endulzar alimentos. En la naturaleza, el 20 % pesa la caña de azúcar y el 15 % de la remolacha azucarera. Se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores. Es un producto intermedio principal de la fotosíntesis. Al ser consumida, cuando llega al estómago sufre de hidrólisis ácida, por lo que se descompone en glucosa y fructosa. La que no logra hidrolizarse, pasa al intestino delgado, donde la invertasa se encarga de convertirla en azúcares invertidos (Lumitos, 2023).

### 3. Polisacáridos

Son polímeros de elevada masa molecular, que se forman por la condensación de monosacáridos simples que pueden llegar a presentar estructuras complejas. Estos suelen tener funciones estructurales o de reserva. Algunos son complejos, por lo que además de tener unidades glucosídicas, también contienen otras moléculas como lípidos, proteínas o secuencias peptídicas. Esta complejidad estructural les brinda una variedad de funciones (Ramírez, 2018).

### 4. Azúcares invertidos

Estos contienen proporciones de fructosa y glucosa aproximadamente iguales. Tiene una mayor demanda que la glucosa pura como edulcorante en la industria de alimentos y bebidas, debido a que la fructosa le proporciona mayor dulzor. Sus principales consumidores son las industrias de panificación, bebidas, conservas, confitería y lácteos. Este se prepara mediante la hidrólisis de sacarosa a glucosa y fructosa. Se pueden encontrar completa o parcialmente, en donde parte de los azúcares se dejan en forma de sacarosa. Un azúcar invertido parcialmente (50% sacarosa, 50% invertido) tiene una dulzura aumentada de 20% en comparación con el azúcar puro o el invertido puro. Esta dulzura adicional es beneficiosa al usarlo como edulcorante, pues se puede utilizar alrededor de un 20% menos (ScanCo, 2021).

Se conoce como miel artificial, pues su composición y propiedades son muy similares. El azúcar invertido enzimáticamente es un edulcorante saludable, que se obtiene mediante el uso de la invertasa. La fructosa puede ser consumida por pacientes diabéticos, ya que su metabolismo es independiente de la insulina. Además, al ser un 28-30% más dulce que el azúcar de mesa, se puede reducir la cantidad que se utiliza. Su elaboración no implica el uso de productos químicos o ácidos. La inversión enzimática tiene ventajas sobre la ácida, ya que esta presenta un rendimiento cercano al 100%, ocurre a bajas temperaturas por lo que tiene un bajo costo energético, no genera subproductos por lo que no requiere de purificación y se utilizan bajas dosis de enzima. Sin embargo, esta alternativa es más cara que la inversión ácida (ScanCo, 2021).

### 5. Producción de azúcar en Guatemala

En el 2021, se tuvo una producción de entre 2.6 y 2.7 toneladas métricas de azúcar. De acuerdo a la producción de la zafra, que inicia cada año en noviembre y termina en mayo, esto equivale a entre 57 y 58 millones de quintales de azúcar. Guatemala es el tercer país con mayor productividad en el mundo, con un promedio de 10.6 toneladas de azúcar por cada hectárea de caña que se cosecha. El área cultivada es de 250,662 hectáreas y de acuerdo con el Mapa de Cobertura Forestal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), esto representa el 3.3% del total de área cultivable en el país. Guatemala también es el segundo mayor exportador a nivel latinoamericano y el cuarto a nivel mundial. Los

principales mercados de exportación durante el período 2019-2020 fueron Canadá, Estados Unidos, Chile, China, Nueva Zelanda, Haití y Senegal. Las exportaciones de azúcar, alcohol y melaza representaron el 7% de las exportaciones totales del país en el 2019 (Asazgua, 2021).

## C. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización enzimática es cuando estas son confinadas en un soporte que limita su movimiento, pero no pierden su poder catalítico. Además, su estabilidad se ve aumentada y se mantienen en su forma insoluble, por lo que se pueden reutilizar varias veces (El-Sayed et al., 2015). La existencia de uniones multipuntuales entre el soporte y la enzima hacen que su estructura terciaria sea más rígida, permitiendo que resista la desactivación térmica o química. Sin embargo, existen algunas desventajas de este método, como la alteración de su conformación y la disminución o pérdida de su actividad. Esto se debe a que se puede impedir el paso del sustrato hacia el sitio activo o pueden ocurrir cambios que dan lugar a una forma inactiva o desnaturalizada de esta (Flores, 2011). Existen diversos métodos de inmovilización enzimática, tanto químicos como físicos.

### 1. Atrapamiento

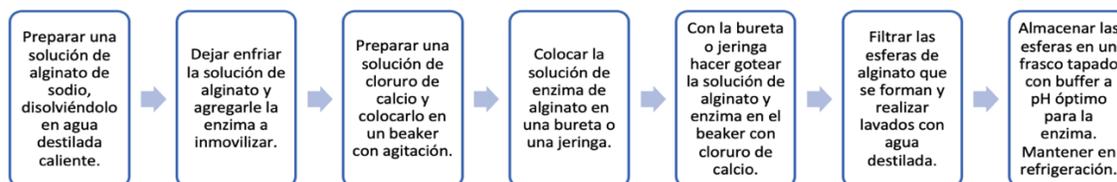
Es un método en el que la enzima se une de manera física al soporte (El-Sayed et al., 2015). Consiste en la retención de esta en las cavidades interiores de una matriz sólida, que se construye de polímeros como el colágeno, poliacrilamida o el alginato (Martínez & Morales, 2007). Para seleccionar el que se va a utilizar se debe considerar que este sea de un bajo costo y alta disponibilidad. Además, debe de poder maximizar la capacidad y actividad enzimática luego de la inmovilización. El alginato se extrae de diversas especies de algas marrones. Es de los más utilizados para alimentos porque es estable y de fácil espesamiento. Es el componente principal de la membrana y al combinarse con iones divalentes como el calcio, se induce la gelificación debido a que estos se entrecruzan con las unidades de ácido glucurónico en el alginato. El gel se forma de inmediato, pero se endurece más con el tiempo, por lo que es una metodología efectiva (Flores, 2011).

#### a. Alginato de sodio

Es una sal sódica derivada del ácido algínico, un polisacárido de origen natural que se extrae de las algas marinas (Regemat, 2011). Es eficaz para crear geles suaves, firmes y capaces de resistir diversas temperaturas. Disuelto en una mezcla líquida, reacciona rápidamente con otro líquido rico en calcio, como el cloruro de calcio o el gluconolactato; se gelifica de manera rápida, creando una estructura estable y resistente. Se utiliza en la industria de alimentos, como un espesante, emulsionante y mejorador de texturas. También, en la cocina molecular. En el área de salud, puede ayudar a combatir el reflujo y en el área de

cosméticos, sirve para estabilizar cremas. Usualmente se utiliza en soluciones de entre 0.2% a 2% (Lamya, 2022). Además, este se puede utilizar para inmovilizar enzimas, al atraparlas dentro de una matriz (Cabral et al., 2010).

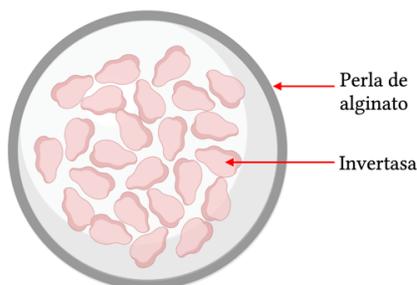
Figura 16. Proceso de inmovilización enzimática con alginato de sodio



Fuente: Cabral et al. (2010).

Este es un proceso general de cómo se realiza la inmovilización de una enzima con este método. Las cantidades de cada reactivo a utilizar varían dependiendo de la finalidad de la inmovilización y del tipo de enzima que se está utilizando. La elección entre usar una bureta o una jeringa para la inmovilización depende del tamaño de esferas que se desea obtener (Cabral et al., 2010).

Figura 17. Esquema de inmovilización de invertasa con alginato de sodio



Fuente: Elaboración propia

Al realizar este tipo de inmovilización se forman esferas de alginato, dentro de las cuales se atrapa la enzima. Esto se debe a que se hace una solución de alginato de sodio y la enzima y cuando el alginato entra en contacto con cloruro de calcio, este se gelifica, reteniendo la enzima dentro de este. En el esquema, se puede observar una ilustración de ejemplo de cómo se vería una enzima, la invertasa, retenida dentro de la esfera de alginato. No es una ilustración a escala.

## 2. Microencapsulación

Es un método de retención física en el que las enzimas están rodeadas por membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de la enzima. Estas membranas pueden ser no permanentes, es decir, generadas por surfactantes; o pueden ser permanentes, que son originadas por polimerización interfacial (Martínez & Morales, 2007).

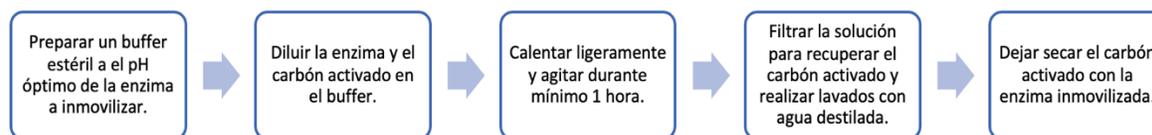
### 3. Adsorción

Es otro método físico que consiste en que la enzima se une a un soporte que no ha sido funcionalizado, mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Este se ve influenciado por diversos factores, como el pH, que controla el número y la naturaleza de las cargas en la superficie del soporte y de la enzima. La fuerza iónica también influye, pues cuando esta aumenta, se produce una desorción de la enzima, debido a que los iones inorgánicos se unen más fuertemente al soporte que a la proteína. El diámetro del poro es importante y debe ser aproximadamente dos veces mayor al tamaño del eje más grande de la enzima. Finalmente, si hay presencia de iones que actúen como cofactores de la proteína, también se ve afectada la inmovilización (Martínez & Morales, 2007).

#### a. Carbón activado

Es un polvo fino, negro e inoloro que se produce sobrecalentando las fuentes naturales del carbón, como la madera. Su fabricación lo hace extremadamente adsorbente, lo que permite unirse a moléculas, átomos y iones, que se encuentran disueltas, eliminándolas de la solución. El proceso de activación elimina el carbón de las moléculas adsorbidas con anterioridad y libera las áreas de unión. También, reduce el tamaño de los poros y genera mayor cantidad de orificios, aumentando el área de superficie. Se utiliza comúnmente en el tratamiento de emergencia por sobredosis o envenenamientos, debido a sus propiedades que permiten eliminar toxinas. Además, se utiliza como un filtro de agua natural, ya que elimina una gran cantidad de impurezas que esta contiene (Carter, 2020). Debido a sus propiedades adsorbentes, este es capaz de retener las enzimas que se encuentran en una solución en su superficie, siendo así un soporte viable para la inmovilización (Boukraa-Oulad, Kaddour, & Sadoun, 2010).

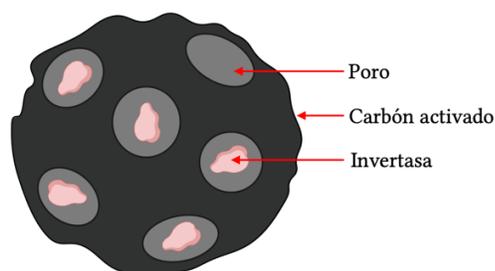
Figura 18. Proceso de inmovilización enzimática con carbón activado



Fuente: Boukraa-Oulad, Kaddour, & Sadoun (2010).

Este es un proceso general de cómo se realiza la inmovilización de una enzima con este método. Las cantidades de cada reactivo a utilizar varían dependiendo de la finalidad de la inmovilización y del tipo de enzima que se está utilizando. La temperatura a la cual se debe calentar la enzima depende de su temperatura de desnaturalización y el tiempo de agitación puede variar, pues un mayor tiempo favorece la adsorción de esta (Boukraa-Oulad, Kaddour, & Sadoun, 2010).

Figura 19. Esquema de inmovilización de invertasa con carbón activado



Fuente: Elaboración propia

El carbón activado es un material adsorbente. Esto se debe a que tienen poros, dentro de los cuales se retiene el sólido que se desea adsorber de una solución. Al realizar este tipo de inmovilización, la enzima es adsorbida por el carbón activado por lo que se retiene dentro de sus poros. En el esquema, se puede observar una ilustración de ejemplo de cómo se vería una enzima, la invertasa, retenida dentro de los poros de una partícula de carbón activado. No es una ilustración a escala.

#### 4. Unión covalente

Los métodos químicos son más utilizados. Entre estos, se encuentra la unión covalente, que se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que estos reaccionen con nucleófilos de las proteínas, permitiendo así la unión de ambos (Martínez & Morales, 2007).

##### a. Funcionalización

Es un proceso químico que inserta grupos funcionales a un material, que puede facilitar la incorporación de otras moléculas que pueden tener una variedad de aplicaciones (Santiago, 2020). En este, se crean grupos funcionales necesarios para que se pueda fijar un elemento biológico a la superficie que se está tratando. Se puede realizar este proceso utilizando glutaraldehído, que es comúnmente usado como un desinfectante frío, para limpiar equipo que es sensible al calor (NIOSH, 2001).

Figura 20. Proceso de inmovilización enzimática con un material funcionalizado



Fuente: El-Sayed et al., (2015)

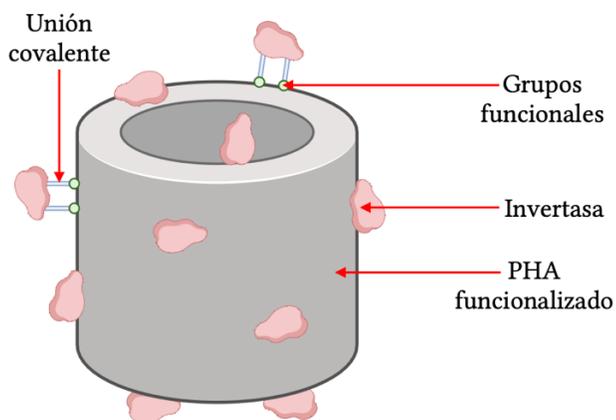
Este es un proceso general de cómo se realiza la inmovilización de una enzima con este método. Las cantidades de cada reactivo a utilizar varían dependiendo de la finalidad de la

inmovilización y del tipo de enzima que se está utilizando. Para realizar la inmovilización por unión covalente se pueden funcionalizar una gran variedad de materiales, media vez estos contengan grupos funcionales OH, y estos servirán como soporte para la inmovilización enzimática. Durante este proceso, se insertan grupos funcionales en la superficie del material, permitiendo que la enzima se una a este. La elección del material depende de las necesidades del proceso y de la disponibilidad de este. Además, el tiempo de agitación después de agregar el hidróxido de sodio depende del material, pues este paso sirve principalmente para causar su precipitación y facilitar el filtrado (El-Sayed et al., 2015).

#### b. Polihidroxialcanoato

Los polihidroxialcanoatos, también conocidos como PHA, son biopoliésteres que se sintetizan de manera intracelular en algunos microorganismos como una reserva de carbono y energía. Cuando se extraen de la célula, presentan características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo. Este se acumula cuando los microorganismos se encuentran en un desbalance de nutrientes, ya sirve como una reserva energética en condiciones de estrés. Se acumulan como polímeros líquidos, móviles y en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano, y su producción termina cuando alcanza cerca del 80% del peso seco total de la célula. (González, Meza, & Córdova, 2013).

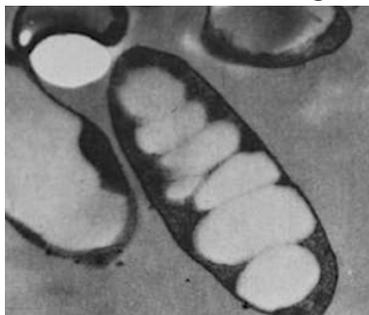
Figura 21. Esquema de inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado



Fuente: Elaboración propia

Al funcionalizar el PHA se agregan grupos funcionales en su superficie. Al utilizar esta técnica de inmovilización estos permiten que se forme una unión covalente entre los grupos funcionales y la enzima, reteniéndola en la superficie del material funcionalizado. En el esquema, se puede observar una ilustración de ejemplo de cómo se vería una enzima, la invertasa, unida covalentemente a la superficie del PHA funcionalizado. Además, se ejemplifica esta unión entre la enzima y los grupos funcionales. No es una ilustración a escala.

Figura 22. Célula bacteriana con gránulos de PHA



Fuente: Gonzáles, Meza, & Córdova (2013).

## 5. Entrecruzamiento

Otro método químico es el entrecruzamiento, muy utilizado para estabilizar muchas enzimas. Consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Entre estos se encuentran dialdehídos, diamonoésteres, sales de bisdiazonio y diisocianatos. El resultado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles que se vuelven más resistentes a condiciones extremas de pH y temperatura (Martínez & Morales, 2007).

## D. REFRACTOMETRÍA

Es un método para determinar el índice de refracción de una sustancia para evaluar su composición. Este depende de la temperatura y es característico de cada sustancia. Es una propiedad óptica de una sustancia y el número de partículas disueltas en esta. Por lo tanto, se define como la relación de la velocidad en un espacio vacío, en relación a la velocidad de la luz que pasa a través de una sustancia. La luz se desvía cuando viaja a través de una sustancia (Hanna Instruments, 2019).

Los refractómetros son instrumentos de medición en los que se pone en práctica este fenómeno de desviación de luz. Se basan en el principio de que, al aumentar la densidad de una sustancia, el índice de refracción aumenta de manera proporcional. Existen dos tipos: los sistemas transparentes y los de reflexión. Los refractómetros portátiles y los de tipo Abbe cuentan con sistemas transparentes. Por otra parte, los digitales utilizan el de reflexión (Infoagro, 2020).

El índice de refracción es el cociente de la velocidad de la luz cuando pasa a través de dos medios. Es un número adimensional y depende de factores como la longitud de la onda de luz y la temperatura. Por lo tanto, la reflectometría es un método analítico que se usa para medir el índice de refracción de una sustancia para determinar su composición o pureza. Esta

es una técnica cualitativa, no destructiva. Los refractómetros digitales utilizan el método de reflexión total para medir el índice de refracción, mediante un volumen pequeño de muestra, de 0.5 a 1 mL y el análisis se lleva a cabo en segundos. En la industria, se usa con fines de control de calidad. En alimentos y bebidas se usa para controlar el contenido de azúcar en refrescos. Se puede usar para determinar el punto de congelación de un producto químico, la concentración de ácido o base, o encontrar la presencia de un disolvente inorgánico. En la industria farmacéutica, se usa para medir los porcentajes de peróxido de hidrógeno o metanol (Toledo, 2017).

## V. ANTEDECENTES

En 2007, se realizó un estudio en el Instituto Politécnico Nacional, en la Ciudad de México, propuesta por (Martínez & Morales, 2007). En este, se realizó un estudio cinético de invertasa libre, utilizada para hidrolizar sacarosa y se determinaron los efectos del cambio en diversas condiciones de operación, como el pH, temperatura y concentración de enzimática y de sustrato, de la enzima libre. Se evaluaron dos métodos de inmovilización, por adsorción utilizando cáscara de huevo y por atrapamiento mediante alginato de sodio a distintas concentraciones, donde se determinó que el segundo tenía un mejor rendimiento, por lo que este se utilizó para realizar una comparación con la enzima libre. En base a esto, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 1. Constantes cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de la enzima libre

Conc. Enzima (g/L)	1/Vmax	Km/Vmax	Vmax (UI/mL)	Km (M)
0.01	0.6648	18.513	1.504211793	27.8474729
0.025	0.3667	10.672	2.727024816	29.1028088
0.05	0.2581	13.87	3.874467261	53.7388609
0.1	0.1474	7.5661	6.784260516	51.3303935
0.5	0.0227	0.9303	44.05286344	40.9823789
1	0.0353	0.8444	28.3286119	23.9206799
Promedio de Km				37.8204325

Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la invertasa libre e inmovilizada

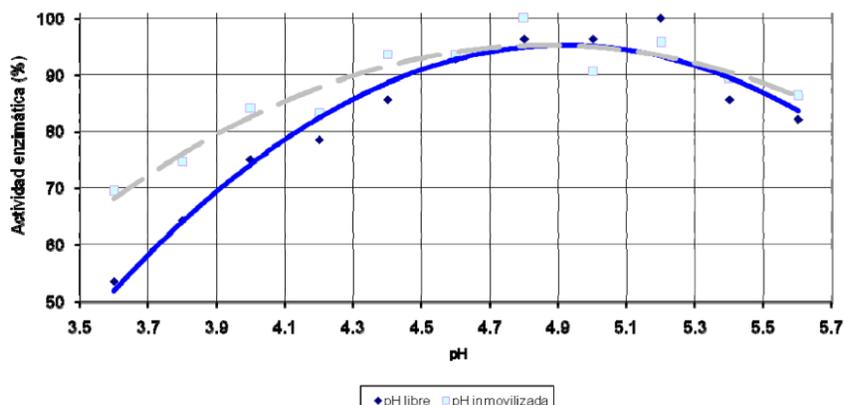


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la invertasa libre

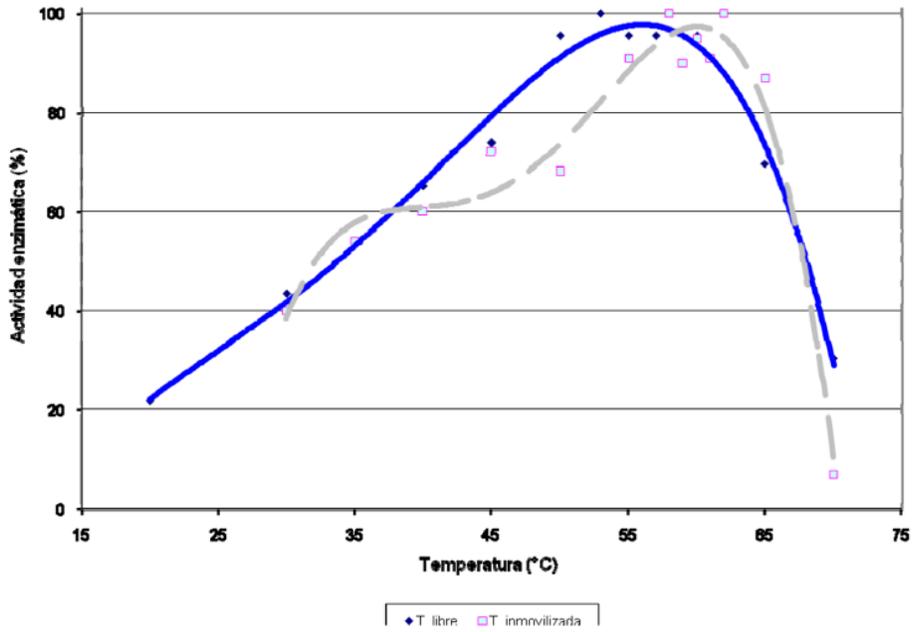


Figura 25. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática a diferentes concentraciones de invertasa libre

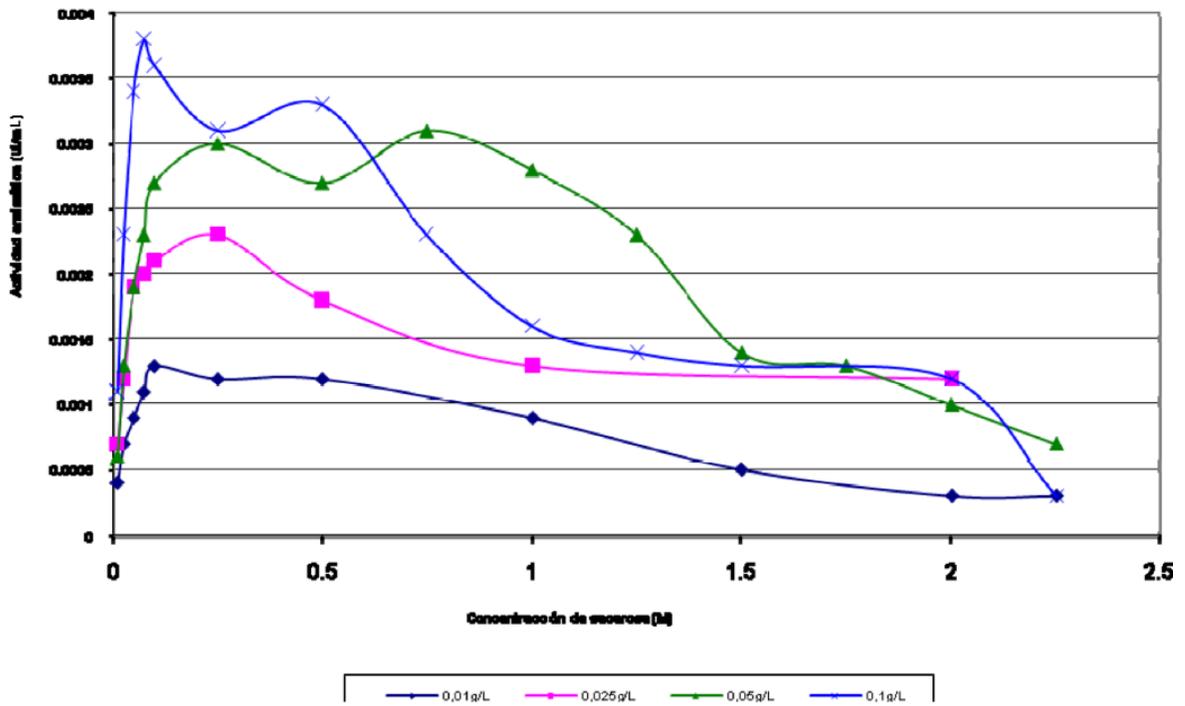
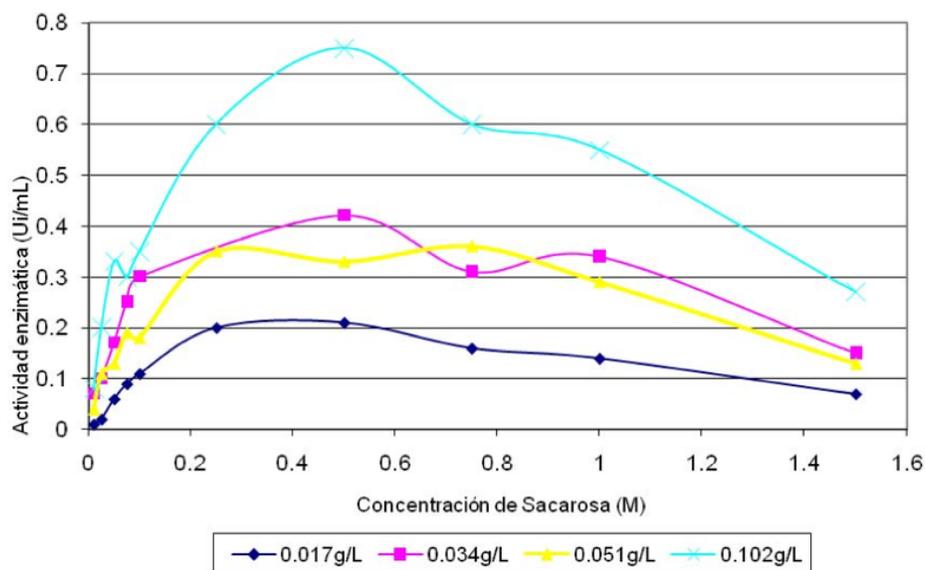


Figura 26. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática a diferentes concentraciones de invertasa inmovilizada con alginato de sodio



Cuadro 2. Constantes cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

Conc. Enzima (g/L)	1/Vmax	Km/Vmax	Vmax (UI/gsoporte)	Km (M)
0.017	0.38182	1029.69	2911.074	2696.79
0.034	2.34315	129.94	474.364	55.45
0.0501	2.34897	220.811	473.189	94.00
0.102	1.27196	109.94	873.853	86.43
0.51	0.26083	24.51	4261.421	93.96
1.003	0.19442	12.87	5717.037	66.19
Promedio de Km				79.21

Otro estudio realizado en la Universidad Nacional de Córdoba, propuesta por (Federico, 2021), donde propone los parámetros de reacción óptimos de la invertasa libre. Esto son un tiempo de 20 minutos, y una temperatura de 40°C. Además, se determinaron que los valores cinéticos del modelo de Michaelis-Menten obtenidos para esta reacción son: Km: 0.22 ± 0.02 mM y Vmax = 1.81 ± 0.04 μmol/min/mg de proteína.

## VI. METODOLOGÍA

*\*Fichas técnicas de reactivos y datos en la sección F en anexos*

### A. OBTENCIÓN DE LA INVERTASA

Obtener invertasa grado industrial por parte de un ingenio azucarero de Guatemala.

### B. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA REFRACTOMETRÍA

Materiales y equipo:

- Azúcar comercial (sacarosa)
- Glucosa 99%
- Fructosa 99%
- Acetato de calcio 94%
- Ácido acético 95%
- Potenciómetro marca Dr. Meter
- Espátula analítica
- Balanza analítica marca OHAUS
- Agitadores magnéticos
- Pipetas de 5 mL
- Beaker de 1000 mL
- Bulbo
- Estufa con agitación
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

Procedimiento:

1. Pesar 3.95 g de acetato de calcio y disolver en 1000 mL de agua destilada, para preparar un buffer.
2. Ajustar el pH del buffer a 7. Este se utilizará para realizar las siguientes soluciones.
3. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.05 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
  - a. 0.25 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 0.2 g de sacarosa, 0.026 g de glucosa y 0.026 g de fructosa

- c. 0.15 g de sacarosa, 0.052 g de glucosa y 0.052 g de fructosa
  - d. 0.1 g de sacarosa, 0.079 g de glucosa y 0.079 g de fructosa
  - e. 0.05 g de sacarosa, 0.105 g de glucosa y 0.105 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 0.131 g de glucosa y 0.131 g de fructosa
4. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.10 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
- a. 0.5 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 0.4 g de sacarosa, 0.052 g de glucosa y 0.052 g de fructosa
  - c. 0.3 g de sacarosa, 0.105 g de glucosa y 0.105 g de fructosa
  - d. 0.2 g de sacarosa, 0.158 g de glucosa y 0.158 g de fructosa
  - e. 0.1 g de sacarosa, 0.211 g de glucosa y 0.211 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 0.263 g de glucosa y 0.263 g de fructosa
5. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.15 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
- a. 0.75 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 0.60 g de sacarosa, 0.079 g de glucosa y 0.079 g de fructosa
  - c. 0.45 g de sacarosa, 0.158 g de glucosa y 0.158 g de fructosa
  - d. 0.30 g de sacarosa, 0.237 g de glucosa y 0.237 g de fructosa
  - e. 0.15 g de sacarosa, 0.315 g de glucosa y 0.315 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 0.395 g de glucosa y 0.395 g de fructosa
6. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.20 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
- a. 1 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 0.8 g de sacarosa, 0.105 g de glucosa y 0.105 g de fructosa
  - c. 0.6 g de sacarosa, 0.211 g de glucosa y 0.211 g de fructosa
  - d. 0.4 g de sacarosa, 0.316 g de glucosa y 0.316 g de fructosa
  - e. 0.2 g de sacarosa, 0.412 g de glucosa y 0.412 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 0.526 g de glucosa y 0.526 g de fructosa
7. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.40 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
- a. 1.2 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 1.6 g de sacarosa, 0.211 g de glucosa y 0.211 g de fructosa
  - c. 1.2 g de sacarosa, 0.421 g de glucosa y 0.421 g de fructosa
  - d. 0.8 g de sacarosa, 0.632 g de glucosa y 0.632 g de fructosa
  - e. 0.4 g de sacarosa, 0.842 g de glucosa y 0.842 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 1.053 g de glucosa y 1.053 g de fructosa

8. Preparar soluciones de 5 mL para realizar la curva de calibración para una concentración de sacarosa de 0.60 g/mL, utilizando las siguientes cantidades:
  - a. 3 g de sacarosa, 0 g de glucosa y 0 g de fructosa
  - b. 2.4 g de sacarosa, 0.316 g de glucosa y 0.316 g de fructosa
  - c. 1.8 g de sacarosa, 0.632 g de glucosa y 0.632 g de fructosa
  - d. 1.2 g de sacarosa, 0.947 g de glucosa y 0.947 g de fructosa
  - e. 0.6 g de sacarosa, 1.263 g de glucosa y 1.263 g de fructosa
  - f. 0 g de sacarosa, 1.579 g de glucosa y 1.579 g de fructosa
9. Medir el índice de refracción de todas las soluciones en un refractómetro y utilizar estos datos para construir la curva de calibración de cada concentración.

## C. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE OPERACIÓN DE LA ENZIMA LIBRE

Procedimiento basado en lo realizado por Tanriseven & Dogan (2001) y Bargamasco et al., (2000):

Materiales y equipo:

- Invertasa grado industrial
- Azúcar comercial (sacarosa)
- Acetato de calcio 94%
- Ácido acético 95%
- Potenciómetro marca Dr. Meter
- Estufa con agitación
- Baño térmico marca PRECISION
- Erlenmeyers de 250 mL
- Agitadores magnéticos
- Probeta de 100 mL
- Termómetro
- Pipetas de 10 mL
- Bulbo
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

Procedimiento:

1. Pesar 3.95 g de acetato de calcio y disolver en 1000 mL de agua destilada, para preparar un buffer.

2. Medir el pH del buffer preparado y ajustarlo a 5.
3. Pesar 0.1 g de invertasa grado industrial y disolverla en 100 mL de buffer.
4. Pesar 5 g de azúcar y disolverla en 100 mL de buffer.
5. Colocar el erlenmeyer con la solución en un baño térmico a 40°C.
6. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 1 mL de solución de invertasa a la solución de sacarosa.
7. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 3, 5, 10 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
10. Realizar pruebas de temperatura, repitiendo los pasos 4 al 7, a 50°C, 60°C y 70°C.
11. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa, para determinar la temperatura a la que se logra la mayor conversión de sustrato.
12. Realizar pruebas de pH, ajustando el pH del buffer a 3, 6, 7 y 9.
13. Con el buffer a cada pH, preparar una solución de 5 g de azúcar por cada 100 mL de buffer.
14. Colocar la solución de pH 3 en un baño térmico a la temperatura que se que se logra la mayor conversión de sustrato.
15. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 1 mL de solución de invertasa a la solución de sacarosa.
16. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
17. Repetir los pasos 12 al 16 con los buffers de pH 6, 7 y 9.
18. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa, para determinar el pH al que se logra la mayor conversión de sustrato.
19. Preparar soluciones de sacarosa como se menciona a continuación, utilizando el pH al que se logra la mayor conversión de sustrato (pH 5)
  - a. 10 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
  - b. 15 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
  - c. 20 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
  - d. 40 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
  - e. 60 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
20. Colocar la solución de 10 g de azúcar en un baño térmico a temperatura a la que se logra la mayor conversión de sustrato (50°C).
21. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 1 mL de solución de invertasa a la solución de sacarosa.
22. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la

enzima.

23. Repetir los pasos 17 al 20 con las soluciones con las demás concentraciones de azúcar.
24. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa y la concentración de sustrato a la que se logra la mayor conversión a producto.

## D. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR ADSORCIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

Procedimiento basado en lo realizado por Boukraa-Oulad, Kaddour, & Sadoun (2010):

Materiales y equipo:

- Invertasa grado industrial
- Carbón activado
- Ácido acético 95%
- Buffer de acetato de calcio 0.05 M
- Potenciómetro marca Dr. Meter
- Termómetro
- Estufa con agitación
- Pipeta 10 mL
- Kitasato
- Espátula analítica
- Balanza analítica
- Embudo Buchner
- Bomba de vacío
- Papel filtro
- Agitador magnético

Procedimiento:

1. Pesar 0.8 g de invertasa y diluirla en 500 mL de buffer acetato de sodio.
2. Ajustar el pH de la solución a 4.8
3. Pesar 1.0 g de carbón activado y disolverlos en la solución de invertasa.
4. Calentar a 50°C durante 1 hora con agitación.
5. Filtrar la solución para recuperar el carbón y realizar lavados con buffer.

## E. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR ATRAPAMIENTO CON ALGINATO DE SODIO

Procedimiento basado en lo realizado por Cabral et al. (2010)

Materiales y equipo:

- Invertasa grado industrial
- Cloruro de calcio 98%
- Buffer de acetato de calcio 0.05 M
- Ácido algínico, sal sódica
- Balones aforados de 25 mL
- Balón de 250 mL
- Beaker de 50 mL
- Beaker 100 mL
- Estufa con agitación
- Agitador magnético
- Jeringa
- Kitasato
- Bomba de vacío
- Embudo Buchner

Procedimiento:

1. Preparar 25 mL de alginato de sodio al 2%, pesando 0.5 g de alginato de sodio y disolviéndolos en agua caliente. Luego, aforar el volumen a 25 mL.
2. Pesar 0.25 g de invertasa y disolverlo en 5 mL de agua, luego aforar el volumen a 25 mL.
3. Preparar una solución de cloruro de calcio 0.3 M, pesando 2.5 g de cloruro de calcio y disolviéndolo en 50 mL de agua. Luego aforar a 250 mL.
4. Mezclar las soluciones de invertasa y alginato de sodio, y se vacían en un beaker de 50 mL.
5. Colocar en un beaker la solución de cloruro de calcio, con agitación leve.
6. Con una jeringa, tomar la solución de invertasa y alginato de sodio y hacer que gotee, procurando que estas caigan en la solución de cloruro de calcio, para que se formen esferas de alginato conteniendo la enzima.
7. Filtrar las esferas utilizando un el embudo, kitasato y bomba de vacío.
8. Almacenarlas en un frasco tapado y adicionarles buffer. Mantener en refrigeración.

## F. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR UNIÓN COVALENTE CON PHA FUNCIONALIZADO

Procedimiento basado en lo realizado por El-Sayed et al. (2015):

### Materiales y equipo

- Invertasa grado industrial
- PHA
- Buffer de acetato 0.05 M
- Glutaraldehído 25%
- Hidróxido de sodio 99%
- Estufa con agitación
- Agitador magnético
- Micropipeta del 100 microlitos
- Puntas para micropipeta
- Termómetro
- Kitasato
- Bomba de vacío
- Embudo Buchner

### Procedimiento

1. Agregar 0.2 g de invertasa y diluirla en 100 mL de buffer de acetato.
2. Preparar 500 mL de buffer de acetato 0.05M a pH 5 y agregarle 0.45 mL de glutaraldehído.
3. Pesar 50 g de PHA, agregarlo al buffer con glutaraldehído y agitarlo durante 2 horas a 30°C.
4. Agregar 100 mL de NaOH 0.1M.
5. Filtrar el PHA en el sistema de filtrado, realizando lavados con agua destilada.
6. El PHA húmedo se mezcló con 100 mL de solución enzimática y agitar suavemente por 3 horas a 30°C.
7. Realizar lavados con el buffer.

## G. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE OPERACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Procedimiento basado en lo realizado por Tanriseven & Dogan (2001) y Bargamasco et al., (2000):

## Materiales y equipo

- Invertasa inmovilizada
- Azúcar comercial (sacarosa)
- Buffer de acetato de calcio 0.05 M
- Ácido acético 95%
- Potenciómetro marca Dr. Meter
- Estufa con agitación
- Baño térmico marca PRECISION
- Beakers 250 mL
- Agitadores magnéticos
- Probeta de 100 mL
- Erlenmeyers 250 mL
- Termómetro
- Pipetas de 10 mL
- Bulbo
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

## Procedimiento

1. Pesar 3.95 g de acetato de calcio y disolver en 1000 mL de agua destilada, para preparar un buffer.
2. Pesar 5 g de azúcar y disolverla en 100 mL de buffer.
3. Colocar el erlenmeyer con la solución en un baño térmico a 40°C.
4. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 5 g de perlas de alginato con invertasa inmovilizada a la solución de sacarosa.
5. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 3, 5, 10 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
6. Realizar pruebas de temperatura, repitiendo los pasos 2 al 5 a 50°C, 60°C y 70°C.
7. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa, para determinar la temperatura a la que se logra la mayor conversión de sustrato.
8. Realizar pruebas de pH, ajustando el pH del buffer a 3, 6, 7 y 9.
9. Con el buffer a cada pH, preparar una solución de 5 g de azúcar por cada 100 mL de buffer.
10. Colocar la solución de pH 3 en un baño térmico a la temperatura que se logra la mayor conversión de sustrato.
11. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 5 g de perlas de alginato con

- invertasa inmovilizada a la solución de sacarosa
12. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
  13. Repetir los pasos 8 al 12 con los buffers de pH 6, 7 y 9.
  14. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa, para determinar el pH al que se logra la mayor conversión de sustrato.
  15. Preparar soluciones de sacarosa como se menciona a continuación, utilizando el pH con el que se logra la mayor conversión de sustrato (pH 5)
    - a. 10 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
    - b. 15 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
    - c. 20 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
    - d. 40 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
    - e. 60 g de azúcar comercial en 100 mL de buffer.
  16. Colocar la solución de 10 g de azúcar en un baño térmico a la temperatura que se logra la mayor conversión de sustrato (50°C).
  17. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 5 g de perlas de alginato con invertasa inmovilizada a la solución de sacarosa
  18. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
  19. Repetir los pasos 16 al 18 con las soluciones con las demás concentraciones de azúcar.
  20. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa y la concentración de sustrato a la que se logra la mayor conversión a producto.
  21. Repetir procedimiento utilizando 0.05 g de carbón activado y 5 g de PHA, ambos con invertasa inmovilizada.

## H. DETERMINACIÓN DE ENZIMA SIN INMOVILIZAR

### Materiales y equipo

- Muestras de remanentes de inmovilización
- Azúcar comercial
- Buffer de acetato de calcio
- Ácido acético
- Potenciómetro
- Estufa con agitación

- Baño térmico
- Beakers 250 mL
- Agitadores magnéticos
- Probeta de 100 mL
- Erlenmeyers 250 mL
- Termómetro
- Pipetas de 10 mL
- Bulbo
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

#### Procedimiento

1. Pesar 3.95 g de acetato de calcio y disolver en 1000 mL de agua destilada, para preparar un buffer y ajustar su pH a 5.
2. Pesar 15 g de azúcar y disolverla en 100 mL de buffer.
3. Colocar el erlenmeyer con la solución en un baño térmico a 50°C.
4. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 1 mL del cloruro de calcio utilizado para realizar la inmovilización con alginato de sodio.
5. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de 3 mL de la solución al pasar 0, 1, 3, 5, 10 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
6. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración, para determinar la cantidad de sacarosa, fructosa y glucosa.
7. Repetir procedimiento utilizando 1 mL del buffer donde se realizó la inmovilización con carbón activado y el que se usó para la inmovilización con PHA funcionalizado.

## I. ANÁLISIS CINÉTICO

#### Materiales y equipo

- Programa Berkeley Madonna

#### Procedimiento

1. Construir un modelo utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2).
2. Importar datos de concentración de sustrato (sacarosa) y producto (fructosa y glucosa) de cada una de las corridas realizadas.
3. Ajustar el modelo, para que su comportamiento se apege a los datos experimentales obtenidos.
4. Determinar los parámetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten y velocidad

- máxima) para cada una de las corridas realizadas.
5. Modificar el modelo, para que se ajuste a las corridas realizadas para la enzima inmovilizada con distintos soportes.
  6. Ajustar los nuevos modelos, para que su comportamiento se apegue a los datos experimentales obtenidos.

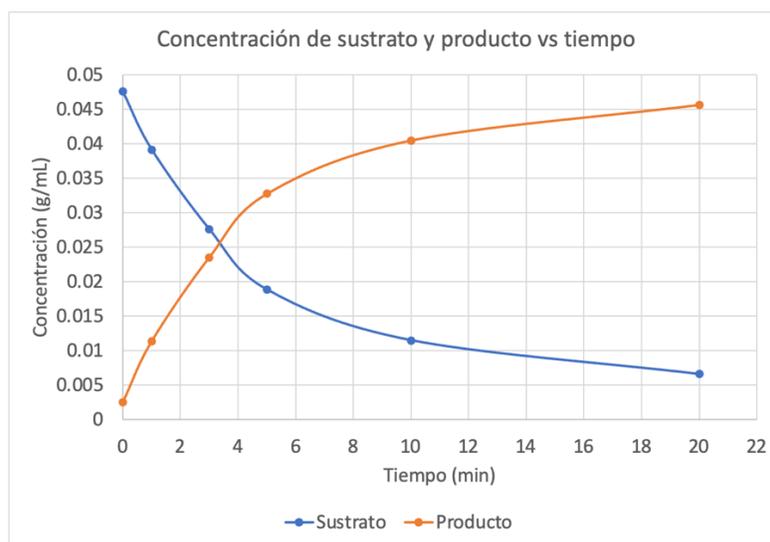
## VII. RESULTADOS

Cuadro 3. Diseño experimental de la determinación de condiciones de operación de la invertasa

Corrida	Condiciones		
	Temperatura (°C ± 0.5 °C)	pH (± 0.005)	Concentración de sustrato (g/mL ± 0.0005 g/mL )
1	40	5	0.05
2	50	5	0.05
3	60	5	0.05
4	70	5	0.05
5	50	3	0.05
6	50	6	0.05
7	50	7	0.05
8	50	9	0.05
9	50	5	0.1
10	50	5	0.15
11	50	5	0.2
12	50	5	0.4
13	50	5	0.6

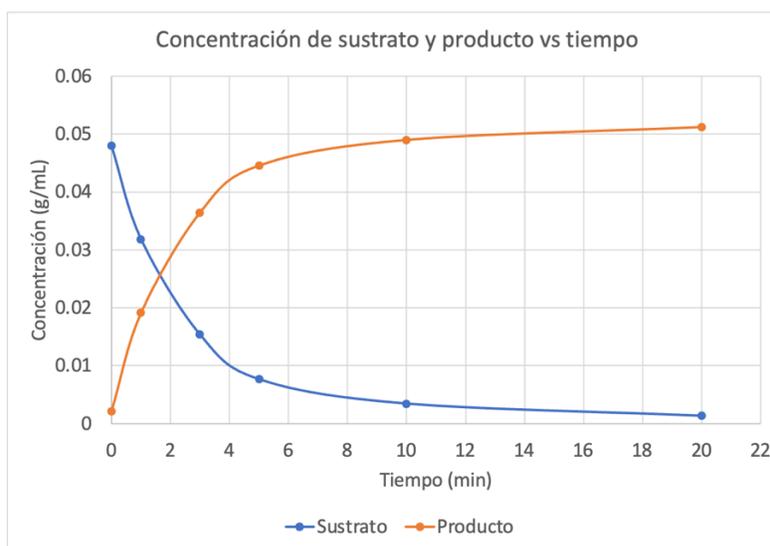
Este diseño experimental se utilizó para determinar la temperatura, pH y concentración a las que se obtiene la mayor cantidad de conversión de sustrato, al usar la invertasa libre. Las mismas condiciones se utilizaron para evaluar la enzima inmovilizada con los tres soportes catalíticos.

Figura 27. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



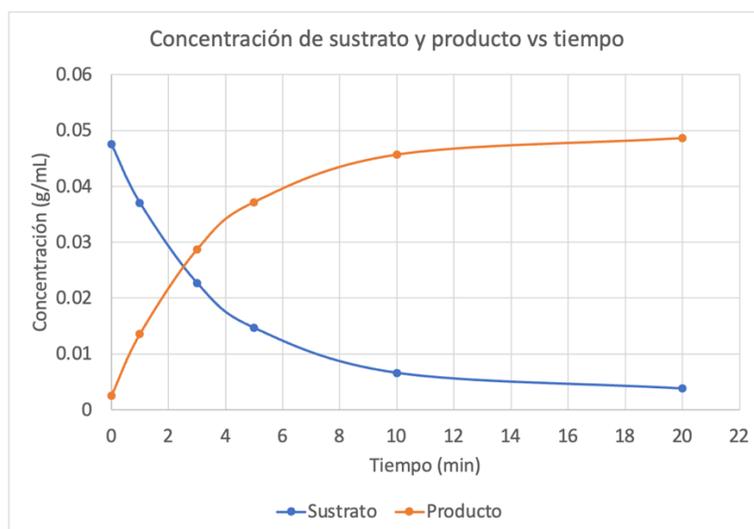
Es la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 28. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



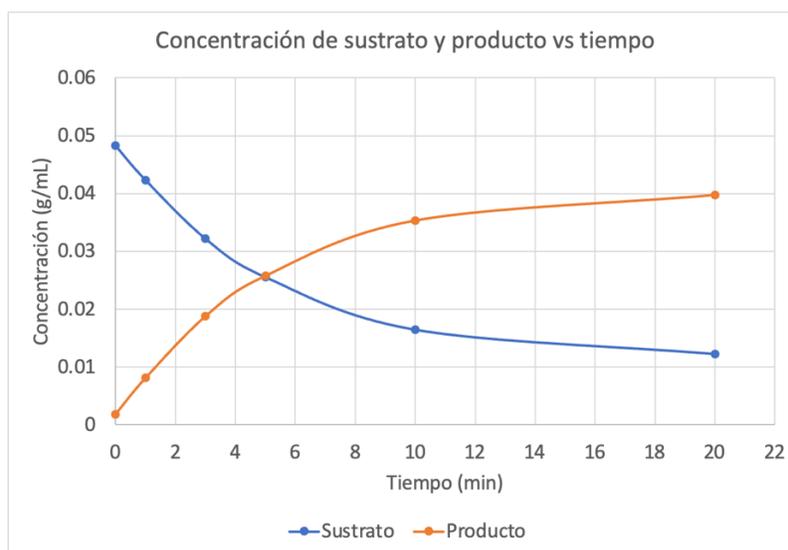
Es la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 29. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



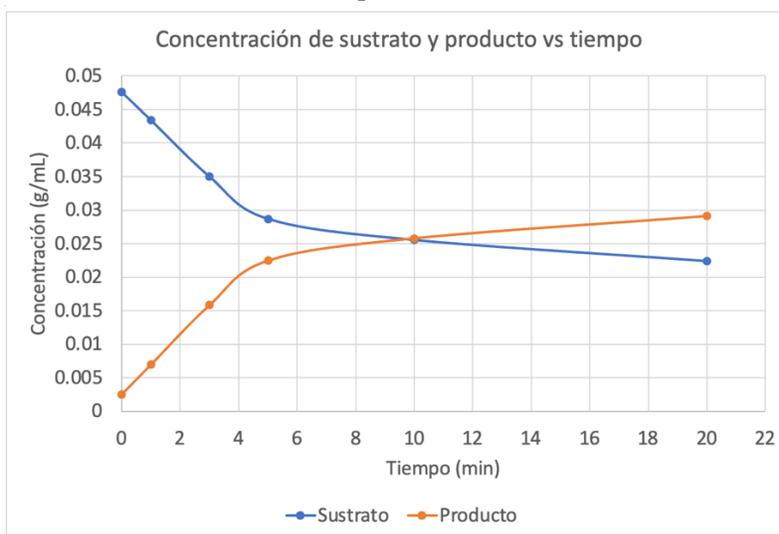
Es la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 30. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



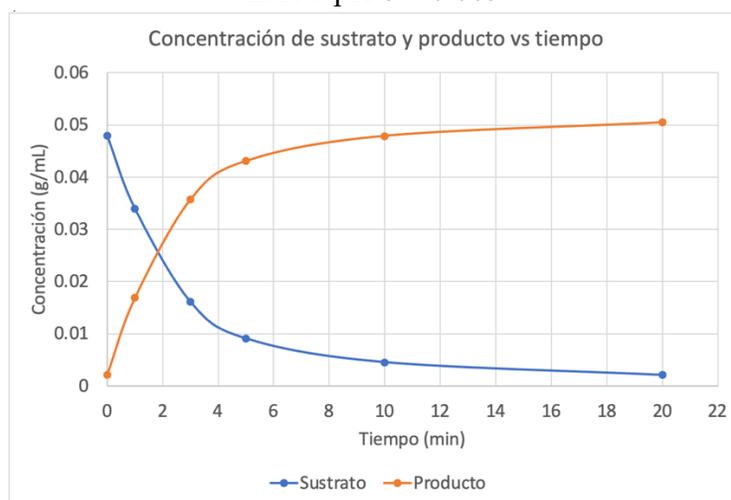
Es la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 31. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH  $3 \pm 0.005$



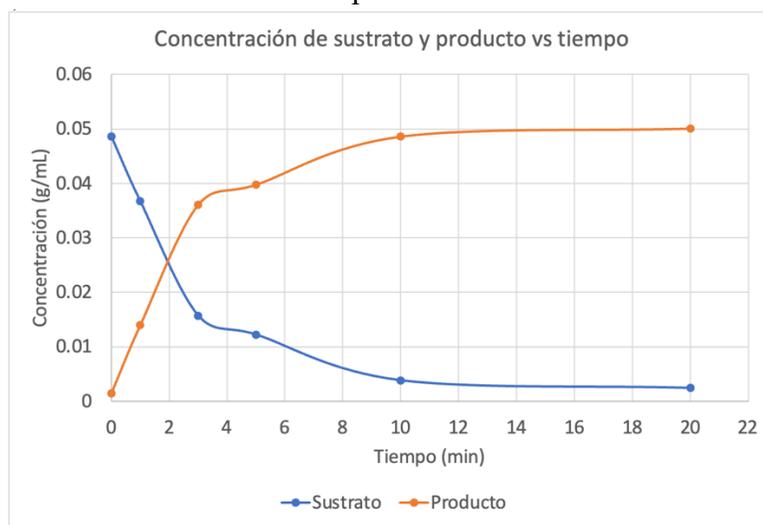
Es la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 32. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a pH  $6 \pm 0.005$



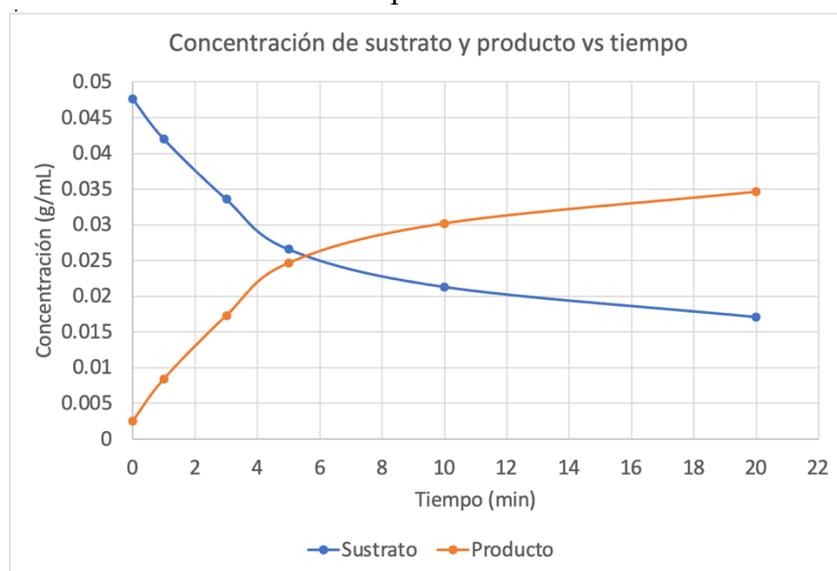
Es la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 33. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



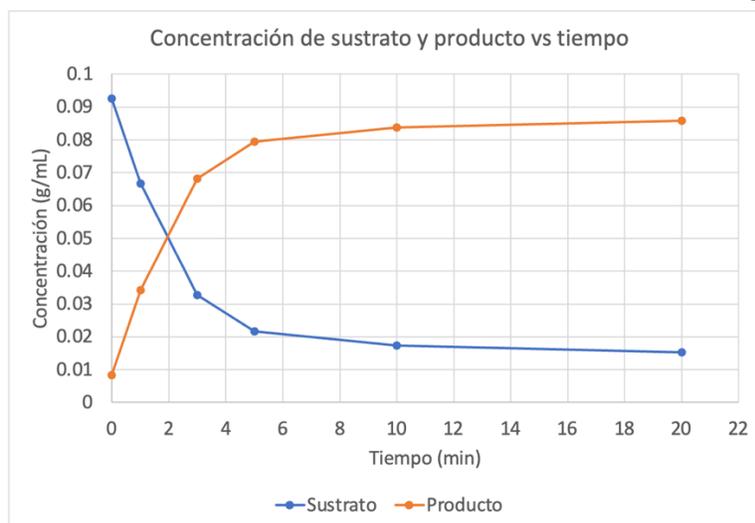
Es la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 34. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$



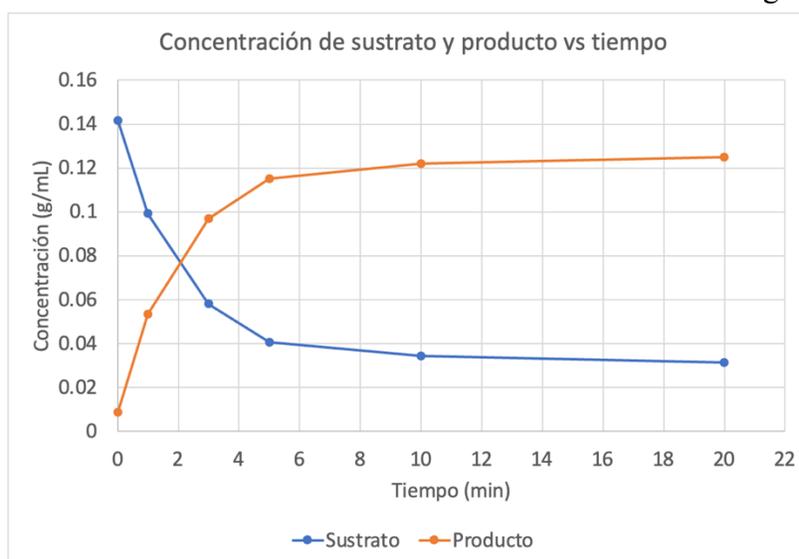
Es la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 35. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL



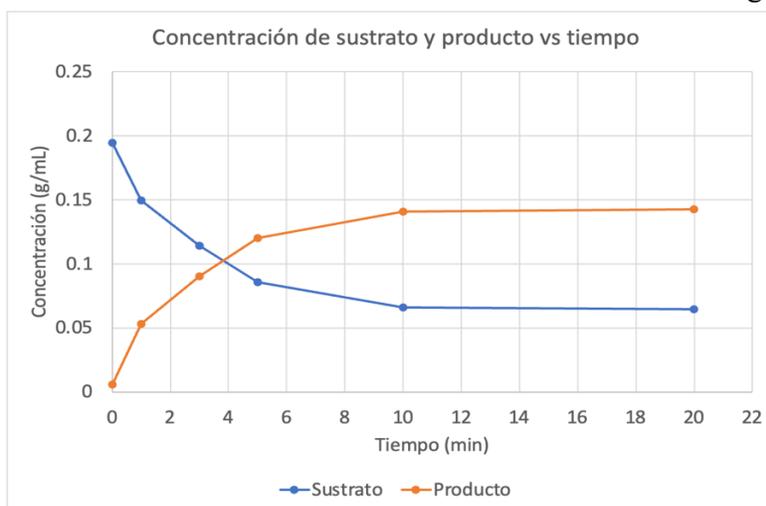
Es la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 36. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL



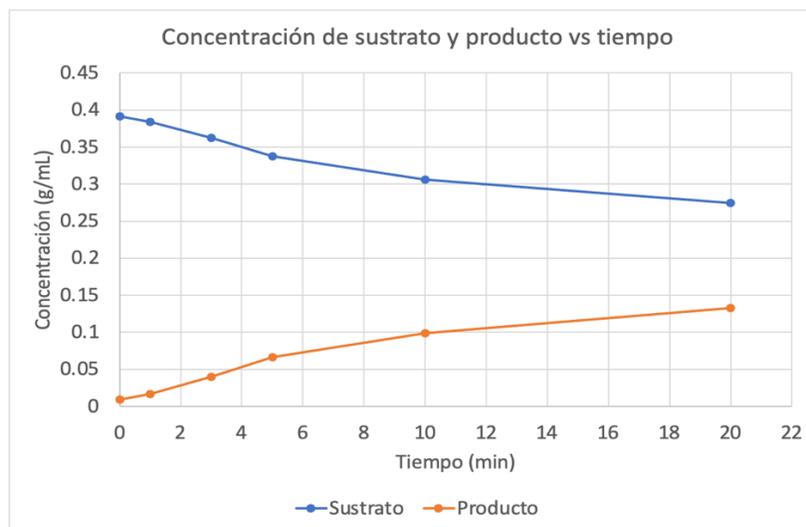
Es la corrida 10 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 37. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



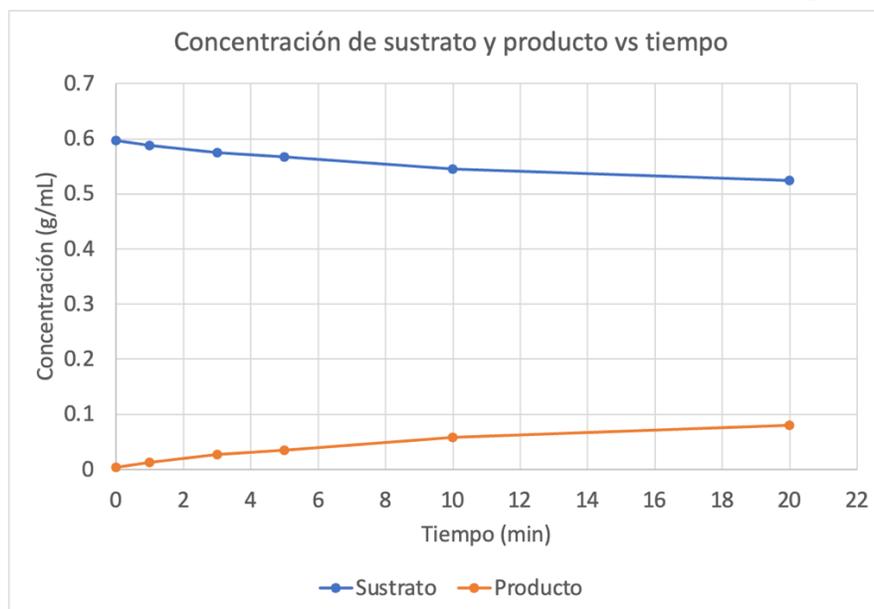
Es la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 38. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 39. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL



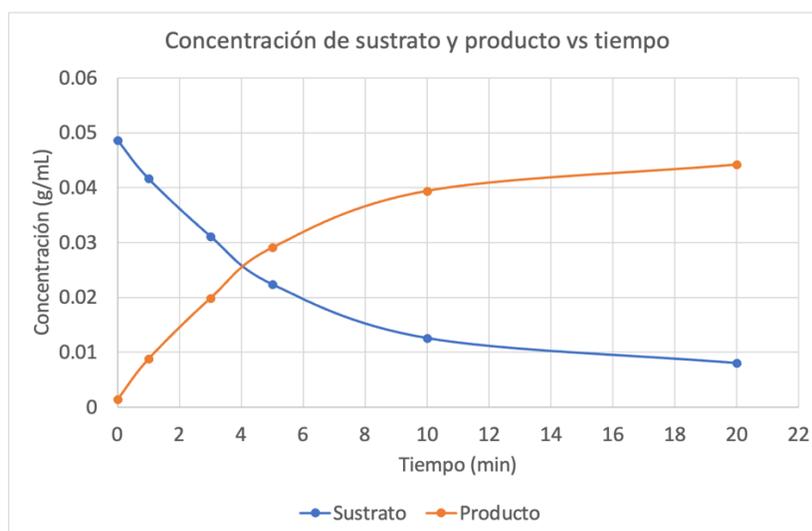
Es la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Cuadro 4. Rendimientos de inmovilización con los distintos soportes utilizados

Soporte	Rendimiento de inmovilización (%)
Carbón activado	$26.38 \pm 0.006$
PHA	$31.45 \pm 0.006$
Alginato de sodio	$69.75 \pm 0.007$

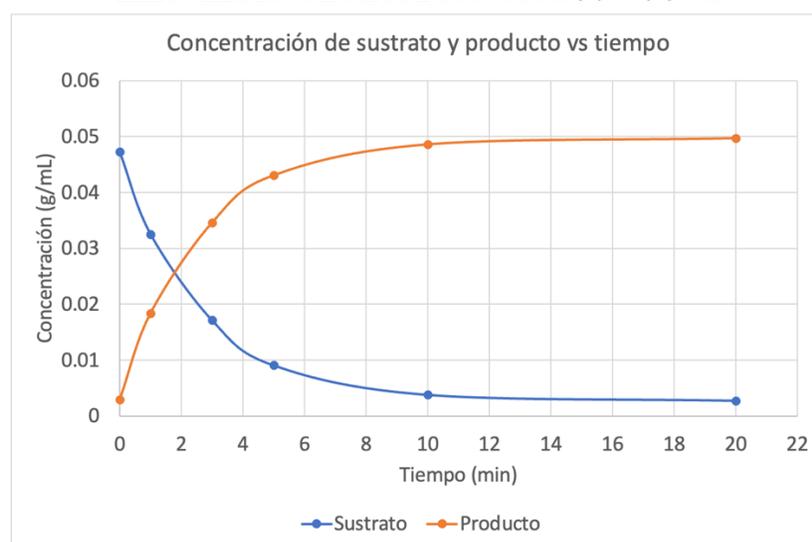
Se evaluaron tres soportes de inmovilización, carbón activado (adsorción), PHA (unión covalente) y alginato de sodio (atrapamiento). Para determinar el rendimiento, se determinó cuánta enzima quedó en el sobrenadante del medio utilizado para la inmovilización. Por lo tanto, el restante fue inmovilizado satisfactoriamente en el soporte.

Figura 40. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



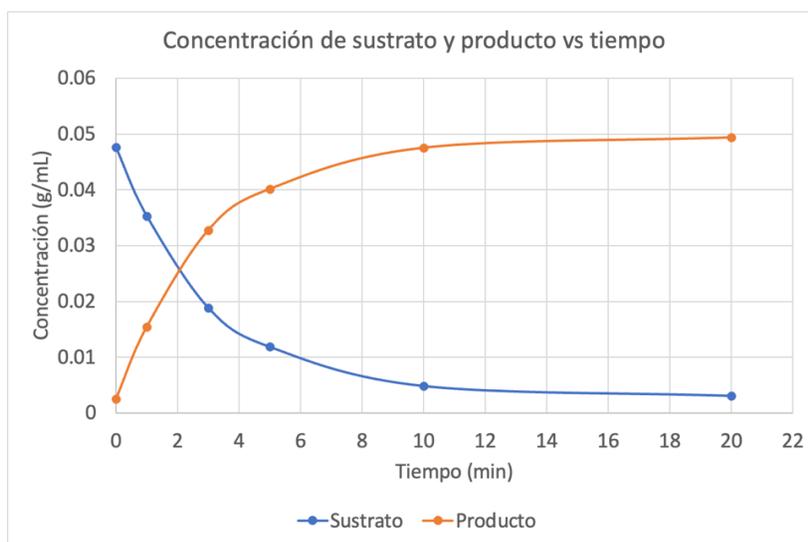
Es la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 41. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



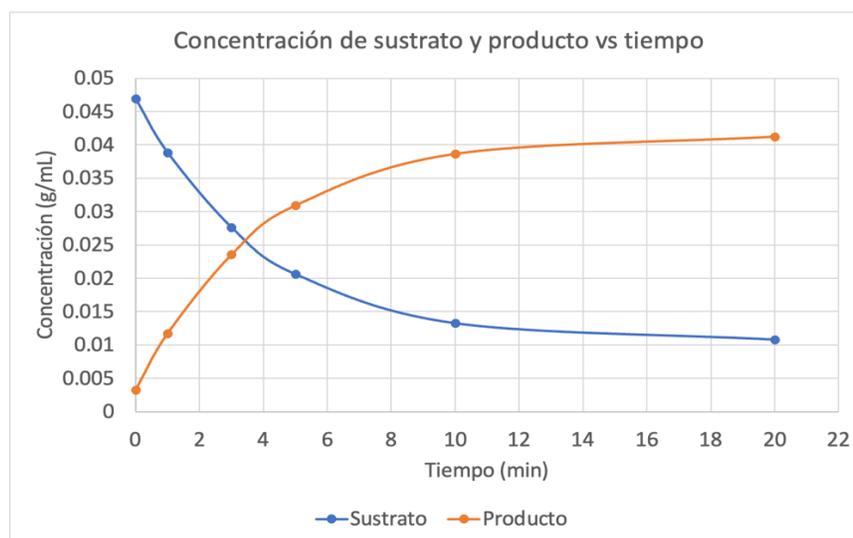
Es la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 42. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



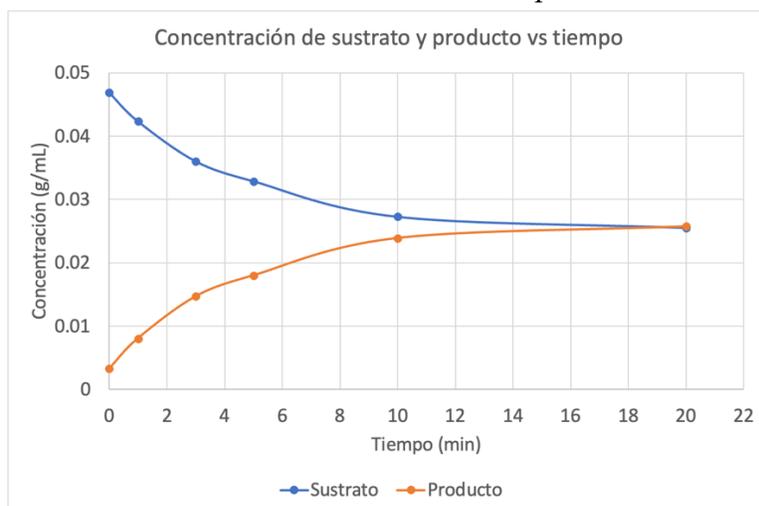
Es la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 43. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



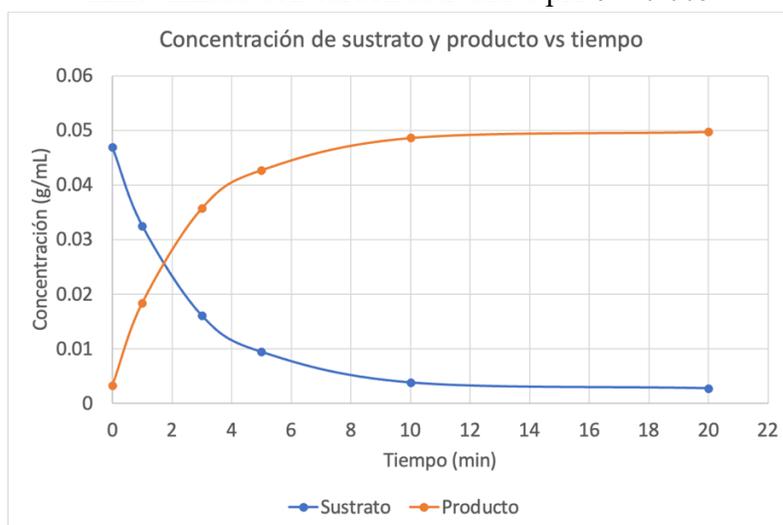
Es la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 44. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $\text{pH } 3 \pm 0.005$



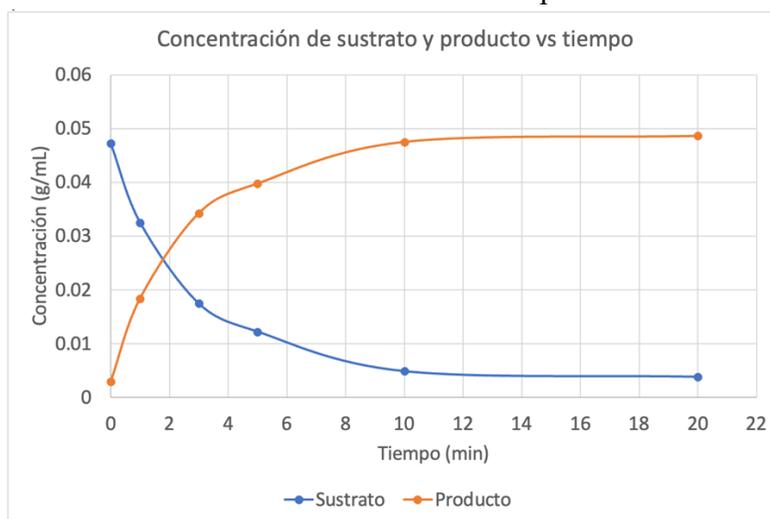
Es la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 45. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



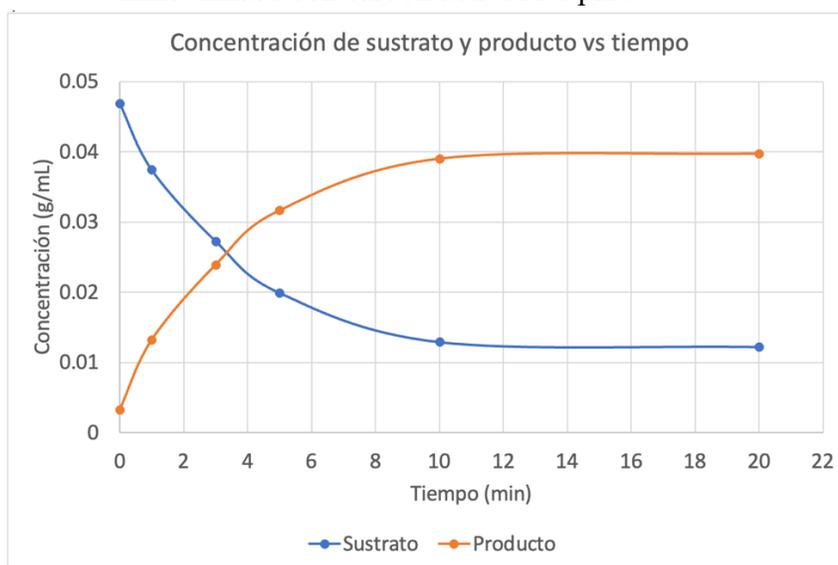
Es la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 46. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



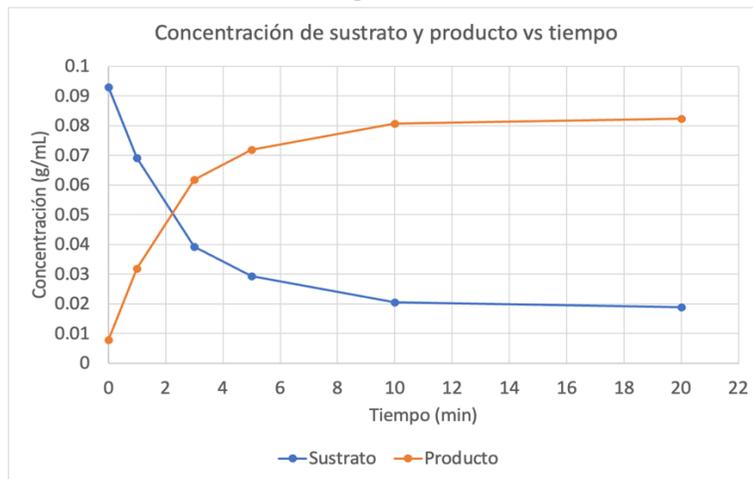
Es la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 47. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$



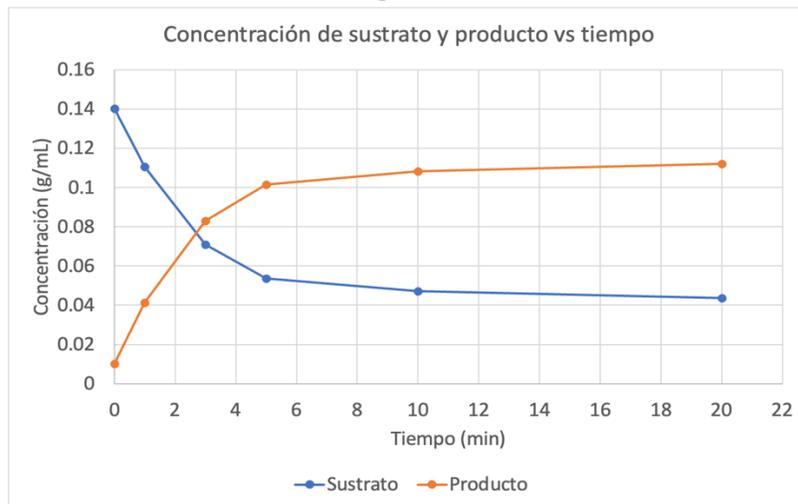
Es la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 48. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL



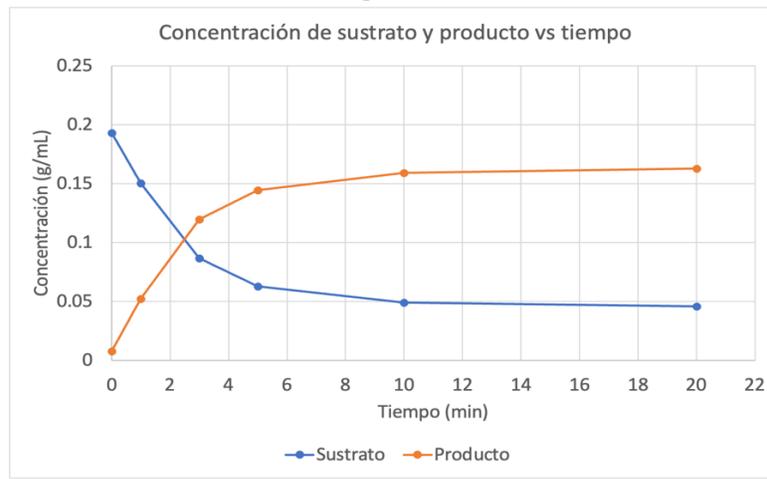
Es la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 49. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL



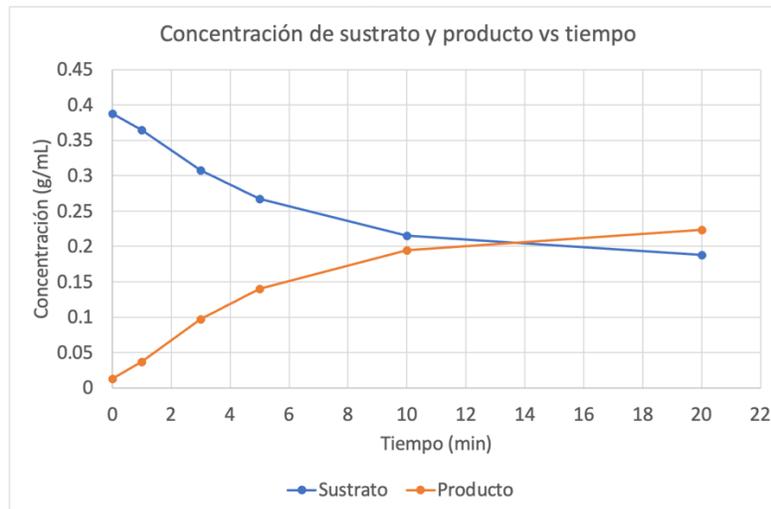
Es la corrida 10 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 50. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



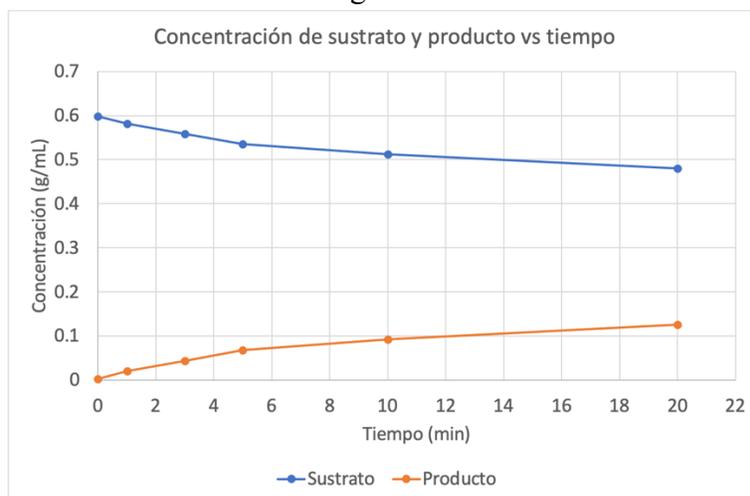
Es la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 51. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



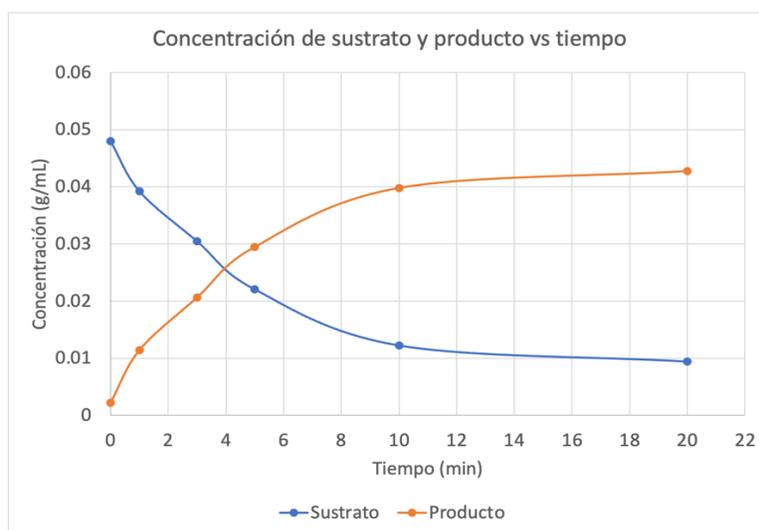
Es la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 52. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa l inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL



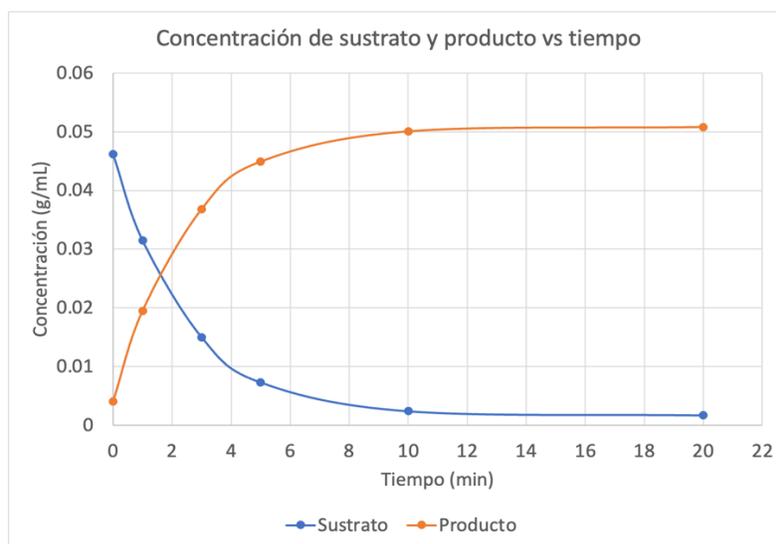
Es la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 53. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $40 \pm 0.5^\circ$  C



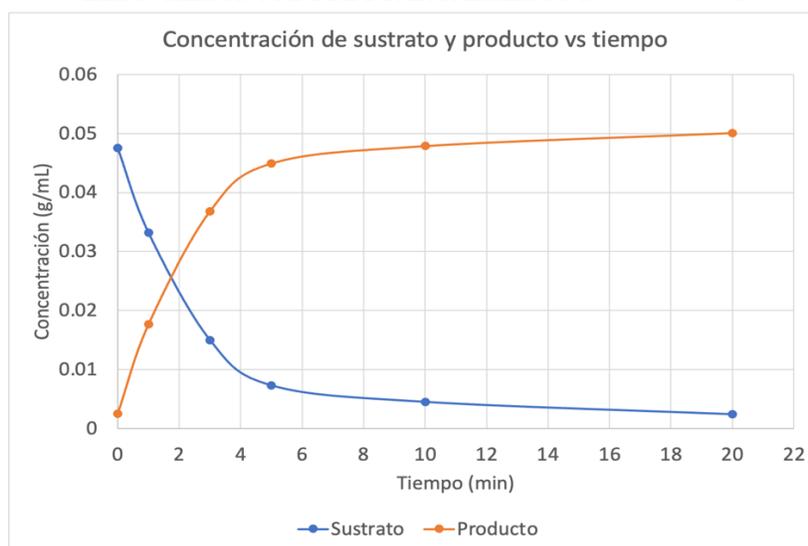
Es la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $40 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 54. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



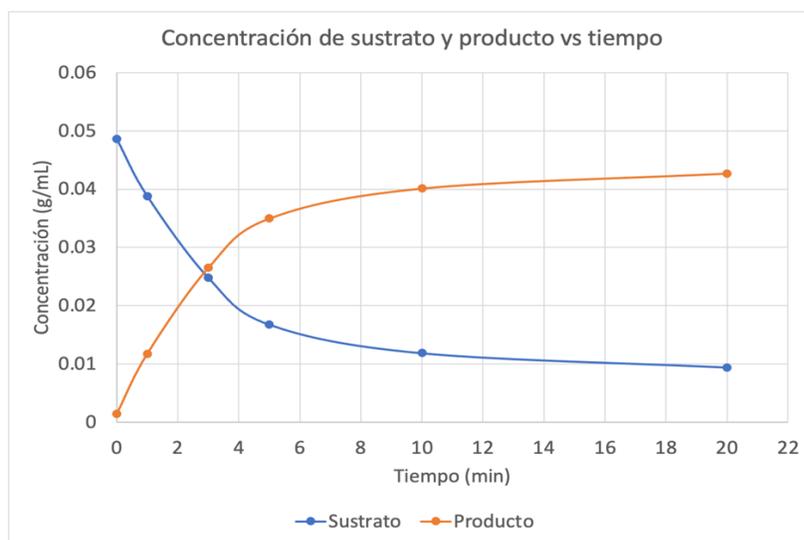
Es la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 55. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



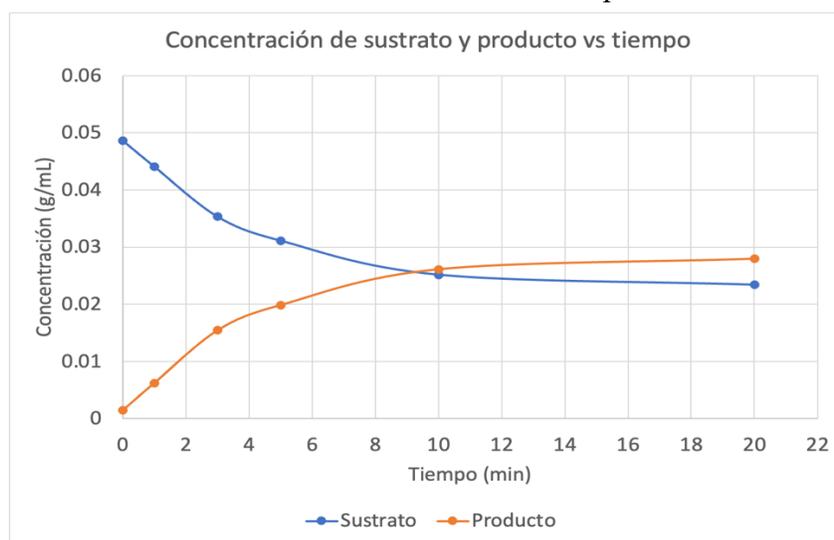
Es la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 56. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



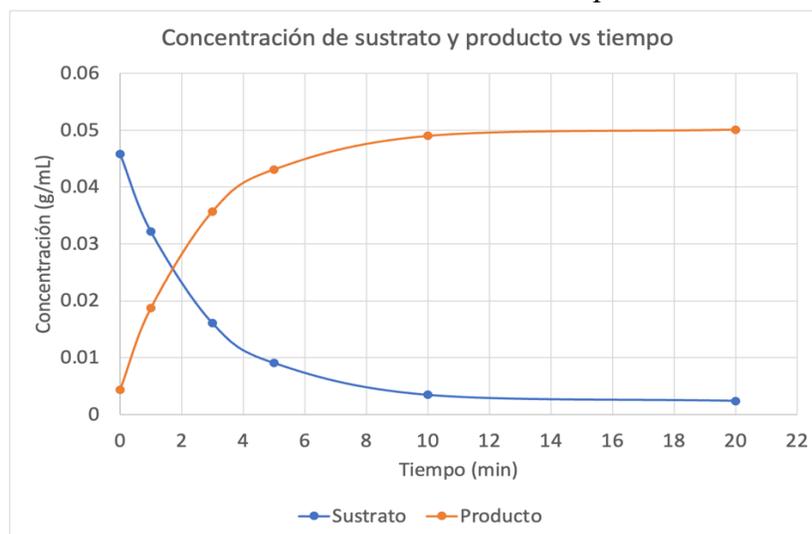
Es la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 57. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 3 \pm 0.005$



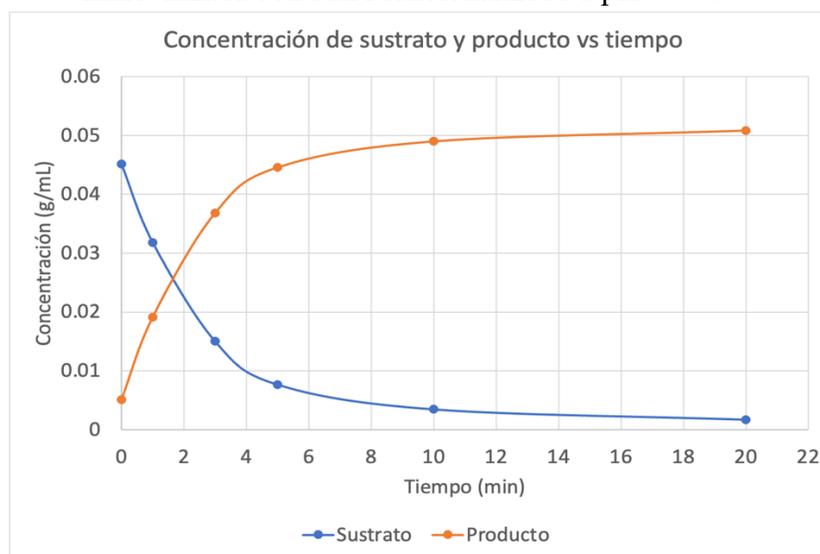
Es la corrida 5 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 58. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



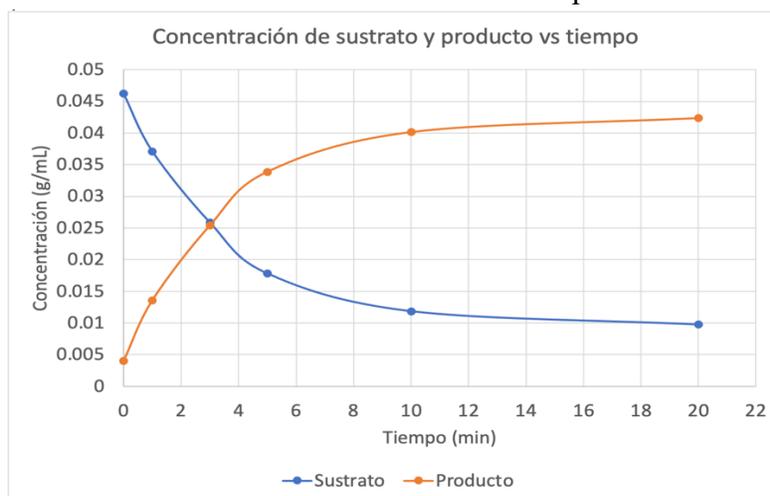
Es la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

Figura 59. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



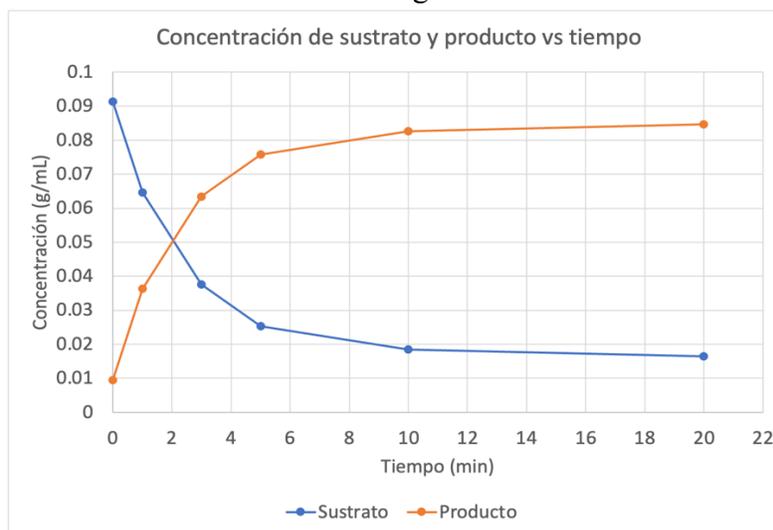
Es la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 60. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH  $9 \pm 0.005$



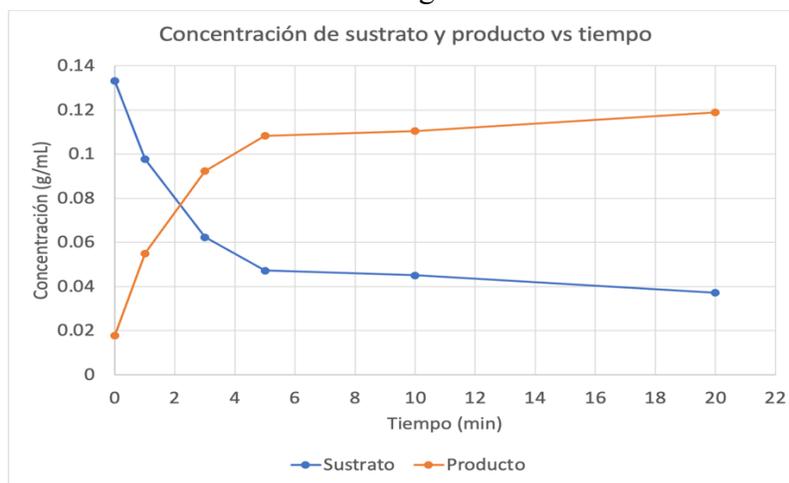
Es la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 61. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



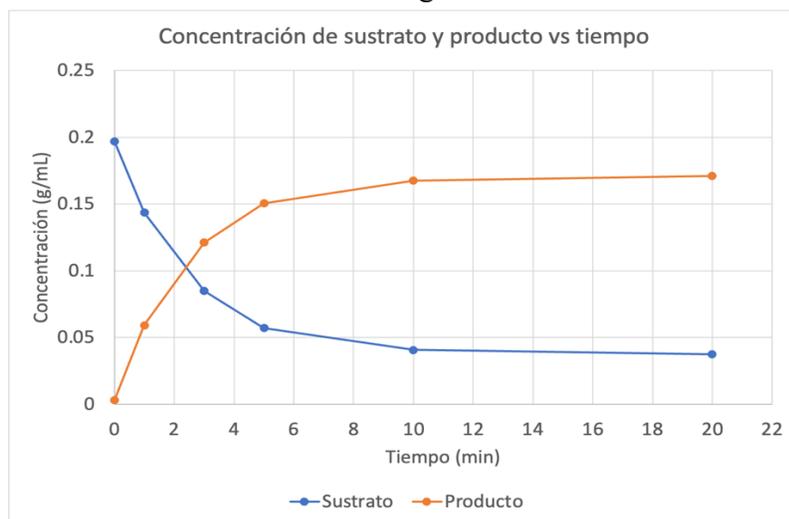
Es la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 62. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL



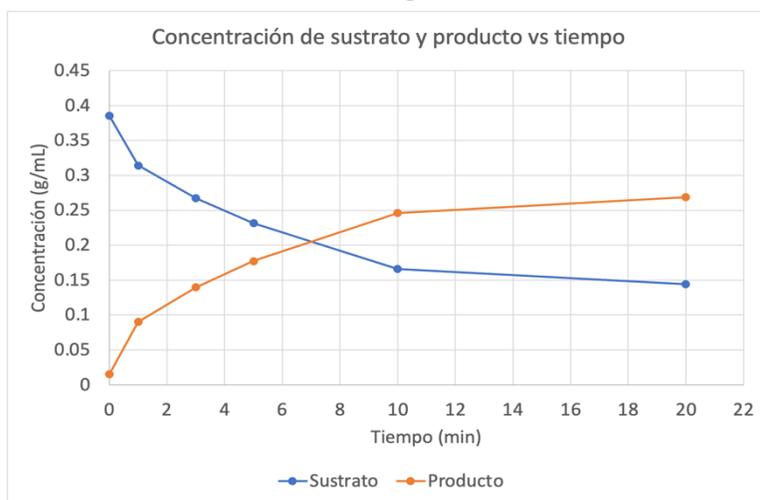
Es la corrida 10 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 63. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



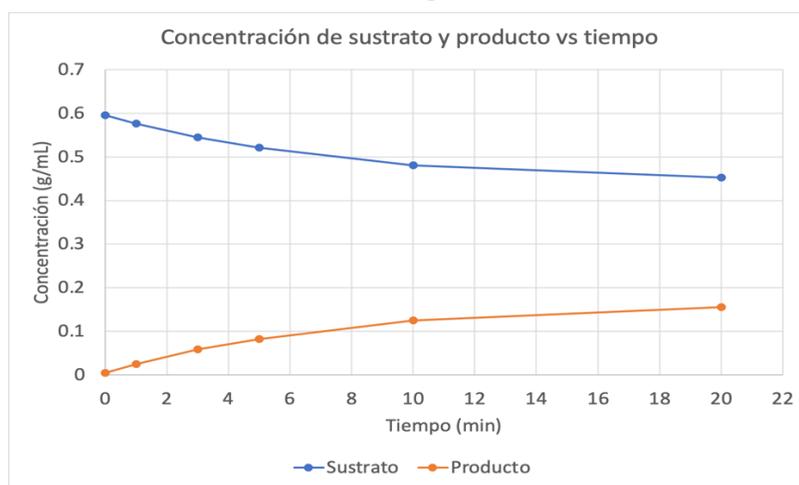
Es la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 64. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa l inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



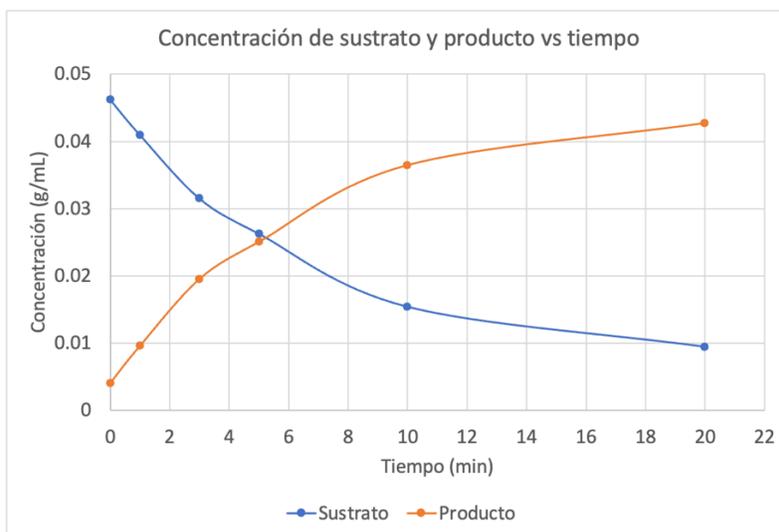
Es la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 65. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada en PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL



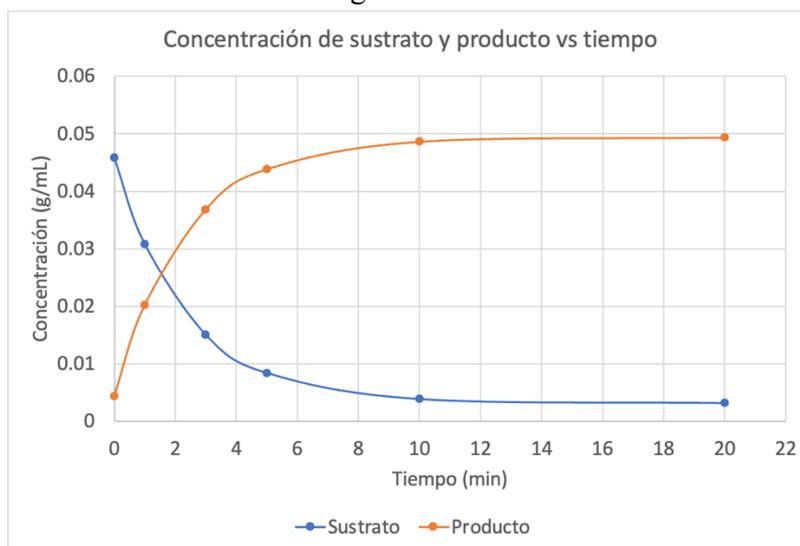
Es la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 66. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



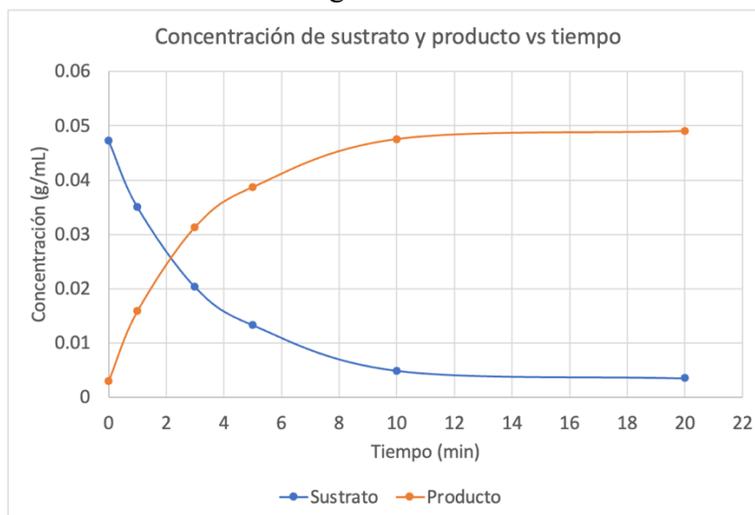
Es la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 67. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



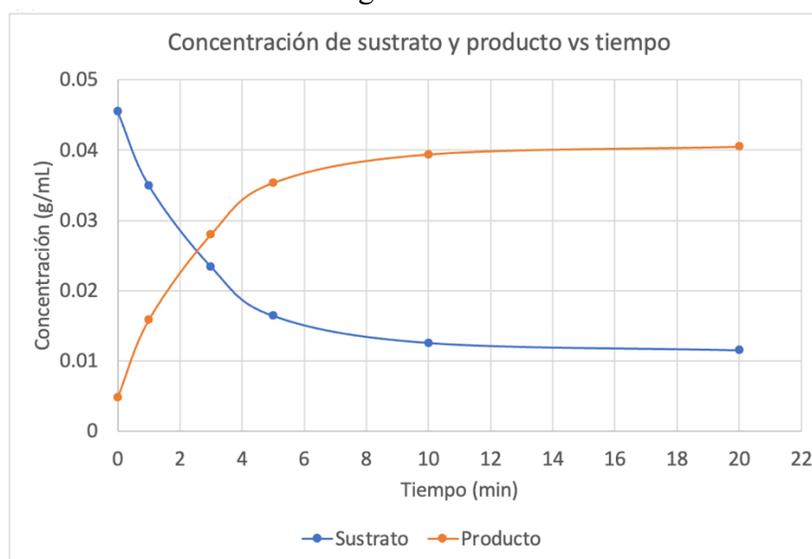
Es la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 68. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



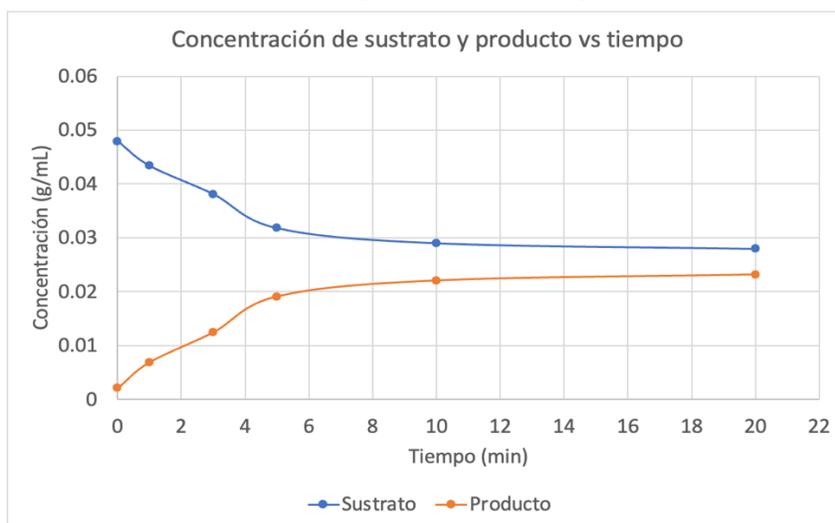
Es la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 69. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



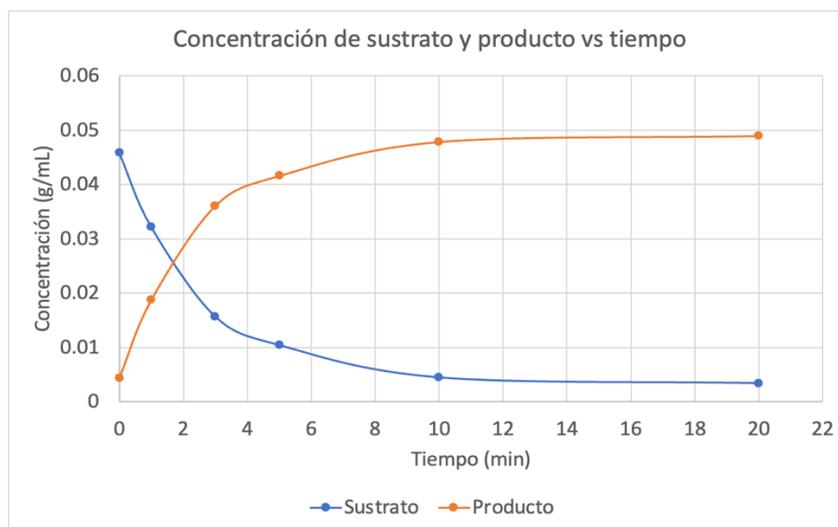
Es la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar a la que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 70. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH  $3 \pm 0.005$



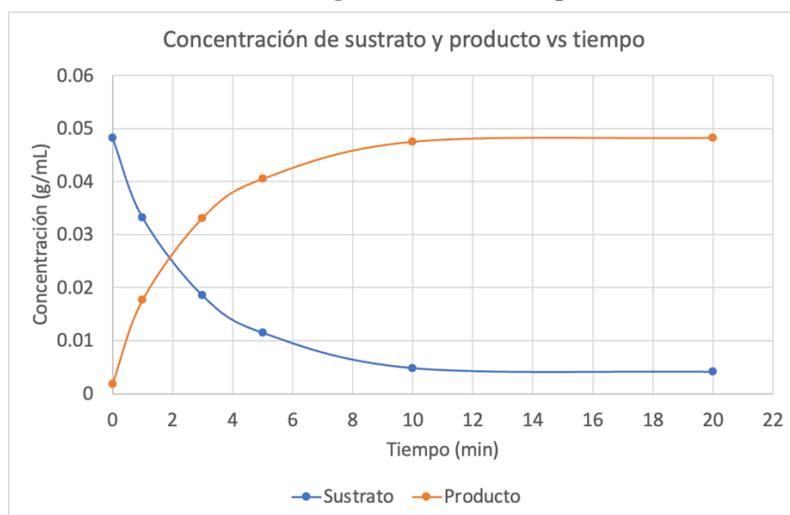
Es la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 71. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH  $6 \pm 0.005$



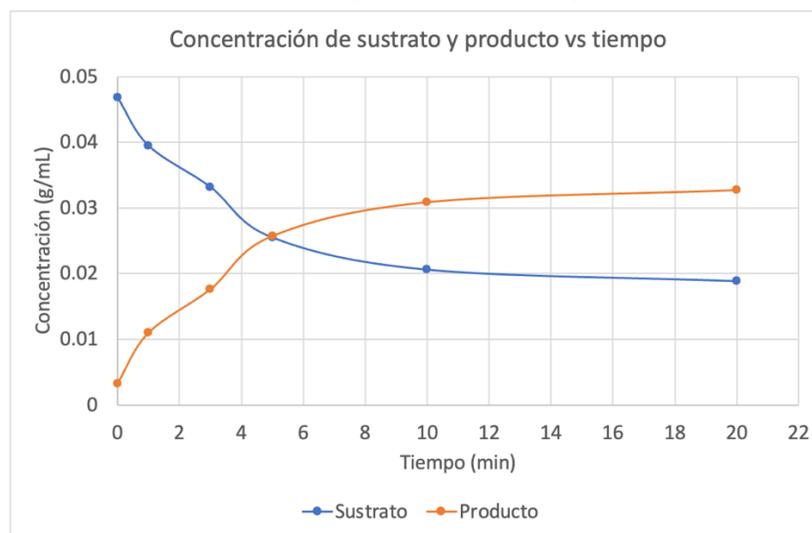
Es la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 72. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



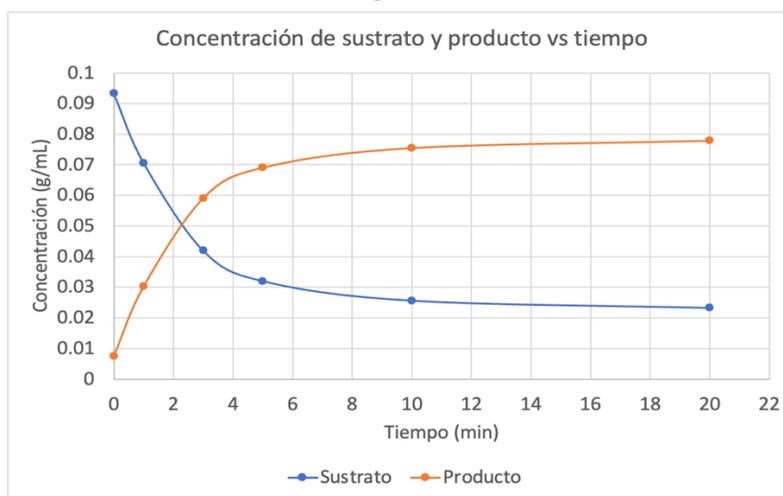
Es la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 73. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$



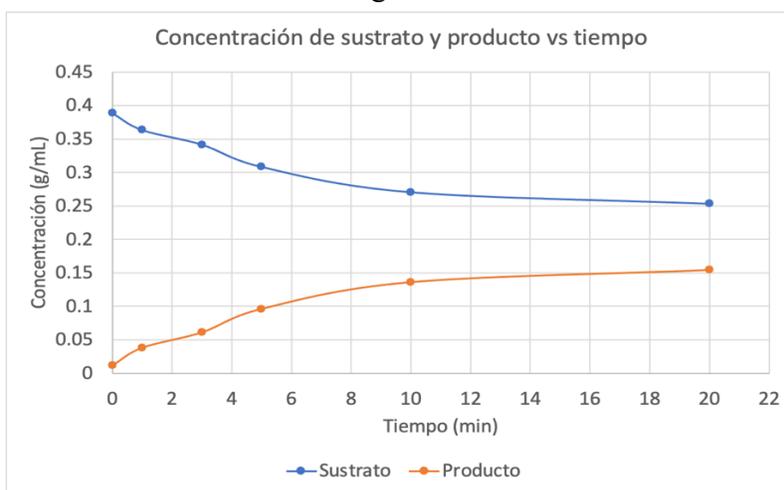
Es la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa el pH, para determinar el valor al que se produce la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 74. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL



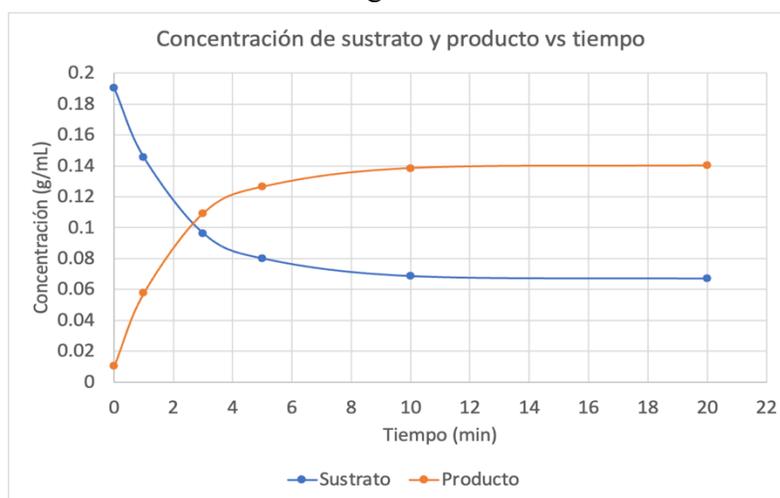
Es la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 75. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL



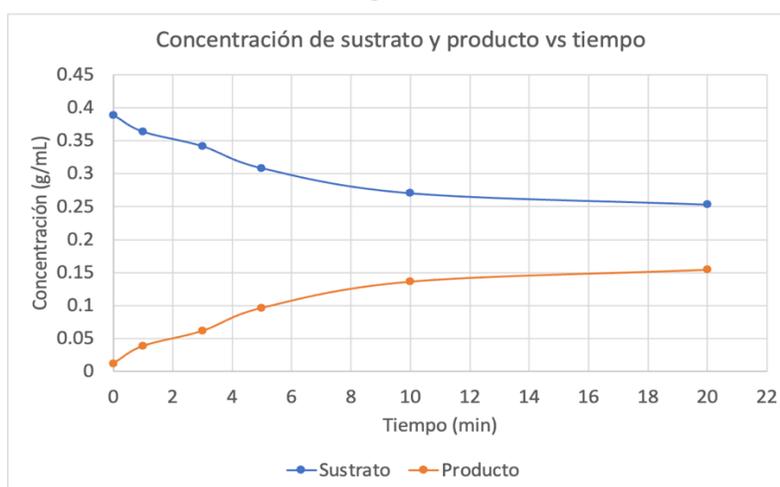
Es la corrida 10 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 76. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



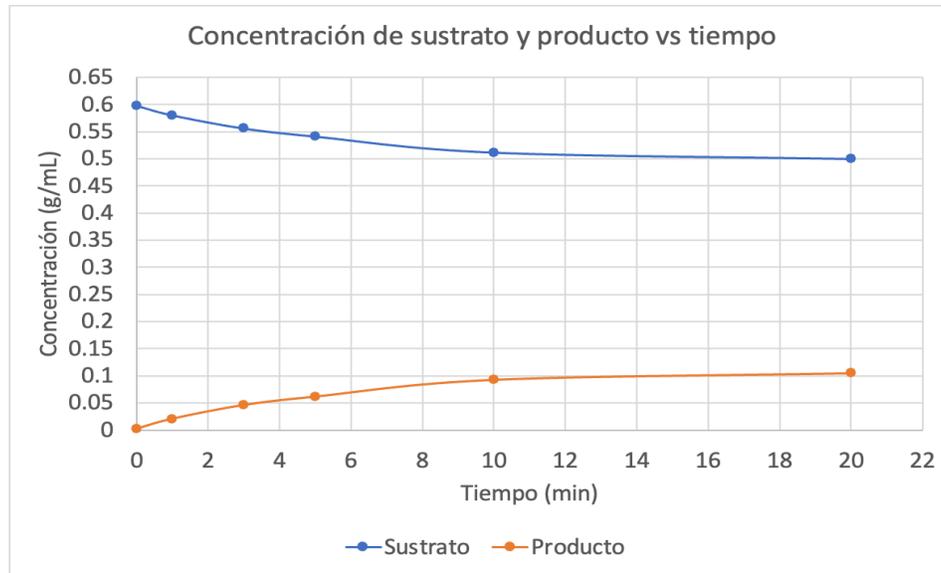
Es la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 77. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa I inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es la corrida 12 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Figura 78. Concentración de sustrato y producto de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada en alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL



Es la corrida 13 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la concentración inicial de sacarosa, para determinar a cuál se logra la mayor conversión de sustrato a producto. Las condiciones de la hidrólisis son temperatura  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Se muestra una tendencia suavizada realizada en Excel de los datos obtenidos experimentalmente, no es un modelo.

Ecuación 8. Modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa

$$r_p = \frac{B * K_2 * E_0 * (S - X)}{(S - X) + \left(\frac{K_M}{C}\right)}$$

$r_p$  = velocidad de reacción

$B$  = factor de inmovilización de la velocidad máxima

$K_2$  = constante de velocidad

$S$  = concentración de sustrato

$X$  = concentración final de sustrato

$K_M$  = constante de Michaelis-Menten

$C$  = factor de inmovilización de la constante de Michaelis-Menten

Este modelo se obtuvo utilizando el software Berkeley Madonna. Se realizó un ajuste de los datos para cada una de las corridas experimentales realizadas, exceptuando las de concentración inicial de sustrato de  $0.4 \pm 0.000$  y  $0.6 \pm 0.000$  g/mL tanto para la enzima libre como para las tres inmovilizaciones. Este se obtuvo tomando el modelo de Monod como base (ecuación 2).

Ecuación 9. Modelo general con inhibición por sustrato de la hidrólisis de sacarosa con invertasa

$$r_p = \frac{B * K_2 * E_0 * (S - X)}{(S - X) + \left(\frac{K_M}{C}\right) + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)}$$

$r_p$  = velocidad de reacción

$B$  = factor de inmovilización de la velocidad máxima

$K_2$  = constante de velocidad

$S$  = concentración de sustrato

$X$  = concentración final de sustrato

$K_M$  = constante de Michaelis-Menten

$C$  = factor de inmovilización de la constante de Michaelis-Menten

$K_i$  = constante de inhibición

Este modelo se obtuvo utilizando el software Berkeley Madonna. Se realizó un ajuste de los datos para las corridas experimentales de concentración inicial de sustrato de  $0.4 \pm 0.000$  y  $0.6 \pm 0.000$  g/mL realizadas, tanto para la enzima libre como para las tres inmovilizaciones. Este se obtuvo tomando el modelo de Haldane como base (ecuación 4). Se realizó un modelo distinto para estas corridas porque presentaron inhibición por sustrato.

Cuadro 5. Parámetros cinéticos obtenidos para cada corrida utilizando el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa

Soporte	Variable	Concen. inicial sustrato (init S) (g/mL)	Concen. inicial producto (init P) (g/mL)	Concen. final sustrato (X) (g/mL)	Km	K2	Eo (ppm)	B	C	
Libre	Temperatura	40° C	0.048	0.003	0.007	2.320	0.045	12.000	1.000	1.000
		50° C	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000	1.000	1.000
		60° C	0.048	0.003	0.004	1.919	0.049	12.000	1.000	1.000
		70° C	0.048	0.002	0.012	2.424	0.042	12.000	1.000	1.000
Libre	pH	3	0.048	0.003	0.022	2.250	0.044	12.000	1.000	1.000
		5	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000	1.000	1.000
		6	0.048	0.002	0.002	1.834	0.059	12.000	1.000	1.000
		7	0.049	0.001	0.002	1.854	0.056	12.000	1.000	1.000
		9	0.048	0.003	0.017	2.355	0.041	12.000	1.000	1.000
Libre	Concentración	0.05 g/mL	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000	1.000	1.000
		0.10 g/mL	0.093	0.008	0.015	1.813	0.066	12.000	1.000	1.000

Soporte	Variable		Concen. inicial sustrato (init S) (g/mL)	Concen. inicial producto (init P) (g/mL)	Concen. final sustrato (X) (g/mL)	Km	K2	Eo (ppm)	B	C
Libre	Concentración	0.15 g/mL	0.142	0.009	0.031	1.793	0.072	12.000	1.000	1.000
		0.20 g/mL	0.194	0.006	0.064	1.863	0.057	12.000	1.000	1.000
	Temperatura	40° C	0.049	0.001	0.008	2.320	0.045	13.190	0.770	1.000
		50° C	0.047	0.003	0.003	1.818	0.062	13.190	0.890	1.000
		60° C	0.048	0.003	0.003	1.919	0.049	13.190	1.040	1.000
		70° C	0.047	0.003	0.011	2.424	0.042	13.190	1.120	1.000
		3	0.047	0.003	0.026	2.250	0.044	13.190	0.910	1.000
Carbón activado	pH	5	0.047	0.003	0.002	1.818	0.062	13.190	0.890	1.000
		6	0.047	0.003	0.003	1.834	0.059	13.190	0.890	1.000
		7	0.047	0.003	0.004	1.854	0.056	13.190	0.950	1.000
		9	0.047	0.003	0.012	2.355	0.041	13.190	1.190	1.000
	Concentración	0.05 g/mL	0.047	0.003	0.002	1.818	0.062	13.190	0.880	1.000
		0.10 g/mL	0.093	0.008	0.019	1.813	0.066	13.190	0.870	1.000
		0.15 g/mL	0.140	0.010	0.044	1.793	0.072	13.190	0.850	1.000
Temperatura	0.20 g/mL	0.193	0.008	0.046	1.863	0.057	13.190	1.060	1.000	
	40° C	0.048	0.002	0.008	2.320	0.045	12.580	0.840	1.000	
	50° C	0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580	0.920	1.000	
	60° C	0.048	0.003	0.002	1.919	0.049	12.580	1.260	1.000	
	70° C	0.049	0.001	0.009	2.424	0.042	12.580	1.430	1.000	
PHA	pH	3	0.049	0.001	0.023	2.250	0.044	12.580	0.950	1.000
		5	0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580	0.920	1.000
		6	0.046	0.004	0.002	1.834	0.059	12.580	0.940	1.000
		7	0.045	0.005	0.002	1.854	0.056	12.580	1.010	1.000
	Concentración	9	0.046	0.004	0.010	2.355	0.041	12.580	1.240	1.000
		0.05 g/mL	0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580	0.920	1.000
		0.10 g/mL	0.091	0.009	0.016	1.813	0.066	12.580	0.920	1.000
Temperatura	0.15 g/mL	0.133	0.018	0.037	1.793	0.072	12.580	0.900	1.000	
	0.20 g/mL	0.197	0.003	0.038	1.863	0.057	12.580	1.110	1.000	
Alginato de sodio	Temperatura	40° C	0.046	0.004	0.009	2.320	0.045	17.438	0.680	0.750
		50° C	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438	0.760	0.890

SopORTE	Variable		Concen. inicial sustrato (init S) (g/mL)	Concen. inicial producto (init P) (g/mL)	Concen. final sustrato (X) (g/mL)	Km	K2	Eo (ppm)	B	C
Alginato de sodio	Temperatura	60° C	0.047	0.003	0.003	1.919	0.049	17.438	1.030	0.890
		70° C	0.045	0.005	0.012	2.424	0.042	17.438	1.060	0.910
	pH	3	0.048	0.002	0.028	2.250	0.044	17.438	0.870	0.730
		5	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438	0.760	0.890
		6	0.046	0.004	0.003	1.834	0.059	17.438	0.780	0.880
		7	0.048	0.002	0.004	1.854	0.056	17.438	0.800	0.920
		9	0.047	0.003	0.019	2.355	0.041	17.438	1.050	0.850
		Concentración	0.05 g/mL	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438	0.760
	0.10 g/mL		0.093	0.007	0.023	1.813	0.066	17.438	0.760	0.890
	0.15 g/mL		0.139	0.012	0.048	1.793	0.072	17.438	0.770	0.880
	0.20 g/mL		0.190	0.010	0.067	1.863	0.057	17.438	0.980	0.900

Los datos se obtuvieron con el modelo (ecuación 8) realizando un ajuste con los datos de cada corrida en Berkeley Madonna, exceptuando las de concentración inicial de sustrato de  $0.4 \pm 0.000$  y  $0.6 \pm 0.000$  g/mL, tanto de la enzima libre como las tres inmovilizadas. Los factores de inmovilización toman un valor de 1 en el modelaje de las corridas de la enzima en su estado libre.

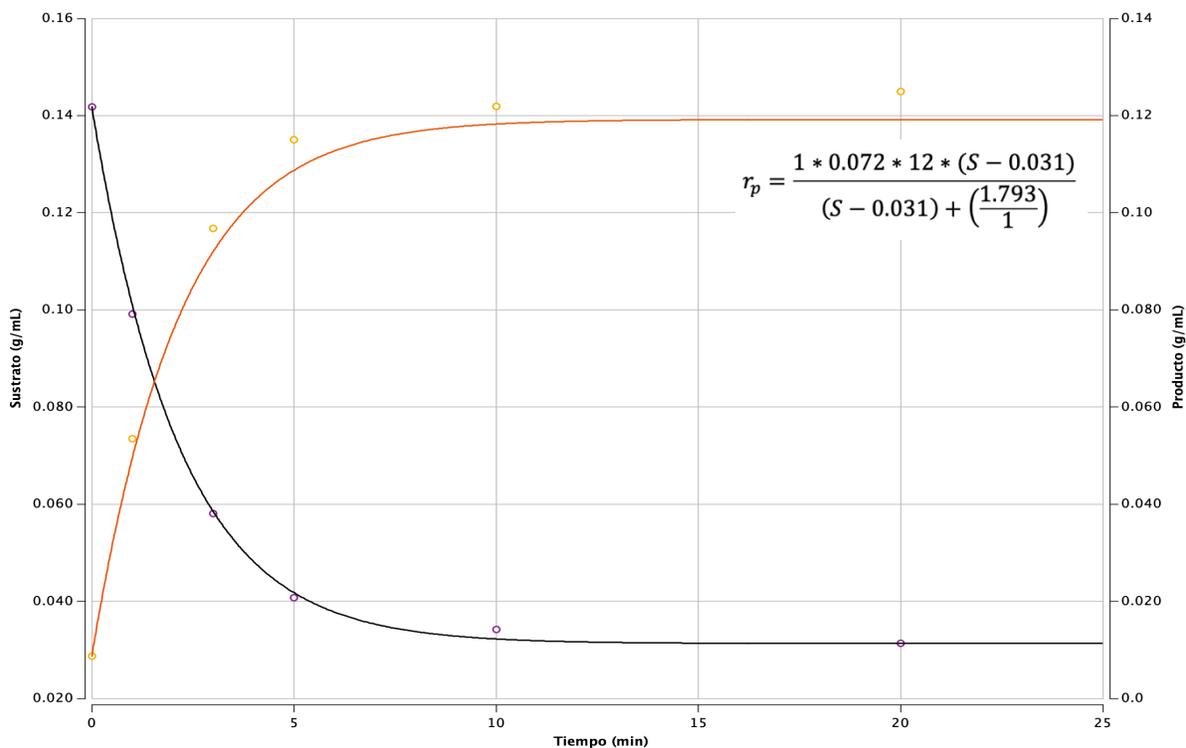
Cuadro 6. Parámetros cinéticos obtenidos para cada corrida utilizando el modelo general con inhibición de la hidrólisis de sacarosa con invertasa

SopORTE	Concen.	Concen. inicial sustrato (init S) (g/mL)	Concen. inicial producto (init P) (g/mL)	Concen. final sustrato (X) (g/mL)	Km (g/mL)	K2 (ppm <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Eo (ppm)	Ki	B	C
Enzima libre	0.40 g/mL	0.391	0.009	0.274	2.715	0.048	12.000	0.074	1.000	1.000
	0.60 g/mL	0.597	0.003	0.524	2.895	0.039	12.000	0.278	1.000	1.000
Carbón activado	0.40 g/mL	0.388	0.013	0.188	2.715	0.048	13.190	0.074	1.270	1.000
	0.60 g/mL	0.598	0.002	0.480	2.895	0.039	13.190	0.278	1.180	1.000
PHA	0.40 g/mL	0.385	0.015	0.144	2.715	0.048	12.580	0.074	1.310	1.000
	0.60 g/mL	0.594	0.006	0.452	2.895	0.039	12.580	0.278	1.250	1.000
Alginato de sodio	0.40 g/mL	0.389	0.012	0.253	2.715	0.048	17.438	0.074	1.090	0.930
	0.60 g/mL	0.598	0.002	0.500	2.895	0.039	17.438	0.278	1.120	0.960

Los datos se obtuvieron con el modelo (ecuación 9) realizando un ajuste con los datos de cada corrida en Berkeley Madonna para las de concentración inicial de sustrato de  $0.4 \pm 0.000$

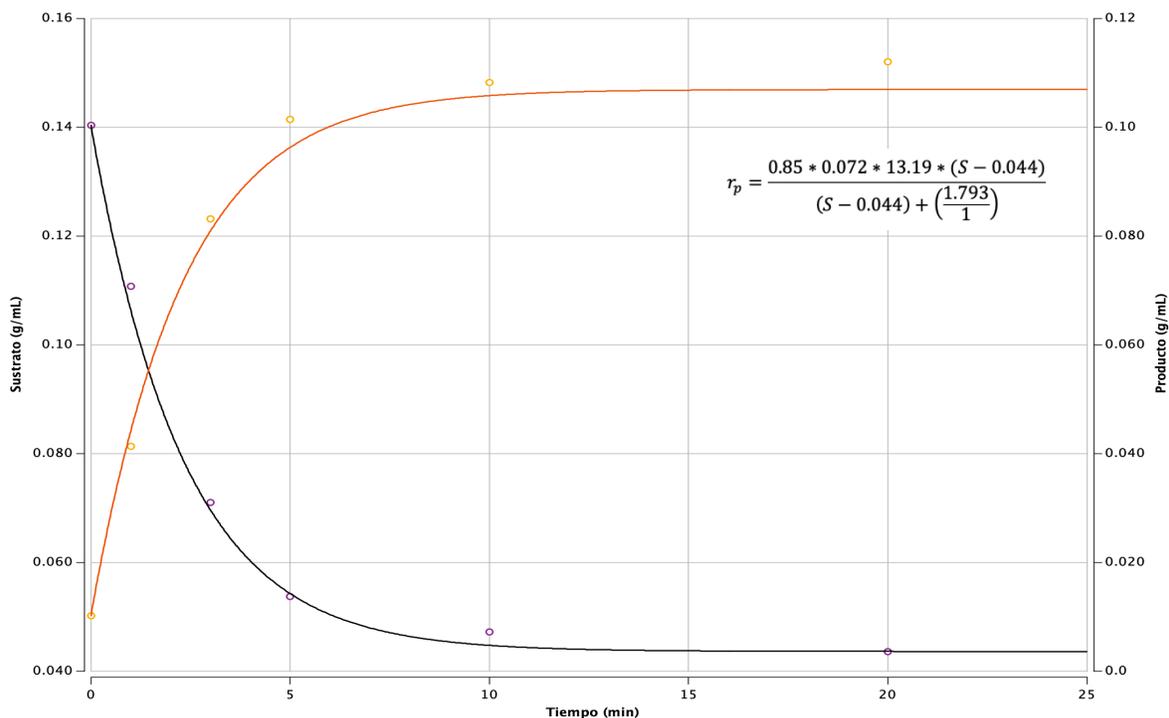
y  $0.6 \pm 0.000$  g/mL, tanto de la enzima libre como las tres inmovilizadas. Los factores de inmovilización toman un valor de 1 en el modelaje de las corridas de la enzima en su estado libre.

Figura 79. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa libre



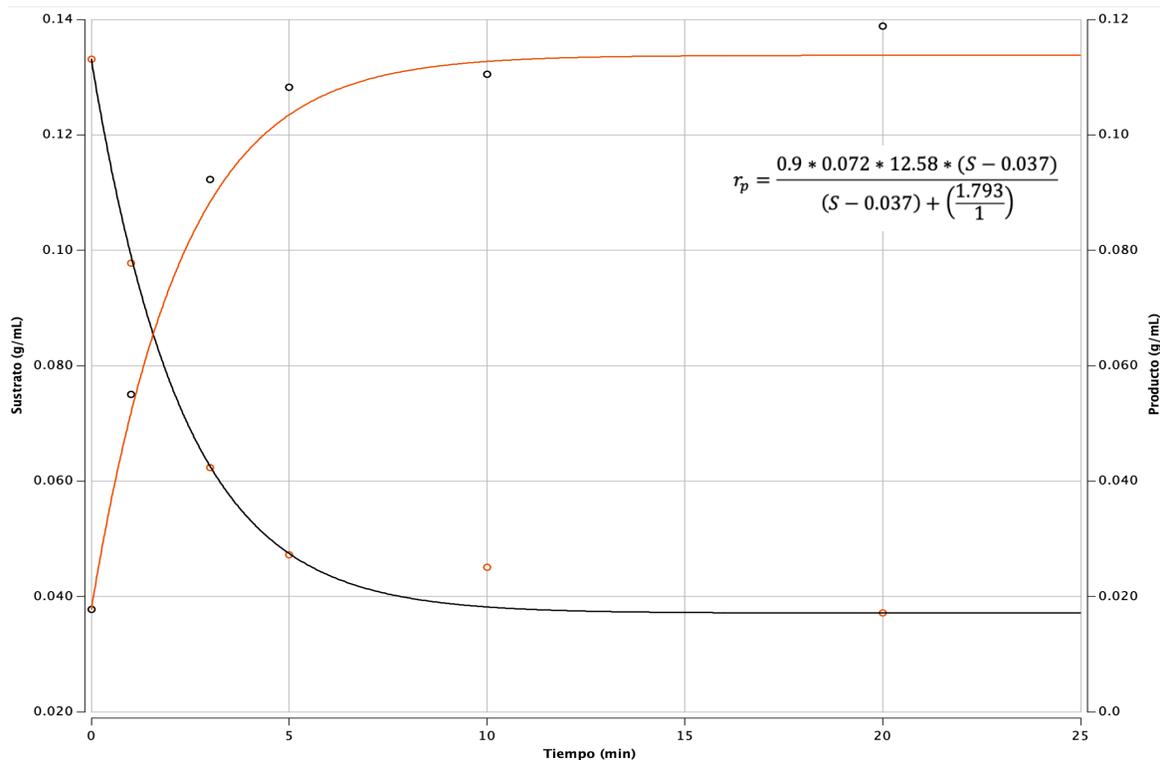
Este fue el modelo que presentó la menor contante de Michaelis-Menten y la mayor velocidad de reacción (el producto entre  $K_2$  y  $E_0$ ) para la enzima libre. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se puede observar la ecuación con la que se obtiene este modelo específica para estas condiciones, que se obtuvo basándose en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho). Los puntos que se observan en anaranjado son los resultados experimentales obtenidos para el cambio de la concentración de producto (glucosa y fructosa) durante la hidrólisis mientras que los negros son la concentración de sustrato (sacarosa). Por otra parte, la línea negra y la roja son el modelo generado para el cambio en la concentración de sustrato y producto contra el tiempo, respectivamente.

Figura 80. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con carbón activado



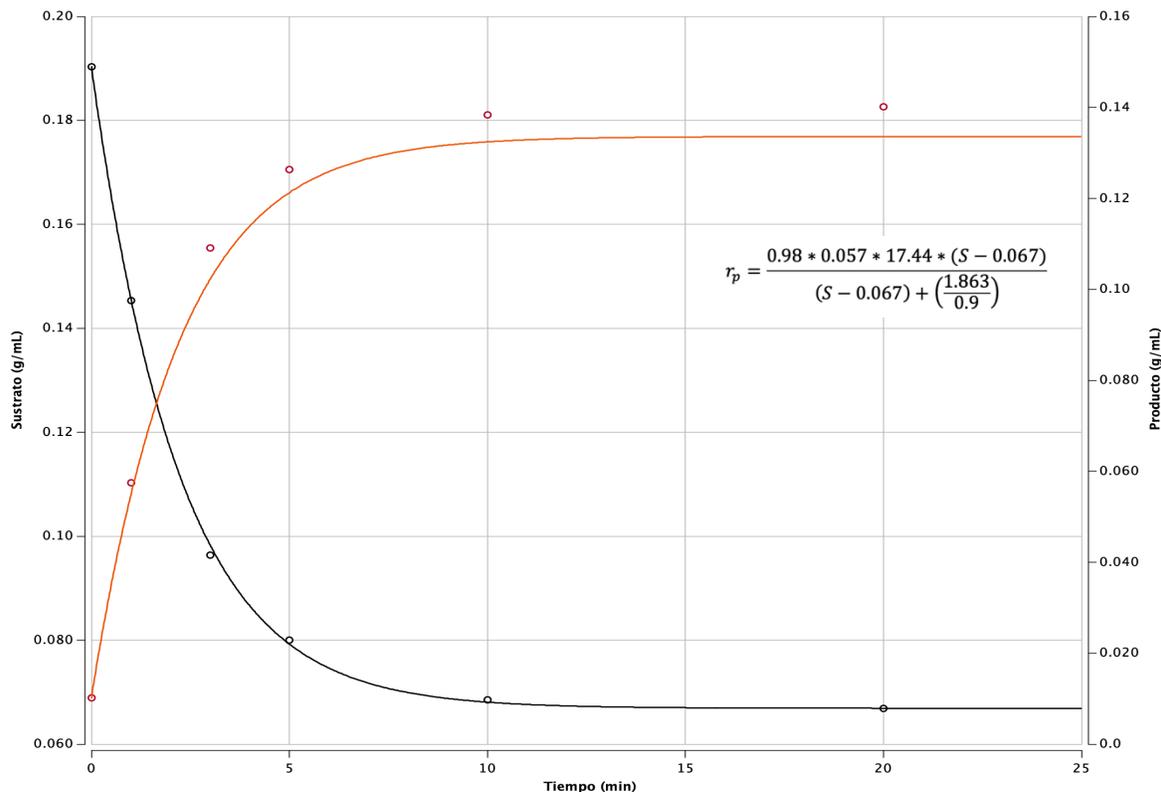
Este fue el modelo que presentó la menor constante de Michaelis-Menten y la mayor velocidad de reacción (el producto entre  $K_2$  y  $E_0$ , que multiplica por el factor de inmovilización B) para la enzima libre. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se puede observar la ecuación con la que se obtiene este modelo específica para estas condiciones, que se obtuvo basándose en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho). Los puntos que se observan en anaranjado son los resultados experimentales obtenidos para el cambio de la concentración de producto (glucosa y fructosa) durante la hidrólisis mientras que los negros son la concentración de sustrato (sacarosa). Por otra parte, la línea negra y la roja son el modelo generado para el cambio en la concentración de sustrato y producto contra el tiempo, respectivamente.

Figura 81. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado



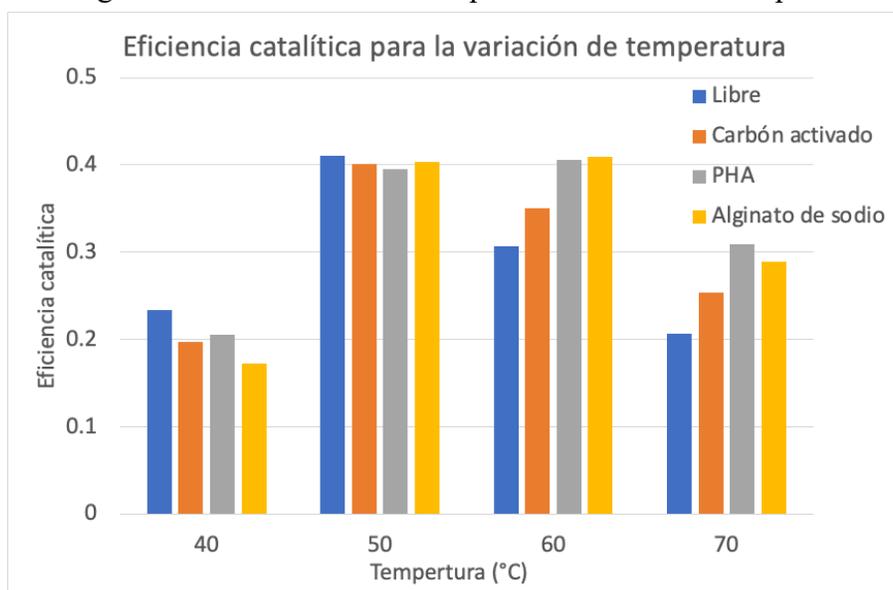
Este fue el modelo que presentó la menor contante de Michaelis-Menten y la mayor velocidad de reacción (el producto entre  $K_2$  y  $E_0$ , que multiplica por el factor de inmovilización B) para la enzima libre. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se puede observar la ecuación con la que se obtiene este modelo específica para estas condiciones, que se obtuvo basándose en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho). Los puntos que se observan en anaranjado son los resultados experimentales obtenidos para el cambio de la concentración de producto (glucosa y fructosa) durante la hidrólisis mientras que los negros son la concentración de sustrato (sacarosa). Por otra parte, la línea negra y la roja son el modelo generado para el cambio en la concentración de sustrato y producto contra el tiempo, respectivamente.

Figura 82. Modelo obtenido con las condiciones en las que se logra la mayor conversión de sustrato a producto con la invertasa inmovilizada con alginato de sodio



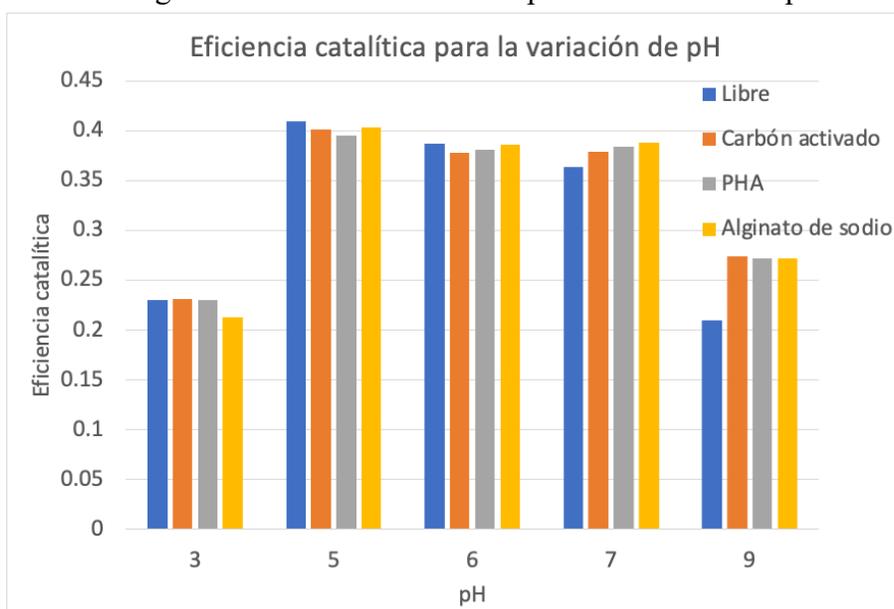
Este fue el modelo que presentó la menor constante de Michaelis-Menten (que se divide por el factor de inmovilización C) y la mayor velocidad de reacción (el producto entre  $K_2$  y  $E_0$ , que multiplica por el factor de inmovilización B) para la enzima libre. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se puede observar la ecuación con la que se obtiene este modelo específica para estas condiciones, que se obtuvo basándose en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho). Los puntos que se observan en anaranjado son los resultados experimentales obtenidos para el cambio de la concentración de producto (glucosa y fructosa) durante la hidrólisis mientras que los negros son la concentración de sustrato (sacarosa). Por otra parte, la línea negra y la roja son el modelo generado para el cambio en la concentración de sustrato y producto contra el tiempo, respectivamente.

Figura 83. Eficiencia catalítica para la variación de temperatura



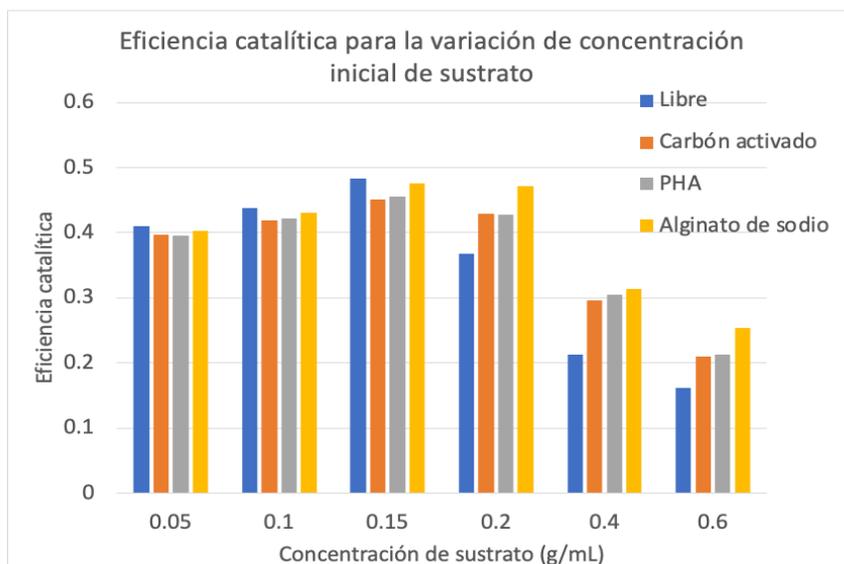
La eficiencia catalítica se obtiene dividiendo la velocidad máxima por la constante de Michaelis-Menten. Esta se calculó para todas las corridas de variación de temperatura, tanto para la invertasa libre como las tres inmovilizaciones. Los datos se encuentran en el cuadro 37 de la sección de datos originales.

Figura 84. Eficiencia catalítica para la variación de pH



La eficiencia catalítica se obtiene dividiendo la velocidad máxima por la constante de Michaelis-Menten. Esta se calculó para todas las corridas de variación de pH, tanto para la invertasa libre como las tres inmovilizaciones. Los datos se encuentran en el cuadro 37 de la sección de datos originales.

Figura 85. Eficiencia catalítica para la variación de concentración inicial de sustrato



La eficiencia catalítica se obtiene dividiendo la velocidad máxima por la constante de Michaelis-Menten. Esta se calculó para todas las corridas de variación de concentración de sustrato, tanto para la invertasa libre como las tres inmobilizaciones. Los datos se encuentran en el cuadro 37 de la sección de datos originales.

Cuadro 7. Análisis de varianza (ANOVA)

Comparación de medias para los diferentes soportes a	Estadística F	Valor crítico de F
Temperatura	40° C	3.259
	50° C	1.259
	60° C	0.507
	70° C	1.556
pH	3	12.500
	5	1.259
	6	0.583
	7	1.819
	9	26.800
Concentración	0.05 g/mL	1.259
	0.10 g/mL	2.152
	0.15 g/mL	12.000
	0.20 g/mL	39.774
	0.40 g/mL	74.496
	0.60 g/mL	1174.388

Se realizó un análisis de varianza de una variable, con un 95% de confianza, utilizando la

herramienta de análisis de datos de Excel. La comparación se realizó entre la concentración final de producto, para la enzima libre y las tres inmobilizaciones, para cada una de las condiciones de temperatura, pH y concentración evaluadas.

Cuadro 8. Comparación entre soportes de inmobilización

Condición evaluada	Mejor eficiencia	Peor eficiencia	
T (°C)	40	Enzima libre	Alginato de sodio
	50	Enzima libre	PHA funcionalizado
	60	Alginato de sodio	Enzima libre
	70	PHA funcionalizado	Enzima libre
pH	3	Carbón activado	Alginato de sodio
	5	Enzima libre	PHA funcionalizado
	6	Enzima libre	Carbón activado
	7	Alginato de sodio	Enzima libre
	9	Carbón activado	Enzima libre
Concen. inicial de sustrato (g/mL)	0.05	Enzima libre	PHA funcionalizado
	0.1	Enzima libre	Carbón activado
	0.15	Enzima libre	Carbón activado
	0.2	Alginato de sodio	Enzima libre
	0.4	Alginato de sodio	Enzima libre
	0.6	Alginato de sodio	Enzima libre

Se puede observar una comparación entre la eficiencia catalítica de la enzima inmobilizada en los distintos soportes de inmobilización y en su estado libre. Para cada condición evaluada se determinó qué soporte permitía que la invertasa tuviera la mayor y menor eficiencia catalítica para llevar a cabo la hidrólisis de sacarosa.

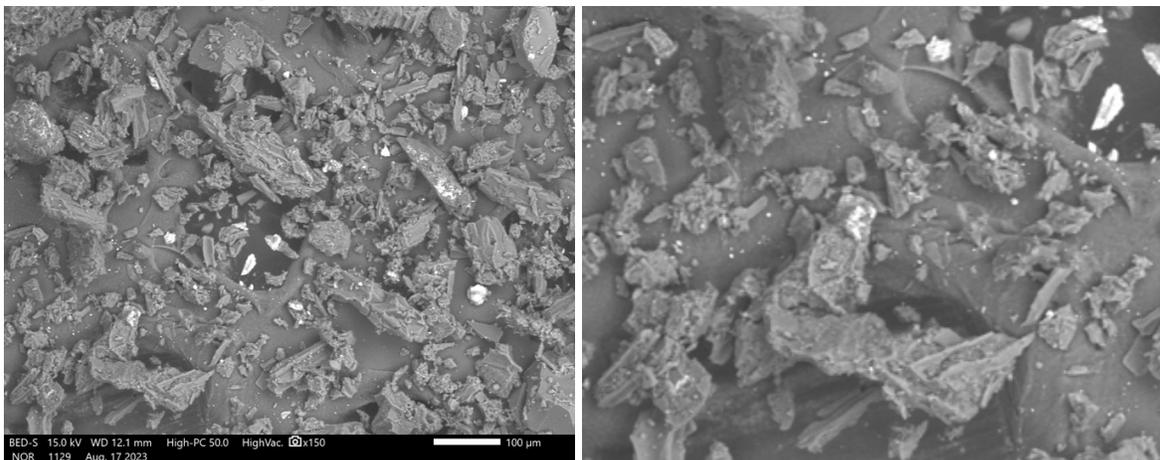
Cuadro 9. Energía de activación para el modelo sin inhibición

Soporte	Parámetro de cálculo	Energía de activación (kJ/mol)	Factor de frecuencia (g/mL/min)
Libre	Vmax	26.961	17,003.652
	Km	20.514	3,764.158
Carbón activado	Vmax	39.147	1,551,267.723
	Km	20.514	3,764.158
PHA	Vmax	34.615	283,164.884
	Km	20.514	3,764.158
Alginato de sodio	Vmax	36.319	611,409.611
	Km	34.913	899,254.038

Se calculó la energía de activación y el factor de frecuencia, con la velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten. Se utilizaron los datos de las corridas a 50° C, y el

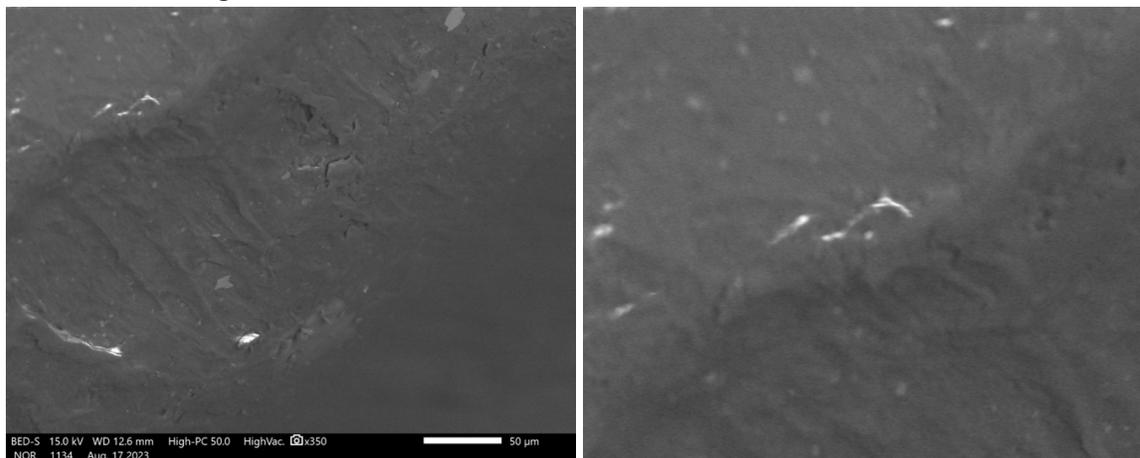
cambio desde 40° C. Se utilizó la linealización de la ecuación de Arrhenius (ecuación 7). Se realizó el cálculo para la enzima libre y para las tres inmobilizaciones.

Figura 86. Inmovilización de invertasa con carbón activado



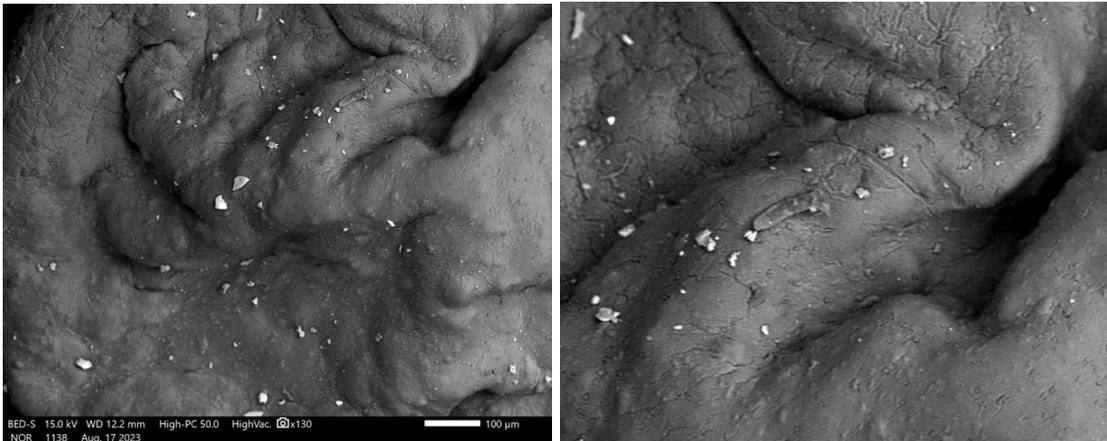
Se analizó la muestra utilizando un microscopio electrónico de barrido. El análisis se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso. La fotografía tiene un aumento de 100  $\times$ . Se pueden observar pequeñas partículas blancas en la imagen, que son la invertasa inmobilizada en el soporte.

Figura 87. Inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado



Se analizó la muestra utilizando un microscopio electrónico de barrido. El análisis se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso. La fotografía tiene un aumento de 50  $\times$ . Se pueden observar pequeñas partículas blancas en la imagen, que son la invertasa inmobilizada en el soporte. La imagen tiene baja resolución debido a que el PHA no es un material conductor, lo que complicaba el análisis con el microscopio electrónico de barrido.

Figura 88. Inmovilización de invertasa con alginato de sodio



Se analizó la muestra utilizando un microscopio electrónico de barrido. El análisis se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso. La fotografía tiene un aumento de 100  $\times$ m. Se pueden observar pequeñas partículas blancas en la imagen, que son la invertasa inmovilizada en el soporte.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó una evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial, utilizando tres métodos de inmovilización. Esto se logró mediante el estudio del comportamiento de la invertasa libre para hidrolizar sacarosa en las principales condiciones que afecten su funcionalidad, con el que se estableció su rango de operación. Luego se realizaron tres inmovilizaciones con distintos soportes, carbón activado, PHA funcionalizado y alginato de sodio, para los cuales se comparó el rendimiento de inmovilización, para determinar la efectividad del proceso a escala laboratorio. Luego, se estudió el comportamiento de la enzima para cada inmovilización, se estableció su rango de operación, para realizar una comparación con el de la enzima libre.

Para establecer el rango de operación de la invertasa libre, se evaluaron tres condiciones, temperatura, pH y concentración inicial de sustrato. Como se puede observar en el Cuadro 3, el primer factor que se varió fue la temperatura, por lo que se mantuvo constantes el pH y la concentración inicial de sustrato. Inicialmente, se utilizó un pH de  $5 \pm 0.005$ , ya que el rango en el que la invertasa muestra una actividad óptima es de entre 4.6 y 5 (Ferreira et al., 2018). Además, se trabajó con una concentración inicial de sacarosa de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL, debido a que, a concentraciones bajas de invertasa, un estudio realizado por Martínez & Morales (2007) indica que, a esta concentración, la enzima presentó la mayor actividad.

Como se puede observar en la Figura 24, al realizar la hidrólisis a una temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ$  C, se alcanzó una concentración final de producto, azúcares invertidos, de  $0.0457 \pm 0.0033$  g/mL. La siguiente temperatura que se evaluó fue de  $50 \pm 0.5^\circ$  C (Figura 25) y la concentración final de producto que se obtuvo fue de  $0.0512 \pm 0.0033$  g/mL. En la Figura 26 se puede observar a que  $60 \pm 0.5^\circ$  C, la concentración final de azúcares invertidos es de  $0.0486 \pm 0.0038$  g/mL y para  $70 \pm 0.5^\circ$  C esta fue de  $0.0398 \pm 0.0051$  g/mL (Figura 27).

De acuerdo con el comportamiento de la reacción a distintas temperaturas, se determinó que a  $50 \pm 0.5^\circ$  C se logró la mayor conversión de sustrato a producto. Esto coincide con el rango de temperatura óptima teórica de la invertasa, que es de entre 45 y  $50^\circ$  C (Ferreira et al., 2018). Se notó un aumento de la conversión de sacarosa a fructosa y glucosa al elevar la temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ$  C a  $50 \pm 0.5^\circ$  C, debido a que, a mayor temperatura hay una mayor cantidad de moléculas de sustrato que tienen suficiente energía para reaccionar (Lera, 2011). Sin embargo, cuando esta se elevó a  $60 \pm 0.5^\circ$  C, nuevamente hubo una disminución en la cantidad de producto que se obtuvo de la hidrólisis. Esto se debe a que la temperatura de

desnaturalización de la invertasa es de 55° C (Martínez & Morales, 2007). Cuando una proteína se desnaturaliza, experimenta cambios en su conformación tridimensional, que es la que le permite llevar a cabo su función, lo que explica la disminución en la conversión de sustrato cuando temperatura durante la hidrólisis se aumentó (Porto, 2014).

De acuerdo al Cuadro 3, el siguiente factor que se evaluó fue el pH. Se optó por evaluar el rango de operación que se presentaba en la ficha técnica de la invertasa, entre 5 y 7, y un valor más ácido y otro básico. Durante estas corridas, se mantuvo constante la temperatura (a  $50 \pm 0.5^\circ$  C, ya que esta mostró los mejores resultados entre las temperaturas evaluadas) y la concentración de sacarosa de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Como se puede observar en la Figura 28, a un pH de  $3 \pm 0.005$  se logró una concentración de producto de  $0.0291 \pm 0.0033$  g/mL. A un pH de  $6 \pm 0.005$ , esta fue de  $0.0504 \pm 0.0038$  g/mL (Figura 29), a un pH de  $7 \pm 0.005$  fue de  $0.0501 \pm 0.0033$  g/mL (Figura 30) y finalmente, a un pH de  $9 \pm 0.005$ , como se puede observar en la Figura 31, esta fue de  $0.0346 \pm 0.0033$  g/mL.

Según los resultados obtenidos, el dónde se obtuvo una mayor conversión de sustrato para la reacción es de  $5 \pm 0.005$  (el que se mantuvo durante las corridas de evaluación de temperatura). Este coincide con el pH óptimo teórico de la invertasa, que se encuentra entre 4.6 y 5 (Ferreira et al., 2018). La cantidad de producto que se obtuvo de la hidrólisis a pH 6 y  $7 \pm 0.005$  fue bastante similar a la obtenida a  $5 \pm 0.005$ , debido a que este tipo de invertasa comercial opera bien en un rango más amplio de pH. También se pudo observar que, fuera del rango establecido en su ficha técnica, la invertasa logró hidrolizar más sacarosa a un pH ácido que a uno básico. Este se debe a que esta la obtención de azúcares invertidos también se puede lograr mediante el uso de ácidos (ScanCo, 2021). Por lo tanto, pese a que la enzima no estaba funcionando de manera óptima a un pH de  $3 \pm 0.005$ , puede que el medio ácido en el que se encontraba la sacarosa haya favorecido su hidrólisis. La concentración de producto más baja se obtuvo al trabajar con un pH de  $9 \pm 0.005$ , debido a que en un pH mayor a 7.6 ocasiona cambios en el punto isoelectrico de la enzima e inhiben su capacidad catalítica (Martínez & Morales, 2007).

Al tener definidos el pH y la temperatura a los que se obtiene una mayor concentración de producto, se evaluó la el efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis, como se puede observar en el Cuadro 3. Los jugos clarificados, una posible materia prima para reacciones de hidrólisis con invertasa, tienen un contenido de sacarosa mínimo de 12.6%, uno máximo de 18.1% y en promedio tienen 21.5% (Corpoica, 2013). Por lo tanto, se decidió evaluar el comportamiento de la reacción a  $0.10$ ,  $0.15$  y  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Además, debido a que lo que se busca en la industria es minimizar el uso de enzima, mientras se obtiene la mayor cantidad de producto, también se evaluaron concentraciones de sacarosa más altas, en caso se estuviera utilizando azúcar refinada como materia prima, siendo estas  $40$  y  $60 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa.

Como se puede observar en la Figura 32, a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL, se obtuvo una concentración de azúcares invertidos de  $0.0858 \pm 0.0208$  g/mL, mientras que, como se muestra en la Figura 33, para  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa iniciales, se obtienen  $0.1249 \pm 0.0104$  g/mL de producto. Para  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, la concentración final de azúcares invertidos fue de  $0.1423 \pm 0.0134$  g/mL (Figura 34), para  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa fue de  $0.1326 \pm 0.0006$  g/mL (Figura 35) y para  $0.6 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa fue de  $0.0799 \pm 0.0037$  g/mL (Figura 36). Debido a que las concentraciones iniciales son distintas, se utilizó la forma de las gráficas para determinar cuál es la concentración que permite una mayor conversión, basándose en la inclinación de la gráfica, siendo esta la Figura 33 ( $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa).

En concentraciones más elevadas a  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, las graficas muestran que la reacción se alenta, ya que se pueden ver que las líneas de concentración de sustrato y producto se vuelven más horizontales y, a partir de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, estas ya no se intersectan. Este comportamiento se debe a las altas concentraciones de sustrato, que están causando una inhibición. En la inhibición por sustrato, en lugar de alcanzarse un equilibrio de estado estacionario cuando la reacción alcanza su velocidad máxima, el exceso de sustrato presente comienza a inhibir la reacción, por lo que se reduce la cantidad de sacarosa que se hidroliza (Kakkonen et al., 2021).

Luego de tener establecido el rango de operación de la invertasa libre, se procedió a realizar tres inmobilizaciones, por adsorción utilizando carbón activado, por unión covalente mediante PHA funcionalizado y por atrapamiento con alginato de sodio. Para cada una se determinó el rendimiento de inmobilización. Como se puede observar en el Cuadro 4, para el carbón activado este fue de  $26.38 \pm 0.006\%$ , para el PHA funcionalizado fue de  $31.45 \pm 0.006\%$  y para el alginato de sodio fue de  $69.75 \pm 0.007\%$ . Estos son rendimientos bastante bajos, especialmente para el carbón activado y el PHA, que es uno de los principales problemas de la inmobilización enzimática.

La inmobilización por unión covalente suele ser el método más complicado, ya que se debe lograr un cambio en la superficie del soporte, que en este caso fue la funcionalización del PHA con glutaraldehído, para que la enzima se adhiere a esta. Por esta razón suele presentar rendimientos de inmobilización bajos. La inmobilización con carbón activado suele ser un proceso tardado, ya que el carbón necesita un largo tiempo de exposición a la enzima para que esta logre ser adsorbida. Por lo tanto, en tiempos de reacción cortos, el rendimiento suele ser bajo. Por otra parte, la inmobilización por atrapamiento, como la realizada con alginato de sodio, suele tener más rendimiento, debido a que la enzima se encuentra en solución con el soporte, que luego la contiene dentro de una membrana. Debido a esto, es un método que incluso puede ser utilizado para inmobilizar varios tipos de enzima a la vez (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

Para poder determinar el rendimiento de inmovilización enzimática, fue necesario determinar la cantidad de enzima que se logró retener en el soporte. Esto se determinó mediante un balance másico, ya que se cuantificó la cantidad de enzima libre en los remanentes de cada inmovilización y al tener la cantidad de enzima total agregada a la solución, se pudo determinar cuánta invertasa se logró inmovilizar (los balances se encuentran en las Figuras 146-152 en la sección G “Balances de masa” de Anexos). Estos balances también permitieron cuantificar cuánta enzima se estaba agregando a cada una de las corridas de condiciones que se realizaron para la invertasa inmovilizada con los tres soportes, basándose en la cantidad de enzima retenida en total y la cantidad de carbón activado, alginato de sodio y PHA funcionalizado con el que se realizaba la hidrólisis.

Para cada inmovilización, se evaluaron las mismas condiciones de operación que para la enzima libre, siguiendo el mismo diseño experimental que se muestra en el Cuadro 3, para determinar su rango de operación. Primero se evaluó la hidrólisis con la enzima inmovilizada con carbón activado, que, como se puede observar en las Figuras 37-40, se logró obtener la mayor cantidad de producto a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$  ( $0.0497 \pm 0.0019 \text{ g/mL}$ ). Se notó el incremento en la conversión que causa el aumento de temperatura desde  $40$  a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$  y se mantuvo la misma temperatura a la que se logra la mayor conversión de sacarosa que con la enzima libre. Sin embargo, se logró alcanzar una concentración final de producto menor a esta temperatura. Por otra parte, se notó un aumento en la cantidad de azúcares invertidos que se lograron obtener a  $60$  y  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$  ( $0.0494 \pm 0.0051$  y  $0.0413 \pm 0.0033 \text{ g/mL}$  respectivamente), al compararlo con la enzima libre. Este aumento en la conversión a temperaturas que están sobre la temperatura de desnaturalización de la invertasa se debe a existen uniones multipuntuales entre la enzima y el soporte, que hacen que su estructura terciaria sea más rígida, permitiendo que resista la desactivación térmica, ya que no pierde su estructura y con ella, su función (Flores, 2011).

En cuanto a la evaluación del efecto del pH (Figuras 41-44) de igual manera se mantuvo el mismo pH con el que se logra la mayor conversión de sustrato, que, con la enzima libre,  $5 \pm 0.005$ . Sin embargo, también se notó la disminución en la concentración final de producto que se alcanza en esta condición. También se notó una menor cantidad de producto final obtenido cuando el medio se encuentra a un pH de  $6$  y  $7 \pm 0.005$  ( $0.0486 \pm 0.0038$  y  $0.0497 \pm 0.0019 \text{ g/mL}$  respectivamente). Por otra parte, para el pH  $3$  y  $9 \pm 0.005$ , hubo un aumento en la cantidad de fructosa y glucosa que se obtuvo, en relación con la enzima libre ( $0.0398 \pm 0.0051$  y  $0.0258 \pm 0.0033 \text{ g/mL}$  respectivamente). Esto se debe a que la unión de la enzima con el soporte hace que la estructura terciaria de esta sea más estable y permitiendo así que su estructura resista cambios de pH, evitando su desactivación química (Flores, 2011). Por lo tanto, la invertasa resiste los cambios en el punto isoeléctrico causados por pH básico y así, no pierde su actividad (Martínez & Morales, 2007).

Se evaluó la hidrólisis con distintas concentraciones iniciales de sacarosa (Figuras 45-49). Según el comportamiento de las gráficas,  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL fue la concentración de sustrato que generó mayor conversión a producto ( $0.1112 \pm 0.0078$  g/mL), por lo que se mantiene el mismo comportamiento que con la invertasa libre, aunque, nuevamente disminuye la cantidad de azúcares invertidos que se obtiene. Esta disminución también se hace evidente en las concentraciones menores a  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Sin embargo, a partir de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL, se nota un aumento en la cantidad de producto obtenido. Esto se debe a que la invertasa experimenta una inhibición de sustrato cuando hay exceso de sacarosa en el medio. La inmovilización y el aumento de estabilidad que le da el soporte a la enzima puede disminuir esta inhibición, por lo que aumenta la conversión de sustrato a producto a  $0.20$ ,  $0.40$  y  $0.6 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa (Flores, 2011). En las tres condiciones evaluadas se notó una disminución en la cantidad de producto que se obtiene, cuando se trabaja en condiciones favorables. Esto pudo ocurrir porque este tipo de inmovilización puede ser sensible a las fuerzas de corte mecánicas que afectan la unión de la enzima al soporte debido a cambios en las condiciones de reacción (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

Luego se realizó la misma evaluación de condiciones para la inmovilización con PHA funcionalizado, siguiendo el diseño experimental del Cuadro 3. Para la temperatura, como se puede observar en las Figuras 50-53, la temperatura con la que mayor inversión de sacarosa se logró fue a  $50 \pm 0.5^\circ$  C ( $0.0508 \pm 0.0051$  g/mL de producto), al igual que con la enzima libre, pese a que hubo una disminución. Nuevamente se notó un aumento en la cantidad de azúcares invertidos finales para  $60 \pm 0.5^\circ$  C ( $0.0501 \pm 0.0033$  g/mL) y para  $70 \pm 0.5^\circ$  C con  $0.0427 \pm 0.0069$  g/mL, debido a la estabilidad que le brinda el soporte a la invertasa, permitiéndole soportar de mejor manera la desactivación térmica. Entre  $40$  y  $50 \pm 0.5^\circ$  C, se notó que la temperatura lograba mejorar la reacción, pero luego hubo una disminución a partir de  $60 \pm 0.5^\circ$  C. Por lo que el comportamiento general se mantuvo similar al de la enzima libre.

Al evaluar el pH, se logró obtener una mayor cantidad de producto a  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  ( $0.0508 \pm 0.0051$  g/mL), por lo que este comportamiento fue similar al de la invertasa libre. Sin embargo, como se puede observar en las Figuras 54-57, se logró la misma conversión cuando el pH se ajustó a  $7 \pm 0.005$ . A  $\text{pH } 3$ ,  $5$  y  $6 \pm 0.005$  se obtuvo concentraciones de producto menores que con la enzima libre ( $0.0279 \pm 0.0033$ ,  $0.0508 \pm 0.0051$ ,  $0.0508 \pm 0.0051$  g/mL respectivamente), mientras que para  $\text{pH } 7$  y  $9 \pm 0.005$  esta resultó mayor ( $0.0508 \pm 0.0019$  y  $0.0424 \pm 0.0033$  respectivamente). Esto evidencia que la inmovilización hace que la enzima resista de mejor manera cambios de pH, especialmente cuando este se vuelve más básico.

La concentración a la que se logra la mayor inversión de sacarosa, como se puede observar en las Figuras 58-62, debido al comportamiento de las gráficas,  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL fue la concentración de sustrato con la que se logró obtener la mayor conversión a producto

( $0.1112 \pm 0.0078$  g/mL), debido a la inclinación de la gráfica. A partir de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL, la reacción se vuelve más lenta y esto se evidencia en que las gráficas adoptan un comportamiento con menor inclinación e incluso en  $0.4$  y  $0.6 \pm 0.0005$  g/mL, las líneas de sustrato y producto no se intersecan. Por lo tanto, el comportamiento es similar al presentado por la invertasa libre. Sin embargo, se notó un aumento en la concentración de producto que se obtiene a partir de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL, en relación con la enzima libre, lo que indica que la unión al soporte vuelve a la enzima más resistente a la inhibición por sustrato que genera el exceso de sacarosa. La inmovilización por unión covalente puede resultar en la pérdida o reducción de la actividad catalítica de la enzima por cambios conformacionales que esta puede sufrir al unirse a la superficie del soporte (Meneau, Borrego, & Liva, 2021). Esto puede explicar la reducción en la conversión de sustrato, en relación con la enzima libre cuando las condiciones evaluadas eran favorables para la reacción.

Se evaluaron las condiciones, según el Cuadro 3, para la inmovilización con alginato de sodio. Durante la evaluación de temperatura, que se puede observar en las Figuras 63-66, se logró obtener la mayor inversión de sustrato a  $50 \pm 0.5^\circ$  C ( $0.0494 \pm 0.0051$  g/mL). Esta inmovilización también presentó un comportamiento similar al de la enzima libre, pues se notó un aumento en la cantidad de producto obtenido entre  $40$  y  $50 \pm 0.5^\circ$  C, y luego una disminución en  $60$  y  $70 \pm 0.5^\circ$  C. Sin embargo, fue evidente un aumento se obtuvo una menor cantidad de producto para  $40$  y  $50 \pm 0.5^\circ$  C ( $0.0423 \pm 0.0051$  y  $0.0494 \pm 0.0051$  g/mL, respectivamente), y una mayor para  $60$  y  $70 \pm 0.5^\circ$  C ( $0.0490 \pm 0.0057$  y  $0.0405 \pm 0.0051$  g/mL respectivamente), en relación a la enzima libre, lo que demuestra que el alginato le permite a la invertasa resistir de mejor manera la inactivación por temperatura.

Durante la evaluación del pH, se determinó que a  $5 \pm 0.005$ , se obtuvo la mayor cantidad de azúcares invertidos entre todas las evaluaciones,  $0.0493 \pm 0.0051$  g/mL. Como se puede observar en las Figuras 67-70, las cantidades de producto obtenidas para pH  $6$  y  $7 \pm 0.005$ , que se encuentran dentro del rango de operación establecido para esta enzima fueron similares a la de  $5 \pm 0.005$ , aunque se notó una ligera disminución ( $0.0490 \pm 0.0066$  y  $0.0483 \pm 0.0077$  g/mL respectivamente). Además, se produce una menor cantidad de producto a pH  $3$  y  $9 \pm 0.005$  ( $0.0232 \pm 0.0051$  y  $0.0328 \pm 0.0051$  g/mL respectivamente). Este comportamiento coincide con el de la invertasa libre. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos con los de la enzima libre, se notó una disminución en todos. Este soporte no evita que el punto isoeléctrico de la enzima se modifique cuando se supera un pH de  $7.6$ , lo que hace que no aumente su actividad a pH  $9 \pm 0.005$ .

Finalmente, se evaluó el efecto del aumento de la concentración de sustrato inicial. Como se observa en las Figuras 71-75. Debido al comportamiento de las gráficas, se determinó que la concentración a la que se produce la mayor conversión a producto es  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL ( $0.1401 \pm 0.0155$  g/mL de azúcares invertidos). Este comportamiento es distinto al de la enzima libre, en el que la concentración con mayor conversión fue  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de

sacarosa. Esto, junto con el aumento en la conversión de producto que se evidenció para 0.4 y  $0.6 \pm 0.0005$  g/mL ( $0.1426 \pm 0.0207$  y  $0.1050 \pm 0.0073$  g/mL de producto respectivamente), con respecto a la enzima libre, permite ver que la inmovilización hace que la enzima resista mejor la inhibición por sustrato. Esto se puede deber a que la invertasa se encuentra dentro de una matriz, por lo que la tasa de difusión de la enzima se reduce, limitando el contacto que esta tiene con el sustrato, permitiendo así, que este no la inhiba tan fácilmente (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

Sin embargo, es este mismo fenómeno el que causa que la actividad de la enzima disminuya en condiciones más favorables, como ocurre en las concentraciones más bajas evaluadas y en las evaluaciones de temperatura y pH, ya que la enzima pierde parte de su actividad debido a la presencia de la matriz. Durante la evaluación de la temperatura, a una concentración de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa se dio una inhibición. Como se puede observar en la Figura 72, las líneas de sustrato y producto de la gráfica no se interceptan, como había pasado en la enzima libre y en las otras inmovilizaciones. Por lo tanto, se puede descartar una inhibición por sustrato, ya que, a una concentración más alta para este mismo soporte, la enzima presentó su mayor actividad y en las otras inmovilizaciones, esta fue la concentración a la que se logró mayor inversión de sacarosa.

Se podía esperar una disminución en su actividad a esta concentración, debido a la disminución de la tasa de difusión de la enzima generada por el alginato de sodio, pero este comportamiento evidencia algún tipo de inhibición externa, que pudo ser causada por contaminación durante la toma de mediciones. Esta pudo ocurrir debido a una esterilización incorrecta de la cristalería con la que se realizó la experimentación. También, se pudo dar por algún contaminante presente en los reactivos utilizados. Además, durante la hidrólisis, el erlenmeyer en el que se realiza la hidrólisis se encuentra abierto, por lo que un contaminante en el ambiente también pudo afectar la experimentación. Por lo tanto, se recomienda comprobar que el medio se encuentre libre de cualquier contaminante que pueda inhibir a la invertasa.

Al tener evaluadas todas las condiciones de operación, tanto para la invertasa libre como la inmovilizada, se procedió a realizar un modelo cinético para el comportamiento de cada una de estas (Ecuación 8). Se utilizó el modelo de Michaelis-Menten define la velocidad de una reacción en términos de la concentración de enzima y sustrato. Además, define una constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), determinada por medios experimentales y que es característica de cada enzima y sustrato, en condiciones específicas. Esta indica la afinidad de la enzima por el sustrato. En este caso, la velocidad máxima de reacción está indicada por el valor de reacción  $k_2[E]_0$  representa, donde  $k_2$  es la constante de velocidad y  $[E]_0$  es la concentración de enzima (McKee & McKee, 2013). Además, fue necesario agregar dos factores de inmovilización, uno que afecta la velocidad máxima y otro, la  $K_m$ . En el caso de la enzima libre, estos factores asumieron un valor de 1.

Debido a que al evaluar las concentraciones iniciales de sacarosa de  $0.4$  y  $0.6 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, se evidenció una inhibición por sustrato, fue necesario realizar otro modelo que predijera mejor este comportamiento. Se utilizó como base la ecuación de Haldane, que es análoga a la de Michaelis-Menten, pero contiene un término adicional en el denominador para explicar el complejo enzima sustrato que se forma, que es catalíticamente inactivo. Este tiene un efecto dramático en la forma de la curva de velocidad, debido a las altas concentraciones de sustrato, ya que la actividad disminuye debido su formación. Por lo tanto, el modelo incluye una nueva constante  $K_I$  que surge de la formación de este estado (Morrison, 2016). Este modelo se puede observar en la Ecuación 9 y se evidencia que nuevamente fue necesario modificar el modelo, agregando los dos factores de inmovilización.

Al realizar el modelaje de cada una de las corridas de temperatura realizadas para la enzima libre, utilizando el modelo presentado en la Ecuación 8, se obtuvo que a  $50 \pm 0.5^\circ$  C se obtuvo el la constante  $k_2$  mayor ( $0.0621 \text{ min}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ ), como se puede observar en el Cuadro 5. Debido a que la concentración de enzima se mantuvo constante durante todas las corridas, esto implica que es a esta temperatura que se alcanza la mayor velocidad máxima de reacción. Además, fue a esta temperatura que se obtiene la  $K_m$  menor ( $1.818 \text{ g/mL}$ ). Esta constante es un indicador de la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Además, indica la afinidad de la enzima por el sustrato; cuando esta es menor, existe una mayor afinidad (McKee & McKee, 2013). Por otra parte, fue a  $70 \pm 0.5^\circ$  C donde se obtuvo la  $k_2$  menor ( $0.0417 \text{ min}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ ) y la  $K_m$  mayor ( $2.424 \text{ g/mL}$ ), lo que indica que esta reacción alcanza una velocidad máxima más lenta y la invertasa es menos afín al sustrato. Esto se debe a la desnaturalización térmica que sufre la enzima, que la vuelve incapaz de hidrolizar el sustrato.

Al realizar el modelaje de la evaluación de temperatura para la inmovilización por carbón activado, se observa que los valores de  $k_2$  y  $K_m$  se mantienen iguales, ya que estos son parámetros característicos para cada enzima a condiciones específicas (McKee & McKee, 2013). Sin embargo, la adición del soporte hizo necesaria la aplicación de un factor de inmovilización que afecta la velocidad máxima. Este es el valor “B” que se puede observar en el Cuadro 5, que resultó ser menor a 1 para  $40$  y  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pero mayor a 1 para  $60$  y  $70 \pm 0.5^\circ$  C. Cuando este factor es menor a 1, causa que  $V_{max}$  disminuya, por lo que la presencia del soporte disminuyó la velocidad de reacción en relación con la enzima libre. Por otra parte, la aceleró para  $60$  y  $70 \pm 0.5^\circ$  C, debido a la resistencia térmica que este le provee a la invertasa. Pese a la introducción de estos factores, la temperatura a la que se tuvo una mayor velocidad máxima continuó siendo  $50 \pm 0.5^\circ$  C. Debido a que, en una inmovilización por adsorción, la enzima se encuentra en la superficie del soporte, no hay interferencia entre el contacto de la invertasa y la sacarosa, por lo que su afinidad no se ve afectada. Esto se refleja en que los valores de  $K_m$  se mantuvieron iguales (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

La misma evaluación se realizó para la inmovilización con PHA, y como se puede observar en el Cuadro 5, se obtuvieron resultados similares a la inmovilización con carbón activado. Nuevamente, se obtuvieron factores de inmovilización que impactan a la velocidad máxima menores a 1 para 40 y  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pero mayores a 1 para 60 y  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , indicando que alentó la reacción a temperaturas bajas, pero la aceleró a temperaturas más altas, debido a la resistencia térmica que la enzima adquiere. Sin embargo, debido a el factor obtenido para  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , esta termina siendo la temperatura a la que se tiene una mayor velocidad de reacción ( $0.7780 \text{ min}^{-1}$ ) En las inmovilizaciones por unión covalente, la enzima también se encuentra en la superficie del soporte, por lo que la afinidad (y por consiguiente la  $K_m$ ) de cada una de las corridas, se mantienen igual (Meneau, Borrego, & Liva, 2021).

Finalmente, se puede observar el análisis térmico para la inmovilización con alginato de sodio. Al igual que con las otras dos inmovilizaciones factores de inmovilización que impactan a la velocidad máxima menores a 1 para 40 y  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pero mayores a 1 para 60 y  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ . Debido al factor obtenido, para esta inmovilización, la mayor velocidad máxima se obtiene a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ . Una diferencia que tiene esta inmovilización a las otras es que la invertasa se encuentra retenida dentro de una matriz, que limita su contacto con la sacarosa. Esta disminución en la difusión entre la enzima y es sustrato causa que la afinidad se reduzca. Esto se puede ver reflejado en los valores “C” del Cuadro 5, que son un factor de afinidad que afecta a la  $K_m$ , y como todos resultaron ser menores a 1, causan que esta aumente, reflejando la disminución de la afinidad de la invertasa (Meneau, Borrego, & Liva, 2021). Pese a el cambio en los valores de  $K_m$ , la invertasa continuó siendo más afín al sustrato a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ .

El mismo análisis cinético se realizó para las evaluaciones de pH para la enzima libre. Como se puede observar en el Cuadro 5, fue a  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  que se obtuvo la  $K_m$  menor, por lo que la invertasa es más afín a la sacarosa en estas condiciones y también el valor mayor de  $k_2$ , por lo que también tiene la mayor velocidad máxima de reacción. Además, fue a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  donde se obtuvo  $k_2$  menor y  $K_m$  mayor, indicando que enzima es menos afín y la reacción es más lenta en estas condiciones. También se analizaron las pruebas realizadas para el carbón activado, donde los valores de  $K_m$  se mantuvieron iguales, pero se agregó el factor B que modifica la  $V_{max}$ . Este fue menor a 1 para  $\text{pH } 3, 5, 6 \text{ y } 7 \pm 0.005$ , lo que indica que el soporte alentó las reacciones a estos valores de pH, pero al ser mayor para  $9 \pm 0.005$ , la resistencia a la desnaturalización química que le otorgó el carbón a la invertasa aceleró la reacción. Tomando en cuenta este factor, la  $V_{max}$  más elevada se mantuvo en  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  al igual que con la enzima libre.

Al analizar la inmovilización con PHA funcionalizado se mantuvieron los valores de  $K_m$  y se agregó el factor de inmovilización que afecta a la  $V_{max}$ . Este fue menos a 1 para  $\text{pH } 3, 5 \text{ y } 6 \pm 0.005$ , lo que indica que el soporte alentó las reacciones a estos valores de pH, pero al ser mayor para  $7 \text{ y } 9 \pm 0.005$ . El factor para  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  fue 1.01, lo que indica que,

aunque la velocidad aumentó en relación la enzima libre, este valor es bastante cercano a 1 por lo que el cambio fue mínimo. Sin embargo, para  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  fue de 1.24, lo que evidencia la resistencia cambios en el punto isoeléctrico de la enzima que inhiben su capacidad catalítica, permitiendo que la reacción sea más rápida. Nuevamente, el pH con mayor velocidad máxima se mantuvo en  $\text{pH } 5 \pm 0.005$ .

Al realizar el análisis para la inmovilización con alginato de sodio, los factores B presentaron un comportamiento similar al del carbón activado, siendo menor a 1 para pH 3, 5, 6 y  $7 \pm 0.005$ , lo que indica que el soporte alentó las reacciones a estos valores de pH, pero es mayor para  $9 \pm 0.005$ , lo que evidencia la resistencia a la desnaturalización química gracias a la matriz de alginato. Además, el pH con mayor velocidad máxima se mantuvo en  $\text{pH } 5 \pm 0.005$ . Sin embargo, este soporte y su efecto en el contacto entre la enzima y el sustrato requiere tomar en cuenta el factor de inmovilización C, en donde todos fueron menores a 1, indicando que la  $K_m$  disminuyó para todas las corridas evaluadas. Debido a esto, hubo un cambio con respecto a la enzima libre y es el  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  el que tiene la menor  $K_m$  (2.0151).

En cuanto al análisis de la concentración inicial de sustrato, el modelo presentado en la Ecuación 8 se ajusta para las corridas de 0.05 a  $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  y los datos de su parametrización se encuentran en el Cuadro 5. Sin embargo, debido a la inhibición por sustrato, el modelaje de las concentraciones 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  se realizaron utilizando la Ecuación 9 y los resultados se encuentran en el Cuadro 6. Para el análisis de la enzima libre, fue a  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  de sacarosa que se obtuvo la  $K_m$  menor, por lo que la invertasa tiene mayor afinidad en estas condiciones y también el valor mayor de  $k_2$ , por lo que también tiene la mayor velocidad máxima de reacción. Fue a  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  donde se obtuvo la menor  $k_2$  y  $K_m$  mayor, indicando que enzima es menos afín y la reacción es más lenta en estas condiciones, debido a la inhibición por sustrato que ocurre a concentraciones más elevadas. También es importante mencionar que, como se puede observar en el Cuadro 6, a  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  se obtiene una constante de inhibición mayor que a  $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ , lo que indica la relación que, entre mayor es la concentración de sacarosa, mayor es la saturación que sufre la enzima, causando su inhibición.

Al analizar estas condiciones para la inmovilización con carbón activado, se mantienen los valores de  $K_m$  y las constantes de inhibición para las concentraciones que se evalúan con el modelo de la Ecuación 9. Sin embargo, es necesario agregar el factor de inmovilización que afecta a la velocidad máxima. Para 0.05, 0.10 y  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ , este fue menor a 1, indicando que la reacción se volvió más lenta, pero para 0.20, 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ , fue mayor a 1, por lo que se aceleró la reacción. Esto se debe a que el soporte puede darle resistencia a la inhibición por sustrato, permitiendo que esta conserve más actividad y así, la reacción alcance una mayor  $V_{max}$ . Tomando en cuenta este factor, se mantuvo que a  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  de sacarosa, la  $V_{max}$  es mayor.

Se presentó un comportamiento similar con la inmovilización con PHA funcionalizado al obtenido con el carbón activado, ya que para 0.05, 0.10 y  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, el factor B fue menor a 1, indicando que la reacción se volvió más lenta, pero para 0.20, 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL, fue mayor a 1, por lo que se aceleró la reacción. Sin embargo, al tomar en cuenta este factor y la inhibición sufrida por la enzima a  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, ahora la  $V_{max}$  más alta se obtuvo con  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Los valores de  $K_m$  y la constante de inhibición se mantienen iguales que para la enzima libres.

Finalmente, se parametrizaron las corridas de concentración de sustrato para la inmovilización con alginato de sodio. El factor B fue menor a 1 para 0.05, 0.10, 0.15 y  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa, el factor B fue menor a 1, indicando que la reacción se volvió más lenta, pero para 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL, fue mayor a 1, por lo que se aceleró la reacción. Tomando en cuenta este factor, fue a  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa que se obtuvo la mayor  $V_{max}$ . Las constantes de inhibición se mantuvieron, pero el factor C fue necesario para modificar la  $K_m$ . Estos fueron todos menores a 1, y fue  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL que se obtuvo la menor  $K_m$  y, por consiguiente, la mayor afinidad. En las Figuras 76-79 se pueden observar los modelos generados con Berkeley Madonna, a las condiciones que permiten la mayor conversión de sustrato a producto, determinadas basándose en las concentraciones de producto finales obtenidas, con los que se obtuvo los parámetros cinéticos. Los demás modelos generados se encuentran en la sección de Modelos Cinéticos en Anexos.

En estos modelos, se puede observar que los datos experimentales no se apegan completamente a las curvas del modelo generado con Berkeley Madonna. Esto se debe a las posibles fuentes de error que están presentes durante la experimentación. Primero, el error sistemático generado por las incertidumbres de los equipos, especialmente el refractómetro, debido a que este se utiliza para determinar las concentraciones que se grafican en Berkeley Madonna. Además, el que no se utilice sacarosa pura, sino azúcar refinada como materia prima implica que esta contiene otros contaminantes, así como concentraciones bajas de azúcares invertidos, por lo que la concentración real de sacarosa que se encuentra presente es menor a la que se pesa y se agrega a cada corrida de la experimentación. Otro factor de error es que, cuando se toman las muestras a los respectivos tiempos de medición, estas se deben hervir para desnaturalizar la enzima y que esta pierda su actividad catalítica. Sin embargo, en lo que esto ocurre, la invertasa continúa llevando a cabo la hidrólisis de sacarosa que se encuentra en la muestra, afectando así los valores finales de producto y sustrato en cada muestra. Finalmente, la presencia de contaminantes, que se encuentran en la cristalería, en las matrices de inmovilización o en los demás reactivos que intervienen durante la experimentación pueden interferir con las lecturas del índice de refracción de las muestras, afectando así las concentraciones que se obtienen de sacarosa, glucosa y fructosa.

Con la  $V_{max}$  y  $K_m$  obtenida para cada condición evaluada, se determinó la eficiencia catalítica de esa corrida. En la Figura 80, se puede observar la eficiencia catalítica para cada

soporte y la enzima libre a todas las temperaturas evaluadas. Para la invertasa libre y la inmovilización con carbón activado se obtuvo la mayor eficiencia a  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , mientras que para la inmovilización con PHA funcionalizado y alginato de sodio, fue a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ . Además, esta gráfica permite ver qué soporte ofrece la mayor eficiencia a cada temperatura. A  $40$  y  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$  es la enzima libre, debido a que son condiciones más favorables, por lo que la disminución en la  $V_{\text{max}}$  o el aumento en la  $K_m$  que pueda causar el soporte de inmovilización hace que esta eficiencia se reduzca. A  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$  es la inmovilización con alginato de sodio la que presenta mayor eficiencia, seguida por el PHA funcionalizado y para  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , es el PHA. Sin embargo, la cantidad de enzima que se utilizó con la inmovilización de alginato de sodio es mayor a la de PHA, por lo que esto genera un aumento en la  $V_{\text{max}}$ , que a su vez, aumenta la eficiencia catalítica. Esto nos indica que, al presentarse la necesidad de trabajar a temperaturas elevadas, el soporte recomendable es el PHA funcionalizado.

Además, se realizó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA), para las concentraciones finales obtenidas con cada soporte, para cada una de las temperaturas evaluadas. Un ANOVA es un método estadístico que permite analizar las diferencias en las medias de tres o más grupos, que se emplea cuando se tiene un factor independiente y se quiere determinar si las variaciones de este factor tienen algún efecto medible sobre una variable dependiente (JMP Statistical Discovery, 2023). En este caso, el factor independiente es la condición evaluada (por ejemplo, la temperatura) y la dependiente es la concentración final de producto que se obtiene. La variación entre los grupos que se evalúa es si la invertasa se encuentra libre o en cualquiera de las tres inmovilizaciones evaluadas.

Al realizar esta prueba, se obtiene un valor estadístico F que es la razón de la varianza entre los grupos y la varianza dentro de estos. También, un valor crítico de F, que sirve como referencia para determinar si la estadística F que se calculó es suficientemente grande para que las diferencias entre las medias se consideren como estadísticamente significativas (JMP Statistical Discovery, 2023). Como se puede observar en el Cuadro 7, para todas las temperaturas se obtuvo un valor crítico de F de 4.066 y todas las estadísticas F se encuentran por debajo de este valor, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de producto que se obtiene con la enzima libre y las tres inmovilizaciones en las cuatro temperaturas evaluadas.

La eficiencia catalítica también se calculó para el análisis de pH (Figura 81), en donde la mayor para la invertasa, tanto libre como para las tres inmovilizaciones se obtuvo a  $5 \pm 0.005$ . Además, fue posible ver qué soporte ofrece la mayor eficiencia catalítica para cada valor de pH. Para 3, 5 y  $6 \pm 0.005$ , fue la enzima libre la que presentaba mayor eficiencia catalítica. En cuanto a las inmovilizaciones, el carbón activado presentó la segunda mayor eficiencia catalítica para  $3 \pm 0.005$  y el alginato de sodio para 5 y  $6 \pm 0.005$ . Luego a  $7 \pm 0.005$ , fue el alginato de sodio el que presentó mejores resultados, pero estos se pudieron ver

influenciados por la concentración más elevada de enzima. Finalmente, para  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  fue el carbón activado el que presentó la mayor eficiencia catalítica, por lo que, al presentarse la necesidad de trabajar en un medio básico, este soporte puede ayudar a la enzima a no perder su actividad.

Al realizar el ANOVA (Cuadro 7), se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones finales de producto que se obtienen con los distintos métodos para  $\text{pH } 3$  y  $9 \pm 0.005$ , por lo que esto valida el uso del carbón activado para inmovilizar la invertasa y usarla en estas condiciones. Esto se debe a que se tiene un valor crítico de F de 4.066 y una estadística F de 12.500 para  $\text{pH } 3 \pm 0.005$ , y de 26.800 para  $\text{pH } 9 \pm 0.005$ , por lo que al ser mayor la estadística F que el valor crítico, la diferencia es estadísticamente significativa. Por otra parte, para  $\text{pH } 5-7 \pm 0.005$ , los valores de la estadística F son menores que el valor crítico, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de producto que se obtiene con la enzima libre o inmovilizada en estos valores de pH.

En la Figura 82 se puede observar la eficiencia catalítica de las distintas concentraciones de sustrato, para cada método evaluado. La concentración inicial de sacarosa para la que se obtuvieron mayores eficiencias catalíticas fue para  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  para la enzima libre y las tres inmovilizaciones, pero, para el alginato de sodio, la de  $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  fue igual que este valor. También se puede ver qué soporte presenta mayor eficiencia catalítica a cada concentración inicial, siendo la enzima libre para 0.05, 0.10 y  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Sin embargo, si se requiere el uso de un método de inmovilización para este rango de concentración, sería el alginato de sodio, que presentó la segunda mayor eficiencia catalítica para  $0.05-0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  y la mayor para  $0.20 - 0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Esto se puede deber a la mayor concentración de enzima que logra inmovilizar y a que resiste mejor la inhibición por sustrato al limitar el contacto entre la invertasa y la sacarosa, ya que la enzima está dentro de la matriz.

El ANOVA que se puede observar en el Cuadro 7, muestra que a partir de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ , hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones finales obtenidas con cada método, lo que permitiría validar el uso del alginato de sodio para mejorar la resistencia de cambios de concentración. Esto se debe a que el valor crítico de F es 4.066, mientras que los valores de la estadística F que se obtienen para las concentraciones de sacarosa de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ , son 12.000, 39.774, 74.496 y 1174.388, respectivamente, por lo que son mayores que el valor crítico. Esto demuestra que la cantidad de producto que se obtiene con los distintos soportes y la enzima libre sí es estadísticamente distinta cuando se trabaja a estas concentraciones. Por otra parte, para  $0.05$  y  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$  de sacarosa, los valores de la estadística F son menores al valor crítico, por lo que la diferencia en la cantidad de producto no es estadísticamente significativa.

En el Cuadro 8 se muestra qué soporte presentó la mayor y la menor eficiencia catalítica para cada una de las condiciones evaluadas. Cuando se trabaja con temperaturas por debajo de la temperatura de desnaturalización de la invertasa, 40 y 50 °C, es la enzima libre la que tiene una mayor eficiencia catalítica y el alginato de sodio y el PHA funcionalizado, respectivamente, los que presentan una menor. Esto indica que a estas temperaturas es mejor no utilizar ninguno de estos soportes, para evitar que se pierda mucho rendimiento en la hidrólisis. Sin embargo, en 60 y 70 °C, es la enzima libre la que presenta la menor eficiencia, por lo que es recomendable inmovilizarla si se debe operar a estas temperaturas, para otorgarle una mayor resistencia. Los soportes que presentaron la mayor eficiencia fueron el alginato de sodio a 60 °C y el PHA funcionalizado a 70 °C.

Además, en la evaluación de pH se notó que a condiciones ácidas, el carbón activado es el que tiene la menor eficiencia, mientras que el alginato de sodio fue el que tiene la mayor. Esto indica que uno de los soportes aumenta la conversión de sustrato a producto con respecto a la enzima libre, mientras que otro, la disminuye, dejando en evidencia la importancia de seleccionar el soporte adecuado. Cuando se trabaja a pH de 5 y 6, al no ocurrir ninguna desnaturalización química, la invertasa libre es la que tiene la mayor eficiencia, mientras que el PHA funcionalizado y el carbón activado, presentaron la menor. Sin embargo, cuando se alcanza un pH de 7, aunque aún se encuentra entre el rango de operación de la invertasa que se está utilizando, es el alginato el que presenta la mayor eficiencia catalítica, debido a que le agrega más estabilidad a la enzima. En este pH y también a uno de 9, es la enzima libre la que presenta la menor eficiencia catalítica, debido a los cambios conformacionales que le causa el pH. Como los soportes hacen a la invertasa más estable, en un medio básico, es el alginato de sodio el que tiene la mayor eficiencia.

En cuanto al análisis de la concentración inicial de sustrato a 0.05-0.15 g/mL de sacarosa fue la enzima libre la que presentó la mejor eficiencia catalítica, ya que la enzima funciona bien a concentraciones bajas. La adición de soportes a estas concentraciones (PHA funcionalizado para 0.05 g/mL de sacarosa y carbón activado para 0.10 y 0.15 g/mL de sacarosa) hacen que la reacción se vuelva más lenta. Sin embargo, cuando la concentración aumenta y la enzima sufre inhibición por sustrato, es necesaria la inmovilización. Esto se evidencia ya que a 0.20-0.60 g/mL de sacarosa, la enzima libre presenta la menor eficiencia, mientras que el alginato presenta la mayor, siendo este el soporte que mejor funciona cuando se desea trabajar a concentraciones más elevadas.

El Cuadro 9 muestra la energía de activación calculada con la  $V_{max}$  y la  $K_m$  para la reacción catalizada con la enzima libre y para todas las inmovilizaciones. Los cálculos se realizaron para el rango de temperatura de  $40-50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , debido a que, para algunas de las condiciones evaluadas, la invertasa experimentaba una desnaturalización térmica a  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , lo que afectaba su determinación. Una reacción química ocurre debido a la reorganización de los átomos de los reactivos, que da lugar a la formación de productos. Esto no se realiza

directamente, sino a través de un estado transitorio llamado complejo activado. La energía necesaria para que esta se forme se llama energía de activación y es la energía que deben salvar las moléculas para que la reacción se lleve a cabo. La ecuación de Arrhenius permite relacionar la constante de la velocidad, con la temperatura para una reacción química específica (Gobierno Vasco, 2017).

Las enzimas son catalizadores biológicos, que disminuyen la energía de activación de las reacciones, lo que hace que la velocidad aumente. Así, la invertasa logra acelerar la inversión de la sacarosa. Un aumento en la temperatura causa un aumento en la energía cinética de las moléculas y también aumentará el número de choques entre ellas por unidad de tiempo, y por consiguiente, también lo hará con la velocidad (Ripoll, 2013). De acuerdo con el Cuadro 9, la invertasa libre fue la que presentó la menor energía de activación, al calcularla utilizando la  $V_{max}$ . A esta la sigue la invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado, luego con alginato de sodio y por último, con carbón activado. Esto quiere decir que la enzima libre una menor energía de activación para que se lleve a cabo la reacción y por lo tanto, presenta una velocidad de reacción mayor.

Además, deja en evidencia que, en este rango de temperatura, la inmovilización hace que se requiera una mayor energía de activación para formar el complejo intermedio. Sin embargo, es este aumento en la energía de activación lo que permite que la enzima adquiera resistencia a la inactivación térmica a temperaturas más elevadas, ya que una energía de activación mayor indica que la enzima es menos sensible a cambios de temperatura. Por otra parte, los cálculos realizados con  $V_{max}$  son iguales para la invertasa libre, inmovilizada con carbón activado y con PHA funcionalizado, pero es mayor para la inmovilización con alginato de sodio. Esto se debe a que, con las inmovilizaciones por adsorción y unión covalente no hay interferencia entre la unión de la enzima y el sustrato. Sin embargo, en la inmovilización por atrapamiento, la matriz interfiere con este contacto, por lo que se necesita mayor energía de activación para para que la enzima se pegue al sustrato.

También es posible observar los factores de frecuencia, tanto para la energía determinada con  $V_{max}$  como  $K_m$ . Este también se conoce como factor pre-exponencial y es la frecuencia con la que se producen las colisiones en la mezcla reactiva, por unidad de concentración (Tuñón, 2011). Este varía de manera proporcional con la energía de activación. Por lo tanto, el factor de frecuencia calculado con  $V_{max}$  fue menor para la enzima libre, seguido por la inmovilización con PHA, alginato de sodio y por último, con carbón activado. Debido a que este es el factor entrópico, es la inmovilización con carbón activado la que tiene la mayor entropía. Esto se debe a que, a mayor cantidad de colisiones, existe un mayor grado de desorden molecular en el sistema, y por lo tanto, más entropía (Tuñón, 2011). Cuando se calcula el factor de frecuencia con la  $K_m$ , este solo aumenta para la inmovilización con alginato de sodio, indicando que tiene mayor entropía, mientras que, para las otras tres condiciones, se mantiene igual.

Para comprobar la inmovilización se enviaron las muestras al Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso, donde se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Esta utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar la imagen. Tiene la capacidad de producir imágenes de alta resolución, lo que permite que estas sean examinadas a una magnificación alta. Sin embargo, se requiere que las muestras sean conductoras ya que son barridas por electrones acelerados que viajan a través de un cañón. Tiene un detector que mide la cantidad de electrones enviados que indica la intensidad de la zona de la muestra, permitiendo la formación de una imagen en tres dimensiones (Castroviejo, 2020).

En las Figuras 83-85 se observan los resultados de la MEB realizada para la invertasa inmovilizada con carbón activado, con PHA funcionalizado y con alginato de sodio. La Figura 81, donde se encuentra inmovilizada con PHA funcionalizado tiene baja resolución. Esto se debe a que el PHA no tiene propiedades conductoras, lo que dificulta que el haz de electrones y el detector del equipo logren generar una imagen de alta calidad (González, Meza, & Córdova, 2013). Sin embargo, en las tres imágenes se logran observar partículas pequeñas blancas, que son la invertasa inmovilizada en las matrices. Se produce el contraste entre la enzima y las matrices debido a que su composición es distinta lo que hace que la densidad electrónica entre ellas sea distinta, induciendo el contraste de color en la imagen. Además, la invertasa tiene un peso molecular de entre 135,000 y 270,000 Daltons, dependiendo de si es extracelular o intracelular (Buitrago, Prada, & Velázquez, 2015). Por lo tanto, son moléculas bastante pequeñas. Esto respalda que es las partículas blancas pequeñas que se ven en los tres análisis con MEB son la invertasa que se logró inmovilizar utilizando tres soportes distintos.

## IX. CONCLUSIONES

1. Evaluando todas las condiciones de temperatura, pH y concentración inicial de sacarosa que afectan el comportamiento de la invertasa libre al hidrolizar sacarosa, se observa que en todos los casos se tiene la tendencia esperada para una cinética tipo Michaelis-Menten, de reducción de sustrato e incremento de producto, y se comprueba la funcionalidad de la invertasa libre a temperatura  $40-70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH de  $3-9 \pm 0.005$  y concentración inicial de sacarosa de  $0.05-0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .
2. Se determinaron los rendimientos de inmovilización de los tres métodos, siendo  $26.38 \pm 0.006\%$  para el carbón activado,  $31.45 \pm 0.006\%$  para el PHA funcionalizado y  $69.75 \pm 0.007\%$  para el alginato de sodio, por lo que el alginato de sodio es el más efectivo a escala laboratorio.
3. Se observó el comportamiento esperado para una cinética tipo Michaelis-Menten, de reducción de sustrato e incremento de producto, al inmovilizar la invertasa con tres soportes catalíticos. Sin se observan comportamientos más lentos en condiciones en donde no existe desnaturalización por temperatura o pH, o inhibición por sustrato. Al tener desnaturalización térmica o química, o inhibición por sustrato se observa un efecto positivo de inmovilizar, con un incremento en la velocidad de reacción.

## X. RECOMENDACIONES

1. Estudiar el efecto del tiempo de funcionalización del PHA y adsorción con carbón activado, sobre el rendimiento de inmovilización y su potencial efecto en la velocidad de reacción.
2. Realizar pruebas para determinar la cantidad de enzima que se pierde de cada soporte de inmovilización, por cada corrida realizada, para determinar el desprendimiento de la invertasa ante el uso de cada matriz de inmovilización.
3. Evaluar el efecto de la concentración de invertasa en la función catalítica de la enzima y en el efecto que las condiciones de reacción tienen sobre la hidrólisis de la sacarosa.
4. Estudiar el efecto de las condiciones de gelificación de la técnica de inmovilización con alginato de sodio sobre la eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada y el rendimiento de la inmovilización.
5. Evaluar otras matrices o técnicas de inmovilización enzimática y su efecto sobre la eficiencia catalítica de la invertasa en la hidrólisis de sacarosa.
6. Evaluar la hidrólisis de la sacarosa utilizando otras enzimas que generen la reacción de inversión de azúcares.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, M., Acebal, C., & Mata, I. (2014). «Biocatálisis y biotecnología». *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 190.
- Asazgua. (2021). *Ingenios de Guatemala producen 55 millones de galones de alcohol al año*. Ciudad de Guatemala: Azúcar de Guatemala.
- Balandin, J. (2016). *¿Qué es el azúcar invertido? Definición y significado*. Madrid: Casera.
- Bargamasco, R., et al. (2000). Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17, 4-7. doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322000000400051>
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479.
- Boukraa-Oulad, F., Kaddour, S., & Sadoun, T. (2010). Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75, 75, 93-99. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.019
- Buitrago, L., Prada, M., & Velázquez, L. (2015). *Cinética enzimática de la invertasa mediante la determinación de la velocidad inicial de reacción*. Bioprocesos.
- Cabral, H., et al. (2018). «Inmovilización de enzimas». *Boletín Científico de Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería*, 10, 7-8.
- Carter, A. (2020). *¿Cuáles son los beneficios del carbón activado?* Kansas: Medical News Today.
- Castroviejo, M. (2020). *Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)*. Burgos: Universidad de Burgos.
- Corpoica. (2013). *Estudio agroindustrial de caña panelera en cinco regiones paneleras del país*. Pamplona: Universidad de Pamplona.

- El-Sayed, M., *et al.* (2015). Immobilization, Optimization and Properties of Pea Invertase within Sodium. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 1213-1222.
- Eufic. (2020). *¿Qué es la fructosa y es mala para ti?* Bruselas: Food Facts and Healthy Choices.
- Federico, M. (2021). *Estudio de la actividad invertasa en mieles del departamento Cruz del Eje (Córdoba): tratamiento térmico y posible adulteración*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Ferreira, M., Farias, A., Peraca, Ruiz, W., & Valmor, C. (2018). «Extracción optimizada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno». *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(2), 478-489.
- Flores, G. (2011). *Efecto de un proceso de inmovilización por gelación iónica sobre la actividad proteolítica*. Ciudad de México: Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Gobierno Vasco. (2017). *Energía de activación, ecuación de Arrhenius, catálisis*. País Vasco: Euskera.
- González, Y., Meza, J., & Córdoba, J. (2013). «Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano». *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1).
- Hanna Instruments. (2019). *La refractometría como método para determinar la concentración de las soluciones*. Ciudad de México: HannaPro.
- Ilyina, A., & Aguilar, C. (2016). Magnetic Separation of nanobiostructured systems for innovation of biocatalytic processes in food industry. *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*.
- Infoagro. (2020). *Qué es la refracción*. Madrid: Infoagro.
- JMP Statistical Discovery. (2023). Recuperado el 23 de junio de 2023 *ANOVA de un factor*: [https://www.jmp.com/es\\_co/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html](https://www.jmp.com/es_co/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html)
- Kakkonen, P., *et al.* (2021). *Inhibición del sustrato mediante el bloqueo de la liberación del producto y su control por la ingeniería de túneles*. RSC Biología Química.
- Lamya. (2022). *Alginato de sodio*. Guatemala: Lamya.

- Lelia, C. (2017). *Cómo elaborar azúcar invertida para uso industrial*. Santo Domingo: Consualion.
- Lera, A. (2011). *Las enzimas*. Bilbao: EHU.
- López, L., & González, S. (2020). *Glucosa*. Chiapas: Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Lumitos. (2023). *Sacarosa*. Argentina: Bionity.
- Luque, V. (2017). *Estructura y propiedades de las proteínas*. Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Martínez, J., & Morales, F. (2007). *Caracterización cinética de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre e inmovilizada*. Ciudad de México: Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- McKee, T., & McKee, J. (2013). *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. San Francisco: McGraw Hill.
- Meneau, R., Borrego, K., & Liva, M. (2021). «Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y retos». *CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 59-78.
- Merino, J., & Noriega, M. (2011). *Enzimas*. Cantabria: Universidad de Cantabria.
- Mira, J. (12 de Febrero de 2021). *Inhibición por retroalimentación*. Madrid: EGC.
- Morrison, C. (2016). *A generalized model for enzymatic substrate inhibition*. Nueva York: The Science Snail.
- Nadaroglu, H., & Setid, M. (2022). *Microbial extremozymes: novel sources and industrial applications*. Microbial Extroenzymes.
- NIOSH. (2001). *El glutaraldehído: los peligros ocupacionales en los hospitales*. Atlanta: CDC.
- Noack, C. (3 de Diciembre de 2022). *Calidad de melaza nacional es reconocida*. Prensa Libre.
- Porto, A. (2014). *Enzimas*. Xunta de Galicia: Instituto de Educación Secundaria María Casares.
- Ramírez, M. (2018). *Carbohidratos*. Ciudad de México: UNAM.
- Regemat. (2011). *¿Qué es el alginato de sodio?* Granada: CDTI.

- Ripoll, E. (2013). *Ecuación de Arrhenius*. California: Creative Commons.
- Sainz-Polo, M., Ramírez, M., & Lafraya, A. (2013). Role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9755-9766.
- Santiago, B. (2020). *Funcionalización de materiales nanocarbonosos con polietilenimina*. Cantabria: Universidad de Cantabria.
- ScanCo. (2021). *El azúcar invertido*. San José: ScanCo.
- Tanriseven, A., & Dogan, S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36, 1081-1083.
- Tena, M., & Jorrín, J. (2020). «Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería». *Revista de la Universidad de Córdoba*, 1-10.
- Toledo, M. (2017). Recuperado el 14 de marzo de 2023, de *Índice de refracción: definición y cómo calcularlo*:  
[https://www.mt.com/es/es/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/Refractive\\_index/definition\\_and\\_measurement.html](https://www.mt.com/es/es/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/Refractive_index/definition_and_measurement.html)
- Tuckerman, M. (2022). *El mecanismo Michaelis-Menten para catálisis enzimática*. Nueva York: LibreTexts.
- Tuñón, I. (2011). *Químicas, la velocidad de las reacciones*. Valencia: Universidad de Valencia.

## XII. ANEXOS

### A. DATOS ORIGINALES

Cuadro 10. Concentraciones e índices de refracción de las curvas de calibración del índice de refracción vs concentración de sacarosa, y fructosa y glucosa

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de fructosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de glucosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Índice de refracción ( $\pm$ 0.00002)
0.05	0.050	0.000	0.000	1.33992
	0.040	0.005	0.005	1.34006
	0.030	0.011	0.011	1.34018
	0.020	0.016	0.016	1.34021
	0.010	0.021	0.021	1.34031
	0.000	0.026	0.026	1.34043
0.10	0.100	0.000	0.000	1.34634
	0.080	0.011	0.011	1.34663
	0.060	0.021	0.021	1.34683
	0.040	0.032	0.032	1.34696
	0.010	0.042	0.042	1.34715
	0.000	0.053	0.053	1.34723
0.15	0.150	0.000	0.000	1.35283
	0.120	0.016	0.016	1.35304
	0.090	0.032	0.032	1.35316
	0.060	0.047	0.047	1.35325
	0.030	0.063	0.063	1.35346
	0.000	0.079	0.079	1.35353
0.20	0.200	0.000	0.000	1.35897
	0.160	0.021	0.021	1.35910
	0.120	0.042	0.042	1.35922
	0.080	0.063	0.063	1.35947
	0.040	0.084	0.084	1.35962
	0.000	0.105	0.105	1.35975

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de fructosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Concen. de glucosa (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Índice de refracción ( $\pm$ 0.00002)
0.40	0.400	0.000	0.000	1.37903
	0.320	0.042	0.042	1.37939
	0.240	0.084	0.084	1.37963
	0.160	0.126	0.126	1.37992
	0.080	0.168	0.168	1.38002
	0.000	0.211	0.211	1.38022
0.60	0.600	0.000	0.000	1.39220
	0.480	0.063	0.063	1.39480
	0.360	0.126	0.126	1.39630
	0.240	0.189	0.189	1.39762
	0.120	0.253	0.253	1.39957
	0.000	0.316	0.316	1.40010

Se construyeron 6 curvas de calibración, una para cada concentración inicial de sustrato (sacarosa) evaluada. Se prepararon 6 soluciones con distintas concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa, para cada una de las curvas. A estas soluciones, se les midió el índice de refracción utilizando un refractómetro marca ATAGO. Las gráficas de las curvas se pueden observar en las figuras de la sección de curvas de calibración.

Cuadro 11. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima libre

Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
40	0	1.33997	1.33996	1.33998
	1	1.34005	1.34004	1.34006
	3	1.34015	1.34017	1.34016
	5	1.34023	1.34026	1.34024
	10	1.34029	1.34031	1.34034
	20	1.34035	1.34036	1.34037
50	0	1.33997	1.33996	1.33997
	1	1.34011	1.34012	1.34013
	3	1.34027	1.34029	1.34027
	5	1.34035	1.34034	1.34036
	10	1.34040	1.34039	1.34038
	20	1.34042	1.34041	1.34040

Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
60	0	1.33996	1.33997	1.33998
	1	1.34008	1.34006	1.34007
	3	1.34021	1.34021	1.34020
	5	1.34029	1.34029	1.34027
	10	1.34035	1.34036	1.34037
	20	1.34038	1.34040	1.34038
70	0	1.33996	1.33995	1.33998
	1	1.34001	1.34002	1.34003
	3	1.34011	1.34013	1.34011
	5	1.34018	1.34019	1.34017
	10	1.34026	1.34026	1.34028
	20	1.34031	1.34029	1.34032

Se tomaron muestras de las corridas de variación de temperatura en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 12. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima libre

pH ( $\pm 0.005$ )	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
3	0	1.33998	1.33996	1.33997
	1	1.34000	1.34001	1.34002
	3	1.34011	1.34009	1.34007
	5	1.34017	1.34013	1.34015
	10	1.34017	1.34019	1.34018
	20	1.34021	1.34020	1.34022
5	0	1.33997	1.33996	1.33997
	1	1.34011	1.34012	1.34013
	3	1.34027	1.34029	1.34027
	5	1.34035	1.34034	1.34036
	10	1.34040	1.34039	1.34038
	20	1.34042	1.34041	1.34040
6	0	1.33999	1.33996	1.33995
	1	1.34010	1.34011	1.34009
	3	1.34027	1.34026	1.34028
	5	1.34032	1.34034	1.34035
	10	1.34037	1.34038	1.34039
	20	1.34039	1.34041	1.34041

pH ( $\pm 0.005$ )	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
7	0	1.33995	1.33995	1.33998
	1	1.34001	1.34009	1.34012
	3	1.34027	1.34027	1.34028
	5	1.34032	1.34030	1.34030
	10	1.34040	1.34038	1.34038
	20	1.34041	1.34040	1.34039
9	0	1.33995	1.33997	1.33999
	1	1.34003	1.34002	1.34002
	3	1.34011	1.34010	1.34010
	5	1.34017	1.34015	1.34019
	10	1.34021	1.34023	1.34022
	20	1.34027	1.34025	1.34026

Se tomaron muestras de las corridas de variación de pH en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 13. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima libre

Concen. de sustrato (g/mL $\pm 0.005$ g/mL)	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
0.05	0	1.33997	1.33996	1.33997
	1	1.34011	1.34012	1.34013
	3	1.34027	1.34029	1.34027
	5	1.34035	1.34034	1.34036
	10	1.34040	1.34039	1.34038
	20	1.34042	1.34041	1.34040
0.10	0	1.34649	1.34647	1.34650
	1	1.34669	1.34670	1.34672
	3	1.34699	1.34700	1.34697
	5	1.34708	1.34709	1.34707
	10	1.34715	1.34712	1.34708
	20	1.34710	1.34710	1.34720
0.15	0	1.35289	1.35291	1.35291
	1	1.35311	1.35309	1.35310
	3	1.35328	1.35330	1.35329

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.005 g/mL)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
0.15	5	1.35337	1.35338	1.35336
	10	1.35342	1.35339	1.35339
	20	1.35343	1.35341	1.35340
0.20	0	1.35898	1.35897	1.35896
	1	1.35914	1.35917	1.35915
	3	1.35929	1.35930	1.35930
	5	1.35941	1.35942	1.35941
	10	1.35949	1.35948	1.35951
	20	1.35949	1.35949	1.35952
	0	1.37913	1.37915	1.37916
0.40	1	1.37917	1.37916	1.37917
	3	1.37923	1.37924	1.37922
	5	1.37929	1.37930	1.37932
	10	1.37938	1.37939	1.37941
	20	1.37949	1.37948	1.37949
	0	1.39287	1.39286	1.39288
0.60	1	1.39298	1.39300	1.39297
	3	1.39316	1.39318	1.39314
	5	1.39325	1.39326	1.39329
	10	1.39357	1.39359	1.39350
	20	1.39382	1.39384	1.39381

Se tomaron muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 14. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con carbón activado

Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
40	0	1.33995	1.33997	1.33996
	1	1.34004	1.34003	1.34001
	3	1.34011	1.34013	1.34014
	5	1.34021	1.34022	1.34020
	10	1.34029	1.34031	1.34031
	20	1.34034	1.34035	1.34035
50	0	1.33995	1.33998	1.33999
	1	1.34010	1.34011	1.34013
	3	1.34026	1.34025	1.34027
	5	1.34035	1.34033	1.34033
	10	1.34039	1.34039	1.34038
	20	1.34039	1.34040	1.34040
60	0	1.33996	1.33997	1.33998
	1	1.34009	1.34008	1.34009
	3	1.34023	1.34024	1.34026
	5	1.34031	1.34032	1.34030
	10	1.34037	1.34039	1.34037
	20	1.34039	1.34041	1.34038
70	0	1.33999	1.33997	1.33997
	1	1.34005	1.34005	1.34006
	3	1.34014	1.34016	1.34018
	5	1.34021	1.34023	1.34024
	10	1.34029	1.34030	1.34030
	20	1.34031	1.34032	1.34033

Se tomaron muestras de las corridas de variación de temperatura en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 15. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con carbón activado

pH ( $\pm 0.005$ )	Tiempo (min $\pm 0.0005$ min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
3	0	1.33999	1.33996	1.33998
	1	1.34004	1.33999	1.34003
	3	1.34007	1.34009	1.34008
	5	1.34011	1.34012	1.34010
	10	1.34017	1.34015	1.34017
	20	1.34018	1.34017	1.34019
5	0	1.33995	1.33998	1.33999
	1	1.34010	1.34011	1.34013
	3	1.34026	1.34025	1.34027
	5	1.34035	1.34033	1.34033
	10	1.34039	1.34039	1.34038
	20	1.34039	1.34040	1.34040
6	0	1.33997	1.33998	1.33998
	1	1.34011	1.34012	1.34011
	3	1.34026	1.34028	1.34027
	5	1.34033	1.34034	1.34033
	10	1.34038	1.34039	1.34039
	20	1.34040	1.34039	1.34040
7	0	1.33997	1.33999	1.33996
	1	1.34013	1.34009	1.34012
	3	1.34025	1.34026	1.34026
	5	1.34032	1.34030	1.34030
	10	1.34037	1.34037	1.34039
	20	1.34038	1.34038	1.34040
9	0	1.33998	1.33996	1.33999
	1	1.34008	1.34005	1.34007
	3	1.34014	1.34019	1.34016
	5	1.34023	1.34024	1.34023
	10	1.34030	1.34030	1.34030
	20	1.34029	1.34032	1.34031

Se tomaron muestras de las corridas de variación de pH en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 16. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con carbón activado

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.005 g/mL)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
0.05	0	1.33995	1.33998	1.33999
	1	1.34010	1.34011	1.34013
	3	1.34026	1.34025	1.34027
	5	1.34035	1.34033	1.34033
	10	1.34039	1.34039	1.34038
	20	1.34039	1.34040	1.34040
	0.10	0	1.34648	1.34646
1		1.34668	1.34669	1.34668
3		1.34695	1.34693	1.34692
5		1.34702	1.34702	1.34701
10		1.34712	1.34706	1.34709
20		1.34711	1.34709	1.34711
0.15	0	1.35292	1.35291	1.35290
	1	1.35304	1.35308	1.35302
	3	1.35324	1.35323	1.35322
	5	1.35330	1.35331	1.35332
	10	1.35334	1.35335	1.35333
	20	1.35335	1.35337	1.35335
0.20	0	1.35899	1.35899	1.35895
	1	1.35915	1.35914	1.35916
	3	1.35941	1.35942	1.35940
	5	1.35952	1.35951	1.35949
	10	1.35957	1.35955	1.35957
	20	1.35959	1.35956	1.35958
0.40	0	1.37917	1.37916	1.37914
	1	1.37920	1.37924	1.37923
	3	1.37940	1.37939	1.37938
	5	1.37951	1.37949	1.37952
	10	1.37965	1.37967	1.37965
	20	1.37971	1.37974	1.37976
0.60	0	1.39285	1.39284	1.39288
	1	1.39305	1.39309	1.39308
	3	1.39335	1.39338	1.39339
	5	1.39366	1.39369	1.39368
	10	1.39396	1.39398	1.39399
	20	1.39441	1.39440	1.39438

Se tomaron muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 17. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
40	0	1.33998	1.33997	1.33995
	1	1.34006	1.34004	1.34005
	3	1.34012	1.34014	1.34014
	5	1.34022	1.34020	1.34022
	10	1.34031	1.34029	1.34032
	20	1.34035	1.34032	1.34033
50	0	1.33998	1.34000	1.33997
	1	1.34011	1.34014	1.34012
	3	1.34026	1.34027	1.34031
	5	1.34036	1.34035	1.34035
	10	1.34039	1.34040	1.34041
	20	1.34039	1.34041	1.34042
60	0	1.33999	1.33997	1.33995
	1	1.34011	1.34010	1.34011
	3	1.34026	1.34028	1.34030
	5	1.34034	1.34036	1.34036
	10	1.34037	1.34039	1.34038
	20	1.34039	1.34041	1.34040
70	0	1.33998	1.33995	1.33995
	1	1.34003	1.34009	1.34004
	3	1.34020	1.34019	1.34017
	5	1.34028	1.34026	1.34025
	10	1.34030	1.34031	1.34032
	20	1.34031	1.34035	1.34034

Se tomaron muestras de las corridas de variación de temperatura en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 18. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

pH ( $\pm$ 0.005)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
3	0	1.33995	1.33997	1.33996
	1	1.33999	1.34004	1.33998
	3	1.34009	1.34011	1.34006
	5	1.34012	1.34014	1.34012
	10	1.34018	1.34019	1.34018
	20	1.34019	1.34020	1.34021
5	0	1.33998	1.34000	1.33997
	1	1.34011	1.34014	1.34012
	3	1.34026	1.34027	1.34031
	5	1.34036	1.34035	1.34035
	10	1.34039	1.34040	1.34041
	20	1.34039	1.34041	1.34042
6	0	1.33995	1.34001	1.34000
	1	1.34012	1.34011	1.34012
	3	1.34029	1.34025	1.34027
	5	1.34034	1.34033	1.34034
	10	1.34039	1.34040	1.34038
	20	1.34040	1.34041	1.34039
7	0	1.34002	1.33999	1.33997
	1	1.34012	1.34013	1.34011
	3	1.34028	1.34029	1.34027
	5	1.34035	1.34034	1.34036
	10	1.34039	1.34038	1.34040
	20	1.34041	1.34040	1.34041
9	0	1.34003	1.33995	1.33997
	1	1.34005	1.34007	1.34009
	3	1.34016	1.34020	1.34017
	5	1.34024	1.34026	1.34026
	10	1.34031	1.34030	1.34032
	20	1.34033	1.34032	1.34034

Se tomaron muestras de las corridas de variación de pH en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 19. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.005 g/mL)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
0.05	0	1.33998	1.34000	1.33997
	1	1.34011	1.34014	1.34012
	3	1.34026	1.34027	1.34031
	5	1.34036	1.34035	1.34035
	10	1.34039	1.34040	1.34041
	20	1.34039	1.34041	1.34042
0.10	0	1.34649	1.34648	1.34652
	1	1.34672	1.34673	1.34671
	3	1.34694	1.34696	1.34694
	5	1.34705	1.34704	1.34706
	10	1.34711	1.34713	1.34708
	20	1.34713	1.34715	1.34709
0.15	0	1.35296	1.35293	1.35294
	1	1.35311	1.35311	1.35310
	3	1.35327	1.35328	1.35326
	5	1.35334	1.35335	1.35333
	10	1.35336	1.35336	1.35333
	20	1.35340	1.35336	1.35340
0.20	0	1.35896	1.35898	1.35894
	1	1.35917	1.35918	1.35918
	3	1.35943	1.35941	1.35941
	5	1.35954	1.35952	1.35953
	10	1.35959	1.35960	1.35960
	20	1.35960	1.35962	1.35961
0.40	0	1.37915	1.37915	1.37919
	1	1.37935	1.37937	1.37939
	3	1.37952	1.37951	1.37949
	5	1.37963	1.37961	1.37959
	10	1.37980	1.37981	1.37979
	20	1.37984	1.37987	1.37988
0.60	0	1.39287	1.39289	1.39289
	1	1.39311	1.39315	1.39314
	3	1.39355	1.39357	1.39354
	5	1.39392	1.39397	1.39368
	10	1.39438	1.39440	1.39439
	20	1.39475	1.39478	1.39477

Se tomaron muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 20. Índices de refracción de las muestras de las corridas de temperatura de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

Temperatura (°C ± 0.5 °C)	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Índice 1 (± 0.00002)	Índice 2 (± 0.00002)	Índice 3 (± 0.00002)
40	0	1.33999	1.34001	1.33995
	1	1.34003	1.34005	1.34002
	3	1.34011	1.34012	1.34014
	5	1.34019	1.34018	1.34015
	10	1.34026	1.34029	1.34028
	20	1.34033	1.34032	1.34035
50	0	1.33997	1.33999	1.34000
	1	1.34012	1.34014	1.34013
	3	1.34028	1.34026	1.34030
	5	1.34034	1.34034	1.34035
	10	1.34041	1.34038	1.34037
	20	1.34041	1.34039	1.34038
60	0	1.33999	1.33998	1.33995
	1	1.34010	1.34009	1.34008
	3	1.34022	1.34024	1.34023
	5	1.34030	1.34031	1.34028
	10	1.34037	1.34037	1.34039
	20	1.34038	1.34038	1.34041
70	0	1.34002	1.33999	1.33996
	1	1.34009	1.34011	1.34007
	3	1.34019	1.34021	1.34020
	5	1.34025	1.34027	1.34028
	10	1.34029	1.34032	1.34030
	20	1.34030	1.34033	1.34031

Se tomaron muestras de las corridas de variación de temperatura en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 21. Índices de refracción de las muestras de las corridas de pH de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

pH ( $\pm$ 0.005)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
3	0	1.33995	1.33997	1.33998
	1	1.34002	1.34000	1.34001
	3	1.34005	1.34007	1.34006
	5	1.34014	1.34012	1.34010
	10	1.34016	1.34013	1.34015
	20	1.34017	1.34014	1.34016
5	0	1.33997	1.33999	1.34000
	1	1.34012	1.34014	1.34013
	3	1.34028	1.34026	1.34030
	5	1.34034	1.34034	1.34035
	10	1.34041	1.34038	1.34037
	20	1.34041	1.34039	1.34038
6	0	1.33995	1.33999	1.34002
	1	1.34012	1.34010	1.34013
	3	1.34026	1.34027	1.34029
	5	1.34034	1.34032	1.34031
	10	1.34036	1.34038	1.34040
	20	1.34037	1.34039	1.34041
7	0	1.33997	1.33995	1.33997
	1	1.34011	1.34010	1.34011
	3	1.34026	1.34023	1.34025
	5	1.34032	1.34033	1.34029
	10	1.34036	1.34037	1.34040
	20	1.34037	1.34037	1.34041
9	0	1.33999	1.33995	1.33999
	1	1.34002	1.34004	1.34008
	3	1.34009	1.34007	1.34016
	5	1.34019	1.34017	1.34018
	10	1.34021	1.34024	1.34023
	20	1.34023	1.34026	1.34024

Se tomaron muestras de las corridas de variación de pH en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 22. Índices de refracción de las muestras de las corridas de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.005 g/mL)	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Índice 1 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 2 ( $\pm$ 0.00002)	Índice 3 ( $\pm$ 0.00002)
0.05	0	1.33997	1.33999	1.34000
	1	1.34012	1.34014	1.34013
	3	1.34028	1.34026	1.34030
	5	1.34034	1.34034	1.34035
	10	1.34041	1.34038	1.34037
	20	1.34041	1.34039	1.34038
0.10	0	1.34647	1.34648	1.34649
	1	1.34669	1.34665	1.34667
	3	1.34691	1.34689	1.34693
	5	1.34700	1.34699	1.34699
	10	1.34703	1.34705	1.34706
	20	1.34706	1.34709	1.34705
0.15	0	1.35293	1.35293	1.35289
	1	1.35310	1.35309	1.35303
	3	1.35322	1.35323	1.35325
	5	1.35331	1.35331	1.35329
	10	1.35332	1.35333	1.35333
	20	1.35332	1.35335	1.35334
0.20	0	1.35895	1.35900	1.35901
	1	1.35916	1.35919	1.35916
	3	1.35937	1.35936	1.35938
	5	1.35944	1.35943	1.35944
	10	1.35946	1.35949	1.35950
	20	1.35947	1.35949	1.35951
0.40	0	1.37915	1.37916	1.37915
	1	1.37921	1.37925	1.37922
	3	1.37925	1.37935	1.37927
	5	1.37937	1.37940	1.37939
	10	1.37955	1.37949	1.37945
	20	1.37959	1.37952	1.37953
0.60	0	1.39289	1.39283	1.39285
	1	1.39309	1.39307	1.39310
	3	1.39338	1.39342	1.39341
	5	1.39362	1.39359	1.39358
	10	1.39395	1.39399	1.39401
	20	1.39417	1.39413	1.39411

Se tomaron muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado.

Cuadro 23. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima sin inmovilizar.

Soporte	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Índice 1 (± 0.00002)	Índice 2 (± 0.00002)	Índice 3 (± 0.00002)
Carbón activado	0	1.33999	1.33998	1.33997
	1	1.34002	1.34001	1.34001
	3	1.34009	1.34007	1.34008
	5	1.34011	1.34012	1.34012
	10	1.34020	1.34019	1.34018
	20	1.34027	1.34028	1.34026
PHA	0	1.33996	1.33998	1.33995
	1	1.34016	1.34014	1.34012
	3	1.34031	1.34029	1.34030
	5	1.34035	1.34036	1.34038
	10	1.34039	1.34040	1.34040
	20	1.34041	1.34042	1.34041
Algianto de sodio	0	1.33997	1.33998	1.33996
	1	1.33998	1.33999	1.33997
	3	1.33999	1.34000	1.33998
	5	1.34001	1.34001	1.34000
	10	1.34009	1.34004	1.34001
	20	1.34017	1.34016	1.34015

Se realizaron corridas con el remanente del medio utilizado para llevar a cabo cada una de las inmovilizaciones. Se tomaron muestras de las corridas en el tiempo 0, 1, 3, 5, 10 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. Las corridas se realizaron en triplicado. Las condiciones de estas corridas fueron temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

## B. DATOS CALCULADOS

Cuadro 24. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima libre

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
40	Sacarosa	0	0.048 ± 7.10E-07	0.049 ± 7.26E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.048 ± 0.003
		1	0.039 ± 5.85E-07	0.040 ± 6.01E-07	0.038 ± 5.69E-07	0.039 ± 0.003
		3	0.029 ± 4.28E-07	0.027 ± 3.97E-07	0.028 ± 4.12E-07	0.028 ± 0.003
		5	0.020 ± 3.02E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.019 ± 2.87E-07	0.019 ± 0.005
		10	0.014 ± 2.08E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.012 ± 0.008
		20	0.008 ± 1.14E-07	0.007 ± 9.86E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.007 ± 0.003
	Glucosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002
		1	0.006 ± 8.49E-08	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 9.32E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.011 ± 1.67E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.012 ± 1.76E-07	0.012 ± 0.002
		5	0.016 ± 2.34E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 0.003
		10	0.019 ± 2.83E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.020 ± 0.004
		20	0.022 ± 3.33E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 0.002
	Fructosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002
		1	0.006 ± 8.49E-08	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 9.32E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.011 ± 1.67E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.012 ± 1.76E-07	0.012 ± 0.002
		5	0.016 ± 2.34E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 0.003
		10	0.019 ± 2.83E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.020 ± 0.004
		20	0.022 ± 3.33E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 0.002
	Producto	0	0.003 ± 2.67E-08	0.001 ± 1.50E-08	0.004 ± 3.84E-08	0.003 ± 0.003
		1	0.011 ± 1.20E-07	0.010 ± 1.08E-07	0.012 ± 1.32E-07	0.011 ± 0.003
3		0.022 ± 2.37E-07	0.025 ± 2.60E-07	0.024 ± 2.49E-07	0.024 ± 0.003	
5		0.031 ± 3.30E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.032 ± 3.42E-07	0.033 ± 0.005	
10		0.038 ± 4.00E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.041 ± 0.008	
20		0.045 ± 4.70E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.046 ± 0.003	
50	Sacarosa	0	0.048 ± 7.10E-07	0.049 ± 7.26E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.048 ± 0.002
		1	0.033 ± 4.91E-07	0.032 ± 4.75E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.032 ± 0.003
		3	0.016 ± 2.40E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.015 ± 0.004
		5	0.008 ± 1.14E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.007 ± 9.86E-08	0.008 ± 0.003
	Glucosa	10	0.002 ± 3.58E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.003 ± 0.003
		20	0.000 ± 4.48E-09	0.001 ± 2.02E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.001 ± 0.003
		0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 0.001
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
50	Glucosa	3	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 0.002	
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002	
		10	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002	
		20	0.026 ± 3.90E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 0.002	
	Fructosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 0.001	
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002	
		3	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 0.002	
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002	
	Producto	10	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002	
		20	0.026 ± 3.90E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 0.002	
		0	0.003 ± 2.67E-08	0.001 ± 1.50E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.002 ± 0.002	
		1	0.018 ± 1.90E-07	0.019 ± 2.02E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.019 ± 0.003	
	Sacarosa	3	0.036 ± 3.77E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.036 ± 0.004	
		5	0.045 ± 4.70E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.045 ± 0.003	
		10	0.050 ± 5.29E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.003	
		20	0.052 ± 5.52E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.051 ± 0.003	
	60	Glucosa	0	0.049 ± 7.26E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.048 ± 0.003
			1	0.036 ± 5.38E-07	0.038 ± 5.69E-07	0.037 ± 5.54E-07	0.037 ± 0.003
			3	0.022 ± 3.34E-07	0.022 ± 3.34E-07	0.023 ± 3.50E-07	0.023 ± 0.002
			5	0.014 ± 2.08E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.015 ± 0.004
Fructosa		10	0.008 ± 1.14E-07	0.007 ± 9.86E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.007 ± 0.003	
		20	0.005 ± 6.72E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.004 ± 0.004	
		0	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002	
		1	0.007 ± 1.10E-07	0.006 ± 9.32E-08	0.007 ± 1.01E-07	0.007 ± 0.002	
Glucosa		3	0.015 ± 2.17E-07	0.015 ± 2.17E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.014 ± 0.001	
		5	0.019 ± 2.83E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 0.002	
		10	0.022 ± 3.33E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 0.002	
		20	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002	
Fructosa	0	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002		
	1	0.007 ± 1.10E-07	0.006 ± 9.32E-08	0.007 ± 1.01E-07	0.007 ± 0.002		
	3	0.015 ± 2.17E-07	0.015 ± 2.17E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.014 ± 0.001		
	5	0.019 ± 2.83E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 0.002		
Fructosa	10	0.022 ± 3.33E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 0.002		
	20	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002		

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
60	Producto	0	0.001 ± 1.50E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.004 ± 3.84E-08	0.003 ± 0.003	
		1	0.015 ± 1.55E-07	0.012 ± 1.32E-07	0.014 ± 1.43E-07	0.014 ± 0.003	
		3	0.029 ± 3.07E-07	0.029 ± 3.07E-07	0.028 ± 2.95E-07	0.029 ± 0.002	
		5	0.038 ± 4.00E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.037 ± 0.004	
		10	0.045 ± 4.70E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.046 ± 0.003	
		20	0.048 ± 5.05E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.004	
	Sacarosa	0	0.049 ± 7.26E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.048 ± 0.005	
		1	0.043 ± 6.48E-07	0.042 ± 6.32E-07	0.041 ± 6.16E-07	0.042 ± 0.003	
		3	0.033 ± 4.91E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.033 ± 4.91E-07	0.032 ± 0.004	
		5	0.026 ± 3.81E-07	0.024 ± 3.65E-07	0.027 ± 3.97E-07	0.026 ± 0.003	
		10	0.017 ± 2.55E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.016 ± 0.004	
		20	0.012 ± 1.77E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.012 ± 0.005	
	70	Glucosa	0	0.001 ± 1.06E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.003
			1	0.003 ± 5.19E-08	0.004 ± 6.02E-08	0.005 ± 6.84E-08	0.004 ± 0.002
3			0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.009 ± 0.002	
5			0.013 ± 1.92E-07	0.013 ± 2.00E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.013 ± 0.002	
Fructosa		10	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.002	
		20	0.020 ± 3.00E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.003	
		0	0.001 ± 1.06E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.003	
		1	0.003 ± 5.19E-08	0.004 ± 6.02E-08	0.005 ± 6.84E-08	0.004 ± 0.002	
Producto	3	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.009 ± 0.002		
	5	0.013 ± 1.92E-07	0.013 ± 2.00E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.013 ± 0.002		
	10	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.002		
	20	0.020 ± 3.00E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.003		
Producto	0	0.001 ± 1.50E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.004 ± 3.84E-08	0.002 ± 0.005		
	1	0.007 ± 7.34E-08	0.008 ± 8.51E-08	0.009 ± 9.67E-08	0.008 ± 0.003		
	3	0.018 ± 1.90E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.018 ± 1.90E-07	0.019 ± 0.004		
	5	0.026 ± 2.72E-07	0.027 ± 2.84E-07	0.025 ± 2.60E-07	0.026 ± 0.003		
	10	0.035 ± 3.65E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.037 ± 3.89E-07	0.035 ± 0.004		
		20	0.040 ± 4.24E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.040 ± 0.005	

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de temperatura de la enzima libre. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 25. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima libre

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
3	Sacarosa	0	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.048 $\pm$ 0.003
		1	0.044 $\pm$ 6.63E-07	0.043 $\pm$ 6.48E-07	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.043 $\pm$ 0.003
		3	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.037 $\pm$ 5.54E-07	0.035 $\pm$ 0.006
		5	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.029 $\pm$ 4.28E-07	0.029 $\pm$ 0.006
		10	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.026 $\pm$ 3.81E-07	0.026 $\pm$ 0.003
		20	0.022 $\pm$ 3.34E-07	0.023 $\pm$ 3.50E-07	0.021 $\pm$ 3.18E-07	0.022 $\pm$ 0.003
	Glucosa	0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.003 $\pm$ 0.002
		3	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 0.003
		5	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.011 $\pm$ 0.003
		10	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 0.002
		20	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.015 $\pm$ 2.25E-07	0.015 $\pm$ 0.002
	Fructosa	0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.003 $\pm$ 0.002
		3	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 0.003
5		0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.011 $\pm$ 0.003	
10		0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 0.002	
20		0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.015 $\pm$ 2.25E-07	0.015 $\pm$ 0.002	
Producto	0	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.003 $\pm$ 0.003	
	1	0.006 $\pm$ 6.17E-08	0.007 $\pm$ 7.34E-08	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.007 $\pm$ 0.003	
	3	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.014 $\pm$ 1.43E-07	0.016 $\pm$ 0.007	
	5	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.022 $\pm$ 2.37E-07	0.022 $\pm$ 0.007	
	10	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.026 $\pm$ 2.72E-07	0.026 $\pm$ 0.003	
	20	0.029 $\pm$ 3.07E-07	0.028 $\pm$ 2.95E-07	0.030 $\pm$ 3.19E-07	0.029 $\pm$ 0.003	
5	Sacarosa	0	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.048 $\pm$ 0.002
		1	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.032 $\pm$ 0.003
		3	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.015 $\pm$ 0.004
		5	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.007 $\pm$ 9.86E-08	0.008 $\pm$ 0.003
		10	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.003 $\pm$ 0.003
	20	0.000 $\pm$ 4.48E-09	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.001 $\pm$ 0.003	
Glucosa	0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.001	
1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.010 $\pm$ 0.002		

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
5	Glucosa	3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
		5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 0.002	
		10	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002	
		20	0.026 $\pm$ 3.90E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 0.002	
	Fructosa	0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.001	
		1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.010 $\pm$ 0.002	
		3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
		5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 0.002	
	Producto	10	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002	
		20	0.026 $\pm$ 3.90E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 0.002	
		0	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.002 $\pm$ 0.002	
		1	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.019 $\pm$ 0.003	
	Sacarosa	3	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.036 $\pm$ 0.004	
		5	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.046 $\pm$ 4.82E-07	0.045 $\pm$ 0.003	
		10	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 0.003	
		20	0.052 $\pm$ 5.52E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.051 $\pm$ 0.003	
	6	Glucosa	0	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 0.007
			1	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.034 $\pm$ 0.003
			3	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.015 $\pm$ 2.24E-07	0.016 $\pm$ 0.003
			5	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.009 $\pm$ 0.005
Fructosa		10	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 0.003	
		20	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 0.004	
		0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 0.003	
		1	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.008 $\pm$ 0.002	
Glucosa	3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 0.002		
	5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.003		
	10	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.002		
	20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.002		
Fructosa	0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 0.003		
	1	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.008 $\pm$ 0.002		
	3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 0.002		
	5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.003		
Fructosa	10	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.002		
	20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.002		

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
6	Producto	0	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.002 $\pm$ 0.007
		1	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.017 $\pm$ 0.003
		3	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.037 $\pm$ 3.89E-07	0.036 $\pm$ 0.003
		5	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.043 $\pm$ 0.005
		10	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 0.003
		20	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.050 $\pm$ 0.004
	Sacarosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.049 $\pm$ 0.005
		1	0.043 $\pm$ 6.48E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.037 $\pm$ 0.018
		3	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.015 $\pm$ 2.24E-07	0.016 $\pm$ 0.002
		5	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.012 $\pm$ 0.004
		10	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.004 $\pm$ 0.004
		20	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 0.003
7	Glucosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.007 $\pm$ 0.009
		3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 0.001
		5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		10	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 0.002
	Fructosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.007 $\pm$ 0.009
		3	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 0.001
		5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		10	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 0.002
9	Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.001 $\pm$ 0.006
		1	0.007 $\pm$ 7.34E-08	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.014 $\pm$ 0.019
		3	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.037 $\pm$ 3.89E-07	0.036 $\pm$ 0.002
		5	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.040 $\pm$ 0.004
		10	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 0.004
		20	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 0.003
	Sacarosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.048 $\pm$ 0.006
		1	0.041 $\pm$ 6.16E-07	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.042 $\pm$ 0.002
		3	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.034 $\pm$ 0.002

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
9	Sacarosa	5	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.029 $\pm$ 4.28E-07	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.027 $\pm$ 0.006
		10	0.022 $\pm$ 3.34E-07	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.021 $\pm$ 3.18E-07	0.021 $\pm$ 0.003
		20	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.018 $\pm$ 2.71E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.017 $\pm$ 0.003
	Glucosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.004 $\pm$ 0.001
		3	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 0.003
		5	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.012 $\pm$ 0.002
		10	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.014 $\pm$ 0.004
		20	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.015 $\pm$ 2.25E-07	0.017 $\pm$ 0.004
		0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.003
	Fructosa	1	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.004 $\pm$ 0.001
		3	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.008 $\pm$ 1.01E-07	0.009 $\pm$ 0.001
		5	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.013 $\pm$ 1.67E-07	0.012 $\pm$ 0.003
		10	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.015 $\pm$ 1.92E-07	0.015 $\pm$ 0.002
		20	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.017 $\pm$ 2.25E-07	0.017 $\pm$ 0.002
	Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.005 $\pm$ 2.67E-08	0.003 $\pm$ 0.007
		1	0.009 $\pm$ 9.67E-08	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.008 $\pm$ 0.002
		3	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.017 $\pm$ 1.43E-07	0.017 $\pm$ 0.002
		5	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.022 $\pm$ 2.37E-07	0.027 $\pm$ 2.37E-07	0.025 $\pm$ 0.007
		10	0.029 $\pm$ 3.07E-07	0.031 $\pm$ 3.30E-07	0.030 $\pm$ 2.72E-07	0.030 $\pm$ 0.003
20		0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.034 $\pm$ 3.54E-07	0.035 $\pm$ 3.19E-07	0.035 $\pm$ 0.003	

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de pH de la enzima libre. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 26. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima libre

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.05	Sacarosa	0	0.048 ± 7.10E-07	0.049 ± 7.26E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.048 ± 0.002
		1	0.033 ± 4.91E-07	0.032 ± 4.75E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.032 ± 0.003
		3	0.016 ± 2.40E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.015 ± 0.004
		5	0.008 ± 1.14E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.007 ± 9.86E-08	0.008 ± 0.003
		10	0.002 ± 3.58E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.003 ± 0.003
		20	0.000 ± 4.48E-09	0.001 ± 2.02E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.001 ± 0.003
	Glucosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 0.001
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.026 ± 3.90E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 0.002
	Fructosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 0.001
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.018 ± 2.67E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.025 ± 3.74E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.026 ± 3.90E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 0.002
	Producto	0	0.003 ± 2.67E-08	0.001 ± 1.50E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.002 ± 0.002
		1	0.018 ± 1.90E-07	0.019 ± 2.02E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.019 ± 0.003
3		0.036 ± 3.77E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.036 ± 0.004	
5		0.045 ± 4.70E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.045 ± 0.003	
10		0.050 ± 5.29E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.003	
20		0.052 ± 5.52E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.051 ± 0.003	
0.10	Sacarosa	0	0.092 ± 1.37E-06	0.095 ± 1.40E-06	0.091 ± 1.35E-06	0.093 ± 0.005
		1	0.068 ± 1.01E-06	0.067 ± 9.96E-07	0.065 ± 9.60E-07	0.067 ± 0.005
		3	0.032 ± 4.81E-07	0.031 ± 4.63E-07	0.035 ± 5.17E-07	0.033 ± 0.005
		5	0.022 ± 3.22E-07	0.020 ± 3.04E-07	0.023 ± 3.39E-07	0.022 ± 0.004
		10	0.013 ± 1.97E-07	0.017 ± 2.51E-07	0.022 ± 3.22E-07	0.017 ± 0.013
		20	0.019 ± 2.86E-07	0.019 ± 2.86E-07	0.007 ± 1.09E-07	0.015 ± 0.021
	Glucosa	0	0.004 ± 6.41E-08	0.003 ± 4.63E-08	0.005 ± 7.30E-08	0.004 ± 0.003
		1	0.016 ± 2.42E-07	0.017 ± 2.51E-07	0.018 ± 2.69E-07	0.017 ± 0.003

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.10	Glucosa	3	0.034 ± 5.10E-07	0.035 ± 5.18E-07	0.033 ± 4.92E-07	0.034 ± 0.003
		5	0.040 ± 5.90E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.039 ± 5.81E-07	0.040 ± 0.002
		10	0.044 ± 6.52E-07	0.042 ± 6.25E-07	0.040 ± 5.90E-07	0.042 ± 0.006
		20	0.041 ± 6.07E-07	0.041 ± 6.07E-07	0.047 ± 6.97E-07	0.043 ± 0.010
	Fructosa	0	0.004 ± 6.41E-08	0.003 ± 4.63E-08	0.005 ± 7.30E-08	0.004 ± 0.003
		1	0.016 ± 2.42E-07	0.017 ± 2.51E-07	0.018 ± 2.69E-07	0.017 ± 0.003
		3	0.034 ± 5.10E-07	0.035 ± 5.18E-07	0.033 ± 4.92E-07	0.034 ± 0.003
		5	0.040 ± 5.90E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.039 ± 5.81E-07	0.040 ± 0.002
	Producto	10	0.044 ± 6.52E-07	0.042 ± 6.25E-07	0.040 ± 5.90E-07	0.042 ± 0.006
		20	0.041 ± 6.07E-07	0.041 ± 6.07E-07	0.047 ± 6.97E-07	0.043 ± 0.010
		0	0.009 ± 9.06E-08	0.006 ± 6.54E-08	0.010 ± 1.03E-07	0.008 ± 0.005
		1	0.033 ± 3.43E-07	0.034 ± 3.55E-07	0.036 ± 3.80E-07	0.034 ± 0.005
Sacarosa	3	0.069 ± 7.21E-07	0.070 ± 7.33E-07	0.066 ± 6.95E-07	0.068 ± 0.005	
	5	0.079 ± 8.34E-07	0.081 ± 8.47E-07	0.078 ± 8.21E-07	0.079 ± 0.004	
	10	0.088 ± 9.22E-07	0.084 ± 8.84E-07	0.079 ± 8.34E-07	0.084 ± 0.013	
	20	0.082 ± 8.59E-07	0.082 ± 8.59E-07	0.094 ± 9.85E-07	0.086 ± 0.021	
0.15	Glucosa	0	0.145 ± 2.14E-06	0.140 ± 2.07E-06	0.140 ± 2.07E-06	0.142 ± 0.007
		1	0.097 ± 1.43E-06	0.101 ± 1.50E-06	0.099 ± 1.47E-06	0.099 ± 0.006
		3	0.060 ± 8.90E-07	0.056 ± 8.26E-07	0.058 ± 8.58E-07	0.058 ± 0.006
		5	0.041 ± 6.02E-07	0.039 ± 5.70E-07	0.043 ± 6.34E-07	0.041 ± 0.006
	Fructosa	10	0.030 ± 4.42E-07	0.036 ± 5.38E-07	0.036 ± 5.38E-07	0.034 ± 0.011
		20	0.028 ± 4.10E-07	0.032 ± 4.74E-07	0.034 ± 5.06E-07	0.031 ± 0.010
		0	0.003 ± 4.17E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.004 ± 0.004
		1	0.028 ± 4.12E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.027 ± 3.95E-07	0.027 ± 0.003
	Glucosa	3	0.047 ± 6.98E-07	0.050 ± 7.32E-07	0.048 ± 7.15E-07	0.048 ± 0.003
		5	0.058 ± 8.50E-07	0.059 ± 8.67E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.058 ± 0.003
		10	0.063 ± 9.34E-07	0.060 ± 8.84E-07	0.060 ± 8.84E-07	0.061 ± 0.006
		20	0.064 ± 9.51E-07	0.062 ± 9.17E-07	0.061 ± 9.00E-07	0.062 ± 0.005
Fructosa	0	0.003 ± 4.17E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.004 ± 0.004	
	1	0.028 ± 4.12E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.027 ± 3.95E-07	0.027 ± 0.003	
	3	0.047 ± 6.98E-07	0.050 ± 7.32E-07	0.048 ± 7.15E-07	0.048 ± 0.003	
	5	0.058 ± 8.50E-07	0.059 ± 8.67E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.058 ± 0.003	
Fructosa	10	0.063 ± 9.34E-07	0.060 ± 8.84E-07	0.060 ± 8.84E-07	0.061 ± 0.006	
	20	0.064 ± 9.51E-07	0.062 ± 9.17E-07	0.061 ± 9.00E-07	0.062 ± 0.005	

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.40	Sacarosa	5	0.342 ± 4.96E-06	0.084 ± 1.22E-06	0.087 ± 1.25E-06	0.171 ± 0.444
		10	0.311 ± 4.51E-06	0.069 ± 1.01E-06	0.062 ± 8.99E-07	0.147 ± 0.425
		20	0.273 ± 3.96E-06	0.067 ± 9.70E-07	0.060 ± 8.63E-07	0.133 ± 0.363
	Glucosa	0	0.002 ± 2.38E-08	0.005 ± 7.64E-08	0.007 ± 1.03E-07	0.005 ± 0.008
		1	0.009 ± 1.29E-07	0.007 ± 1.03E-07	0.009 ± 1.29E-07	0.008 ± 0.003
		3	0.020 ± 2.87E-07	0.022 ± 3.13E-07	0.018 ± 2.60E-07	0.020 ± 0.005
		5	0.031 ± 4.44E-07	0.032 ± 4.71E-07	0.036 ± 5.23E-07	0.033 ± 0.008
		10	0.047 ± 6.81E-07	0.049 ± 7.07E-07	0.052 ± 7.60E-07	0.049 ± 0.008
		20	0.067 ± 9.70E-07	0.065 ± 9.44E-07	0.067 ± 9.70E-07	0.066 ± 0.003
	Fructosa	0	0.002 ± 2.38E-08	0.005 ± 7.64E-08	0.007 ± 1.03E-07	0.005 ± 0.008
		1	0.009 ± 1.29E-07	0.007 ± 1.03E-07	0.009 ± 1.29E-07	0.008 ± 0.003
		3	0.020 ± 2.87E-07	0.022 ± 3.13E-07	0.018 ± 2.60E-07	0.020 ± 0.005
		5	0.031 ± 4.44E-07	0.032 ± 4.71E-07	0.036 ± 5.23E-07	0.033 ± 0.008
		10	0.047 ± 6.81E-07	0.049 ± 7.07E-07	0.052 ± 7.60E-07	0.049 ± 0.008
		20	0.067 ± 9.70E-07	0.065 ± 9.44E-07	0.067 ± 9.70E-07	0.066 ± 0.003
	Producto	0	0.003 ± 3.36E-08	0.011 ± 1.08E-07	0.014 ± 1.45E-07	0.009 ± 0.017
		1	0.018 ± 1.82E-07	0.014 ± 1.45E-07	0.018 ± 1.82E-07	0.017 ± 0.006
		3	0.040 ± 4.05E-07	0.043 ± 4.43E-07	0.036 ± 3.68E-07	0.040 ± 0.011
5		0.061 ± 6.28E-07	0.065 ± 6.66E-07	0.072 ± 7.40E-07	0.066 ± 0.017	
10		0.094 ± 9.63E-07	0.098 ± 1.00E-06	0.105 ± 1.07E-06	0.099 ± 0.017	
20		0.134 ± 1.37E-06	0.130 ± 1.33E-06	0.134 ± 1.37E-06	0.133 ± 0.006	
0.60	Sacarosa	0	0.597 ± 8.57E-06	0.597 ± 8.58E-06	0.596 ± 8.56E-06	0.597 ± 0.002
		1	0.588 ± 8.45E-06	0.587 ± 8.43E-06	0.589 ± 8.46E-06	0.588 ± 0.003
		3	0.575 ± 8.25E-06	0.573 ± 8.23E-06	0.576 ± 8.27E-06	0.575 ± 0.005
		5	0.568 ± 8.15E-06	0.567 ± 8.14E-06	0.565 ± 8.11E-06	0.567 ± 0.005
		10	0.543 ± 7.80E-06	0.542 ± 7.78E-06	0.549 ± 7.88E-06	0.545 ± 0.011
	Glucosa	20	0.524 ± 7.52E-06	0.523 ± 7.50E-06	0.525 ± 7.54E-06	0.524 ± 0.003
		0	0.002 ± 2.47E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.04E-08	0.002 ± 0.001
		1	0.006 ± 8.80E-08	0.007 ± 9.95E-08	0.006 ± 8.22E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.013 ± 1.92E-07	0.014 ± 2.03E-07	0.013 ± 1.80E-07	0.013 ± 0.002
		5	0.017 ± 2.43E-07	0.017 ± 2.49E-07	0.019 ± 2.66E-07	0.018 ± 0.003
10	0.030 ± 4.27E-07	0.031 ± 4.39E-07	0.027 ± 3.87E-07	0.029 ± 0.006		
20	0.040 ± 5.71E-07	0.041 ± 5.83E-07	0.039 ± 5.65E-07	0.040 ± 0.002		

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.60	Fructosa	0	0.002 ± 2.47E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.04E-08	0.002 ± 0.001
		1	0.006 ± 8.80E-08	0.007 ± 9.95E-08	0.006 ± 8.22E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.013 ± 1.92E-07	0.014 ± 2.03E-07	0.013 ± 1.80E-07	0.013 ± 0.002
		5	0.017 ± 2.43E-07	0.017 ± 2.49E-07	0.019 ± 2.66E-07	0.018 ± 0.003
		10	0.030 ± 4.27E-07	0.031 ± 4.39E-07	0.027 ± 3.87E-07	0.029 ± 0.006
		20	0.040 ± 5.71E-07	0.041 ± 5.83E-07	0.039 ± 5.65E-07	0.040 ± 0.002
	Producto	0	0.003 ± 3.49E-08	0.003 ± 2.68E-08	0.004 ± 4.30E-08	0.003 ± 0.002
		1	0.012 ± 1.24E-07	0.014 ± 1.41E-07	0.011 ± 1.16E-07	0.013 ± 0.004
		3	0.027 ± 2.71E-07	0.028 ± 2.87E-07	0.025 ± 2.55E-07	0.027 ± 0.005
		5	0.034 ± 3.44E-07	0.035 ± 3.52E-07	0.037 ± 3.77E-07	0.035 ± 0.005
		10	0.060 ± 6.05E-07	0.061 ± 6.21E-07	0.054 ± 5.48E-07	0.058 ± 0.011
		20	0.080 ± 8.08E-07	0.081 ± 8.24E-07	0.079 ± 8.00E-07	0.080 ± 0.004

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato, de la enzima libre. Esto se realizó con el índice de refracción y las curvas de calibración para una concentración inicial de sustrato de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40 y 0.60 ± 0.0005 g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 27. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con carbón activado

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
40	Sacarosa	0	0.050 ± 7.42E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.049 ± 7.26E-07	0.049 ± 0.003
		1	0.040 ± 6.01E-07	0.041 ± 6.16E-07	0.043 ± 6.48E-07	0.042 ± 0.005
		3	0.033 ± 4.91E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.031 ± 0.005
		5	0.022 ± 3.34E-07	0.021 ± 3.18E-07	0.023 ± 3.50E-07	0.022 ± 0.003
		10	0.014 ± 2.08E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.013 ± 0.004
		20	0.009 ± 1.30E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 0.002
	Glucosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 0.002
		1	0.005 ± 7.67E-08	0.005 ± 6.84E-08	0.003 ± 5.19E-08	0.004 ± 0.003
		3	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.003
		5	0.015 ± 2.17E-07	0.015 ± 2.25E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.015 ± 0.002
		10	0.019 ± 2.83E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 0.002
		20	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
	Fructosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 0.002
		1	0.005 ± 7.67E-08	0.005 ± 6.84E-08	0.003 ± 5.19E-08	0.004 ± 0.003
		3	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.003
		5	0.015 ± 2.17E-07	0.015 ± 2.25E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.015 ± 0.002
		10	0.019 ± 2.83E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 0.002
		20	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
Producto	0	0.000 ± 3.34E-09	0.003 ± 2.67E-08	0.001 ± 1.50E-08	0.001 ± 0.003	
	1	0.010 ± 1.08E-07	0.009 ± 9.67E-08	0.007 ± 7.34E-08	0.009 ± 0.005	
	3	0.018 ± 1.90E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.020 ± 0.005	
	5	0.029 ± 3.07E-07	0.030 ± 3.19E-07	0.028 ± 2.95E-07	0.029 ± 0.003	
	10	0.038 ± 4.00E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.039 ± 0.004	
	20	0.043 ± 4.59E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.044 ± 0.002	
50	Sacarosa	0	0.050 ± 7.42E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.045 ± 6.79E-07	0.047 ± 0.007
		1	0.034 ± 5.06E-07	0.033 ± 4.91E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.033 ± 0.005
		3	0.017 ± 2.55E-07	0.018 ± 2.71E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.017 ± 0.003
		5	0.008 ± 1.14E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.009 ± 0.004
		10	0.003 ± 5.15E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.004 ± 0.002
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.003 ± 0.002
Glucosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 0.003	
	1	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 0.003	

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
50	Glucosa	3	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.001
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.001
	Fructosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 0.003
		1	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.022 ± 0.002
	Producto	10	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.001
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.001
		0	0.000 ± 3.34E-09	0.004 ± 3.84E-08	0.005 ± 5.00E-08	0.003 ± 0.007
		1	0.017 ± 1.78E-07	0.018 ± 1.90E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.018 ± 0.005
Sacarosa	3	0.035 ± 3.65E-07	0.034 ± 3.54E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.035 ± 0.003	
	5	0.045 ± 4.70E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.043 ± 0.004	
	10	0.049 ± 5.17E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.002	
	20	0.049 ± 5.17E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.050 ± 0.002	
60	Glucosa	0	0.049 ± 7.26E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.048 ± 0.003
		1	0.035 ± 5.22E-07	0.036 ± 5.38E-07	0.035 ± 5.22E-07	0.035 ± 0.002
		3	0.020 ± 3.02E-07	0.019 ± 2.87E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.019 ± 0.005
		5	0.012 ± 1.77E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.012 ± 0.003
	Fructosa	10	0.006 ± 8.29E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.005 ± 0.004
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.003 ± 0.005
		0	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002
		1	0.008 ± 1.18E-07	0.007 ± 1.10E-07	0.008 ± 1.18E-07	0.008 ± 0.001
	Glucosa	3	0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.016 ± 0.003
		5	0.020 ± 3.00E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 0.002
		10	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003
Fructosa	0	0.001 ± 1.06E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 0.002	
	1	0.008 ± 1.18E-07	0.007 ± 1.10E-07	0.008 ± 1.18E-07	0.008 ± 0.001	
	3	0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.016 ± 0.003	
	5	0.020 ± 3.00E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 0.002	
Fructosa	10	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.002	
	20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003	

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)		
60	Producto	0	0.001 ± 1.50E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.004 ± 3.84E-08	0.003 ± 0.003		
		1	0.016 ± 1.67E-07	0.015 ± 1.55E-07	0.016 ± 1.67E-07	0.015 ± 0.002		
		3	0.031 ± 3.30E-07	0.032 ± 3.42E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.033 ± 0.005		
		5	0.040 ± 4.24E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.040 ± 0.003		
		10	0.047 ± 4.94E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.048 ± 0.004		
		20	0.049 ± 5.17E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.005		
		0	0.045 ± 6.79E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.047 ± 0.004		
	Sacarosa	1	0.039 ± 5.85E-07	0.039 ± 5.85E-07	0.038 ± 5.69E-07	0.039 ± 0.002		
		3	0.030 ± 4.44E-07	0.028 ± 4.12E-07	0.026 ± 3.81E-07	0.028 ± 0.006		
		5	0.022 ± 3.34E-07	0.020 ± 3.02E-07	0.019 ± 2.87E-07	0.021 ± 0.005		
		10	0.014 ± 2.08E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.013 ± 0.002		
		20	0.012 ± 1.77E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.011 ± 0.003		
		70	Glucosa	0	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.002
				1	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 9.32E-08	0.006 ± 0.001
3	0.011 ± 1.59E-07			0.012 ± 1.76E-07	0.013 ± 1.92E-07	0.012 ± 0.003		
5	0.015 ± 2.17E-07			0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.015 ± 0.003		
10	0.019 ± 2.83E-07			0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.019 ± 0.001		
20	0.020 ± 3.00E-07			0.021 ± 3.08E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 0.002		
0	0.002 ± 3.54E-08			0.001 ± 1.89E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.002		
Fructosa	1	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 9.32E-08	0.006 ± 0.001			
	3	0.011 ± 1.59E-07	0.012 ± 1.76E-07	0.013 ± 1.92E-07	0.012 ± 0.003			
	5	0.015 ± 2.17E-07	0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.015 ± 0.003			
	10	0.019 ± 2.83E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.019 ± 0.001			
	20	0.020 ± 3.00E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 0.002			
	Producto	0	0.005 ± 5.00E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.003 ± 0.004		
		1	0.011 ± 1.20E-07	0.011 ± 1.20E-07	0.012 ± 1.32E-07	0.012 ± 0.002		
3		0.021 ± 2.25E-07	0.024 ± 2.49E-07	0.026 ± 2.72E-07	0.024 ± 0.007			
5		0.029 ± 3.07E-07	0.031 ± 3.30E-07	0.032 ± 3.42E-07	0.031 ± 0.005			
10		0.038 ± 4.00E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.039 ± 0.002			
20		0.040 ± 4.24E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.041 ± 0.003			

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con carbón activado. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 28. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con carbón activado

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
3	Sacarosa	0	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.047 $\pm$ 0.005
		1	0.040 $\pm$ 6.01E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.041 $\pm$ 6.16E-07	0.042 $\pm$ 0.008
		3	0.037 $\pm$ 5.54E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.036 $\pm$ 5.38E-07	0.036 $\pm$ 0.003
		5	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.033 $\pm$ 0.003
		10	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.029 $\pm$ 4.28E-07	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.027 $\pm$ 0.004
		20	0.026 $\pm$ 3.81E-07	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.026 $\pm$ 0.003
	Glucosa	0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.003
		1	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.004 $\pm$ 0.004
		3	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.10E-07	0.007 $\pm$ 0.002
		5	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 0.002
		10	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.012 $\pm$ 0.002
		20	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 0.002
	Fructosa	0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.003
		1	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.004 $\pm$ 0.004
		3	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.10E-07	0.007 $\pm$ 0.002
5		0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 0.002	
10		0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.012 $\pm$ 0.002	
20		0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 0.002	
Producto	0	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.003 $\pm$ 0.005	
	1	0.010 $\pm$ 1.08E-07	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.009 $\pm$ 9.67E-08	0.008 $\pm$ 0.009	
	3	0.014 $\pm$ 1.43E-07	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.015 $\pm$ 1.55E-07	0.015 $\pm$ 0.003	
	5	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.018 $\pm$ 0.003	
	10	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.022 $\pm$ 2.37E-07	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.024 $\pm$ 0.004	
	20	0.026 $\pm$ 2.72E-07	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.026 $\pm$ 0.003	
5	Sacarosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.047 $\pm$ 0.007
		1	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.033 $\pm$ 0.005
		3	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.018 $\pm$ 2.71E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.017 $\pm$ 0.003
		5	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.009 $\pm$ 0.004
		10	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.004 $\pm$ 0.002
		20	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.003 $\pm$ 0.002
Glucosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 0.003	
	1	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 0.003	

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
5	Glucosa	3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 0.002	
		5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 0.002	
		10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.001	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 0.001	
	Fructosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 0.003	
		1	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 0.003	
		3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.017 $\pm$ 0.002	
		5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 0.002	
	Producto	10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.001	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 0.001	
		0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.003 $\pm$ 0.007	
		1	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.018 $\pm$ 0.005	
	Sacarosa	3	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.034 $\pm$ 3.54E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.035 $\pm$ 0.003	
		5	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.043 $\pm$ 0.004	
		10	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 0.002	
		20	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.050 $\pm$ 0.002	
	6	Glucosa	0	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.047 $\pm$ 0.002
			1	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.033 $\pm$ 0.002
			3	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.015 $\pm$ 2.24E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.016 $\pm$ 0.003
			5	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.009 $\pm$ 0.002
Fructosa		10	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.004 $\pm$ 0.002	
		20	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.003 $\pm$ 0.002	
		0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.001	
		1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.009 $\pm$ 0.001	
6	Glucosa	3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
		5	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 0.001	
		10	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.001	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 0.001	
	Fructosa	0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.001	
		1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.009 $\pm$ 0.001	
		3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
		5	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 0.001	
6	Fructosa	10	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.001	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.025 $\pm$ 0.001	

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
6	Producto	0	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.003 $\pm$ 0.002
		1	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.018 $\pm$ 0.002
		3	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.037 $\pm$ 3.89E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.036 $\pm$ 0.003
		5	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.043 $\pm$ 0.002
		10	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.049 $\pm$ 0.002
	Sacarosa	20	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.050 $\pm$ 0.002
		0	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.047 $\pm$ 0.005
		1	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.033 $\pm$ 0.007
		3	0.018 $\pm$ 2.71E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.017 $\pm$ 0.002
		5	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.012 $\pm$ 0.004
7	Glucosa	10	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 0.004
		20	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.004 $\pm$ 0.004
		0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 0.003
		3	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 0.001
	Fructosa	5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		10	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 0.003
9	Producto	3	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 0.001
		5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		10	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		0	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.003 $\pm$ 0.005
	Sacarosa	1	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.018 $\pm$ 0.007
		3	0.034 $\pm$ 3.54E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.034 $\pm$ 0.002
		5	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.040 $\pm$ 0.004
		10	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 0.004
		20	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.049 $\pm$ 0.004

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
9	Sacarosa	5	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.019 $\pm$ 2.87E-07	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		10	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.013 $\pm$ 0.000
		20	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.012 $\pm$ 1.77E-07	0.012 $\pm$ 0.005
	Glucosa	0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.007 $\pm$ 1.10E-07	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.006 $\pm$ 0.004
		3	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.007 $\pm$ 1.10E-07	0.010 $\pm$ 0.009
		5	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.013 $\pm$ 0.013
		10	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.017 $\pm$ 0.012
		20	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.018 $\pm$ 0.011
		0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.003
	Fructosa	1	0.007 $\pm$ 1.10E-07	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.007 $\pm$ 6.84E-08	0.007 $\pm$ 0.003
		3	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.012 $\pm$ 1.10E-07	0.012 $\pm$ 0.004
		5	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.016 $\pm$ 1.26E-07	0.016 $\pm$ 0.001
		10	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.020 $\pm$ 1.84E-07	0.020 $\pm$ 0.000
		20	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 2.00E-07	0.020 $\pm$ 0.003
	Producto	0	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.005 $\pm$ 3.84E-08	0.003 $\pm$ 0.005
		1	0.015 $\pm$ 1.55E-07	0.011 $\pm$ 1.20E-07	0.014 $\pm$ 9.67E-08	0.013 $\pm$ 0.005
		3	0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.024 $\pm$ 1.55E-07	0.024 $\pm$ 0.008
		5	0.031 $\pm$ 3.30E-07	0.032 $\pm$ 3.42E-07	0.031 $\pm$ 1.78E-07	0.032 $\pm$ 0.002
		10	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.039 $\pm$ 2.60E-07	0.039 $\pm$ 0.000
		20	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.040 $\pm$ 2.84E-07	0.040 $\pm$ 0.005

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con carbón activado. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 29. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con carbón activado

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.05	Sacarosa	0	0.050 ± 7.42E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.045 ± 6.79E-07	0.047 ± 0.007
		1	0.034 ± 5.06E-07	0.033 ± 4.91E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.033 ± 0.005
		3	0.017 ± 2.55E-07	0.018 ± 2.71E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.017 ± 0.003
		5	0.008 ± 1.14E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.009 ± 0.004
		10	0.003 ± 5.15E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.004 ± 0.002
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.003 ± 0.002
	Glucosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 0.003
		1	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.001
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.001
	Fructosa	0	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 2.71E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 0.003
		1	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.009 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.001
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.001
Producto	0	0.000 ± 3.34E-09	0.004 ± 3.84E-08	0.005 ± 5.00E-08	0.003 ± 0.007	
	1	0.017 ± 1.78E-07	0.018 ± 1.90E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.018 ± 0.005	
	3	0.035 ± 3.65E-07	0.034 ± 3.54E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.035 ± 0.003	
	5	0.045 ± 4.70E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.043 ± 0.004	
	10	0.049 ± 5.17E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.002	
	20	0.049 ± 5.17E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.050 ± 0.002	
0.10	Sacarosa	0	0.093 ± 1.39E-06	0.096 ± 1.42E-06	0.090 ± 1.33E-06	0.093 ± 0.009
		1	0.069 ± 1.03E-06	0.068 ± 1.01E-06	0.069 ± 1.03E-06	0.069 ± 0.002
		3	0.037 ± 5.52E-07	0.040 ± 5.88E-07	0.041 ± 6.05E-07	0.039 ± 0.005
		5	0.029 ± 4.28E-07	0.029 ± 4.28E-07	0.030 ± 4.46E-07	0.029 ± 0.002
		10	0.017 ± 2.51E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.020 ± 3.04E-07	0.020 ± 0.011
		20	0.018 ± 2.68E-07	0.020 ± 3.04E-07	0.018 ± 2.68E-07	0.019 ± 0.004
	Glucosa	0	0.004 ± 5.52E-08	0.003 ± 3.73E-08	0.006 ± 8.19E-08	0.004 ± 0.005
		1	0.016 ± 2.33E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 2.33E-07	0.016 ± 0.001

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.10	Glucosa	3	0.032 ± 4.74E-07	0.031 ± 4.56E-07	0.030 ± 4.47E-07	0.031 ± 0.003
		5	0.036 ± 5.36E-07	0.036 ± 5.36E-07	0.036 ± 5.27E-07	0.036 ± 0.001
		10	0.042 ± 6.25E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.040 ± 0.005
		20	0.042 ± 6.16E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.042 ± 6.16E-07	0.041 ± 0.002
	Fructosa	0	0.004 ± 5.52E-08	0.003 ± 3.73E-08	0.006 ± 8.19E-08	0.004 ± 0.005
		1	0.016 ± 2.33E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 2.33E-07	0.016 ± 0.001
		3	0.032 ± 4.74E-07	0.031 ± 4.56E-07	0.030 ± 4.47E-07	0.031 ± 0.003
		5	0.036 ± 5.36E-07	0.036 ± 5.36E-07	0.036 ± 5.27E-07	0.036 ± 0.001
	Producto	10	0.042 ± 6.25E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.040 ± 0.005
		20	0.042 ± 6.16E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.042 ± 6.16E-07	0.041 ± 0.002
		0	0.007 ± 7.80E-08	0.005 ± 5.28E-08	0.011 ± 1.16E-07	0.008 ± 0.009
		1	0.031 ± 3.30E-07	0.033 ± 3.43E-07	0.031 ± 3.30E-07	0.032 ± 0.002
Sacarosa	3	0.064 ± 6.70E-07	0.061 ± 6.45E-07	0.060 ± 6.32E-07	0.062 ± 0.005	
	5	0.072 ± 7.58E-07	0.072 ± 7.58E-07	0.071 ± 7.46E-07	0.072 ± 0.002	
	10	0.084 ± 8.84E-07	0.077 ± 8.09E-07	0.081 ± 8.47E-07	0.081 ± 0.011	
	20	0.083 ± 8.72E-07	0.081 ± 8.47E-07	0.083 ± 8.72E-07	0.082 ± 0.004	
0.15	Glucosa	0	0.138 ± 2.04E-06	0.140 ± 2.07E-06	0.142 ± 2.11E-06	0.140 ± 0.006
		1	0.112 ± 1.66E-06	0.104 ± 1.53E-06	0.116 ± 1.72E-06	0.111 ± 0.020
		3	0.069 ± 1.02E-06	0.071 ± 1.05E-06	0.073 ± 1.08E-06	0.071 ± 0.006
		5	0.056 ± 8.26E-07	0.054 ± 7.94E-07	0.052 ± 7.62E-07	0.054 ± 0.006
	Fructosa	10	0.047 ± 6.98E-07	0.045 ± 6.66E-07	0.049 ± 7.30E-07	0.047 ± 0.006
		20	0.045 ± 6.66E-07	0.041 ± 6.02E-07	0.045 ± 6.66E-07	0.044 ± 0.007
		0	0.006 ± 9.22E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.004 ± 5.86E-08	0.005 ± 0.003
		1	0.020 ± 2.94E-07	0.024 ± 3.62E-07	0.018 ± 2.61E-07	0.021 ± 0.010
	Glucosa	3	0.043 ± 6.31E-07	0.042 ± 6.14E-07	0.040 ± 5.97E-07	0.042 ± 0.003
		5	0.050 ± 7.32E-07	0.051 ± 7.49E-07	0.052 ± 7.66E-07	0.051 ± 0.003
		10	0.054 ± 7.99E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.054 ± 0.003
		20	0.055 ± 8.16E-07	0.058 ± 8.50E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.056 ± 0.004
Fructosa	0	0.006 ± 9.22E-08	0.005 ± 7.54E-08	0.004 ± 5.86E-08	0.005 ± 0.003	
	1	0.020 ± 2.94E-07	0.024 ± 3.62E-07	0.018 ± 2.61E-07	0.021 ± 0.010	
	3	0.043 ± 6.31E-07	0.042 ± 6.14E-07	0.040 ± 5.97E-07	0.042 ± 0.003	
	5	0.050 ± 7.32E-07	0.051 ± 7.49E-07	0.052 ± 7.66E-07	0.051 ± 0.003	
		10	0.054 ± 7.99E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.054 ± 0.003
		20	0.055 ± 8.16E-07	0.058 ± 8.50E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.056 ± 0.004

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)		
0.15	Producto	0	0.012 ± 1.30E-07	0.010 ± 1.07E-07	0.008 ± 8.28E-08	0.010 ± 0.007		
		1	0.040 ± 4.16E-07	0.049 ± 5.12E-07	0.035 ± 3.69E-07	0.041 ± 0.021		
		3	0.085 ± 8.93E-07	0.083 ± 8.69E-07	0.081 ± 8.45E-07	0.083 ± 0.007		
		5	0.099 ± 1.04E-06	0.101 ± 1.06E-06	0.104 ± 1.08E-06	0.101 ± 0.007		
		10	0.108 ± 1.13E-06	0.110 ± 1.15E-06	0.106 ± 1.11E-06	0.108 ± 0.007		
		20	0.110 ± 1.15E-06	0.115 ± 1.20E-06	0.110 ± 1.15E-06	0.112 ± 0.008		
		0	0.189 ± 2.79E-06	0.189 ± 2.79E-06	0.199 ± 2.93E-06	0.193 ± 0.017		
	Sacarosa	1	0.150 ± 2.21E-06	0.153 ± 2.25E-06	0.148 ± 2.18E-06	0.150 ± 0.007		
		3	0.087 ± 1.27E-06	0.084 ± 1.24E-06	0.089 ± 1.31E-06	0.087 ± 0.007		
		5	0.060 ± 8.76E-07	0.062 ± 9.12E-07	0.067 ± 9.84E-07	0.063 ± 0.011		
		10	0.047 ± 6.96E-07	0.052 ± 7.68E-07	0.047 ± 6.96E-07	0.049 ± 0.008		
		20	0.042 ± 6.23E-07	0.050 ± 7.32E-07	0.045 ± 6.60E-07	0.046 ± 0.011		
		Glucosa	0	0.006 ± 8.14E-08	0.006 ± 8.14E-08	0.000 ± 5.43E-09	0.004 ± 0.009	
			1	0.026 ± 3.85E-07	0.025 ± 3.66E-07	0.027 ± 4.04E-07	0.026 ± 0.004	
3	0.060 ± 8.79E-07		0.061 ± 8.98E-07	0.058 ± 8.60E-07	0.060 ± 0.004			
5	0.074 ± 1.09E-06		0.073 ± 1.07E-06	0.070 ± 1.03E-06	0.072 ± 0.006			
10	0.080 ± 1.18E-06		0.078 ± 1.14E-06	0.080 ± 1.18E-06	0.080 ± 0.004			
20	0.083 ± 1.22E-06		0.079 ± 1.16E-06	0.082 ± 1.20E-06	0.081 ± 0.006			
0.20	Fructosa		0	0.006 ± 8.14E-08	0.006 ± 8.14E-08	0.000 ± 5.43E-09	0.004 ± 0.009	
		1	0.026 ± 3.85E-07	0.025 ± 3.66E-07	0.027 ± 4.04E-07	0.026 ± 0.004		
		3	0.060 ± 8.79E-07	0.061 ± 8.98E-07	0.058 ± 8.60E-07	0.060 ± 0.004		
		5	0.074 ± 1.09E-06	0.073 ± 1.07E-06	0.070 ± 1.03E-06	0.072 ± 0.006		
		10	0.080 ± 1.18E-06	0.078 ± 1.14E-06	0.080 ± 1.18E-06	0.080 ± 0.004		
		20	0.083 ± 1.22E-06	0.079 ± 1.16E-06	0.082 ± 1.20E-06	0.081 ± 0.006		
		0	0.011 ± 1.15E-07	0.011 ± 1.15E-07	0.001 ± 7.67E-09	0.008 ± 0.018		
	Producto	1	0.052 ± 5.45E-07	0.050 ± 5.18E-07	0.055 ± 5.72E-07	0.052 ± 0.008		
		3	0.119 ± 1.24E-06	0.122 ± 1.27E-06	0.117 ± 1.22E-06	0.119 ± 0.008		
		5	0.148 ± 1.54E-06	0.145 ± 1.51E-06	0.140 ± 1.46E-06	0.144 ± 0.012		
		10	0.161 ± 1.67E-06	0.156 ± 1.62E-06	0.161 ± 1.67E-06	0.159 ± 0.009		
		20	0.166 ± 1.73E-06	0.158 ± 1.65E-06	0.163 ± 1.70E-06	0.162 ± 0.012		
		0.40	Sacarosa	0	0.383 ± 5.56E-06	0.189 ± 2.75E-06	0.199 ± 2.89E-06	0.257 ± 0.327
				1	0.373 ± 5.41E-06	0.153 ± 2.21E-06	0.148 ± 2.14E-06	0.224 ± 0.385
3	0.304 ± 4.41E-06			0.084 ± 1.22E-06	0.089 ± 1.29E-06	0.159 ± 0.377		

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.40	Sacarosa	5	0.266 ± 3.86E-06	0.062 ± 8.99E-07	0.067 ± 9.70E-07	0.132 ± 0.349
		10	0.218 ± 3.16E-06	0.052 ± 7.57E-07	0.047 ± 6.85E-07	0.106 ± 0.291
		20	0.197 ± 2.86E-06	0.050 ± 7.21E-07	0.045 ± 6.50E-07	0.097 ± 0.260
	Glucosa	0	0.006 ± 8.02E-08	0.006 ± 8.02E-08	0.000 ± 5.35E-09	0.004 ± 0.009
		1	0.026 ± 3.80E-07	0.025 ± 3.61E-07	0.027 ± 3.98E-07	0.026 ± 0.004
		3	0.060 ± 8.66E-07	0.061 ± 8.85E-07	0.058 ± 8.47E-07	0.060 ± 0.004
		5	0.074 ± 1.07E-06	0.073 ± 1.05E-06	0.070 ± 1.02E-06	0.072 ± 0.006
		10	0.080 ± 1.17E-06	0.078 ± 1.13E-06	0.080 ± 1.17E-06	0.080 ± 0.004
		20	0.083 ± 1.20E-06	0.079 ± 1.15E-06	0.082 ± 1.18E-06	0.081 ± 0.006
	Fructosa	0	0.006 ± 8.02E-08	0.006 ± 8.02E-08	0.000 ± 5.35E-09	0.004 ± 0.009
		1	0.026 ± 3.80E-07	0.025 ± 3.61E-07	0.027 ± 3.98E-07	0.026 ± 0.004
		3	0.060 ± 8.66E-07	0.061 ± 8.85E-07	0.058 ± 8.47E-07	0.060 ± 0.004
5		0.074 ± 1.07E-06	0.073 ± 1.05E-06	0.070 ± 1.02E-06	0.072 ± 0.006	
10		0.080 ± 1.17E-06	0.078 ± 1.13E-06	0.080 ± 1.17E-06	0.080 ± 0.004	
20		0.083 ± 1.20E-06	0.079 ± 1.15E-06	0.082 ± 1.18E-06	0.081 ± 0.006	
Producto	0	0.011 ± 1.13E-07	0.011 ± 1.13E-07	0.001 ± 7.56E-09	0.008 ± 0.018	
	1	0.052 ± 5.37E-07	0.050 ± 5.10E-07	0.055 ± 5.63E-07	0.052 ± 0.008	
	3	0.119 ± 1.22E-06	0.122 ± 1.25E-06	0.117 ± 1.20E-06	0.119 ± 0.008	
	5	0.148 ± 1.52E-06	0.145 ± 1.49E-06	0.140 ± 1.44E-06	0.144 ± 0.012	
	10	0.161 ± 1.65E-06	0.156 ± 1.59E-06	0.161 ± 1.65E-06	0.159 ± 0.009	
	20	0.166 ± 1.70E-06	0.158 ± 1.62E-06	0.163 ± 1.67E-06	0.162 ± 0.012	
0.60	Sacarosa	0	0.598 ± 8.59E-06	0.599 ± 8.60E-06	0.596 ± 8.56E-06	0.598 ± 0.005
		1	0.583 ± 8.37E-06	0.580 ± 8.33E-06	0.581 ± 8.34E-06	0.581 ± 0.005
		3	0.560 ± 8.04E-06	0.558 ± 8.01E-06	0.557 ± 8.00E-06	0.558 ± 0.005
		5	0.537 ± 7.70E-06	0.534 ± 7.67E-06	0.535 ± 7.68E-06	0.535 ± 0.003
		10	0.514 ± 7.37E-06	0.512 ± 7.35E-06	0.511 ± 7.34E-06	0.512 ± 0.003
		20	0.479 ± 6.88E-06	0.480 ± 6.89E-06	0.482 ± 6.91E-06	0.480 ± 0.003
	Glucosa	0	0.001 ± 1.32E-08	0.001 ± 7.40E-09	0.002 ± 3.04E-08	0.001 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.28E-07	0.011 ± 1.51E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.010 ± 0.003
		3	0.021 ± 3.01E-07	0.022 ± 3.18E-07	0.023 ± 3.24E-07	0.022 ± 0.003
		5	0.033 ± 4.79E-07	0.035 ± 4.96E-07	0.034 ± 4.91E-07	0.034 ± 0.002
		10	0.045 ± 6.52E-07	0.046 ± 6.63E-07	0.047 ± 6.69E-07	0.046 ± 0.002
		20	0.063 ± 9.10E-07	0.063 ± 9.05E-07	0.062 ± 8.93E-07	0.063 ± 0.002

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.60	Fructosa	0	0.001 $\pm$ 1.32E-08	0.001 $\pm$ 7.40E-09	0.002 $\pm$ 3.04E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.009 $\pm$ 1.28E-07	0.011 $\pm$ 1.51E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.010 $\pm$ 0.003
		3	0.021 $\pm$ 3.01E-07	0.022 $\pm$ 3.18E-07	0.023 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 0.003
		5	0.033 $\pm$ 4.79E-07	0.035 $\pm$ 4.96E-07	0.034 $\pm$ 4.91E-07	0.034 $\pm$ 0.002
		10	0.045 $\pm$ 6.52E-07	0.046 $\pm$ 6.63E-07	0.047 $\pm$ 6.69E-07	0.046 $\pm$ 0.002
		20	0.063 $\pm$ 9.10E-07	0.063 $\pm$ 9.05E-07	0.062 $\pm$ 8.93E-07	0.063 $\pm$ 0.002
	Producto	0	0.002 $\pm$ 1.86E-08	0.001 $\pm$ 1.05E-08	0.004 $\pm$ 4.30E-08	0.002 $\pm$ 0.005
		1	0.018 $\pm$ 1.81E-07	0.021 $\pm$ 2.14E-07	0.020 $\pm$ 2.06E-07	0.020 $\pm$ 0.005
		3	0.042 $\pm$ 4.26E-07	0.044 $\pm$ 4.50E-07	0.045 $\pm$ 4.58E-07	0.044 $\pm$ 0.005
		5	0.067 $\pm$ 6.78E-07	0.069 $\pm$ 7.02E-07	0.068 $\pm$ 6.94E-07	0.068 $\pm$ 0.004
		10	0.091 $\pm$ 9.22E-07	0.092 $\pm$ 9.38E-07	0.093 $\pm$ 9.46E-07	0.092 $\pm$ 0.004
		20	0.127 $\pm$ 1.29E-06	0.126 $\pm$ 1.28E-06	0.125 $\pm$ 1.26E-06	0.126 $\pm$ 0.004

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato, de la enzima inmovilizada con carbón activado. Esto se realizó con el índice de refracción y las curvas de calibración para una concentración inicial de sustrato de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 30. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
40	Sacarosa	0	0.047 ± 6.95E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.048 ± 0.005
		1	0.038 ± 5.69E-07	0.040 ± 6.01E-07	0.039 ± 5.85E-07	0.039 ± 0.003
		3	0.032 ± 4.75E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.030 ± 0.004
		5	0.021 ± 3.18E-07	0.023 ± 3.50E-07	0.021 ± 3.18E-07	0.022 ± 0.004
		10	0.012 ± 1.77E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.012 ± 0.005
		20	0.008 ± 1.14E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.009 ± 0.005
	Glucosa	0	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.006 ± 9.32E-08	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.002
		5	0.015 ± 2.25E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.015 ± 2.25E-07	0.015 ± 0.002
		10	0.020 ± 3.00E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.003
		20	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 0.003
	Fructosa	0	0.002 ± 2.71E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.006 ± 9.32E-08	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.006 ± 0.002
		3	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.002
		5	0.015 ± 2.25E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.015 ± 2.25E-07	0.015 ± 0.002
		10	0.020 ± 3.00E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.003
		20	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 0.003
	Producto	0	0.004 ± 3.84E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.002 ± 0.005
		1	0.012 ± 1.32E-07	0.010 ± 1.08E-07	0.011 ± 1.20E-07	0.011 ± 0.003
3		0.019 ± 2.02E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.021 ± 0.004	
5		0.030 ± 3.19E-07	0.028 ± 2.95E-07	0.030 ± 3.19E-07	0.029 ± 0.004	
10		0.040 ± 4.24E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.040 ± 0.005	
20		0.045 ± 4.70E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.043 ± 0.005	
50	Sacarosa	0	0.047 ± 6.95E-07	0.044 ± 6.63E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.046 ± 0.005
		1	0.033 ± 4.91E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.032 ± 4.75E-07	0.031 ± 0.005
		3	0.017 ± 2.55E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.015 ± 0.008
		5	0.007 ± 9.86E-08	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.007 ± 0.002
		10	0.003 ± 5.15E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.002 ± 0.003
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.000 ± 4.48E-09	0.002 ± 0.005
	Glucosa	0	0.002 ± 2.71E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 0.003

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
50	Glucosa	3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 0.004
		5	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.026 ± 3.90E-07	0.025 ± 0.003
		0	0.002 ± 2.71E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.003
	Fructosa	1	0.009 ± 1.34E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 0.004
		5	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.026 ± 3.90E-07	0.025 ± 0.003
	Producto	0	0.004 ± 3.84E-08	0.006 ± 6.17E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.004 ± 0.005
		1	0.018 ± 1.90E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.019 ± 2.02E-07	0.019 ± 0.005
		3	0.035 ± 3.65E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.037 ± 0.009
		5	0.046 ± 4.82E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.045 ± 0.002
		10	0.049 ± 5.17E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.050 ± 0.003
	Sacarosa	20	0.049 ± 5.17E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.052 ± 5.52E-07	0.051 ± 0.005
		0	0.045 ± 6.79E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.048 ± 0.006
		1	0.033 ± 4.91E-07	0.034 ± 5.06E-07	0.033 ± 4.91E-07	0.033 ± 0.002
		3	0.017 ± 2.55E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.015 ± 0.006
		5	0.009 ± 1.30E-07	0.007 ± 9.86E-08	0.007 ± 9.86E-08	0.007 ± 0.004
60	Glucosa	10	0.006 ± 8.29E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.005 ± 0.003
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.002 ± 0.003
		0	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.009 ± 0.001
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
	Fructosa	5	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.002
		0	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.008 ± 1.26E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.009 ± 0.001
	Fructosa	3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
		5	0.022 ± 3.24E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 0.002
		10	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.025 ± 0.002
		0	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
60	Producto	0	0.005 ± 5.00E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.003 ± 0.007
		1	0.018 ± 1.90E-07	0.017 ± 1.78E-07	0.018 ± 1.90E-07	0.018 ± 0.002
		3	0.035 ± 3.65E-07	0.037 ± 3.89E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.037 ± 0.007
		5	0.043 ± 4.59E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.046 ± 4.82E-07	0.045 ± 0.004
		10	0.047 ± 4.94E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.048 ± 0.003
	Sacarosa	20	0.049 ± 5.17E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.050 ± 0.003
		0	0.047 ± 6.95E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.049 ± 0.005
		1	0.041 ± 6.16E-07	0.035 ± 5.22E-07	0.040 ± 6.01E-07	0.039 ± 0.010
		3	0.023 ± 3.50E-07	0.024 ± 3.65E-07	0.027 ± 3.97E-07	0.025 ± 0.005
		5	0.015 ± 2.24E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.018 ± 2.71E-07	0.017 ± 0.005
70	Glucosa	10	0.013 ± 1.93E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.012 ± 0.003
		20	0.012 ± 1.77E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.009 ± 0.007
		0	0.002 ± 2.71E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.005 ± 6.84E-08	0.008 ± 1.18E-07	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 0.005
		3	0.014 ± 2.09E-07	0.013 ± 2.00E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.013 ± 0.003
	Fructosa	5	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.017 ± 0.003
		10	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.002
		20	0.020 ± 3.00E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.021 ± 0.003
		0	0.002 ± 2.71E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.005 ± 6.84E-08	0.008 ± 1.18E-07	0.005 ± 7.67E-08	0.006 ± 0.005
Producto	3	0.014 ± 2.09E-07	0.013 ± 2.00E-07	0.012 ± 1.84E-07	0.013 ± 0.003	
	5	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.017 ± 2.50E-07	0.017 ± 0.003	
	10	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 0.002	
	20	0.020 ± 3.00E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.021 ± 0.003	
	0	0.004 ± 3.84E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.000 ± 3.34E-09	0.001 ± 0.006	
Producto	1	0.009 ± 9.67E-08	0.016 ± 1.67E-07	0.010 ± 1.08E-07	0.012 ± 0.011	
	3	0.028 ± 2.95E-07	0.027 ± 2.84E-07	0.025 ± 2.60E-07	0.027 ± 0.005	
	5	0.037 ± 3.89E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.034 ± 3.54E-07	0.035 ± 0.005	
	10	0.039 ± 4.12E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.040 ± 0.003	
	20	0.040 ± 4.24E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.043 ± 0.007	

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 31. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
3	Sacarosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.049 $\pm$ 7.26E-07	0.049 $\pm$ 0.003
		1	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.040 $\pm$ 6.01E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.044 $\pm$ 0.010
		3	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.038 $\pm$ 5.69E-07	0.035 $\pm$ 0.008
		5	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.030 $\pm$ 4.44E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.031 $\pm$ 0.004
		10	0.026 $\pm$ 3.81E-07	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.026 $\pm$ 3.81E-07	0.025 $\pm$ 0.002
		20	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.023 $\pm$ 3.50E-07	0.022 $\pm$ 3.34E-07	0.023 $\pm$ 0.003
	Glucosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.003 $\pm$ 0.005
		3	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.008 $\pm$ 0.004
		5	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 0.002
		10	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 0.001
		20	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.014 $\pm$ 0.002
	Fructosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.001 $\pm$ 0.002
		1	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.003 $\pm$ 0.005
		3	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.008 $\pm$ 0.004
5		0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 0.002	
10		0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.013 $\pm$ 0.001	
20		0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.014 $\pm$ 0.002	
Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.001 $\pm$ 1.50E-08	0.001 $\pm$ 0.003	
	1	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.010 $\pm$ 1.08E-07	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.006 $\pm$ 0.011	
	3	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.012 $\pm$ 1.32E-07	0.015 $\pm$ 0.008	
	5	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.020 $\pm$ 0.004	
	10	0.026 $\pm$ 2.72E-07	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.026 $\pm$ 2.72E-07	0.026 $\pm$ 0.002	
	20	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.028 $\pm$ 2.95E-07	0.029 $\pm$ 3.07E-07	0.028 $\pm$ 0.003	
5	Sacarosa	0	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.044 $\pm$ 6.63E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.046 $\pm$ 0.005
		1	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.030 $\pm$ 4.44E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.031 $\pm$ 0.005
		3	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.012 $\pm$ 1.77E-07	0.015 $\pm$ 0.008
		5	0.007 $\pm$ 9.86E-08	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.007 $\pm$ 0.002
		10	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 0.003
		20	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.000 $\pm$ 4.48E-09	0.002 $\pm$ 0.005
Glucosa	0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 0.003	
	1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 0.003	

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
5	Glucosa	3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.020 $\pm$ 3.00E-07	0.018 $\pm$ 0.004	
		5	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.001	
		10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.002	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.026 $\pm$ 3.90E-07	0.025 $\pm$ 0.003	
	Fructosa	0	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 0.003	
		1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 0.003	
		3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.020 $\pm$ 3.00E-07	0.018 $\pm$ 0.004	
		5	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.001	
	Producto	10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.002	
		20	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.026 $\pm$ 3.90E-07	0.025 $\pm$ 0.003	
		0	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.006 $\pm$ 6.17E-08	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.004 $\pm$ 0.005	
		1	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.019 $\pm$ 0.005	
	Sacarosa	3	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.040 $\pm$ 4.24E-07	0.037 $\pm$ 0.009	
		5	0.046 $\pm$ 4.82E-07	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.045 $\pm$ 0.002	
		10	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.050 $\pm$ 0.003	
		20	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.052 $\pm$ 5.52E-07	0.051 $\pm$ 0.005	
	6	Glucosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.043 $\pm$ 6.48E-07	0.044 $\pm$ 6.63E-07	0.046 $\pm$ 0.010
			1	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.032 $\pm$ 0.002
			3	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.018 $\pm$ 2.71E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.016 $\pm$ 0.006
			5	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.009 $\pm$ 0.002
Fructosa		10	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.003 $\pm$ 0.003	
		20	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.002 $\pm$ 0.003	
		0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.002 $\pm$ 0.005	
		1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 0.001	
Glucosa		3	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.003	
		5	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 0.001	
		10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002	
		20	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 0.002	
Fructosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.002 $\pm$ 0.005		
	1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.009 $\pm$ 0.001		
	3	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.003		
	5	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 0.001		
Fructosa	10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.024 $\pm$ 0.002		
	20	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.025 $\pm$ 0.002		

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
6	Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.007 $\pm$ 7.34E-08	0.006 $\pm$ 6.17E-08	0.004 $\pm$ 0.011
		1	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.019 $\pm$ 0.002
		3	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.034 $\pm$ 3.54E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.036 $\pm$ 0.007
		5	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.043 $\pm$ 0.002
		10	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 0.003
		20	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.050 $\pm$ 0.003
	Sacarosa	0	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.045 $\pm$ 0.008
		1	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.032 $\pm$ 0.003
		3	0.015 $\pm$ 2.24E-07	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.015 $\pm$ 0.003
		5	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.007 $\pm$ 9.86E-08	0.008 $\pm$ 0.003
10		0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.003 $\pm$ 0.003	
Glucosa	20	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.002 $\pm$ 0.002	
	0	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.003 $\pm$ 0.004	
	1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 0.002	
	3	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
	5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 0.002	
7	Fructosa	10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.001
		0	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.003 $\pm$ 0.004
		1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.010 $\pm$ 0.002
		3	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.018 $\pm$ 0.002
	Producto	5	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.022 $\pm$ 0.002
		10	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.002
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.025 $\pm$ 0.001
		0	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.005 $\pm$ 0.008
		1	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.019 $\pm$ 0.003
9	Sacarosa	3	0.037 $\pm$ 3.89E-07	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.037 $\pm$ 0.003
		5	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.046 $\pm$ 4.82E-07	0.045 $\pm$ 0.003
		10	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.049 $\pm$ 0.003
		20	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.051 $\pm$ 0.002
		0	0.041 $\pm$ 6.16E-07	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.046 $\pm$ 0.013
		1	0.039 $\pm$ 5.85E-07	0.037 $\pm$ 5.54E-07	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.037 $\pm$ 0.006
		3	0.028 $\pm$ 4.12E-07	0.023 $\pm$ 3.50E-07	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.026 $\pm$ 0.007

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
9	Sacarosa	5	0.019 $\pm$ 2.87E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.018 $\pm$ 0.004
		10	0.012 $\pm$ 1.77E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.012 $\pm$ 0.003
		20	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.010 $\pm$ 0.003
	Glucosa	0	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 0.007
		1	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.005 $\pm$ 0.008
		3	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.011 $\pm$ 0.012
		5	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.014 $\pm$ 0.013
		10	0.020 $\pm$ 3.00E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.013 $\pm$ 1.92E-07	0.017 $\pm$ 0.012
		20	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.019 $\pm$ 0.011
		0	0.005 $\pm$ 6.84E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.06E-08	0.002 $\pm$ 0.007
	Fructosa	1	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.008 $\pm$ 2.71E-08	0.007 $\pm$ 0.003
		3	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.014 $\pm$ 2.09E-07	0.012 $\pm$ 9.32E-08	0.013 $\pm$ 0.003
		5	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.017 $\pm$ 1.43E-07	0.017 $\pm$ 0.002
		10	0.020 $\pm$ 3.00E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.021 $\pm$ 1.92E-07	0.020 $\pm$ 0.002
		20	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.022 $\pm$ 2.17E-07	0.021 $\pm$ 0.002
	Producto	0	0.009 $\pm$ 9.67E-08	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.003 $\pm$ 1.50E-08	0.004 $\pm$ 0.014
		1	0.011 $\pm$ 1.20E-07	0.014 $\pm$ 1.43E-07	0.016 $\pm$ 3.84E-08	0.014 $\pm$ 0.007
		3	0.024 $\pm$ 2.49E-07	0.028 $\pm$ 2.95E-07	0.025 $\pm$ 1.32E-07	0.025 $\pm$ 0.007
		5	0.032 $\pm$ 3.42E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.035 $\pm$ 2.02E-07	0.034 $\pm$ 0.004
		10	0.040 $\pm$ 4.24E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.041 $\pm$ 2.72E-07	0.040 $\pm$ 0.003
		20	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.043 $\pm$ 3.07E-07	0.042 $\pm$ 0.003

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 32. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.05	Sacarosa	0	0.047 ± 6.95E-07	0.044 ± 6.63E-07	0.048 ± 7.10E-07	0.046 ± 0.005
		1	0.033 ± 4.91E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.032 ± 4.75E-07	0.031 ± 0.005
		3	0.017 ± 2.55E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.015 ± 0.008
		5	0.007 ± 9.86E-08	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.007 ± 0.002
		10	0.003 ± 5.15E-08	0.002 ± 3.58E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.002 ± 0.003
		20	0.003 ± 5.15E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.000 ± 4.48E-09	0.002 ± 0.005
	Glucosa	0	0.002 ± 2.71E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 0.004
		5	0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.026 ± 3.90E-07	0.025 ± 0.003
	Fructosa	0	0.002 ± 2.71E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.009 ± 1.34E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.010 ± 0.003
		3	0.017 ± 2.58E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 0.004
5		0.023 ± 3.41E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001	
10		0.024 ± 3.66E-07	0.025 ± 3.74E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.025 ± 0.002	
20		0.024 ± 3.66E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.026 ± 3.90E-07	0.025 ± 0.003	
Producto	0	0.004 ± 3.84E-08	0.006 ± 6.17E-08	0.003 ± 2.67E-08	0.004 ± 0.005	
	1	0.018 ± 1.90E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.019 ± 2.02E-07	0.019 ± 0.005	
	3	0.035 ± 3.65E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.037 ± 0.009	
	5	0.046 ± 4.82E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.045 ± 0.002	
	10	0.049 ± 5.17E-07	0.050 ± 5.29E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.050 ± 0.003	
	20	0.049 ± 5.17E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.052 ± 5.52E-07	0.051 ± 0.005	
0.10	Sacarosa	0	0.092 ± 1.37E-06	0.093 ± 1.39E-06	0.089 ± 1.32E-06	0.091 ± 0.007
		1	0.065 ± 9.60E-07	0.063 ± 9.42E-07	0.066 ± 9.76E-07	0.065 ± 0.003
		3	0.038 ± 5.70E-07	0.036 ± 5.34E-07	0.038 ± 5.70E-07	0.038 ± 0.004
		5	0.025 ± 3.75E-07	0.026 ± 3.93E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.004
		10	0.018 ± 2.68E-07	0.016 ± 2.33E-07	0.022 ± 3.22E-07	0.018 ± 0.009
		20	0.016 ± 2.33E-07	0.013 ± 1.97E-07	0.020 ± 3.04E-07	0.016 ± 0.011
Glucosa	0	0.004 ± 6.41E-08	0.004 ± 5.52E-08	0.006 ± 9.08E-08	0.005 ± 0.004	
	1	0.018 ± 2.69E-07	0.019 ± 2.78E-07	0.018 ± 2.61E-07	0.018 ± 0.002	

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.10	Glucosa	3	0.031 ± 4.65E-07	0.033 ± 4.83E-07	0.031 ± 4.65E-07	0.032 ± 0.002
		5	0.038 ± 5.63E-07	0.037 ± 5.54E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.038 ± 0.002
		10	0.042 ± 6.16E-07	0.043 ± 6.34E-07	0.040 ± 5.90E-07	0.041 ± 0.005
		20	0.043 ± 6.34E-07	0.044 ± 6.52E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.042 ± 0.005
	Fructosa	0	0.004 ± 6.41E-08	0.004 ± 5.52E-08	0.006 ± 9.08E-08	0.005 ± 0.004
		1	0.018 ± 2.69E-07	0.019 ± 2.78E-07	0.018 ± 2.61E-07	0.018 ± 0.002
		3	0.031 ± 4.65E-07	0.033 ± 4.83E-07	0.031 ± 4.65E-07	0.032 ± 0.002
		5	0.038 ± 5.63E-07	0.037 ± 5.54E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.038 ± 0.002
	Producto	10	0.042 ± 6.16E-07	0.043 ± 6.34E-07	0.040 ± 5.90E-07	0.041 ± 0.005
		20	0.043 ± 6.34E-07	0.044 ± 6.52E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.042 ± 0.005
		0	0.009 ± 9.06E-08	0.007 ± 7.80E-08	0.012 ± 1.28E-07	0.009 ± 0.007
		1	0.036 ± 3.80E-07	0.037 ± 3.93E-07	0.035 ± 3.69E-07	0.036 ± 0.003
Sacarosa	3	0.063 ± 6.58E-07	0.065 ± 6.83E-07	0.063 ± 6.58E-07	0.063 ± 0.004	
	5	0.076 ± 7.96E-07	0.075 ± 7.84E-07	0.077 ± 8.09E-07	0.076 ± 0.004	
	10	0.083 ± 8.72E-07	0.085 ± 8.97E-07	0.079 ± 8.34E-07	0.083 ± 0.009	
	20	0.085 ± 8.97E-07	0.088 ± 9.22E-07	0.081 ± 8.47E-07	0.085 ± 0.011	
0.15	Glucosa	0	0.129 ± 1.91E-06	0.136 ± 2.01E-06	0.134 ± 1.98E-06	0.133 ± 0.010
		1	0.097 ± 1.43E-06	0.097 ± 1.43E-06	0.099 ± 1.47E-06	0.098 ± 0.004
		3	0.062 ± 9.22E-07	0.060 ± 8.90E-07	0.065 ± 9.54E-07	0.062 ± 0.006
		5	0.047 ± 6.98E-07	0.045 ± 6.66E-07	0.049 ± 7.30E-07	0.047 ± 0.006
	Fructosa	10	0.043 ± 6.34E-07	0.043 ± 6.34E-07	0.049 ± 7.30E-07	0.045 ± 0.011
		20	0.034 ± 5.06E-07	0.043 ± 6.34E-07	0.034 ± 5.06E-07	0.037 ± 0.015
		0	0.011 ± 1.60E-07	0.007 ± 1.09E-07	0.009 ± 1.26E-07	0.009 ± 0.005
		1	0.028 ± 4.12E-07	0.028 ± 4.12E-07	0.027 ± 3.95E-07	0.028 ± 0.002
	Glucosa	3	0.046 ± 6.82E-07	0.047 ± 6.98E-07	0.045 ± 6.65E-07	0.046 ± 0.003
		5	0.054 ± 7.99E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.054 ± 0.003
		10	0.056 ± 8.33E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.055 ± 0.006
		20	0.061 ± 9.00E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.061 ± 9.00E-07	0.059 ± 0.008
Fructosa	0	0.011 ± 1.60E-07	0.007 ± 1.09E-07	0.009 ± 1.26E-07	0.009 ± 0.005	
	1	0.028 ± 4.12E-07	0.028 ± 4.12E-07	0.027 ± 3.95E-07	0.028 ± 0.002	
	3	0.046 ± 6.82E-07	0.047 ± 6.98E-07	0.045 ± 6.65E-07	0.046 ± 0.003	
	5	0.054 ± 7.99E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.054 ± 0.003	
Fructosa	10	0.056 ± 8.33E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.055 ± 0.006	
	20	0.061 ± 9.00E-07	0.056 ± 8.33E-07	0.061 ± 9.00E-07	0.059 ± 0.008	

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.15	Producto	0	0.022 ± 2.26E-07	0.015 ± 1.54E-07	0.017 ± 1.78E-07	0.018 ± 0.010
		1	0.056 ± 5.83E-07	0.056 ± 5.83E-07	0.054 ± 5.59E-07	0.055 ± 0.004
		3	0.092 ± 9.64E-07	0.095 ± 9.88E-07	0.090 ± 9.40E-07	0.092 ± 0.007
		5	0.108 ± 1.13E-06	0.110 ± 1.15E-06	0.106 ± 1.11E-06	0.108 ± 0.007
		10	0.113 ± 1.18E-06	0.113 ± 1.18E-06	0.106 ± 1.11E-06	0.110 ± 0.012
		20	0.122 ± 1.27E-06	0.113 ± 1.18E-06	0.122 ± 1.27E-06	0.119 ± 0.016
	Sacarosa	0	0.197 ± 2.90E-06	0.192 ± 2.82E-06	0.202 ± 2.97E-06	0.197 ± 0.015
		1	0.145 ± 2.14E-06	0.143 ± 2.10E-06	0.143 ± 2.10E-06	0.144 ± 0.004
		3	0.082 ± 1.20E-06	0.087 ± 1.27E-06	0.087 ± 1.27E-06	0.085 ± 0.008
		5	0.055 ± 8.04E-07	0.060 ± 8.76E-07	0.057 ± 8.40E-07	0.057 ± 0.007
		10	0.042 ± 6.23E-07	0.040 ± 5.87E-07	0.040 ± 5.87E-07	0.041 ± 0.004
		20	0.040 ± 5.87E-07	0.035 ± 5.15E-07	0.037 ± 5.51E-07	0.037 ± 0.007
0.20	Glucosa	0	0.002 ± 2.44E-08	0.004 ± 6.24E-08	#### ± #####	0.002 ± 0.008
		1	0.029 ± 4.23E-07	0.030 ± 4.42E-07	0.030 ± 4.42E-07	0.030 ± 0.002
		3	0.062 ± 9.17E-07	0.060 ± 8.79E-07	0.060 ± 8.79E-07	0.061 ± 0.004
		5	0.077 ± 1.13E-06	0.074 ± 1.09E-06	0.075 ± 1.11E-06	0.075 ± 0.004
		10	0.083 ± 1.22E-06	0.084 ± 1.24E-06	0.084 ± 1.24E-06	0.084 ± 0.002
		20	0.084 ± 1.24E-06	0.087 ± 1.28E-06	0.086 ± 1.26E-06	0.086 ± 0.004
	Fructosa	0	0.002 ± 2.44E-08	0.004 ± 6.24E-08	#### ± #####	0.002 ± 0.008
		1	0.029 ± 4.23E-07	0.030 ± 4.42E-07	0.030 ± 4.42E-07	0.030 ± 0.002
		3	0.062 ± 9.17E-07	0.060 ± 8.79E-07	0.060 ± 8.79E-07	0.061 ± 0.004
		5	0.077 ± 1.13E-06	0.074 ± 1.09E-06	0.075 ± 1.11E-06	0.075 ± 0.004
		10	0.083 ± 1.22E-06	0.084 ± 1.24E-06	0.084 ± 1.24E-06	0.084 ± 0.002
		20	0.084 ± 1.24E-06	0.087 ± 1.28E-06	0.086 ± 1.26E-06	0.086 ± 0.004
0.40	Producto	0	0.003 ± 3.45E-08	0.008 ± 8.82E-08	#### ± 1.92E-08	0.003 ± 0.015
		1	0.058 ± 5.98E-07	0.060 ± 6.25E-07	0.060 ± 6.25E-07	0.059 ± 0.004
		3	0.125 ± 1.30E-06	0.119 ± 1.24E-06	0.119 ± 1.24E-06	0.121 ± 0.009
		5	0.153 ± 1.59E-06	0.148 ± 1.54E-06	0.150 ± 1.56E-06	0.150 ± 0.008
		10	0.166 ± 1.73E-06	0.168 ± 1.75E-06	0.168 ± 1.75E-06	0.168 ± 0.004
		20	0.168 ± 1.75E-06	0.174 ± 1.81E-06	0.171 ± 1.78E-06	0.171 ± 0.008
	Sacarosa	0	0.390 ± 5.66E-06	0.192 ± 2.78E-06	0.202 ± 2.93E-06	0.261 ± 0.335
		1	0.321 ± 4.66E-06	0.143 ± 2.07E-06	0.143 ± 2.07E-06	0.202 ± 0.309
		3	0.263 ± 3.81E-06	0.087 ± 1.25E-06	0.087 ± 1.25E-06	0.145 ± 0.305

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.40	Sacarosa	5	0.225 ± 3.26E-06	0.060 ± 8.63E-07	0.057 ± 8.28E-07	0.114 ± 0.288
		10	0.166 ± 2.41E-06	0.040 ± 5.79E-07	0.040 ± 5.79E-07	0.082 ± 0.219
		20	0.152 ± 2.21E-06	0.035 ± 5.08E-07	0.037 ± 5.43E-07	0.075 ± 0.201
	Glucosa	0	0.002 ± 2.41E-08	0.004 ± 6.15E-08	##### ± #####	0.002 ± 0.008
		1	0.029 ± 4.17E-07	0.030 ± 4.36E-07	0.030 ± 4.36E-07	0.030 ± 0.002
		3	0.062 ± 9.03E-07	0.060 ± 8.66E-07	0.060 ± 8.66E-07	0.061 ± 0.004
		5	0.077 ± 1.11E-06	0.074 ± 1.07E-06	0.075 ± 1.09E-06	0.075 ± 0.004
		10	0.083 ± 1.20E-06	0.084 ± 1.22E-06	0.084 ± 1.22E-06	0.084 ± 0.002
		20	0.084 ± 1.22E-06	0.087 ± 1.26E-06	0.086 ± 1.24E-06	0.086 ± 0.004
		0	0.002 ± 2.41E-08	0.004 ± 6.15E-08	##### ± #####	0.002 ± 0.008
		1	0.029 ± 4.17E-07	0.030 ± 4.36E-07	0.030 ± 4.36E-07	0.030 ± 0.002
	Fructosa	3	0.062 ± 9.03E-07	0.060 ± 8.66E-07	0.060 ± 8.66E-07	0.061 ± 0.004
		5	0.077 ± 1.11E-06	0.074 ± 1.07E-06	0.075 ± 1.09E-06	0.075 ± 0.004
		10	0.083 ± 1.20E-06	0.084 ± 1.22E-06	0.084 ± 1.22E-06	0.084 ± 0.002
		20	0.084 ± 1.22E-06	0.087 ± 1.26E-06	0.086 ± 1.24E-06	0.086 ± 0.004
		0	0.003 ± 3.40E-08	0.008 ± 8.70E-08	##### ± 1.89E-08	0.003 ± 0.015
1		0.058 ± 5.90E-07	0.060 ± 6.16E-07	0.060 ± 6.16E-07	0.059 ± 0.004	
Producto		3	0.125 ± 1.28E-06	0.119 ± 1.22E-06	0.119 ± 1.22E-06	0.121 ± 0.009
		5	0.153 ± 1.57E-06	0.148 ± 1.52E-06	0.150 ± 1.54E-06	0.150 ± 0.008
	10	0.166 ± 1.70E-06	0.168 ± 1.73E-06	0.168 ± 1.73E-06	0.168 ± 0.004	
	20	0.168 ± 1.73E-06	0.174 ± 1.78E-06	0.171 ± 1.75E-06	0.171 ± 0.008	
0.60	Sacarosa	0	0.597 ± 8.57E-06	0.595 ± 8.55E-06	0.595 ± 8.55E-06	0.596 ± 0.003
		1	0.578 ± 8.30E-06	0.575 ± 8.26E-06	0.576 ± 8.27E-06	0.577 ± 0.005
		3	0.545 ± 7.82E-06	0.543 ± 7.80E-06	0.546 ± 7.83E-06	0.545 ± 0.003
		5	0.517 ± 7.41E-06	0.513 ± 7.36E-06	0.535 ± 7.68E-06	0.522 ± 0.035
		10	0.482 ± 6.91E-06	0.480 ± 6.89E-06	0.481 ± 6.90E-06	0.481 ± 0.002
	Glucosa	20	0.454 ± 6.50E-06	0.451 ± 6.47E-06	0.452 ± 6.48E-06	0.452 ± 0.003
		0	0.002 ± 2.47E-08	0.003 ± 3.62E-08	0.003 ± 3.62E-08	0.002 ± 0.001
		1	0.011 ± 1.63E-07	0.013 ± 1.86E-07	0.013 ± 1.80E-07	0.012 ± 0.003
		3	0.029 ± 4.16E-07	0.030 ± 4.27E-07	0.029 ± 4.10E-07	0.029 ± 0.002
		5	0.044 ± 6.29E-07	0.046 ± 6.57E-07	0.034 ± 4.91E-07	0.041 ± 0.019
10	0.062 ± 8.93E-07	0.063 ± 9.05E-07	0.063 ± 8.99E-07	0.063 ± 0.001		
20	0.077 ± 1.11E-06	0.078 ± 1.12E-06	0.078 ± 1.12E-06	0.078 ± 0.002		

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.60	Fructosa	0	0.002 ± 2.47E-08	0.003 ± 3.62E-08	0.003 ± 3.62E-08	0.002 ± 0.001
		1	0.011 ± 1.63E-07	0.013 ± 1.86E-07	0.013 ± 1.80E-07	0.012 ± 0.003
		3	0.029 ± 4.16E-07	0.030 ± 4.27E-07	0.029 ± 4.10E-07	0.029 ± 0.002
		5	0.044 ± 6.29E-07	0.046 ± 6.57E-07	0.034 ± 4.91E-07	0.041 ± 0.019
		10	0.062 ± 8.93E-07	0.063 ± 9.05E-07	0.063 ± 8.99E-07	0.063 ± 0.001
	Producto	20	0.077 ± 1.11E-06	0.078 ± 1.12E-06	0.078 ± 1.12E-06	0.078 ± 0.002
		0	0.003 ± 3.49E-08	0.005 ± 5.12E-08	0.005 ± 5.12E-08	0.005 ± 0.003
		1	0.023 ± 2.30E-07	0.026 ± 2.63E-07	0.025 ± 2.55E-07	0.025 ± 0.005
		3	0.058 ± 5.88E-07	0.060 ± 6.05E-07	0.057 ± 5.80E-07	0.058 ± 0.004
		5	0.088 ± 8.89E-07	0.092 ± 9.30E-07	0.068 ± 6.94E-07	0.083 ± 0.037
		10	0.125 ± 1.26E-06	0.126 ± 1.28E-06	0.125 ± 1.27E-06	0.125 ± 0.002
		20	0.154 ± 1.56E-06	0.157 ± 1.59E-06	0.156 ± 1.58E-06	0.156 ± 0.004

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato, de la enzima inmovilizada con PHA funcionalizado. Esto se realizó con el índice de refracción y las curvas de calibración para una concentración inicial de sustrato de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40 y 0.60 ± 0.0005 g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 33. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
40	Sacarosa	0	0.045 ± 6.79E-07	0.043 ± 6.48E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.046 ± 0.010
		1	0.041 ± 6.16E-07	0.039 ± 5.85E-07	0.042 ± 6.32E-07	0.041 ± 0.005
		3	0.033 ± 4.91E-07	0.032 ± 4.75E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.031 ± 0.005
		5	0.024 ± 3.65E-07	0.026 ± 3.81E-07	0.029 ± 4.28E-07	0.026 ± 0.007
		10	0.017 ± 2.55E-07	0.014 ± 2.08E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.015 ± 0.005
		20	0.010 ± 1.46E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.009 ± 0.005
	Glucosa	0	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 5.19E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 0.005
		1	0.005 ± 6.84E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.004 ± 6.02E-08	0.005 ± 0.003
		3	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.003
		5	0.013 ± 2.00E-07	0.013 ± 1.92E-07	0.011 ± 1.67E-07	0.013 ± 0.003
		10	0.017 ± 2.58E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.003
		20	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 0.003
	Fructosa	0	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 5.19E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.002 ± 0.005
		1	0.005 ± 6.84E-08	0.006 ± 8.49E-08	0.004 ± 6.02E-08	0.005 ± 0.003
		3	0.009 ± 1.34E-07	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 0.003
		5	0.013 ± 2.00E-07	0.013 ± 1.92E-07	0.011 ± 1.67E-07	0.013 ± 0.003
		10	0.017 ± 2.58E-07	0.019 ± 2.83E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.003
		20	0.021 ± 3.16E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.021 ± 0.003
Producto	0	0.005 ± 5.00E-08	0.007 ± 7.34E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.004 ± 0.010	
	1	0.009 ± 9.67E-08	0.011 ± 1.20E-07	0.008 ± 8.51E-08	0.010 ± 0.005	
	3	0.018 ± 1.90E-07	0.019 ± 2.02E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.019 ± 0.005	
	5	0.027 ± 2.84E-07	0.026 ± 2.72E-07	0.022 ± 2.37E-07	0.025 ± 0.007	
	10	0.035 ± 3.65E-07	0.038 ± 4.00E-07	0.037 ± 3.89E-07	0.036 ± 0.005	
	20	0.042 ± 4.47E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.043 ± 0.005	
50	Sacarosa	0	0.048 ± 7.10E-07	0.045 ± 6.79E-07	0.044 ± 6.63E-07	0.046 ± 0.005
		1	0.032 ± 4.75E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.031 ± 0.003
		3	0.015 ± 2.24E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.015 ± 0.006
		5	0.009 ± 1.30E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 0.002
		10	0.001 ± 2.02E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.004 ± 0.007
		20	0.001 ± 2.02E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.003 ± 0.005
Glucosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.002 ± 0.003	
	1	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002	

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
50	Glucosa	3	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
		5	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.003
		20	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003
	Fructosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
		5	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
	Producto	10	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.003
		20	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003
		0	0.003 ± 2.67E-08	0.005 ± 5.00E-08	0.006 ± 6.17E-08	0.004 ± 0.005
		1	0.019 ± 2.02E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.020 ± 0.003
	Sacarosa	3	0.037 ± 3.89E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.037 ± 0.007
		5	0.043 ± 4.59E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.044 ± 0.002
		10	0.051 ± 5.40E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.049 ± 0.007
		20	0.051 ± 5.40E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.005
60	Glucosa	0	0.045 ± 6.79E-07	0.047 ± 6.95E-07	0.050 ± 7.42E-07	0.047 ± 0.007
		1	0.034 ± 5.06E-07	0.035 ± 5.22E-07	0.036 ± 5.38E-07	0.035 ± 0.003
		3	0.021 ± 3.18E-07	0.019 ± 2.87E-07	0.020 ± 3.02E-07	0.020 ± 0.003
		5	0.013 ± 1.93E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.013 ± 0.005
	Fructosa	10	0.006 ± 8.29E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 0.004
		20	0.005 ± 6.72E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.001 ± 2.02E-08	0.003 ± 0.005
		0	0.002 ± 3.54E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.008 ± 1.26E-07	0.008 ± 1.18E-07	0.007 ± 1.10E-07	0.008 ± 0.002
	Glucosa	3	0.015 ± 2.25E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 0.002
		5	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.019 ± 0.003
		10	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 0.003
	Fructosa	0	0.002 ± 3.54E-08	0.002 ± 2.71E-08	0.000 ± 2.36E-09	0.001 ± 0.003
		1	0.008 ± 1.26E-07	0.008 ± 1.18E-07	0.007 ± 1.10E-07	0.008 ± 0.002
		3	0.015 ± 2.25E-07	0.016 ± 2.42E-07	0.016 ± 2.34E-07	0.016 ± 0.002
		5	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.019 ± 0.003
		10	0.023 ± 3.49E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 0.002
		20	0.024 ± 3.57E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 0.003

Temp. (°C ± 0.5 °C)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
60	Producto	0	0.005 ± 5.00E-08	0.004 ± 3.84E-08	0.000 ± 3.34E-09	0.003 ± 0.007
		1	0.017 ± 1.78E-07	0.016 ± 1.67E-07	0.015 ± 1.55E-07	0.016 ± 0.003
		3	0.030 ± 3.19E-07	0.032 ± 3.42E-07	0.031 ± 3.30E-07	0.031 ± 0.003
		5	0.039 ± 4.12E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.037 ± 3.89E-07	0.039 ± 0.005
		10	0.047 ± 4.94E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 0.004
		20	0.048 ± 5.05E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.051 ± 5.40E-07	0.049 ± 0.006
	Sacarosa	0	0.042 ± 6.32E-07	0.045 ± 6.79E-07	0.049 ± 7.26E-07	0.045 ± 0.009
		1	0.035 ± 5.22E-07	0.033 ± 4.91E-07	0.037 ± 5.54E-07	0.035 ± 0.006
		3	0.024 ± 3.65E-07	0.022 ± 3.34E-07	0.023 ± 3.50E-07	0.023 ± 0.003
		5	0.018 ± 2.71E-07	0.016 ± 2.40E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.016 ± 0.005
		10	0.014 ± 2.08E-07	0.011 ± 1.61E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.013 ± 0.005
		20	0.013 ± 1.93E-07	0.010 ± 1.46E-07	0.012 ± 1.77E-07	0.012 ± 0.005
	Glucosa	0	0.004 ± 6.02E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.002 ± 0.005
		1	0.008 ± 1.18E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.007 ± 1.01E-07	0.008 ± 0.003
3		0.013 ± 2.00E-07	0.015 ± 2.17E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.014 ± 0.002	
5		0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.003	
10		0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 0.003	
20		0.020 ± 2.91E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 0.003	
70	Fructosa	0	0.004 ± 6.02E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.001 ± 1.06E-08	0.002 ± 0.005
		1	0.008 ± 1.18E-07	0.009 ± 1.34E-07	0.007 ± 1.01E-07	0.008 ± 0.003
		3	0.013 ± 2.00E-07	0.015 ± 2.17E-07	0.014 ± 2.09E-07	0.014 ± 0.002
		5	0.017 ± 2.50E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.018 ± 2.75E-07	0.018 ± 0.003
		10	0.019 ± 2.83E-07	0.021 ± 3.08E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.020 ± 0.003
		20	0.020 ± 2.91E-07	0.021 ± 3.16E-07	0.020 ± 3.00E-07	0.020 ± 0.003
	Producto	0	0.008 ± 8.51E-08	0.005 ± 5.00E-08	0.001 ± 1.50E-08	0.005 ± 0.010
		1	0.016 ± 1.67E-07	0.018 ± 1.90E-07	0.014 ± 1.43E-07	0.016 ± 0.007
		3	0.027 ± 2.84E-07	0.029 ± 3.07E-07	0.028 ± 2.95E-07	0.028 ± 0.003
		5	0.034 ± 3.54E-07	0.036 ± 3.77E-07	0.037 ± 3.89E-07	0.035 ± 0.005
		10	0.038 ± 4.00E-07	0.041 ± 4.35E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.039 ± 0.005
		20	0.039 ± 4.12E-07	0.042 ± 4.47E-07	0.040 ± 4.24E-07	0.041 ± 0.005

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de temperatura de la enzima inmovilizada con alginato de sodio. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 34. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
3	Sacarosa	0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.047 $\pm$ 6.95E-07	0.048 $\pm$ 0.005
		1	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.044 $\pm$ 6.63E-07	0.043 $\pm$ 6.48E-07	0.043 $\pm$ 0.003
		3	0.039 $\pm$ 5.85E-07	0.037 $\pm$ 5.54E-07	0.038 $\pm$ 5.69E-07	0.038 $\pm$ 0.003
		5	0.030 $\pm$ 4.44E-07	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.032 $\pm$ 0.006
		10	0.028 $\pm$ 4.12E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.029 $\pm$ 4.28E-07	0.029 $\pm$ 0.005
		20	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.030 $\pm$ 4.44E-07	0.028 $\pm$ 4.12E-07	0.028 $\pm$ 0.005
	Glucosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.003 $\pm$ 0.002
		3	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.006 $\pm$ 0.002
		5	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.010 $\pm$ 0.003
		10	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.011 $\pm$ 0.003
		20	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.012 $\pm$ 0.003
	Fructosa	0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.003 $\pm$ 0.002
		3	0.006 $\pm$ 8.49E-08	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.006 $\pm$ 0.002
		5	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.010 $\pm$ 0.003
		10	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.011 $\pm$ 0.003
		20	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.012 $\pm$ 0.003
	Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.004 $\pm$ 3.84E-08	0.002 $\pm$ 0.005
		1	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.006 $\pm$ 6.17E-08	0.007 $\pm$ 7.34E-08	0.007 $\pm$ 0.003
3		0.011 $\pm$ 1.20E-07	0.014 $\pm$ 1.43E-07	0.012 $\pm$ 1.32E-07	0.012 $\pm$ 0.003	
5		0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.019 $\pm$ 0.007	
10		0.024 $\pm$ 2.49E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.022 $\pm$ 2.37E-07	0.022 $\pm$ 0.005	
20		0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.024 $\pm$ 2.49E-07	0.023 $\pm$ 0.005	
5	Sacarosa	0	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.044 $\pm$ 6.63E-07	0.046 $\pm$ 0.005
		1	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.030 $\pm$ 4.44E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.031 $\pm$ 0.003
		3	0.015 $\pm$ 2.24E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.013 $\pm$ 1.93E-07	0.015 $\pm$ 0.006
		5	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.008 $\pm$ 1.14E-07	0.008 $\pm$ 0.002
		10	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.004 $\pm$ 0.007
		20	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.003 $\pm$ 0.005
Glucosa	0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.002 $\pm$ 0.003	
	1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.010 $\pm$ 0.002	

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
5	Glucosa	3	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.018 $\pm$ 0.003
		5	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.001
		10	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 0.003
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 0.003
		0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.003 $\pm$ 4.36E-08	0.002 $\pm$ 0.003
	Fructosa	1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.011 $\pm$ 1.59E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.010 $\pm$ 0.002
		3	0.018 $\pm$ 2.75E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.020 $\pm$ 2.91E-07	0.018 $\pm$ 0.003
		5	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.022 $\pm$ 3.33E-07	0.022 $\pm$ 0.001
		10	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 0.003
		20	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 0.003
	Producto	0	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.006 $\pm$ 6.17E-08	0.004 $\pm$ 0.005
		1	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.021 $\pm$ 2.25E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.020 $\pm$ 0.003
		3	0.037 $\pm$ 3.89E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.039 $\pm$ 4.12E-07	0.037 $\pm$ 0.007
		5	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.045 $\pm$ 4.70E-07	0.044 $\pm$ 0.002
		10	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.049 $\pm$ 0.007
	Sacarosa	20	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.049 $\pm$ 0.005
		0	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.046 $\pm$ 0.011
		1	0.032 $\pm$ 4.75E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.031 $\pm$ 4.59E-07	0.032 $\pm$ 0.005
		3	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.016 $\pm$ 2.40E-07	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.016 $\pm$ 0.005
		5	0.009 $\pm$ 1.30E-07	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.012 $\pm$ 1.77E-07	0.010 $\pm$ 0.005
6	Glucosa	10	0.007 $\pm$ 9.86E-08	0.005 $\pm$ 6.72E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.005 $\pm$ 0.006
		20	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.003 $\pm$ 5.15E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.003 $\pm$ 0.006
		0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.002 $\pm$ 0.006
		1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 0.003
		3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.018 $\pm$ 2.67E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.018 $\pm$ 0.003
	Fructosa	5	0.022 $\pm$ 3.24E-07	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.020 $\pm$ 3.00E-07	0.021 $\pm$ 0.003
		10	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.024 $\pm$ 3.57E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.003
		20	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.024 $\pm$ 3.66E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 0.003
		0	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.002 $\pm$ 0.006
		1	0.010 $\pm$ 1.43E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.010 $\pm$ 1.51E-07	0.009 $\pm$ 0.003

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)	
6	Producto	0	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.004 $\pm$ 0.012	
		1	0.019 $\pm$ 2.02E-07	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.020 $\pm$ 2.13E-07	0.019 $\pm$ 0.005	
		3	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.036 $\pm$ 3.77E-07	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.036 $\pm$ 0.005	
		5	0.043 $\pm$ 4.59E-07	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.040 $\pm$ 4.24E-07	0.042 $\pm$ 0.005	
		10	0.046 $\pm$ 4.82E-07	0.048 $\pm$ 5.05E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.048 $\pm$ 0.007	
		20	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.049 $\pm$ 5.17E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.049 $\pm$ 0.007	
	Sacarosa	0	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.048 $\pm$ 7.10E-07	0.048 $\pm$ 0.004	
		1	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.034 $\pm$ 5.06E-07	0.033 $\pm$ 4.91E-07	0.033 $\pm$ 0.002	
		3	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.018 $\pm$ 2.71E-07	0.019 $\pm$ 0.005	
		5	0.011 $\pm$ 1.61E-07	0.010 $\pm$ 1.46E-07	0.014 $\pm$ 2.08E-07	0.012 $\pm$ 0.007	
		10	0.007 $\pm$ 9.86E-08	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.002 $\pm$ 3.58E-08	0.005 $\pm$ 0.007	
		20	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.006 $\pm$ 8.29E-08	0.001 $\pm$ 2.02E-08	0.004 $\pm$ 0.007	
	7	Glucosa	0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.002
			1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.009 $\pm$ 0.001
			3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.017 $\pm$ 0.003
5			0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.020 $\pm$ 0.003	
10			0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.003	
Fructosa		20	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 0.004	
		0	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.001 $\pm$ 1.89E-08	0.001 $\pm$ 0.002	
		1	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.009 $\pm$ 1.34E-07	0.009 $\pm$ 0.001	
		3	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.017 $\pm$ 2.50E-07	0.017 $\pm$ 0.003	
		5	0.021 $\pm$ 3.08E-07	0.021 $\pm$ 3.16E-07	0.019 $\pm$ 2.83E-07	0.020 $\pm$ 0.003	
9	Producto	10	0.023 $\pm$ 3.41E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.025 $\pm$ 3.74E-07	0.024 $\pm$ 0.003	
		20	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.023 $\pm$ 3.49E-07	0.026 $\pm$ 3.82E-07	0.024 $\pm$ 0.004	
		0	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.003 $\pm$ 2.67E-08	0.002 $\pm$ 0.004	
		1	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.017 $\pm$ 1.78E-07	0.018 $\pm$ 1.90E-07	0.018 $\pm$ 0.002	
		3	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.031 $\pm$ 3.30E-07	0.034 $\pm$ 3.54E-07	0.033 $\pm$ 0.005	
	Sacarosa	5	0.041 $\pm$ 4.35E-07	0.042 $\pm$ 4.47E-07	0.038 $\pm$ 4.00E-07	0.041 $\pm$ 0.007	
		10	0.046 $\pm$ 4.82E-07	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.050 $\pm$ 5.29E-07	0.048 $\pm$ 0.007	
		20	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.047 $\pm$ 4.94E-07	0.051 $\pm$ 5.40E-07	0.048 $\pm$ 0.008	
		0	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.050 $\pm$ 7.42E-07	0.045 $\pm$ 6.79E-07	0.047 $\pm$ 0.007	
		1	0.042 $\pm$ 6.32E-07	0.040 $\pm$ 6.01E-07	0.036 $\pm$ 5.38E-07	0.040 $\pm$ 0.010	
		3	0.035 $\pm$ 5.22E-07	0.037 $\pm$ 5.54E-07	0.028 $\pm$ 4.12E-07	0.033 $\pm$ 0.015	

pH ( $\pm$ 0.005)	Compuesto	Tiempo (min $\pm$ 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
9	Sacarosa	5	0.024 $\pm$ 3.65E-07	0.027 $\pm$ 3.97E-07	0.026 $\pm$ 3.81E-07	0.026 $\pm$ 0.003
		10	0.022 $\pm$ 3.34E-07	0.019 $\pm$ 2.87E-07	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.021 $\pm$ 0.005
		20	0.020 $\pm$ 3.02E-07	0.017 $\pm$ 2.55E-07	0.019 $\pm$ 2.87E-07	0.019 $\pm$ 0.005
	Glucosa	0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.001 $\pm$ 0.003
		1	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.003 $\pm$ 5.19E-08	0.004 $\pm$ 0.003
		3	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.006 $\pm$ 9.32E-08	0.007 $\pm$ 0.003
		5	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.008 $\pm$ 1.26E-07	0.011 $\pm$ 0.008
		10	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.011 $\pm$ 1.67E-07	0.014 $\pm$ 0.008
		20	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.012 $\pm$ 1.76E-07	0.015 $\pm$ 0.009
		0	0.002 $\pm$ 3.54E-08	0.000 $\pm$ 2.36E-09	0.002 $\pm$ 2.71E-08	0.002 $\pm$ 0.004
	Fructosa	1	0.004 $\pm$ 6.02E-08	0.005 $\pm$ 7.67E-08	0.007 $\pm$ 5.19E-08	0.006 $\pm$ 0.005
		3	0.008 $\pm$ 1.18E-07	0.007 $\pm$ 1.01E-07	0.012 $\pm$ 9.32E-08	0.009 $\pm$ 0.008
		5	0.013 $\pm$ 2.00E-07	0.012 $\pm$ 1.84E-07	0.013 $\pm$ 1.26E-07	0.013 $\pm$ 0.002
		10	0.015 $\pm$ 2.17E-07	0.016 $\pm$ 2.42E-07	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.015 $\pm$ 0.003
		20	0.016 $\pm$ 2.34E-07	0.017 $\pm$ 2.58E-07	0.016 $\pm$ 1.76E-07	0.016 $\pm$ 0.003
	Producto	0	0.005 $\pm$ 5.00E-08	0.000 $\pm$ 3.34E-09	0.005 $\pm$ 3.84E-08	0.003 $\pm$ 0.008
		1	0.008 $\pm$ 8.51E-08	0.010 $\pm$ 1.08E-07	0.015 $\pm$ 7.34E-08	0.011 $\pm$ 0.010
		3	0.016 $\pm$ 1.67E-07	0.014 $\pm$ 1.43E-07	0.024 $\pm$ 1.32E-07	0.018 $\pm$ 0.016
		5	0.027 $\pm$ 2.84E-07	0.025 $\pm$ 2.60E-07	0.026 $\pm$ 1.78E-07	0.026 $\pm$ 0.003
		10	0.029 $\pm$ 3.07E-07	0.032 $\pm$ 3.42E-07	0.031 $\pm$ 2.37E-07	0.031 $\pm$ 0.005
		20	0.031 $\pm$ 3.30E-07	0.035 $\pm$ 3.65E-07	0.032 $\pm$ 2.49E-07	0.033 $\pm$ 0.005

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de pH de la enzima inmovilizada con alginato de sodio. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 35. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato de la enzima inmovilizada con alginato de sodio

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.05	Sacarosa	0	0.048 ± 7.10E-07	0.045 ± 6.79E-07	0.044 ± 6.63E-07	0.046 ± 0.005
		1	0.032 ± 4.75E-07	0.030 ± 4.44E-07	0.031 ± 4.59E-07	0.031 ± 0.003
		3	0.015 ± 2.24E-07	0.017 ± 2.55E-07	0.013 ± 1.93E-07	0.015 ± 0.006
		5	0.009 ± 1.30E-07	0.009 ± 1.30E-07	0.008 ± 1.14E-07	0.008 ± 0.002
		10	0.001 ± 2.02E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.006 ± 8.29E-08	0.004 ± 0.007
		20	0.001 ± 2.02E-08	0.003 ± 5.15E-08	0.005 ± 6.72E-08	0.003 ± 0.005
	Glucosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
		5	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.003
		20	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003
	Fructosa	0	0.001 ± 1.89E-08	0.002 ± 3.54E-08	0.003 ± 4.36E-08	0.002 ± 0.003
		1	0.010 ± 1.43E-07	0.011 ± 1.59E-07	0.010 ± 1.51E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.018 ± 2.75E-07	0.017 ± 2.58E-07	0.020 ± 2.91E-07	0.018 ± 0.003
		5	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.24E-07	0.022 ± 3.33E-07	0.022 ± 0.001
		10	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.023 ± 3.49E-07	0.024 ± 0.003
		20	0.026 ± 3.82E-07	0.024 ± 3.66E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.025 ± 0.003
Producto	0	0.003 ± 2.67E-08	0.005 ± 5.00E-08	0.006 ± 6.17E-08	0.004 ± 0.005	
	1	0.019 ± 2.02E-07	0.021 ± 2.25E-07	0.020 ± 2.13E-07	0.020 ± 0.003	
	3	0.037 ± 3.89E-07	0.035 ± 3.65E-07	0.039 ± 4.12E-07	0.037 ± 0.007	
	5	0.043 ± 4.59E-07	0.043 ± 4.59E-07	0.045 ± 4.70E-07	0.044 ± 0.002	
	10	0.051 ± 5.40E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.047 ± 4.94E-07	0.049 ± 0.007	
	20	0.051 ± 5.40E-07	0.049 ± 5.17E-07	0.048 ± 5.05E-07	0.049 ± 0.005	
0.10	Sacarosa	0	0.095 ± 1.40E-06	0.093 ± 1.39E-06	0.092 ± 1.37E-06	0.093 ± 0.004
		1	0.068 ± 1.01E-06	0.073 ± 1.08E-06	0.071 ± 1.05E-06	0.071 ± 0.007
		3	0.042 ± 6.23E-07	0.044 ± 6.59E-07	0.040 ± 5.88E-07	0.042 ± 0.007
		5	0.031 ± 4.63E-07	0.032 ± 4.81E-07	0.032 ± 4.81E-07	0.032 ± 0.002
		10	0.028 ± 4.10E-07	0.025 ± 3.75E-07	0.024 ± 3.57E-07	0.026 ± 0.005
		20	0.024 ± 3.57E-07	0.020 ± 3.04E-07	0.025 ± 3.75E-07	0.023 ± 0.007
	Glucosa	0	0.003 ± 4.63E-08	0.004 ± 5.52E-08	0.004 ± 6.41E-08	0.004 ± 0.002
		1	0.016 ± 2.42E-07	0.014 ± 2.07E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.015 ± 0.004

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.10	Glucosa	3	0.030 ± 4.38E-07	0.028 ± 4.20E-07	0.031 ± 4.56E-07	0.030 ± 0.004
		5	0.035 ± 5.18E-07	0.034 ± 5.10E-07	0.034 ± 5.10E-07	0.035 ± 0.001
		10	0.037 ± 5.45E-07	0.038 ± 5.63E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.038 ± 0.003
		20	0.039 ± 5.72E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.038 ± 5.63E-07	0.039 ± 0.004
	Fructosa	0	0.003 ± 4.63E-08	0.004 ± 5.52E-08	0.004 ± 6.41E-08	0.004 ± 0.002
		1	0.016 ± 2.42E-07	0.014 ± 2.07E-07	0.015 ± 2.24E-07	0.015 ± 0.004
		3	0.030 ± 4.38E-07	0.028 ± 4.20E-07	0.031 ± 4.56E-07	0.030 ± 0.004
		5	0.035 ± 5.18E-07	0.034 ± 5.10E-07	0.034 ± 5.10E-07	0.035 ± 0.001
	Producto	10	0.037 ± 5.45E-07	0.038 ± 5.63E-07	0.039 ± 5.72E-07	0.038 ± 0.003
		20	0.039 ± 5.72E-07	0.040 ± 5.99E-07	0.038 ± 5.63E-07	0.039 ± 0.004
		0	0.006 ± 6.54E-08	0.007 ± 7.80E-08	0.009 ± 9.06E-08	0.007 ± 0.004
		1	0.033 ± 3.43E-07	0.028 ± 2.92E-07	0.030 ± 3.17E-07	0.030 ± 0.007
Sacarosa	3	0.059 ± 6.20E-07	0.057 ± 5.95E-07	0.061 ± 6.45E-07	0.059 ± 0.007	
	5	0.070 ± 7.33E-07	0.069 ± 7.21E-07	0.069 ± 7.21E-07	0.069 ± 0.002	
	10	0.073 ± 7.71E-07	0.076 ± 7.96E-07	0.077 ± 8.09E-07	0.075 ± 0.005	
	20	0.077 ± 8.09E-07	0.081 ± 8.47E-07	0.076 ± 7.96E-07	0.078 ± 0.007	
0.15	Glucosa	0	0.136 ± 2.01E-06	0.136 ± 2.01E-06	0.145 ± 2.14E-06	0.139 ± 0.015
		1	0.099 ± 1.47E-06	0.101 ± 1.50E-06	0.114 ± 1.69E-06	0.105 ± 0.025
		3	0.073 ± 1.08E-06	0.071 ± 1.05E-06	0.067 ± 9.86E-07	0.070 ± 0.010
		5	0.054 ± 7.94E-07	0.054 ± 7.94E-07	0.058 ± 8.58E-07	0.055 ± 0.007
	Fructosa	10	0.052 ± 7.62E-07	0.049 ± 7.30E-07	0.049 ± 7.30E-07	0.050 ± 0.004
		20	0.052 ± 7.62E-07	0.045 ± 6.66E-07	0.047 ± 6.98E-07	0.048 ± 0.010
		0	0.007 ± 1.09E-07	0.007 ± 1.09E-07	0.003 ± 4.17E-08	0.006 ± 0.008
		1	0.027 ± 3.95E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.019 ± 2.78E-07	0.024 ± 0.013
	Glucosa	3	0.040 ± 5.97E-07	0.042 ± 6.14E-07	0.044 ± 6.48E-07	0.042 ± 0.005
		5	0.051 ± 7.49E-07	0.051 ± 7.49E-07	0.048 ± 7.15E-07	0.050 ± 0.004
		10	0.052 ± 7.66E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.053 ± 0.002
		20	0.052 ± 7.66E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.054 ± 7.99E-07	0.054 ± 0.005
Fructosa	0	0.007 ± 1.09E-07	0.007 ± 1.09E-07	0.003 ± 4.17E-08	0.006 ± 0.008	
	1	0.027 ± 3.95E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.019 ± 2.78E-07	0.024 ± 0.013	
	3	0.040 ± 5.97E-07	0.042 ± 6.14E-07	0.044 ± 6.48E-07	0.042 ± 0.005	
	5	0.051 ± 7.49E-07	0.051 ± 7.49E-07	0.048 ± 7.15E-07	0.050 ± 0.004	
Fructosa	10	0.052 ± 7.66E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.053 ± 7.83E-07	0.053 ± 0.002	
	20	0.052 ± 7.66E-07	0.055 ± 8.16E-07	0.054 ± 7.99E-07	0.054 ± 0.005	

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.15	Producto	0	0.015 ± 1.54E-07	0.015 ± 1.54E-07	0.006 ± 5.90E-08	0.012 ± 0.016
		1	0.054 ± 5.59E-07	0.051 ± 5.35E-07	0.038 ± 3.92E-07	0.047 ± 0.026
		3	0.081 ± 8.45E-07	0.083 ± 8.69E-07	0.088 ± 9.16E-07	0.084 ± 0.010
		5	0.101 ± 1.06E-06	0.101 ± 1.06E-06	0.097 ± 1.01E-06	0.100 ± 0.008
		10	0.104 ± 1.08E-06	0.106 ± 1.11E-06	0.106 ± 1.11E-06	0.105 ± 0.004
		20	0.104 ± 1.08E-06	0.110 ± 1.15E-06	0.108 ± 1.13E-06	0.107 ± 0.010
	Sacarosa	0	0.199 ± 2.93E-06	0.187 ± 2.75E-06	0.185 ± 2.72E-06	0.190 ± 0.024
		1	0.148 ± 2.18E-06	0.140 ± 2.07E-06	0.148 ± 2.18E-06	0.145 ± 0.013
		3	0.096 ± 1.42E-06	0.099 ± 1.45E-06	0.094 ± 1.38E-06	0.096 ± 0.007
		5	0.079 ± 1.16E-06	0.082 ± 1.20E-06	0.079 ± 1.16E-06	0.080 ± 0.004
		10	0.074 ± 1.09E-06	0.067 ± 9.84E-07	0.064 ± 9.48E-07	0.069 ± 0.015
		20	0.072 ± 1.06E-06	0.067 ± 9.84E-07	0.062 ± 9.12E-07	0.067 ± 0.015
0.20	Glucosa	0	0.000 ± 5.43E-09	0.007 ± 1.00E-07	0.008 ± 1.19E-07	0.005 ± 0.012
		1	0.027 ± 4.04E-07	0.031 ± 4.61E-07	0.027 ± 4.04E-07	0.029 ± 0.007
		3	0.055 ± 8.03E-07	0.053 ± 7.84E-07	0.056 ± 8.22E-07	0.055 ± 0.004
		5	0.064 ± 9.36E-07	0.062 ± 9.17E-07	0.064 ± 9.36E-07	0.063 ± 0.002
		10	0.066 ± 9.74E-07	0.070 ± 1.03E-06	0.071 ± 1.05E-06	0.069 ± 0.008
		20	0.067 ± 9.93E-07	0.070 ± 1.03E-06	0.073 ± 1.07E-06	0.070 ± 0.008
	Fructosa	0	0.000 ± 5.43E-09	0.007 ± 1.00E-07	0.008 ± 1.19E-07	0.005 ± 0.012
		1	0.027 ± 4.04E-07	0.031 ± 4.61E-07	0.027 ± 4.04E-07	0.029 ± 0.007
		3	0.055 ± 8.03E-07	0.053 ± 7.84E-07	0.056 ± 8.22E-07	0.055 ± 0.004
		5	0.064 ± 9.36E-07	0.062 ± 9.17E-07	0.064 ± 9.36E-07	0.063 ± 0.002
		10	0.066 ± 9.74E-07	0.070 ± 1.03E-06	0.071 ± 1.05E-06	0.069 ± 0.008
		20	0.067 ± 9.93E-07	0.070 ± 1.03E-06	0.073 ± 1.07E-06	0.070 ± 0.008
0.40	Producto	0	0.001 ± 7.67E-09	0.014 ± 1.42E-07	0.016 ± 1.69E-07	0.010 ± 0.025
		1	0.055 ± 5.72E-07	0.063 ± 6.52E-07	0.055 ± 5.72E-07	0.058 ± 0.013
		3	0.109 ± 1.14E-06	0.107 ± 1.11E-06	0.112 ± 1.16E-06	0.109 ± 0.008
		5	0.127 ± 1.32E-06	0.125 ± 1.30E-06	0.127 ± 1.32E-06	0.126 ± 0.004
		10	0.132 ± 1.38E-06	0.140 ± 1.46E-06	0.143 ± 1.48E-06	0.138 ± 0.016
		20	0.135 ± 1.40E-06	0.140 ± 1.46E-06	0.145 ± 1.51E-06	0.140 ± 0.015
	Sacarosa	0	0.390 ± 5.66E-06	0.187 ± 2.71E-06	0.185 ± 2.68E-06	0.254 ± 0.354
		1	0.369 ± 5.36E-06	0.140 ± 2.04E-06	0.148 ± 2.14E-06	0.219 ± 0.390
		3	0.356 ± 5.16E-06	0.099 ± 1.43E-06	0.094 ± 1.36E-06	0.183 ± 0.449

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.40	Sacarosa	5	0.314 ± 4.56E-06	0.082 ± 1.18E-06	0.079 ± 1.15E-06	0.158 ± 0.405
		10	0.252 ± 3.66E-06	0.067 ± 9.70E-07	0.064 ± 9.34E-07	0.128 ± 0.323
		20	0.238 ± 3.46E-06	0.067 ± 9.70E-07	0.062 ± 8.99E-07	0.122 ± 0.301
	Glucosa	0	0.000 ± 5.35E-09	0.007 ± 9.89E-08	0.008 ± 1.18E-07	0.005 ± 0.012
		1	0.027 ± 3.98E-07	0.031 ± 4.54E-07	0.027 ± 3.98E-07	0.029 ± 0.007
		3	0.055 ± 7.91E-07	0.053 ± 7.73E-07	0.056 ± 8.10E-07	0.055 ± 0.004
		5	0.064 ± 9.22E-07	0.062 ± 9.03E-07	0.064 ± 9.22E-07	0.063 ± 0.002
		10	0.066 ± 9.59E-07	0.070 ± 1.02E-06	0.071 ± 1.03E-06	0.069 ± 0.008
		20	0.067 ± 9.78E-07	0.070 ± 1.02E-06	0.073 ± 1.05E-06	0.070 ± 0.008
	Fructosa	0	0.000 ± 5.35E-09	0.007 ± 9.89E-08	0.008 ± 1.18E-07	0.005 ± 0.012
		1	0.027 ± 3.98E-07	0.031 ± 4.54E-07	0.027 ± 3.98E-07	0.029 ± 0.007
		3	0.055 ± 7.91E-07	0.053 ± 7.73E-07	0.056 ± 8.10E-07	0.055 ± 0.004
5		0.064 ± 9.22E-07	0.062 ± 9.03E-07	0.064 ± 9.22E-07	0.063 ± 0.002	
10		0.066 ± 9.59E-07	0.070 ± 1.02E-06	0.071 ± 1.03E-06	0.069 ± 0.008	
20		0.067 ± 9.78E-07	0.070 ± 1.02E-06	0.073 ± 1.05E-06	0.070 ± 0.008	
Producto	0	0.001 ± 7.56E-09	0.014 ± 1.40E-07	0.016 ± 1.66E-07	0.010 ± 0.025	
	1	0.055 ± 5.63E-07	0.063 ± 6.43E-07	0.055 ± 5.63E-07	0.058 ± 0.013	
	3	0.109 ± 1.12E-06	0.107 ± 1.09E-06	0.112 ± 1.15E-06	0.109 ± 0.008	
	5	0.127 ± 1.30E-06	0.125 ± 1.28E-06	0.127 ± 1.30E-06	0.126 ± 0.004	
	10	0.132 ± 1.36E-06	0.140 ± 1.44E-06	0.143 ± 1.46E-06	0.138 ± 0.016	
	20	0.135 ± 1.38E-06	0.140 ± 1.44E-06	0.145 ± 1.49E-06	0.140 ± 0.015	
0.60	Sacarosa	0	0.595 ± 8.55E-06	0.600 ± 8.61E-06	0.598 ± 8.59E-06	0.598 ± 0.007
		1	0.580 ± 8.33E-06	0.581 ± 8.35E-06	0.579 ± 8.32E-06	0.580 ± 0.003
		3	0.558 ± 8.01E-06	0.555 ± 7.96E-06	0.556 ± 7.97E-06	0.556 ± 0.005
		5	0.540 ± 7.74E-06	0.542 ± 7.78E-06	0.543 ± 7.79E-06	0.541 ± 0.005
		10	0.514 ± 7.38E-06	0.511 ± 7.34E-06	0.510 ± 7.32E-06	0.512 ± 0.007
		20	0.498 ± 7.14E-06	0.501 ± 7.18E-06	0.502 ± 7.21E-06	0.500 ± 0.007
	Glucosa	0	0.003 ± 3.62E-08	0.000 ± 1.65E-09	0.001 ± 1.32E-08	0.001 ± 0.004
		1	0.011 ± 1.51E-07	0.010 ± 1.40E-07	0.011 ± 1.57E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.022 ± 3.18E-07	0.024 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.35E-07	0.023 ± 0.003
		5	0.032 ± 4.56E-07	0.031 ± 4.39E-07	0.030 ± 4.33E-07	0.031 ± 0.003
		10	0.045 ± 6.46E-07	0.047 ± 6.69E-07	0.047 ± 6.80E-07	0.046 ± 0.004
		20	0.054 ± 7.72E-07	0.052 ± 7.49E-07	0.051 ± 7.38E-07	0.053 ± 0.004

Concen. de sustrato (g/mL ± 0.005 g/mL)	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
0.60	Fructosa	0	0.003 ± 3.62E-08	0.000 ± 1.65E-09	0.001 ± 1.32E-08	0.001 ± 0.004
		1	0.011 ± 1.51E-07	0.010 ± 1.40E-07	0.011 ± 1.57E-07	0.010 ± 0.002
		3	0.022 ± 3.18E-07	0.024 ± 3.41E-07	0.023 ± 3.35E-07	0.023 ± 0.003
		5	0.032 ± 4.56E-07	0.031 ± 4.39E-07	0.030 ± 4.33E-07	0.031 ± 0.003
		10	0.045 ± 6.46E-07	0.047 ± 6.69E-07	0.047 ± 6.80E-07	0.046 ± 0.004
		20	0.054 ± 7.72E-07	0.052 ± 7.49E-07	0.051 ± 7.38E-07	0.053 ± 0.004
	Producto	0	0.005 ± 5.12E-08	0.000 ± 2.33E-09	0.002 ± 1.86E-08	0.002 ± 0.007
		1	0.021 ± 2.14E-07	0.019 ± 1.98E-07	0.022 ± 2.22E-07	0.021 ± 0.004
		3	0.044 ± 4.50E-07	0.048 ± 4.83E-07	0.047 ± 4.74E-07	0.046 ± 0.005
		5	0.064 ± 6.45E-07	0.061 ± 6.21E-07	0.060 ± 6.13E-07	0.062 ± 0.005
		10	0.090 ± 9.14E-07	0.093 ± 9.46E-07	0.095 ± 9.62E-07	0.093 ± 0.007
		20	0.108 ± 1.09E-06	0.104 ± 1.06E-06	0.103 ± 1.04E-06	0.105 ± 0.007

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas de variación de concentración inicial de sustrato, de la enzima inmovilizada con alginato de sodio. Esto se realizó con el índice de refracción y las curvas de calibración para una concentración inicial de sustrato de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40 y  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 36. Concentraciones de sustrato y productos de las muestras de las corridas para determinar la concentración de enzima sin inmovilizar

SopORTE	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
Carbón activado	Sacarosa	0	0.045 ± 6.60E-07	0.047 ± 6.75E-07	0.048 ± 6.90E-07	0.047 ± 0.003
		1	0.042 ± 6.14E-07	0.043 ± 6.29E-07	0.043 ± 6.29E-07	0.043 ± 0.002
		3	0.035 ± 5.07E-07	0.037 ± 5.38E-07	0.036 ± 5.22E-07	0.036 ± 0.003
		5	0.033 ± 4.77E-07	0.032 ± 4.62E-07	0.032 ± 4.61E-07	0.032 ± 0.002
		10	0.023 ± 3.40E-07	0.024 ± 3.55E-07	0.026 ± 3.70E-07	0.024 ± 0.003
		20	0.016 ± 2.33E-07	0.015 ± 2.18E-07	0.017 ± 2.48E-07	0.016 ± 0.003
	Glucosa	0	0.002 ± 3.44E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 0.002
		1	0.004 ± 5.84E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.004 ± 0.001
		3	0.008 ± 1.15E-07	0.007 ± 9.85E-08	0.007 ± 1.07E-07	0.007 ± 0.002
		5	0.009 ± 1.31E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.009 ± 0.001
		10	0.014 ± 2.03E-07	0.013 ± 1.95E-07	0.013 ± 1.87E-07	0.013 ± 0.002
		20	0.018 ± 2.59E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 2.51E-07	0.018 ± 0.002
Fructosa	0	0.002 ± 3.44E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 0.002	
	1	0.004 ± 5.84E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.004 ± 0.001	
	3	0.008 ± 1.15E-07	0.007 ± 9.85E-08	0.007 ± 1.07E-07	0.007 ± 0.002	
	5	0.009 ± 1.31E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.009 ± 0.001	
	10	0.014 ± 2.03E-07	0.013 ± 1.95E-07	0.013 ± 1.87E-07	0.013 ± 0.002	
	20	0.018 ± 2.59E-07	0.018 ± 2.67E-07	0.017 ± 2.51E-07	0.018 ± 0.002	
Producto	0	0.005 ± 4.86E-08	0.004 ± 3.73E-08	0.003 ± 2.59E-08	0.004 ± 0.003	
	1	0.008 ± 8.27E-08	0.007 ± 7.13E-08	0.007 ± 7.13E-08	0.007 ± 0.002	
	3	0.016 ± 1.62E-07	0.014 ± 1.39E-07	0.015 ± 1.51E-07	0.015 ± 0.003	
	5	0.018 ± 1.85E-07	0.019 ± 1.96E-07	0.019 ± 1.96E-07	0.019 ± 0.002	
	10	0.028 ± 2.87E-07	0.027 ± 2.75E-07	0.026 ± 2.64E-07	0.027 ± 0.003	
	20	0.036 ± 3.66E-07	0.037 ± 3.77E-07	0.035 ± 3.55E-07	0.036 ± 0.003	
PHA	Sacarosa	0	0.049 ± 7.05E-07	0.047 ± 6.75E-07	0.050 ± 7.21E-07	0.048 ± 0.005
		1	0.028 ± 4.01E-07	0.030 ± 4.31E-07	0.032 ± 4.62E-07	0.030 ± 0.006
		3	0.012 ± 1.72E-07	0.014 ± 2.02E-07	0.013 ± 1.87E-07	0.013 ± 0.003
	Glucosa	5	0.008 ± 1.11E-07	0.007 ± 9.58E-08	0.005 ± 6.53E-08	0.006 ± 0.005
		10	0.003 ± 5.01E-08	0.002 ± 3.48E-08	0.002 ± 3.48E-08	0.003 ± 0.002
		20	0.001 ± 1.96E-08	0.000 ± 4.35E-09	0.001 ± 1.96E-08	0.001 ± 0.002
Glucosa	0	0.001 ± 1.03E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.000 ± 2.29E-09	0.001 ± 0.003	
	1	0.012 ± 1.71E-07	0.011 ± 1.55E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.011 ± 0.003	
	3	0.020 ± 2.91E-07	0.019 ± 2.75E-07	0.020 ± 2.83E-07	0.020 ± 0.002	
	5	0.022 ± 3.23E-07	0.023 ± 3.31E-07	0.024 ± 3.47E-07	0.023 ± 0.003	
		10	0.024 ± 3.55E-07	0.025 ± 3.63E-07	0.025 ± 3.63E-07	0.025 ± 0.001

SopORTE	Compuesto	Tiempo (min ± 0.0005 min)	Concentración 1 (g/mL)	Concentración 2 (g/mL)	Concentración 3 (g/mL)	Promedio (g/mL)
PHA	Glucosa	20	0.026 ± 3.71E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.026 ± 3.71E-07	0.026 ± 0.001
		0	0.001 ± 1.03E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.000 ± 2.29E-09	0.001 ± 0.003
	Fructosa	1	0.012 ± 1.71E-07	0.011 ± 1.55E-07	0.010 ± 1.39E-07	0.011 ± 0.003
		3	0.020 ± 2.91E-07	0.019 ± 2.75E-07	0.020 ± 2.83E-07	0.020 ± 0.002
		5	0.022 ± 3.23E-07	0.023 ± 3.31E-07	0.024 ± 3.47E-07	0.023 ± 0.003
		10	0.024 ± 3.55E-07	0.025 ± 3.63E-07	0.025 ± 3.63E-07	0.025 ± 0.001
		20	0.026 ± 3.71E-07	0.026 ± 3.79E-07	0.026 ± 3.71E-07	0.026 ± 0.001
		0	0.001 ± 1.46E-08	0.004 ± 3.73E-08	0.000 ± 3.24E-09	0.002 ± 0.005
	Producto	1	0.024 ± 2.41E-07	0.021 ± 2.19E-07	0.019 ± 1.96E-07	0.021 ± 0.007
		3	0.040 ± 4.12E-07	0.038 ± 3.89E-07	0.039 ± 4.00E-07	0.039 ± 0.003
		5	0.045 ± 4.57E-07	0.046 ± 4.68E-07	0.048 ± 4.91E-07	0.046 ± 0.005
		10	0.049 ± 5.02E-07	0.050 ± 5.14E-07	0.050 ± 5.14E-07	0.050 ± 0.002
20		0.051 ± 5.25E-07	0.052 ± 5.36E-07	0.051 ± 5.25E-07	0.052 ± 0.002	
0		0.048 ± 6.90E-07	0.047 ± 6.75E-07	0.049 ± 7.05E-07	0.048 ± 0.003	
Sacarosa	1	0.047 ± 6.75E-07	0.045 ± 6.60E-07	0.048 ± 6.90E-07	0.047 ± 0.003	
	3	0.045 ± 6.60E-07	0.044 ± 6.44E-07	0.047 ± 6.75E-07	0.045 ± 0.003	
	5	0.043 ± 6.29E-07	0.043 ± 6.29E-07	0.044 ± 6.44E-07	0.044 ± 0.002	
	10	0.035 ± 5.07E-07	0.040 ± 5.83E-07	0.043 ± 6.29E-07	0.040 ± 0.013	
	20	0.027 ± 3.85E-07	0.028 ± 4.01E-07	0.029 ± 4.16E-07	0.028 ± 0.003	
	0	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.001 ± 1.03E-08	0.001 ± 0.002	
Alginato de sodio	Glucosa	1	0.002 ± 2.64E-08	0.002 ± 3.44E-08	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 0.002
		3	0.002 ± 3.44E-08	0.003 ± 4.24E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.002 ± 0.002
		5	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 4.24E-08	0.003 ± 0.001
	Fructosa	10	0.008 ± 1.15E-07	0.005 ± 7.45E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.006 ± 0.007
		20	0.012 ± 1.79E-07	0.012 ± 1.71E-07	0.011 ± 1.63E-07	0.012 ± 0.002
		0	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.001 ± 1.03E-08	0.001 ± 0.002
Producto	1	0.002 ± 2.64E-08	0.002 ± 3.44E-08	0.001 ± 1.83E-08	0.002 ± 0.002	
	3	0.002 ± 3.44E-08	0.003 ± 4.24E-08	0.002 ± 2.64E-08	0.002 ± 0.002	
	5	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.003 ± 4.24E-08	0.003 ± 0.001	
	10	0.008 ± 1.15E-07	0.005 ± 7.45E-08	0.003 ± 5.04E-08	0.006 ± 0.007	
	20	0.012 ± 1.79E-07	0.012 ± 1.71E-07	0.011 ± 1.63E-07	0.012 ± 0.002	
	0	0.003 ± 2.59E-08	0.004 ± 3.73E-08	0.001 ± 1.46E-08	0.003 ± 0.003	
Producto	1	0.004 ± 3.73E-08	0.005 ± 4.86E-08	0.003 ± 2.59E-08	0.004 ± 0.003	
	3	0.005 ± 4.86E-08	0.006 ± 6.00E-08	0.004 ± 3.73E-08	0.005 ± 0.003	
	5	0.007 ± 7.13E-08	0.007 ± 7.13E-08	0.006 ± 6.00E-08	0.007 ± 0.002	
	10	0.016 ± 1.62E-07	0.010 ± 1.05E-07	0.007 ± 7.13E-08	0.011 ± 0.013	
		20	0.025 ± 2.53E-07	0.024 ± 2.41E-07	0.022 ± 2.30E-07	0.024 ± 0.003

Se determinaron las concentraciones de sacarosa (sustrato), glucosa, fructosa y producto total para cada una de las corridas con los remanentes de los medios utilizados para realizar las tres inmovilizaciones. Esto se realizó con el índice de refracción y la curva de calibración para una concentración inicial de sustrato de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Las corridas se realizaron en triplicado y se muestra el promedio de estas.

Cuadro 37. Eficiencia catalítica

Variable	Libre	Carbón activado	PHA	Alginato de sodio	
Temperatura	40° C	0.233	0.197	0.205	0.173
	50° C	0.410	0.401	0.395	0.403
	60° C	0.307	0.351	0.405	0.409
	70° C	0.206	0.254	0.309	0.289
pH	3	0.230	0.231	0.230	0.213
	5	0.410	0.401	0.395	0.403
	6	0.387	0.378	0.381	0.386
	7	0.363	0.379	0.384	0.388
	9	0.209	0.274	0.272	0.271
Concentración	0.05 g/mL	0.410	0.396	0.395	0.403
	0.10 g/mL	0.438	0.418	0.422	0.430
	0.15 g/mL	0.483	0.451	0.455	0.475
	0.20 g/mL	0.368	0.428	0.428	0.471
	0.40 g/mL	0.213	0.297	0.305	0.313
	0.60 g/mL	0.162	0.210	0.212	0.253

La eficiencia catalítica se obtiene dividiendo la velocidad máxima por la constante de Michaelis-Menten. Esta se calculó para todas las corridas de variación de temperatura, pH y concentración inicial de sustrato, tanto para la invertasa libre como las tres inmovilizaciones.

Cuadro 38. Pendientes e interceptos de las curvas de calibración de índice de refracción vs concentración de sacarosa y, glucosa y fructosa

Concen. de sustrato (g/mL $\pm$ 0.0005 g/mL)	Pendiente de la sacarosa	Intercepto de la sacarosa	Pendiente de la glucosa y fructosa	Intercepto de la glucosa y fructosa
0.05	-0.0095	1.3404	0.0181	1.3399
0.1	-0.0084	1.3473	0.0167	1.3464
0.15	-0.0046	1.3536	0.0088	1.3529
0.2	-0.0041	1.3598	0.0077	1.3589
0.4	-0.0029	1.3803	0.0055	1.3791
0.6	-0.0131	1.4007	0.0249	1.3928

Se determinaron las pendientes e interceptos, para la concentración de glucosa y fructosa vs el índice de refracción, y para la concentración de sacarosa vs el índice de refracción. Se

construyeron 6 curvas de calibración, una para cada concentración inicial de sustrato (sacarosa) evaluada. Las pendientes e interceptos se utilizaron para determinar las concentraciones de sustrato y producto de las muestras de las distintas corridas de temperatura, pH y concentración inicial utilizando sus índices de refracción. Las gráficas de las curvas se pueden observar en las figuras de la sección de curvas de calibración.

Cuadro 39. Parámetros cinéticos obtenidos para la determinación de enzima sin inmovilizar cada corrida utilizando el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa

Soporte	Concen. inicial sustrato (init S) (g/mL)	Concen. inicial producto (init P) (g/mL)	Concen. final sustrato (X) (g/mL)	Km (g/mL)	K2 (ppm <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Eo (ppm)
Carbón activado	0.047	0.004	0.016	1.818	0.062	3.681
PHA	0.048	0.062	0.001	1.818	0.062	13.710
Alginato de sodio	0.048	0.003	0.028	1.818	0.062	1.210

Los datos se obtuvieron con el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa (ecuación 8) realizando un ajuste con los datos de cada corrida realizada con los remanentes de los medios utilizados para las inmovilizaciones, en Berkeley Madonna. Los factores de inmovilización toman un valor de 1 en el modelaje de las corridas, debido a que la enzima sin inmovilizar se encuentra en su estado libre.

## C. MUESTRAS DE CÁLCULOS

### Cálculo 1. Concentración de sustrato y producto

Se determinó la concentración de sacarosa en la corrida 1 para la enzima libre.

$$x = \frac{y - b}{m} = \frac{1.33997 - 1.34042}{-0.00951 \frac{mL}{g}} = 0.04759 \pm 7.1043 * 10^{-7} \frac{g}{mL}$$

Donde:

x = concentración de sustrato/producto

y = índice de refracción

b = intercepto de la curva de calibración

m = pendiente de la curva de calibración

Este cálculo se repitió para determinar las concentraciones de sustrato y productos para las corridas de variación de temperatura, pH y concentración inicial de sustrato, para la enzima libre y las tres inmovilizaciones. También se repitió este cálculo para encontrar las

concentraciones de sustrato y producto para las corridas realizadas con los remanentes de la inmovilización, para determinar la concentración de enzima sin inmovilizar. Se utilizaron las pendientes e interceptos de las curvas de calibración que se encuentran en el cuadro 38 de datos calculados y los índices de refracción que se encuentran en los cuadros 11-23 de datos calculados. Los resultados se encuentran en los cuadros 24-36 de la sección de datos calculados.

### Cálculo 2. Rendimiento de inmovilización

Se determinó el rendimiento de inmovilización para la adsorción con carbón activado.

$$R = \frac{E_T - E_R}{E_T} * 100 = \frac{(0.001 - 0.0003025) \frac{g \text{ invertasa}}{mL}}{0.001 \frac{g \text{ invertasa}}{mL}} * 100 = 69.75 \pm 0.007 \%$$

Donde:

R = rendimiento de inmovilización

$E_T$  = concentración de enzima total utilizada en la inmovilización

$E_R$  = concentración de enzima en el remanente de la inmovilización

Se utilizó la cantidad de enzima totales utilizadas para la inmovilización con alginato de sodio, y la concentración de enzima en el remanente de este método de inmovilización para determinar el rendimiento de inmovilización. El cálculo se repitió para la inmovilización con carbón activado y PHA funcionalizado. Los datos se encuentran en el cuadro 39 de datos calculados y los resultados se encuentran en el cuadro 4 de la sección de resultados.

### Cálculo 3. Eficiencia catalítica

Se determinó la eficiencia catalítica para la corrida 1 de la enzima libre.

$$e = \frac{K_2 * E_0}{K_M} = \frac{0.045073 * 12 \text{ ppm}}{2.32 \text{ ppm}} = 0.2331$$

Donde:

e = eficiencia catalítica

$K_2$  = constante de velocidad

$E_0$  = concentración inicial de enzima

$K_M$  = constante de Michaelis-Menten

Este cálculo se repitió para las demás corridas de la enzima libre y para todas las corridas de las enzimas inmovilizadas. Se utilizaron los datos de los cuadros 5 y 6 de la sección de resultados y los resultados se encuentran en el cuadro 36 de datos calculados. Estos datos se utilizaron para construir las figuras 80-82 de la sección de resultados.

#### Cálculo 4. Energía de activación

Se determinó la energía de activación para la enzima libre, utilizando la velocidad máxima, entre 40 y 50 ± 0.5° C.

$$E_a = \frac{\ln\left(\frac{v_{max2}}{v_{max1}}\right)}{\left(\frac{1}{T_1}\right) - \left(\frac{1}{T_2}\right)} * R = \frac{\ln\left(\frac{0.75}{0.54}\right)}{\left(\frac{1}{313.15 K}\right) - \left(\frac{1}{323.15 K}\right)} * 0.008314 \frac{kJ}{mol K} = 26.961 \frac{kJ}{mol}$$

Donde:

$E_a$  = energía de activación

$v_{max}$  = velocidad máxima

T = temperatura

R = constante de los gases ideales

Se utilizó la ecuación 7. Este cálculo se repitió utilizando los datos de la constante de Michaelis-Menten, en lugar de la velocidad máxima, para la enzima libre en el mismo rango de temperatura. El cálculo se repitió para las tres enzimas inmovilizadas. Se utilizaron los datos en los cuadros 5 y 6 de la sección de resultados y los resultados se encuentran en el cuadro 9 de la sección de resultados.

#### Cálculo 5. Factor de frecuencia de la energía de activación

Se determinó el factor de frecuencia de la energía de activación para la enzima libre, utilizando la velocidad máxima a 50 ± 0.5° C.

$$v_{max0} = \frac{v_{max}}{e^{\frac{-E_a}{R*T}}} = \frac{0.75}{e^{\frac{-26.961 \frac{kJ}{mol}}{0.008314 \frac{kJ}{mol K} * 323.15 T}}} = 17003.6517$$

Donde:

$v_{max0}$  = factor de frecuencia

$E_a$  = energía de activación

$v_{max}$  = velocidad máxima

T = temperatura

R = constante de los gases ideales

Se utilizó la ecuación 7. Este cálculo se repitió utilizando los datos de la constante de Michaelis-Menten, en lugar de la velocidad máxima, para la enzima libre a la misma

temperatura. El cálculo se repitió para las tres enzimas inmovilizadas. Se utilizaron los datos en los cuadros 5 y 6 de la sección de resultados y los resultados se encuentran en el cuadro 9 de la sección de resultados.

## D. ANÁLISIS DE ERROR

Cálculo 6. Incertidumbre de la concentración de sustrato y producto

Se realizó este cálculo para encontrar la incertidumbre de la concentración de sacarosa en la corrida 1 de la enzima libre.

$$\frac{I}{R * C} = \frac{0.00002}{1.33997 * 0.0476} = \pm 7.1043 * 10^{-7} \frac{g}{mL}$$

Donde:

I = incertidumbre refractómetro

R = índice de refracción

C = concentración de sustrato/producto

Se repitió para las demás concentraciones de sustrato y productos de todas las corridas tanto para la enzima libre, como la inmovilizada. También se realizó para las corridas de determinación de invertasa sin inmovilizar. Se usaron los datos en los cuadros 11-23 de datos originales y los cuadros 24-36 de datos calculados. Los resultados se encuentran en los cuadros 24-36 de datos calculados.

Ecuación 10. Propagación de error de multiplicación y división

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\frac{S_a^2}{a} + \frac{S_b^2}{b} + \dots + \frac{S_i^2}{i}}$$

Donde:

$S_y$  = Incertidumbre del resultado

y = valor del resultado del cálculo

$S_i$  = Incertidumbre de cada medida (a, b, i,...)

a, b, i... = valores de cada medida

### Cálculo 7. Incertidumbre del rendimiento de inmovilización

Se realizó el cálculo para determinar la incertidumbre del rendimiento de inmovilización con alginato de sodio

$$S_y = 69.75\% * \sqrt{\frac{0.0005^2}{0.001} + \frac{0.0005^2}{0.0006975}} = \pm 0.007\%$$

Se utilizó la ecuación 10. Este se repitió para las otras dos inmovilizaciones. Se usaron los datos en el cuadro 4 de resultados y el cuadro 39 de datos calculados. Los resultados se encuentran en el cuadro 4 de resultados.

### Ecuación 11. Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar

N = número de observaciones

$x_i$  = observación número i de la variable X

$\bar{X}$  = media de la variable

### Cálculo 8. Desviación estándar de las concentraciones de sustrato y producto

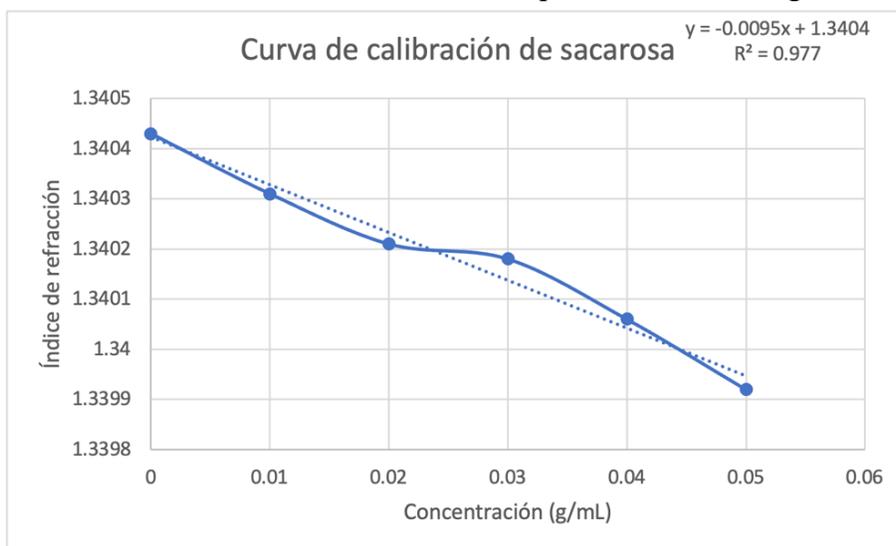
Se realizó el cálculo para determinar la desviación estándar de las mediciones de la corrida 1 para la enzima libre, en triplicado.

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0.0476 - 0.0476)^2 + (0.0486 - 0.0476)^2 + (0.0465 - 0.0476)^2}{3 - 1}} = \pm 0.0032$$

Se utilizó la ecuación 11. Este se repitió para las demás corridas, tanto de la enzima libre como de las tres inmovilizaciones. También, para las corridas para determinar la concentración de enzima sin inmovilizar. Se usaron los datos de los cuadros 24-36 de datos calculados. Los resultados se encuentran en los cuadros 24-36 de datos calculados.

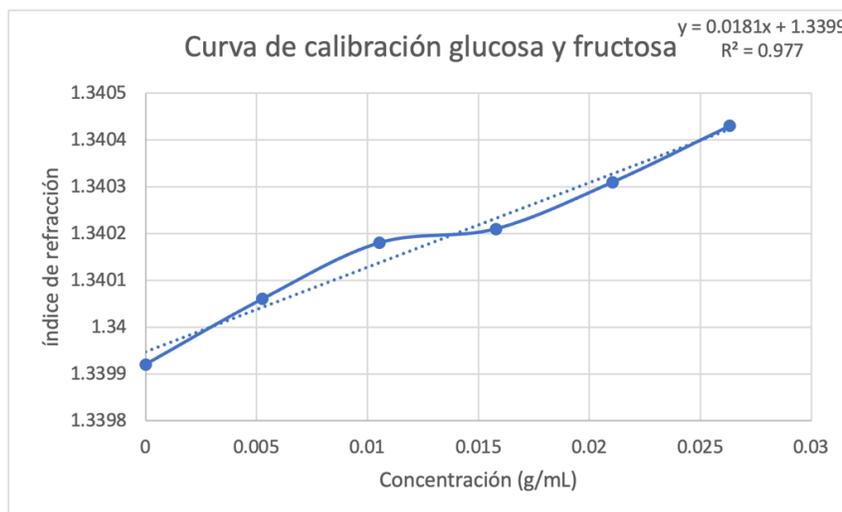
## E. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Figura 89. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



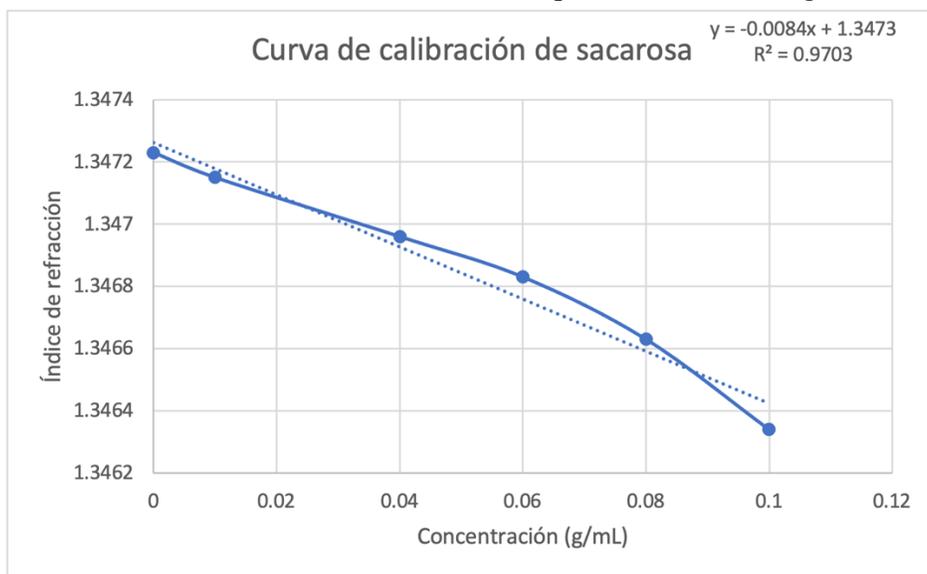
Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 90. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



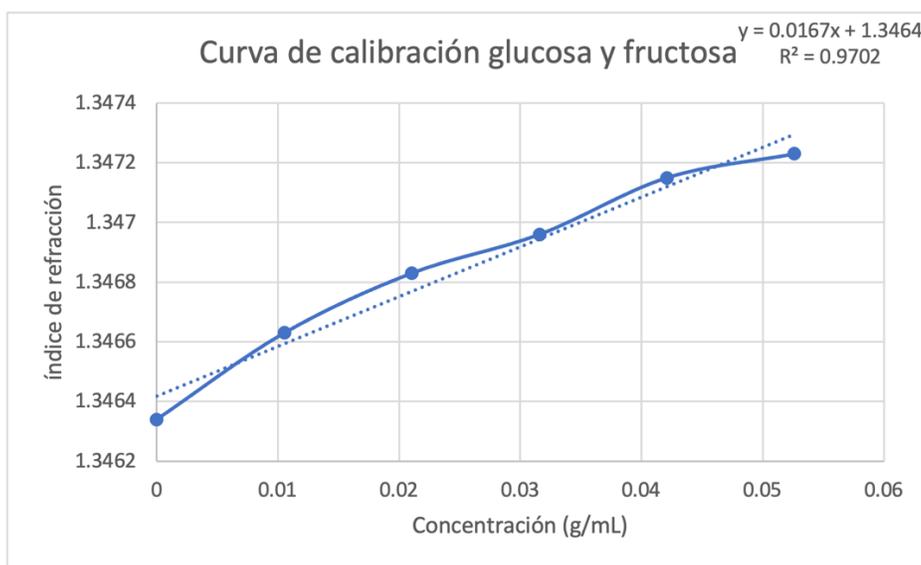
Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.05 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 91. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



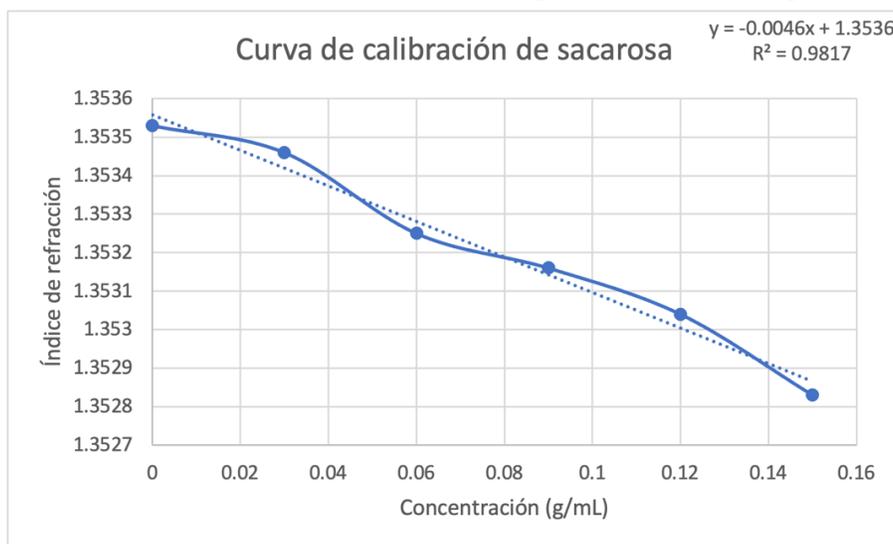
Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 92. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



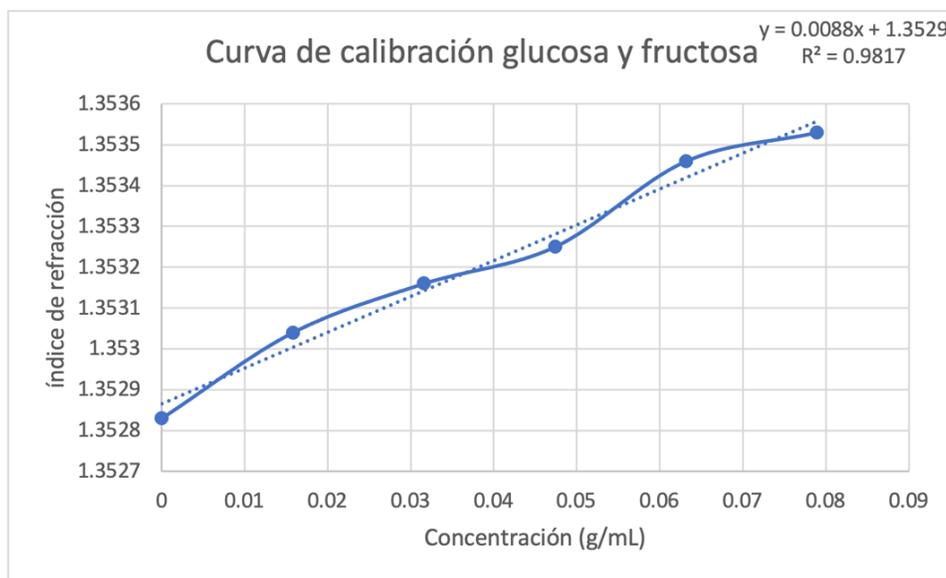
Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.10 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 93. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



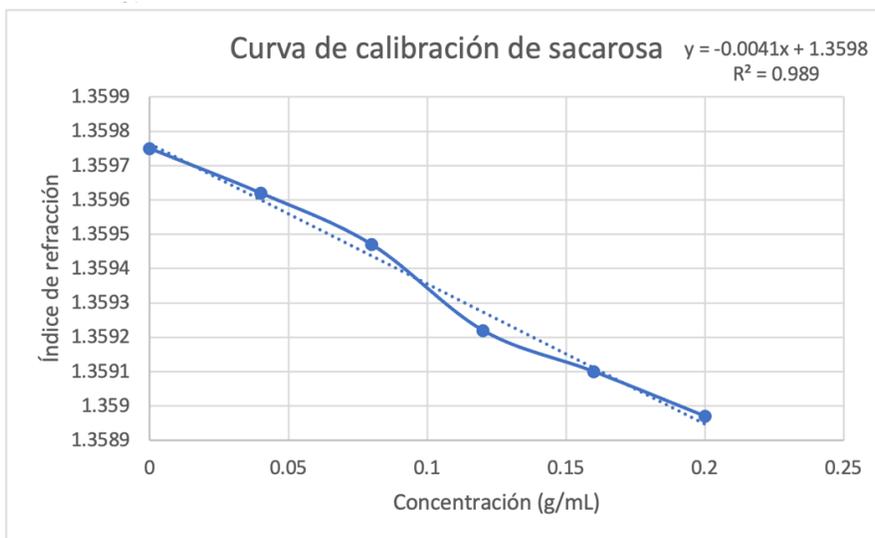
Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 94. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



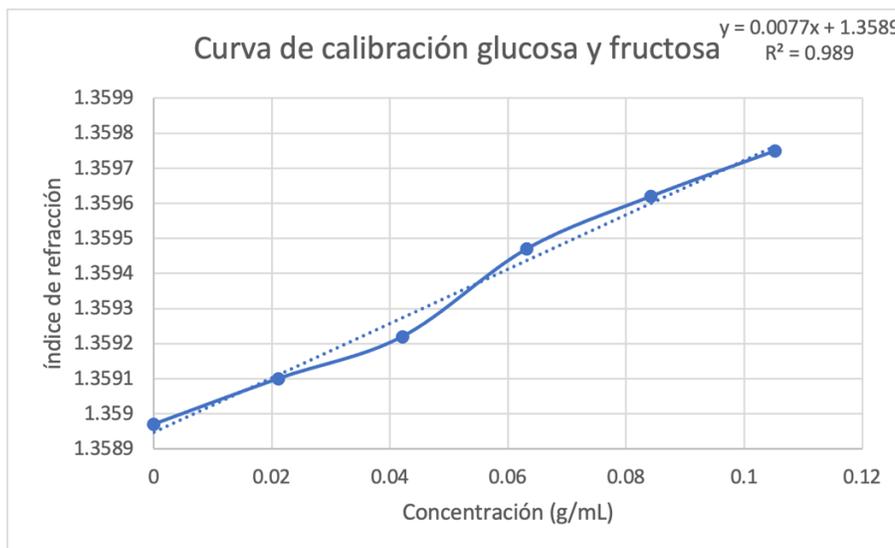
Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 95. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



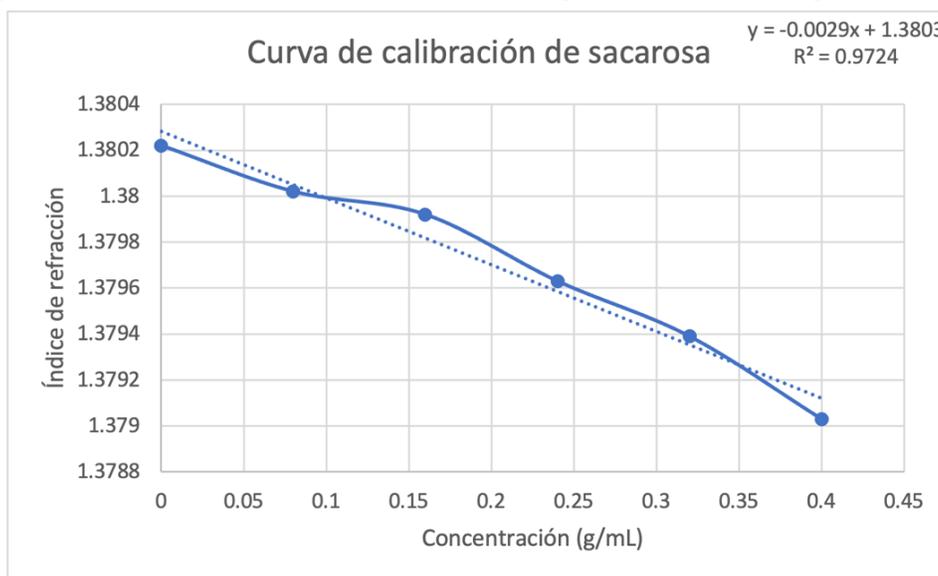
Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 96. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



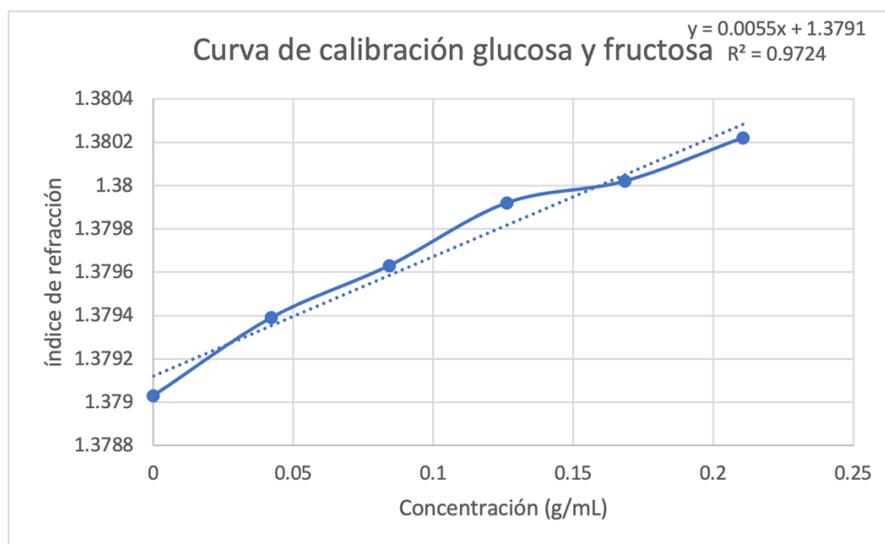
Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 97. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



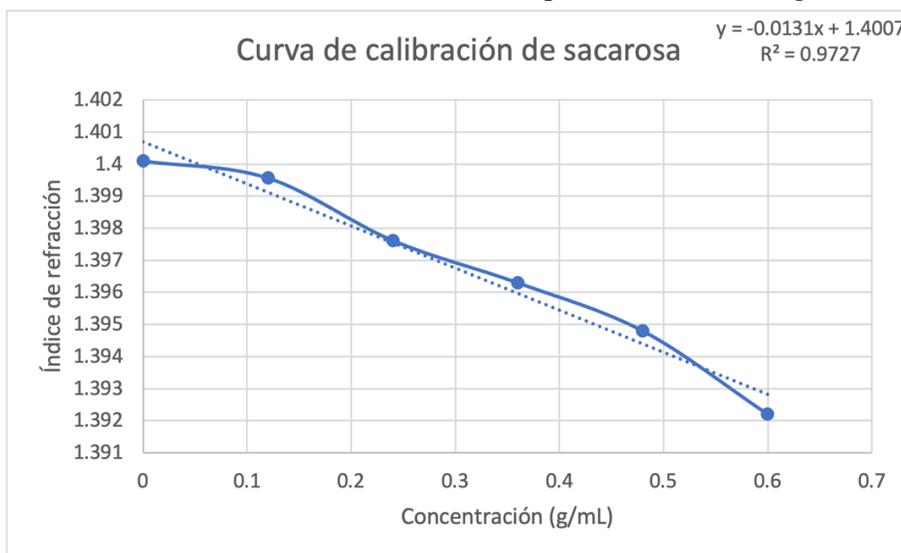
Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 98. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



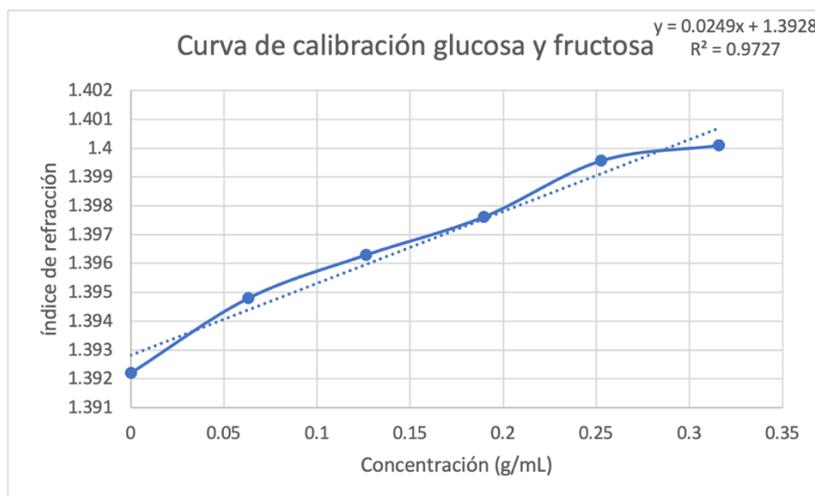
Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

Figura 99. Curva de calibración de la sacarosa para  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



Se realizó una curva de calibración para la sacarosa, con una concentración inicial de esta de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de sacarosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

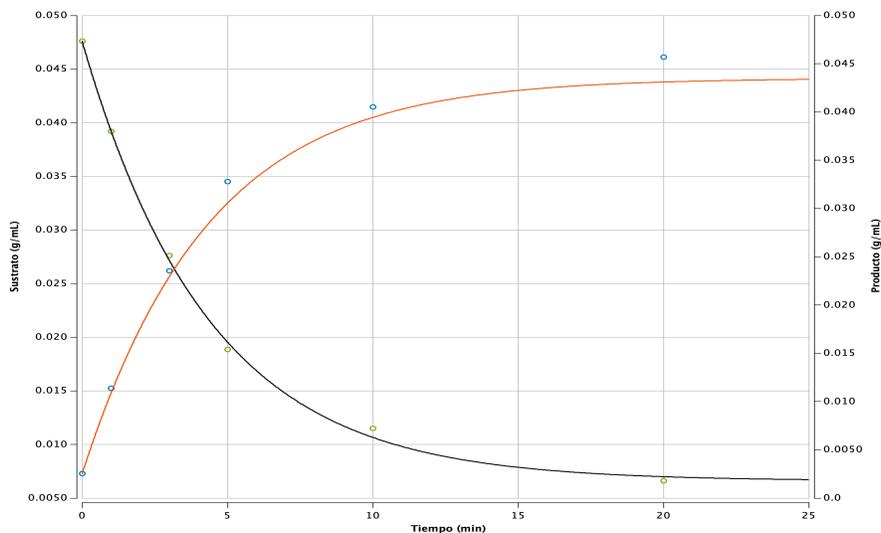
Figura 100. Curva de calibración de glucosa y fructosa para  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa



Se realizó una curva de calibración para la glucosa y fructosa, con una concentración inicial de  $0.60 \pm 0.0005$  g/mL de sacarosa. Se realizó con las concentraciones de las soluciones preparadas y su índice de refracción. La ecuación de la curva permitió calcular las concentraciones de glucosa y fructosa de las mediciones de las corridas de condiciones de la enzima libre e inmovilizada, al medir su índice de refracción.

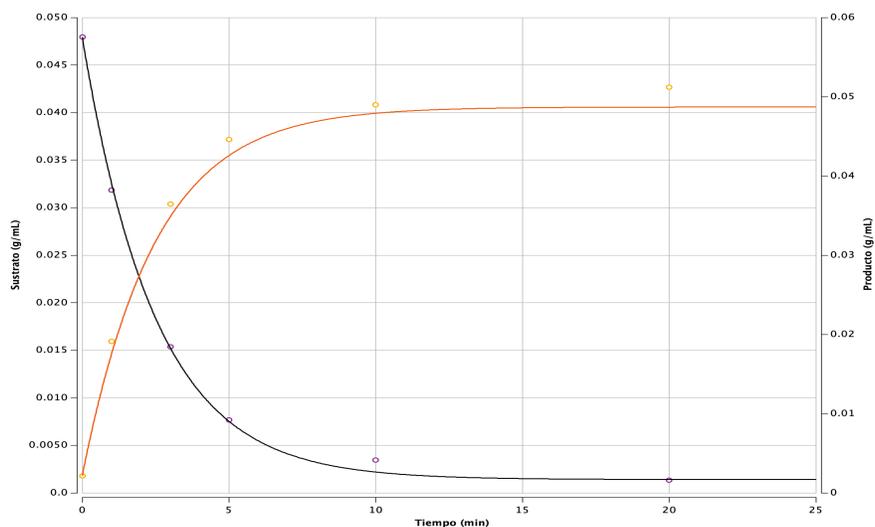
## F. MODELOS CINÉTICOS

Figura 101. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

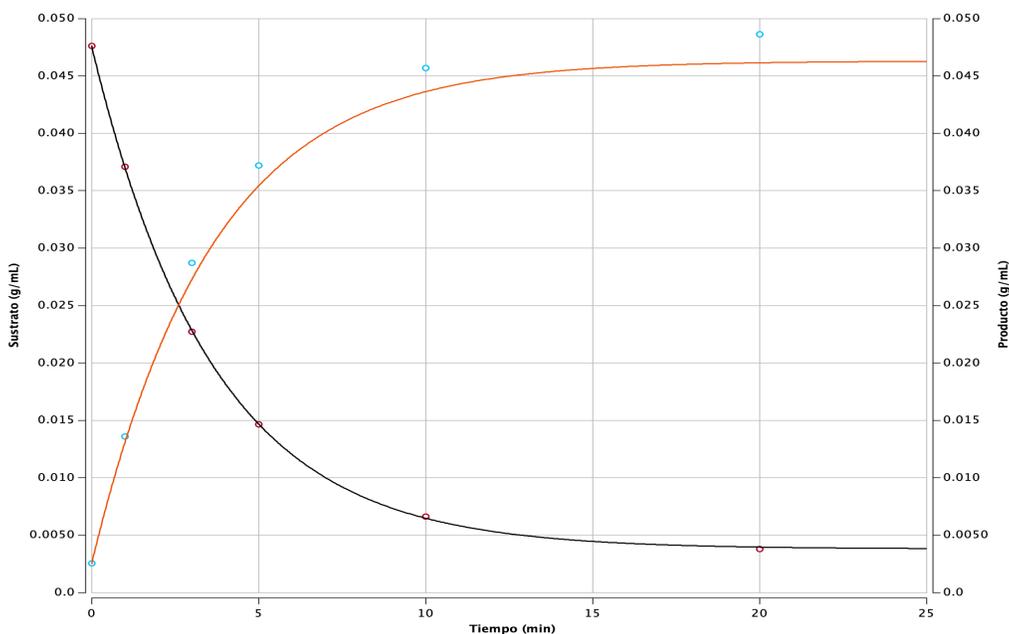
Figura 102. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

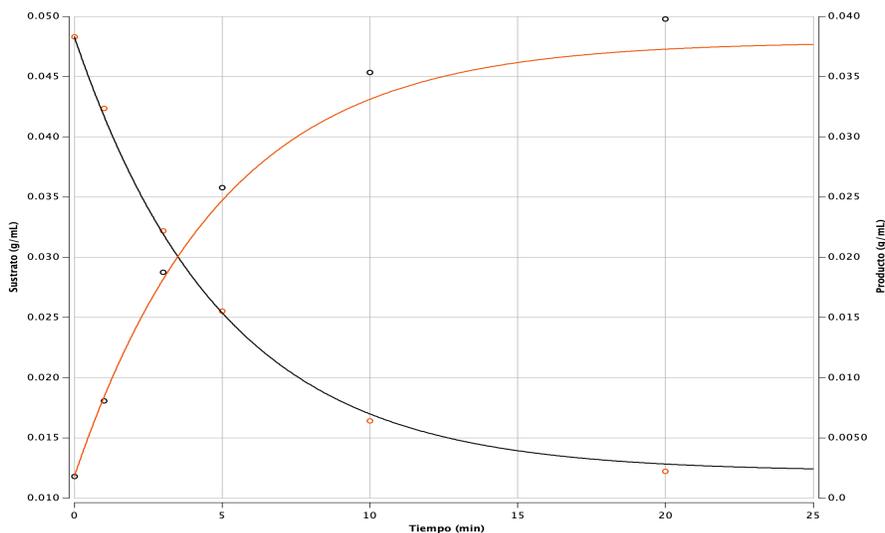
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 103. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



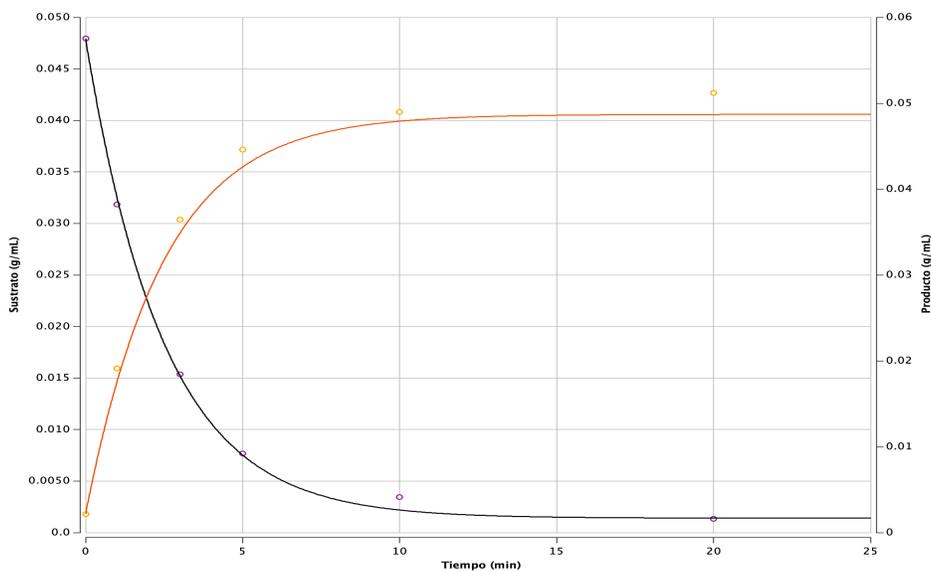
Es el modelo para la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 104. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

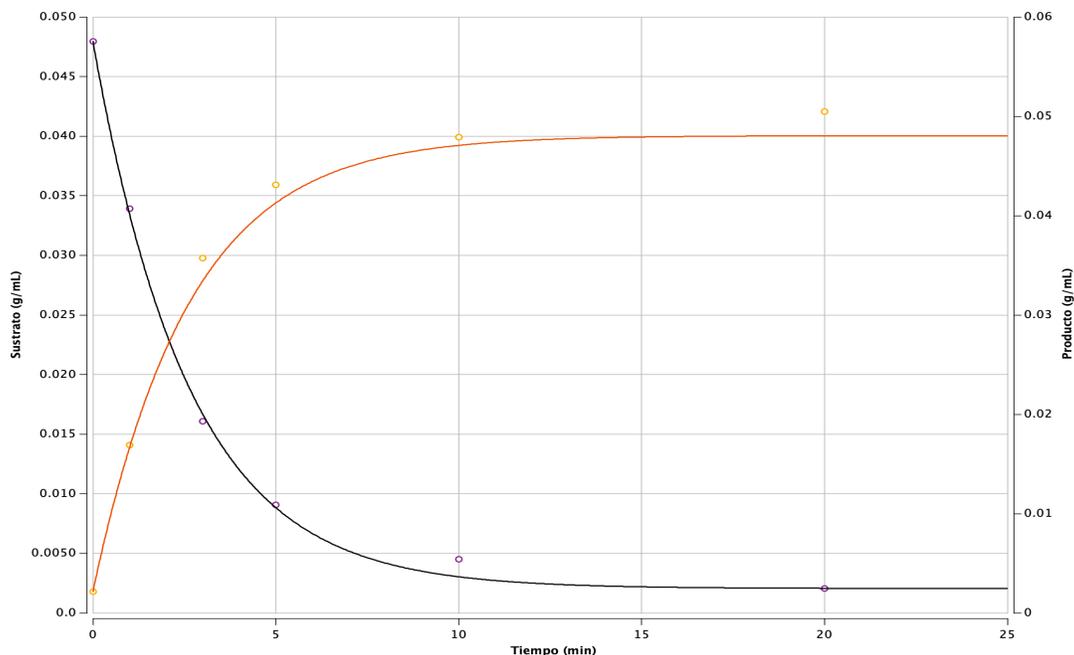
Figura 105. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 3 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

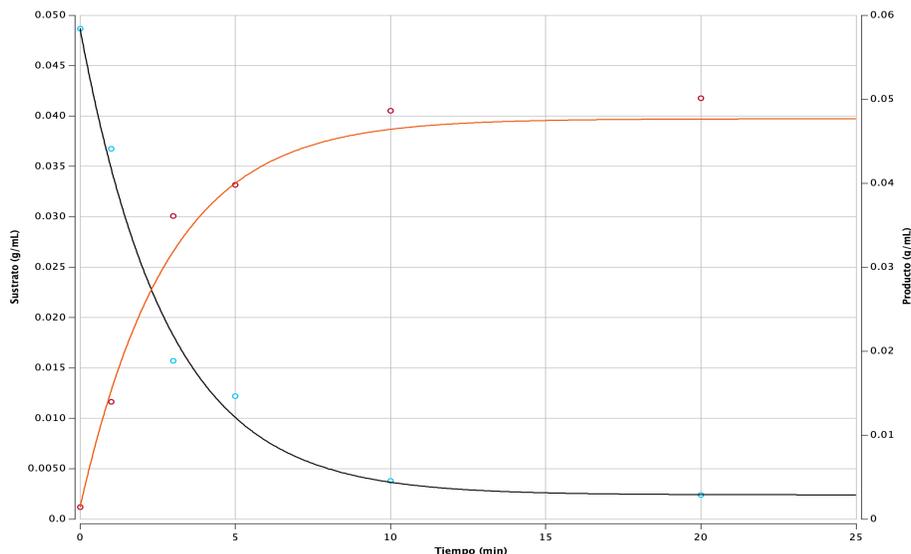
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 106. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



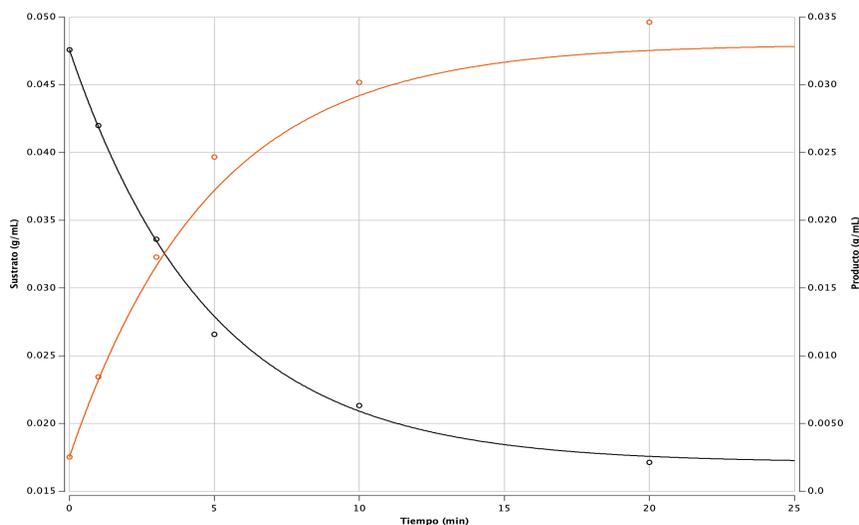
Es el modelo para la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 107. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

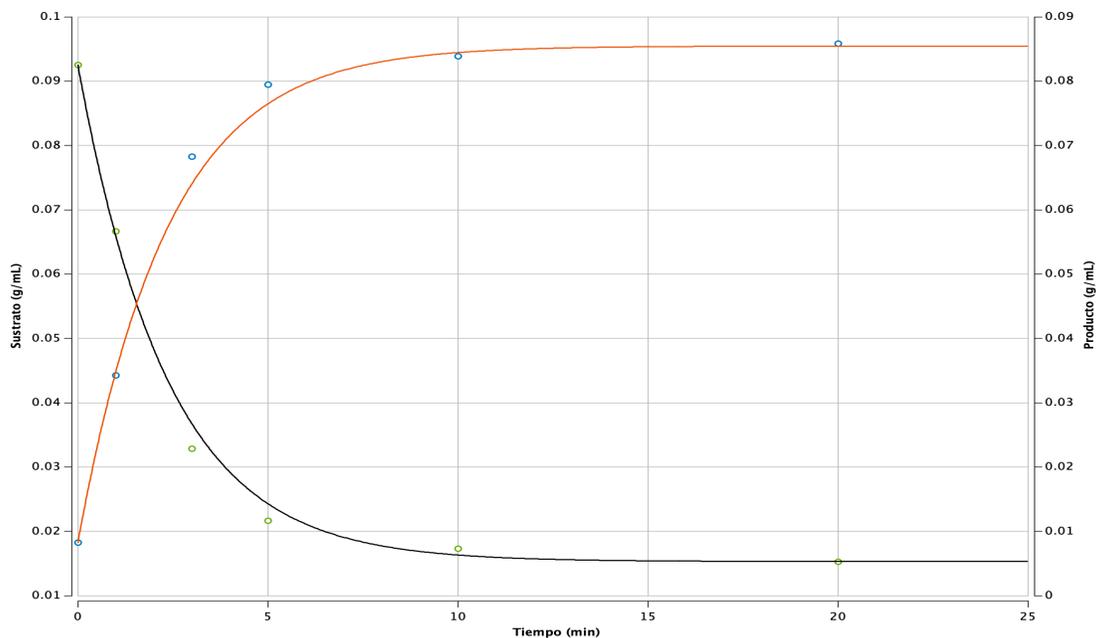
Figura 108. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

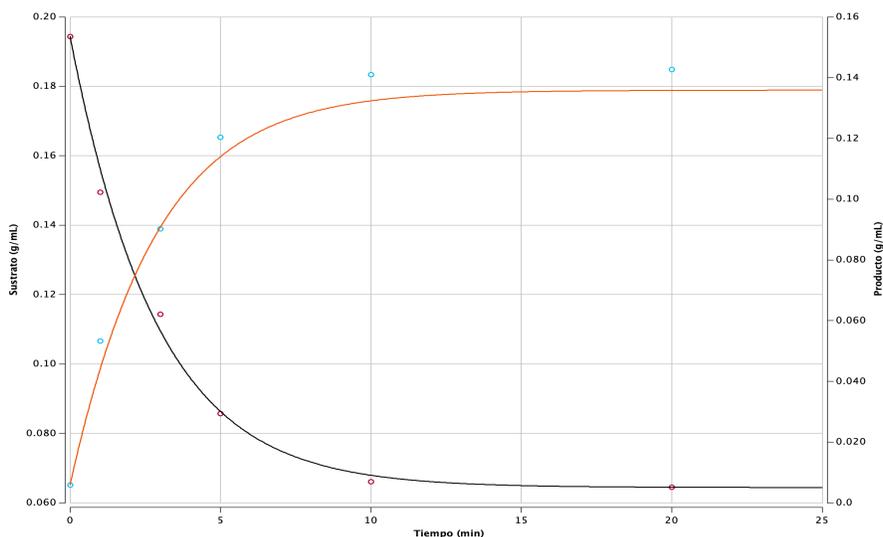
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 109. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



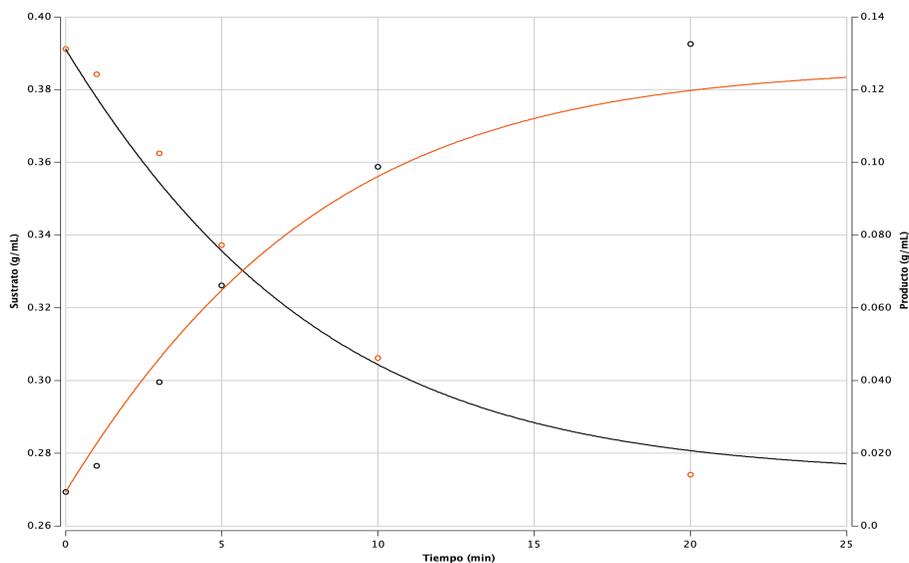
Es el modelo para la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 110. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

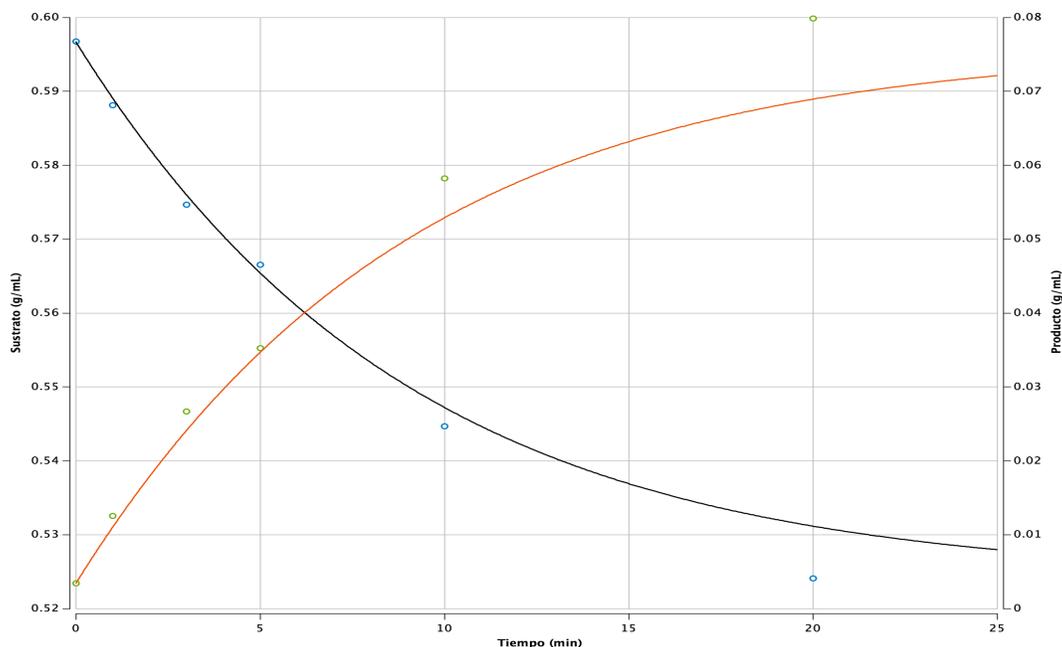
Figura 111. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

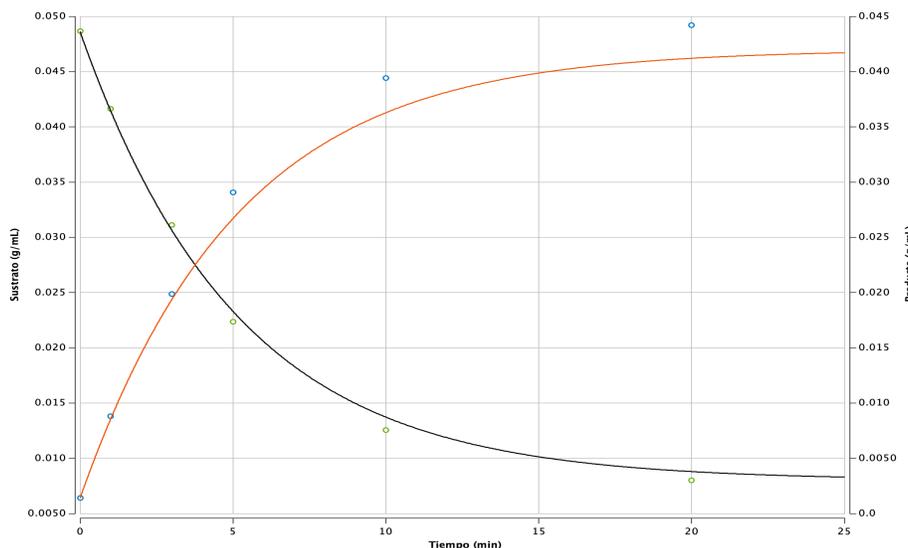
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 112. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



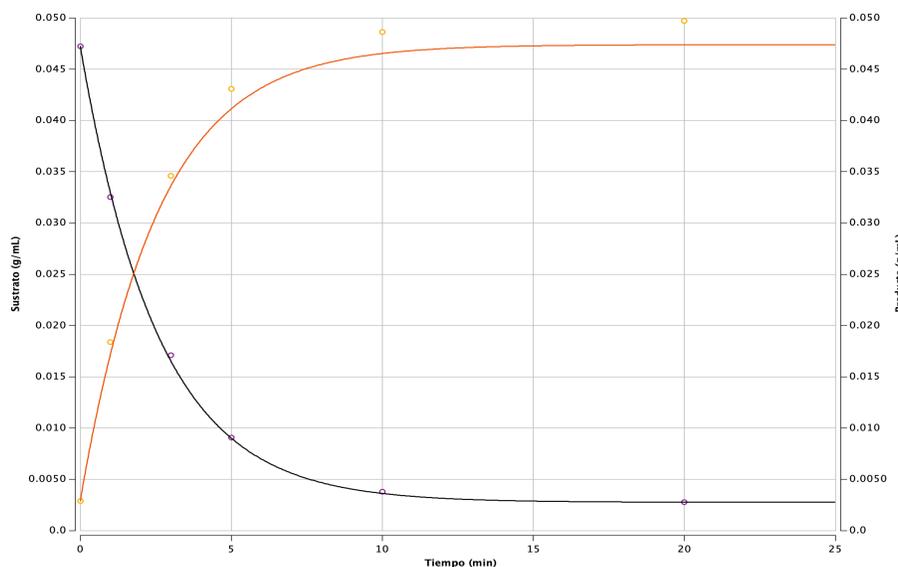
Es el modelo para la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 113. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

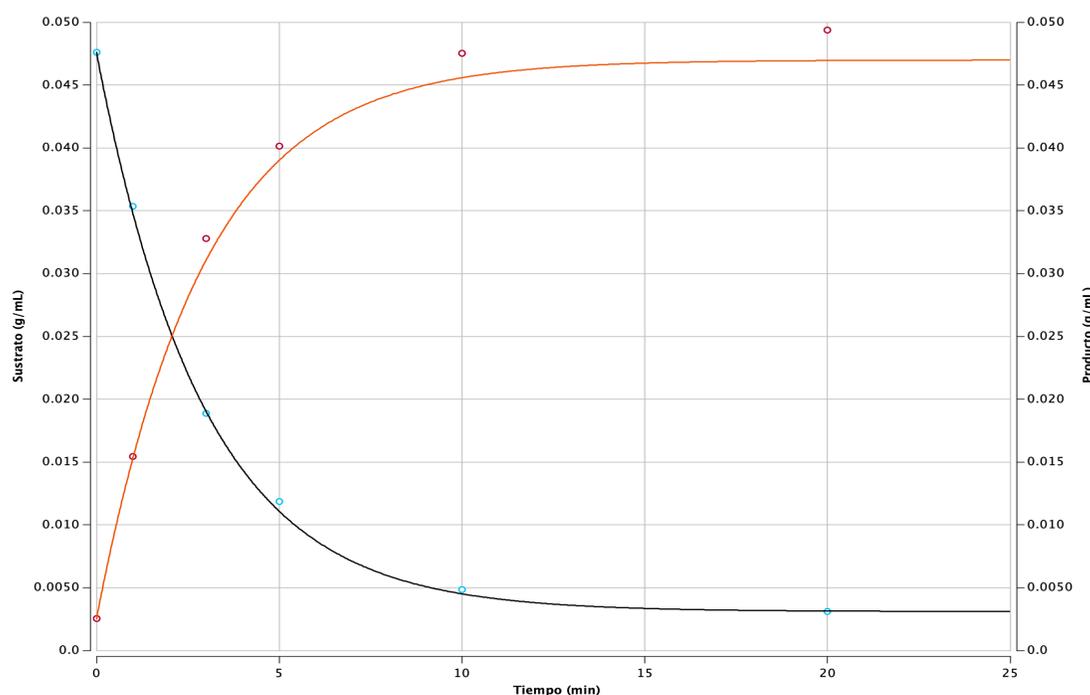
Figura 114. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para

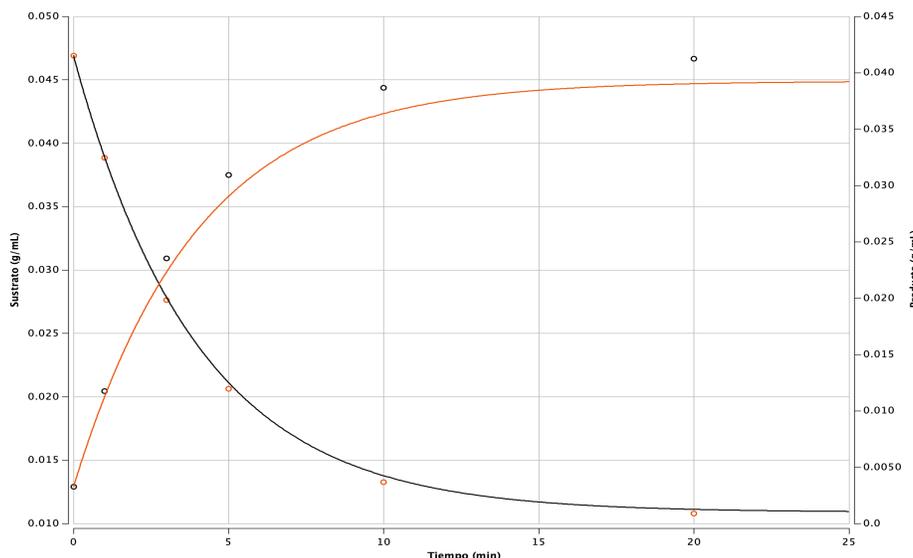
determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 115. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



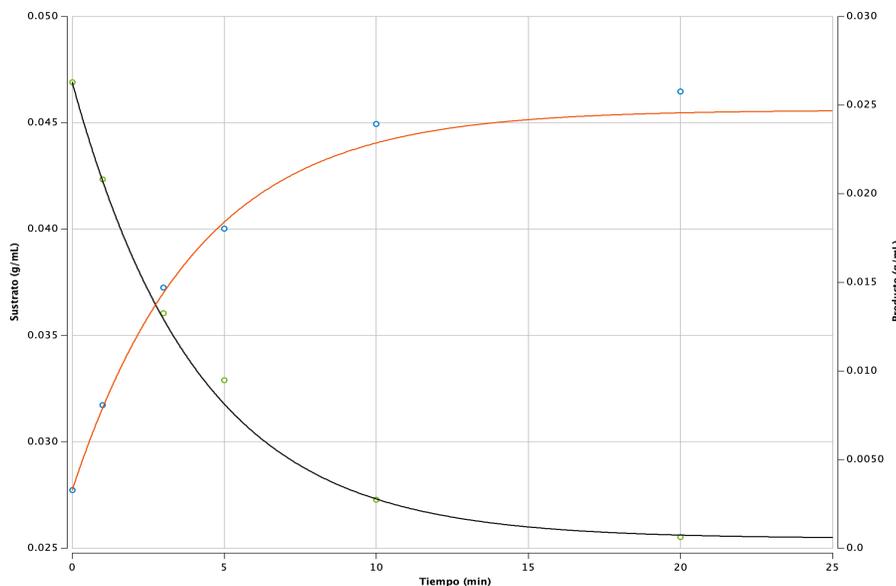
Es el modelo para la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 116. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

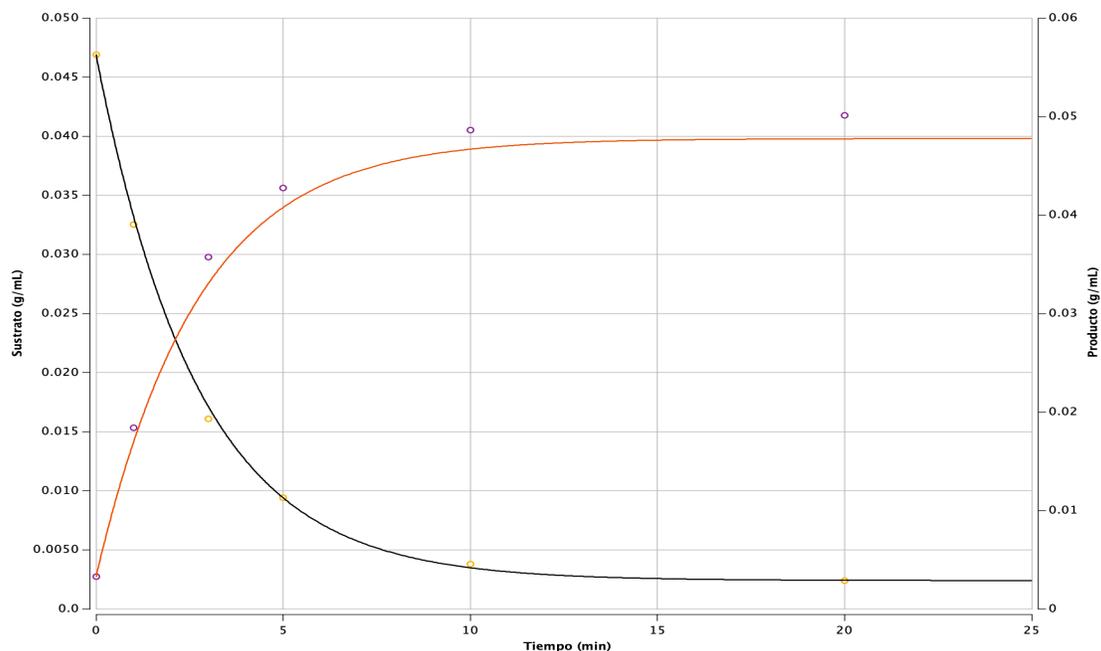
Figura 117. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH  $3 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

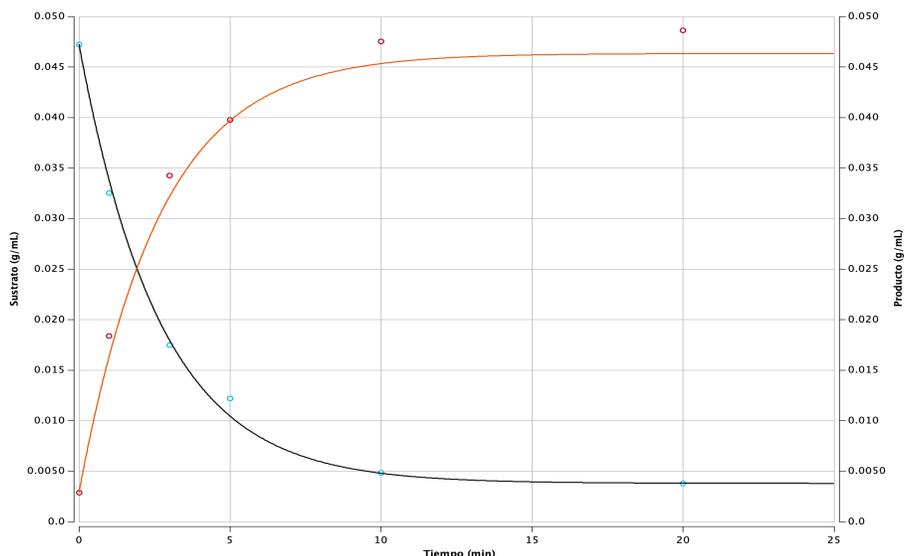
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 118. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



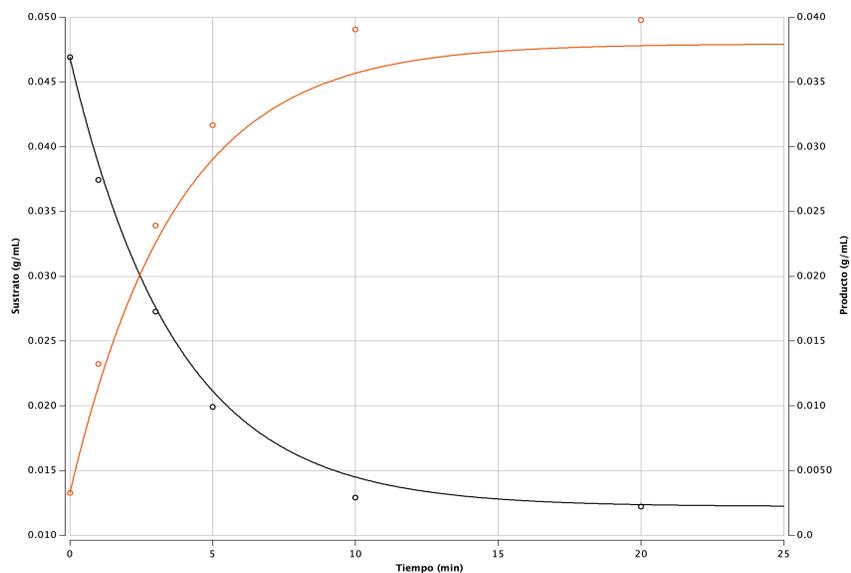
Es el modelo para la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 119. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH  $7 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

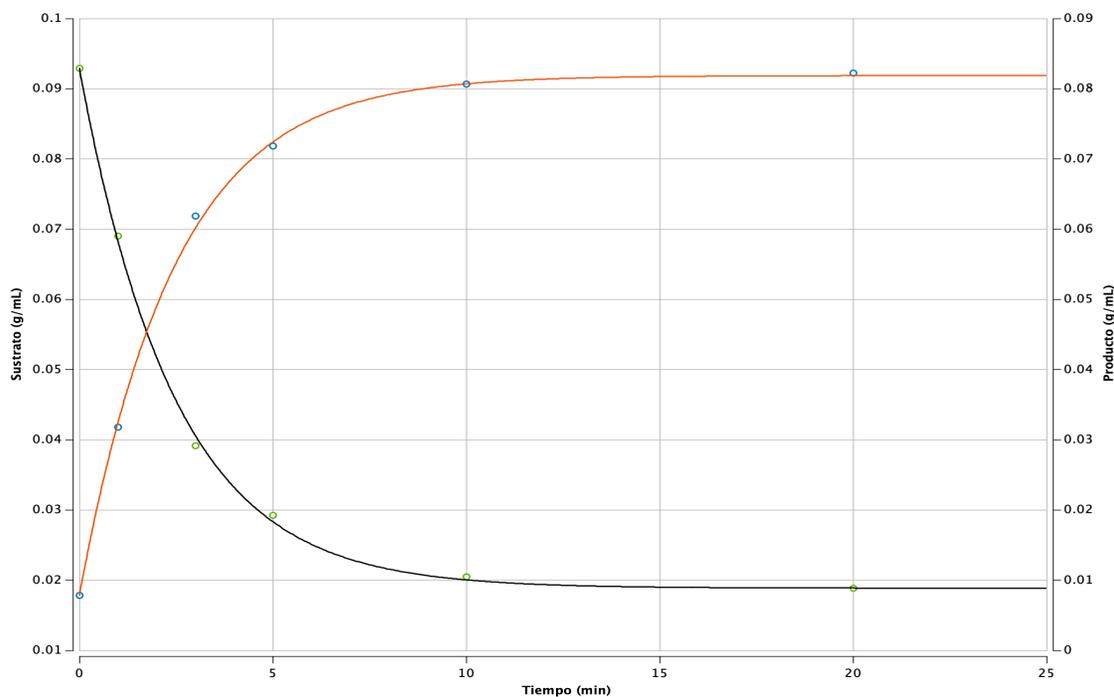
Figura 120. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a pH  $9 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

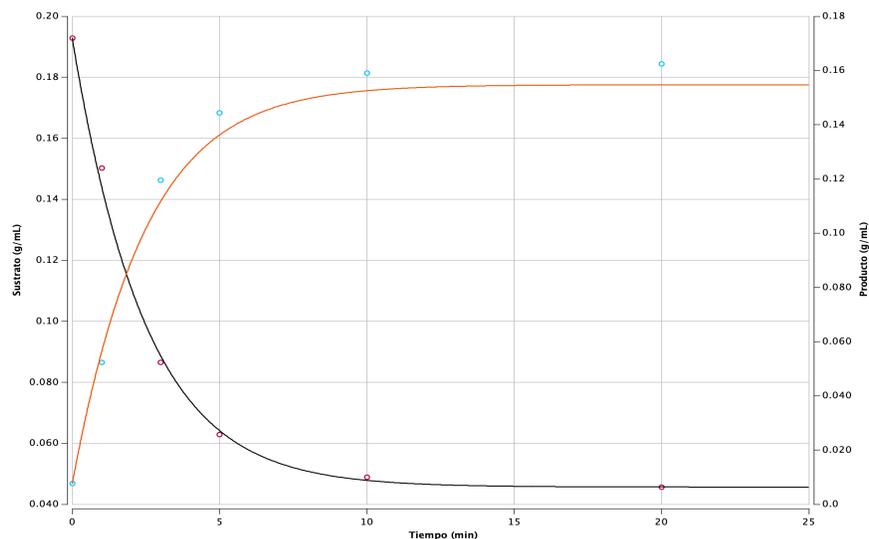
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 121. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



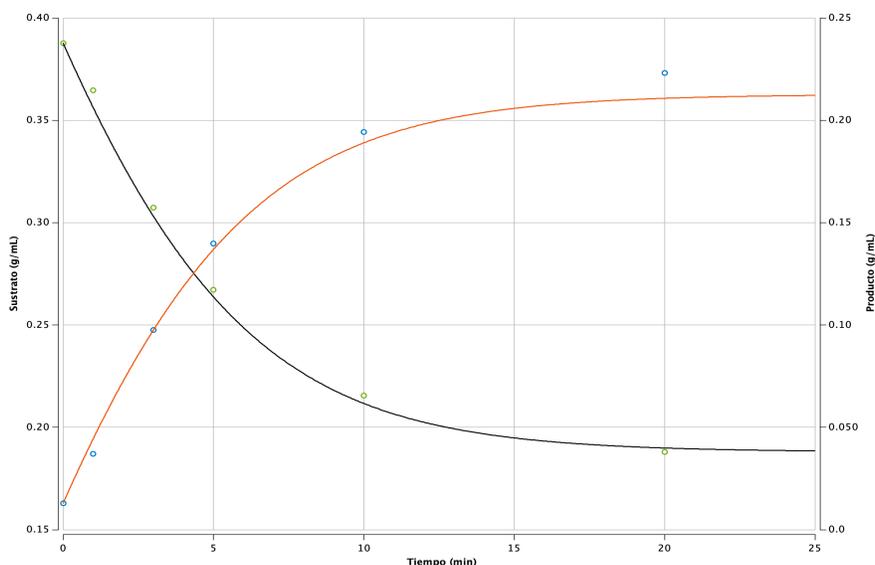
Es el modelo para la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 122. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

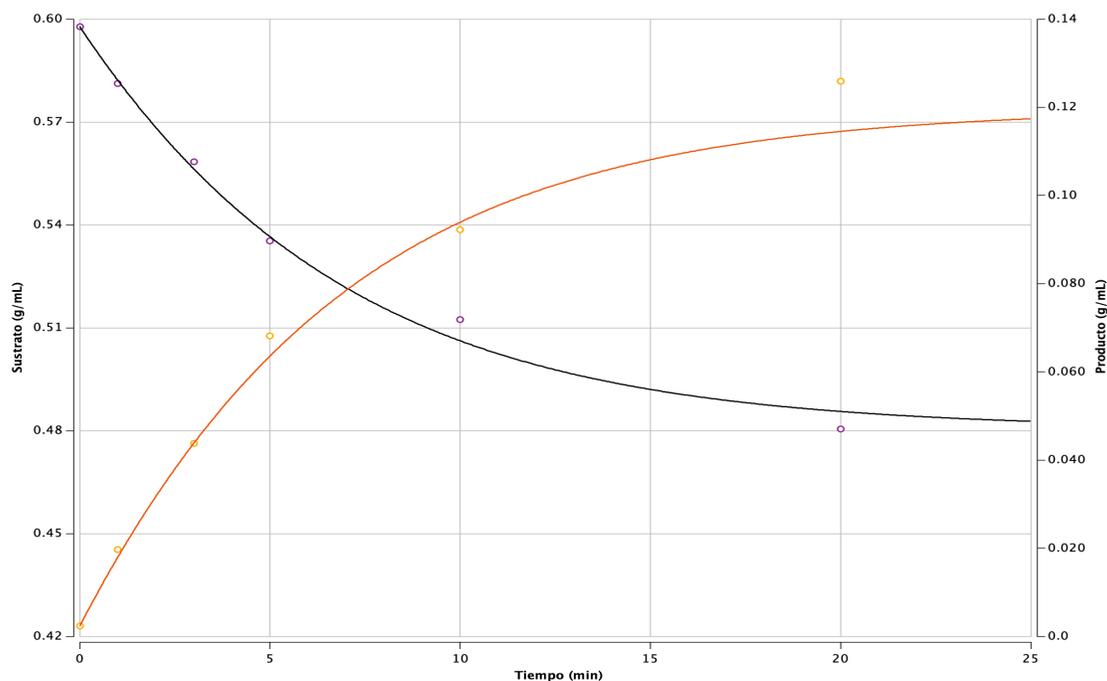
Figura 123. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

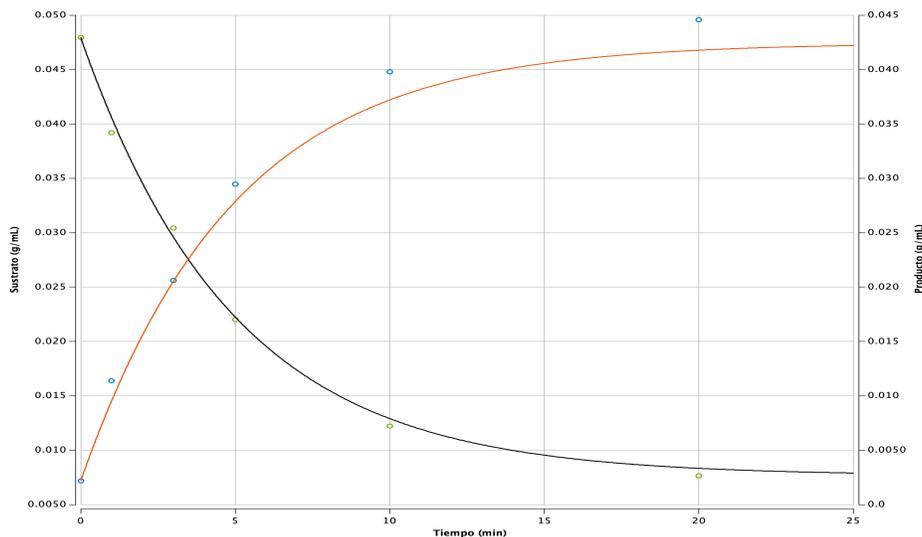
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 124. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



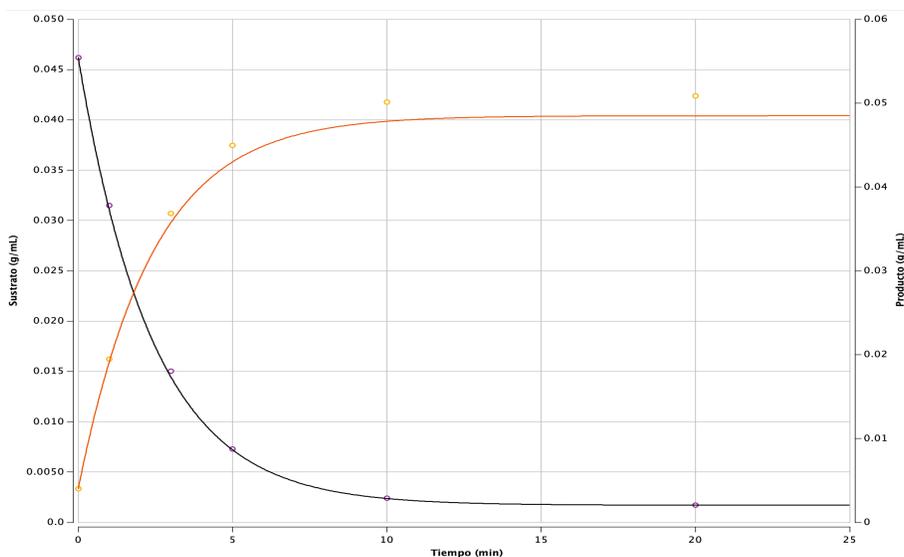
Es el modelo para la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 125. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

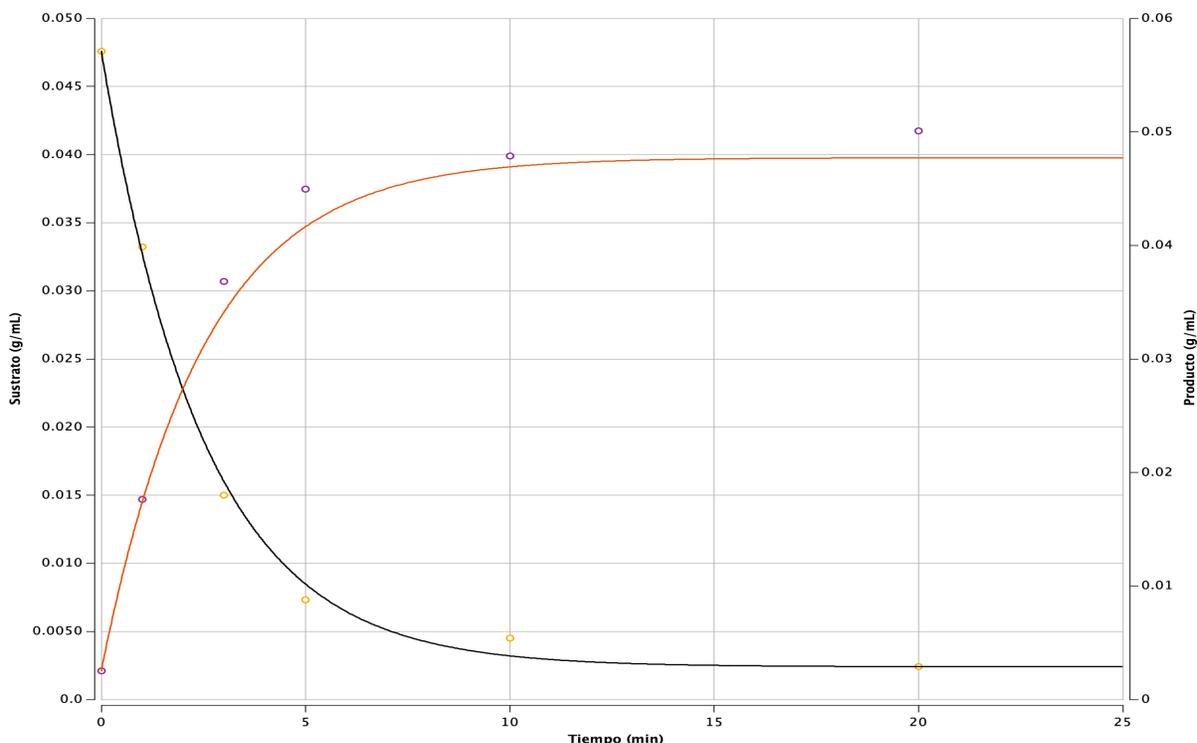
Figura 126. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 2 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

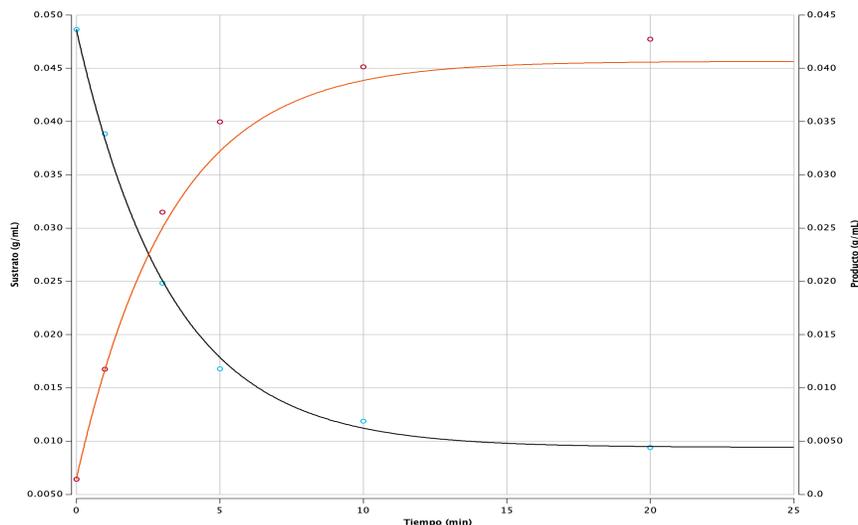
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 127. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



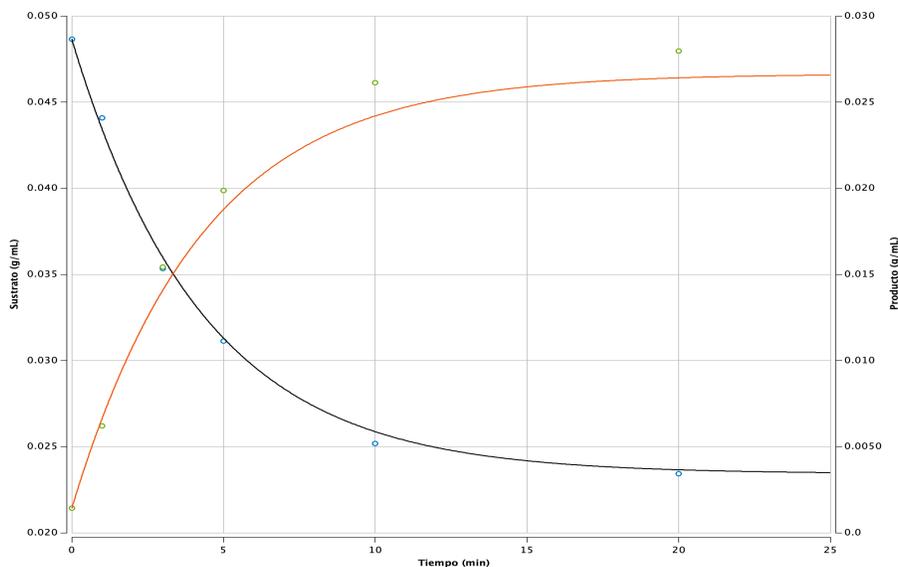
Es el modelo para la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 128. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 4 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

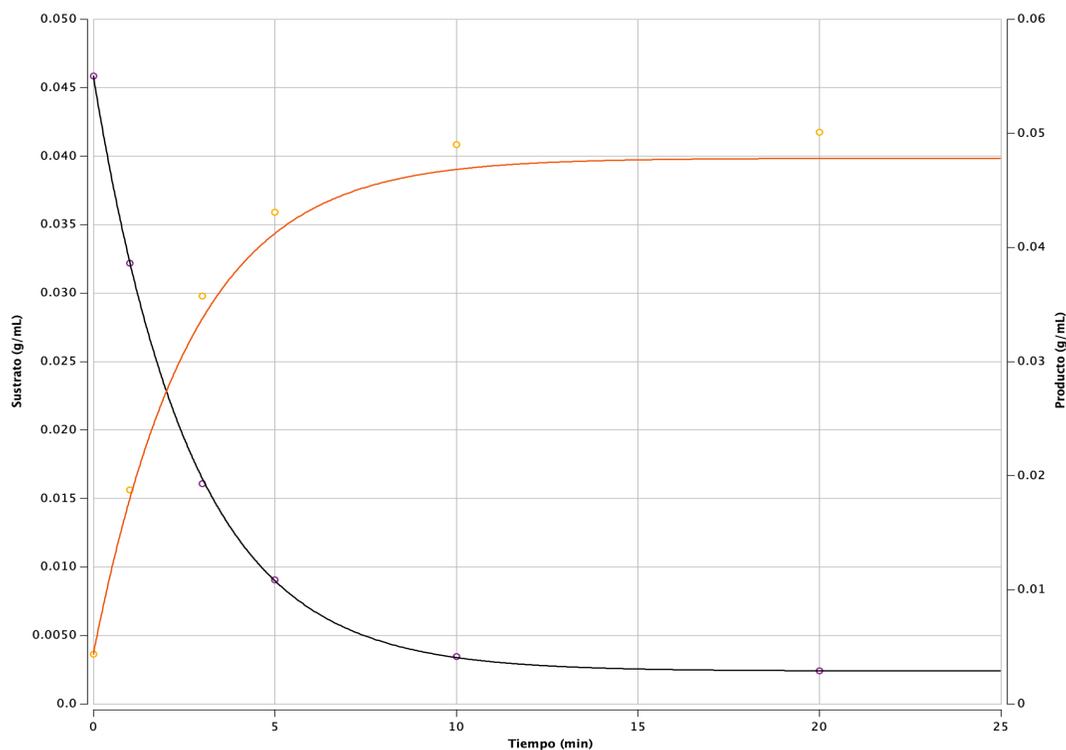
Figura 129. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a pH  $3 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

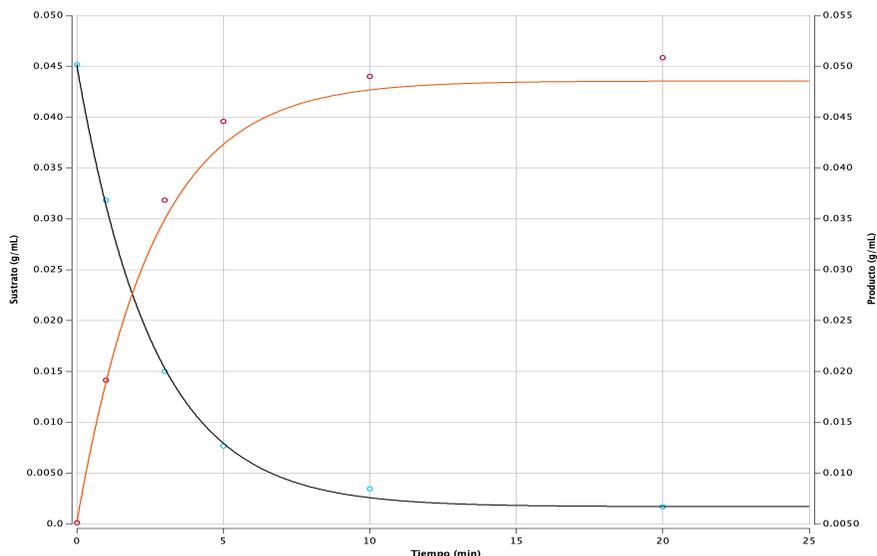
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 130. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



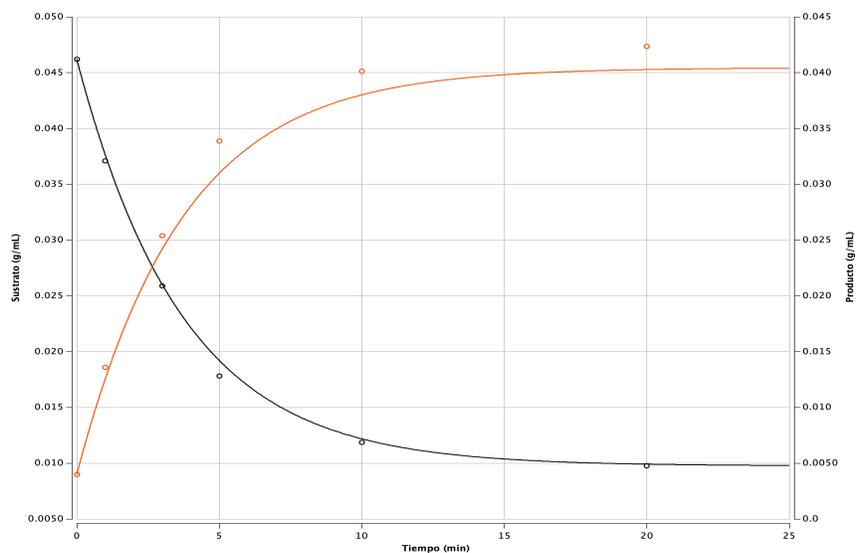
Es el modelo para la corrida 6 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 131. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 7 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

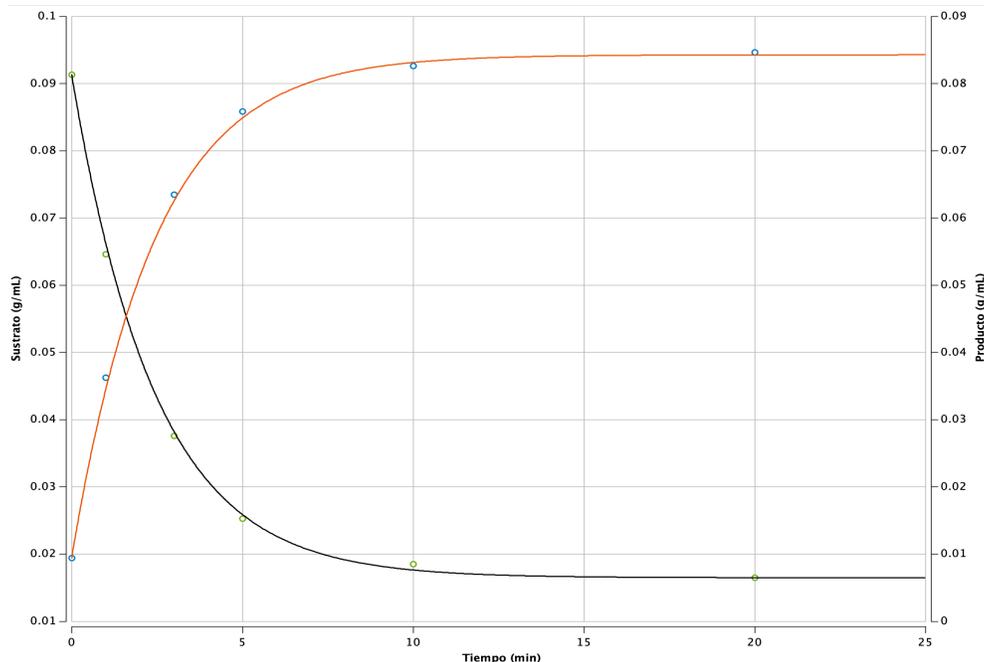
Figura 132. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a  $\text{pH } 9 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 8 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

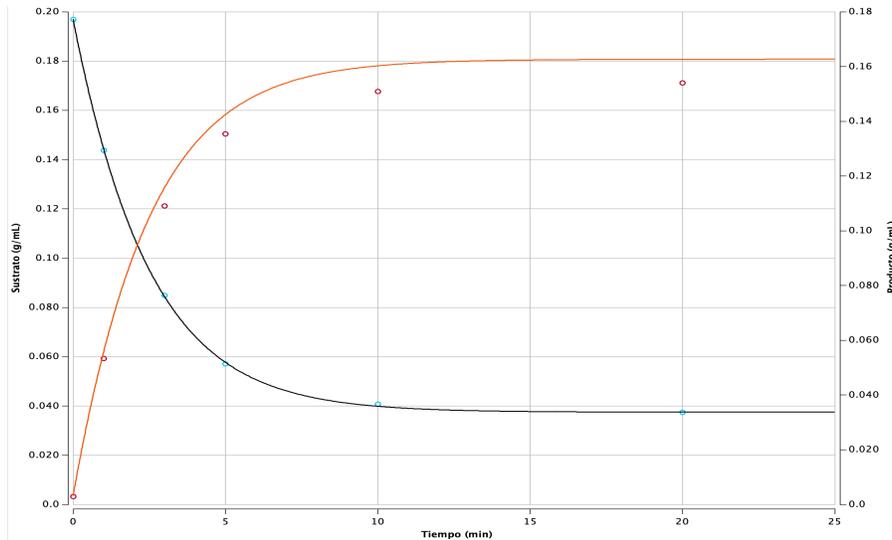
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 133. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



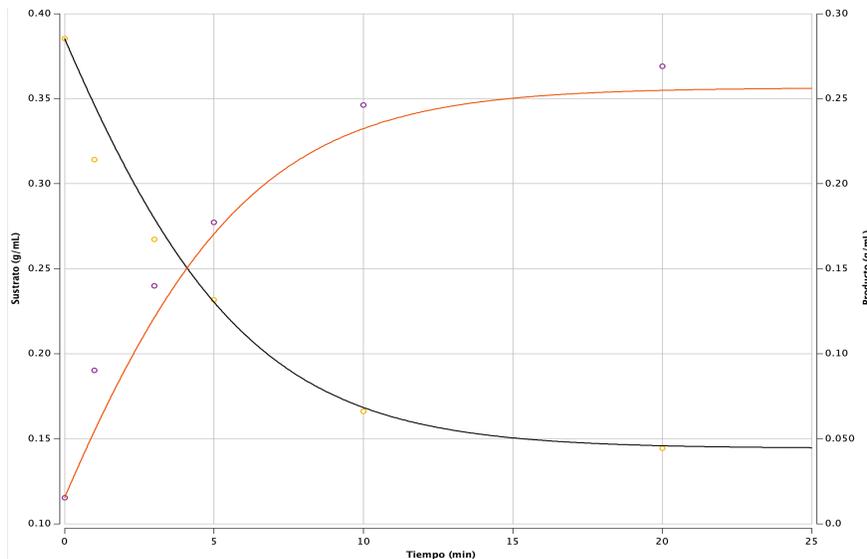
Es el modelo para la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 134. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 11 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005$  g/mL. Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

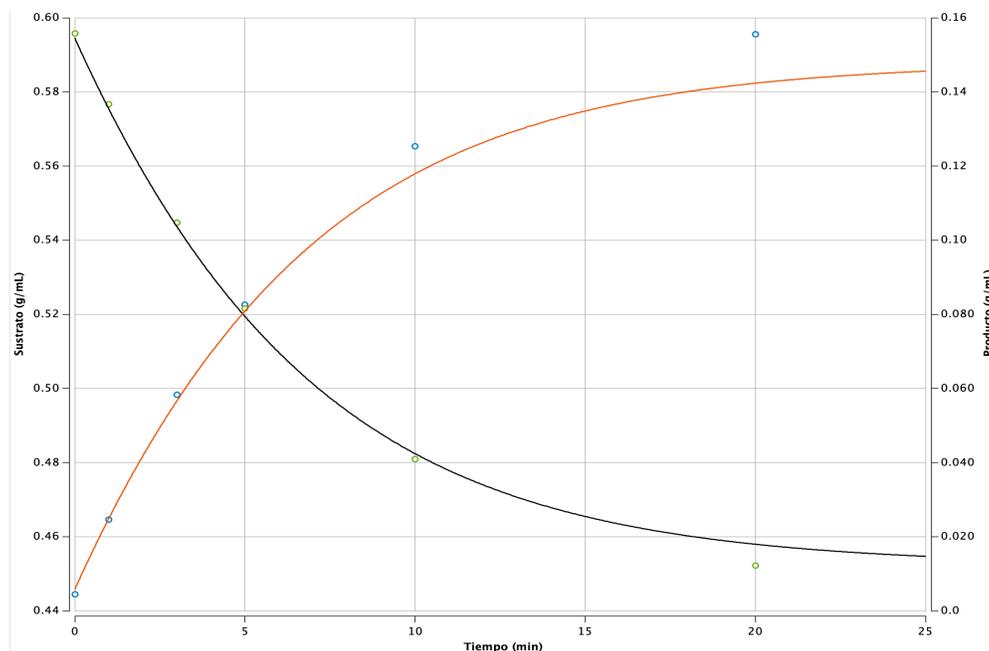
Figura 135. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

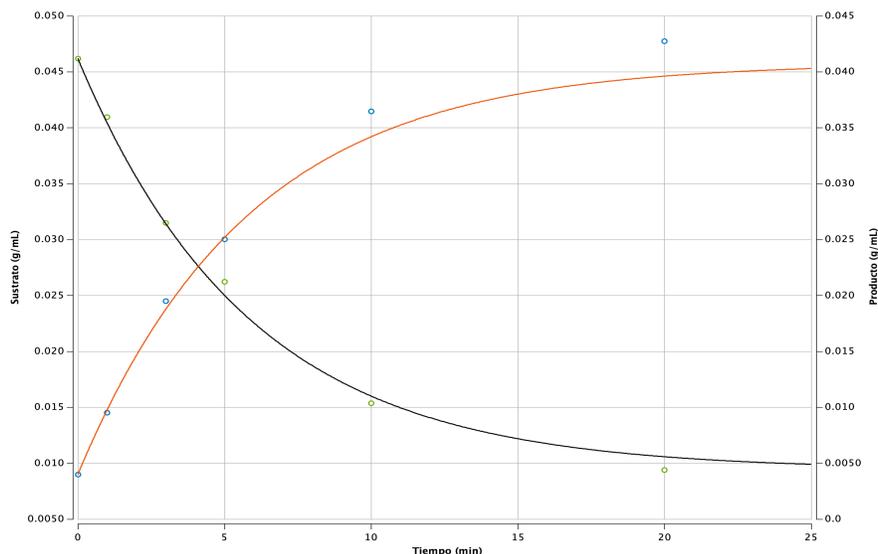
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 136. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



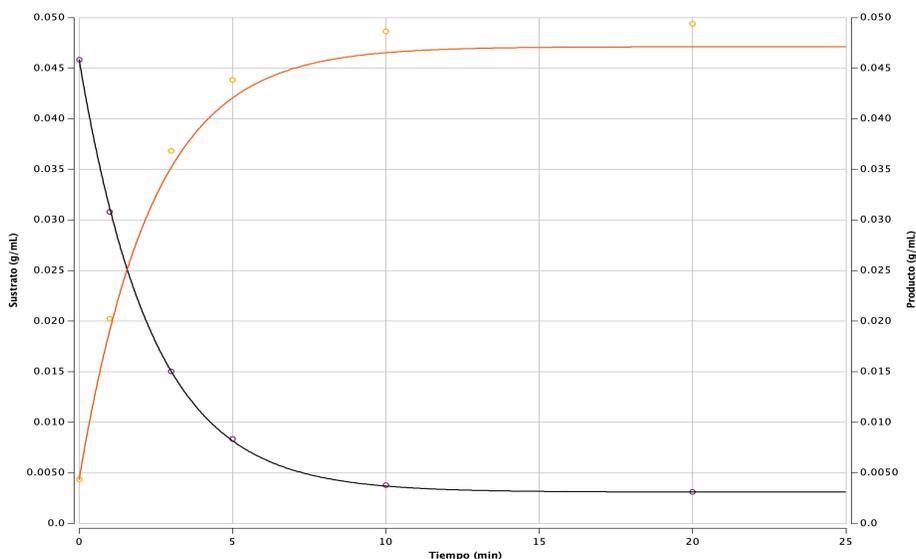
Es el modelo para la corrida 13 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 137. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 1 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $40 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

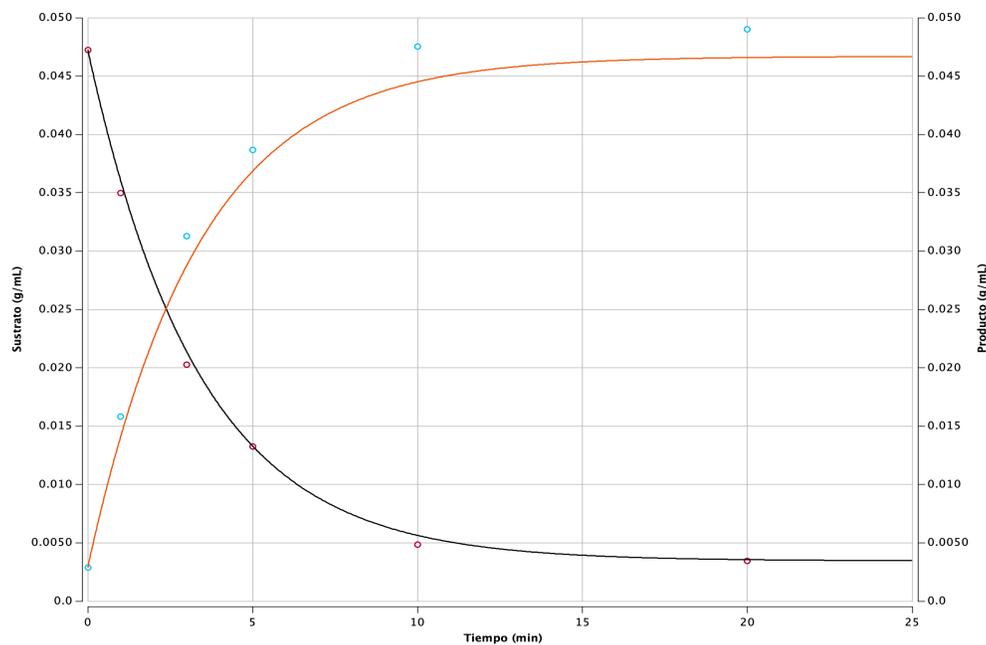
Figura 138. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 2 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

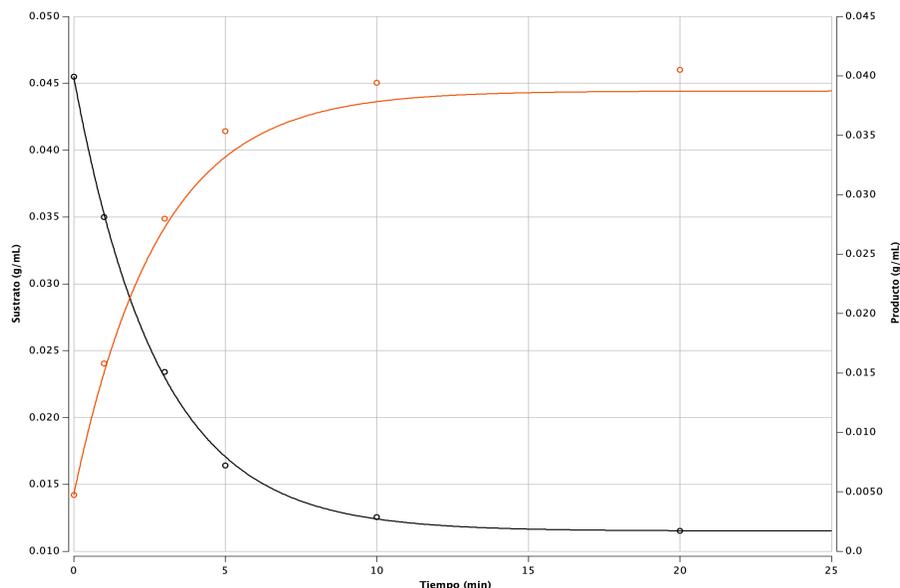
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 139. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$



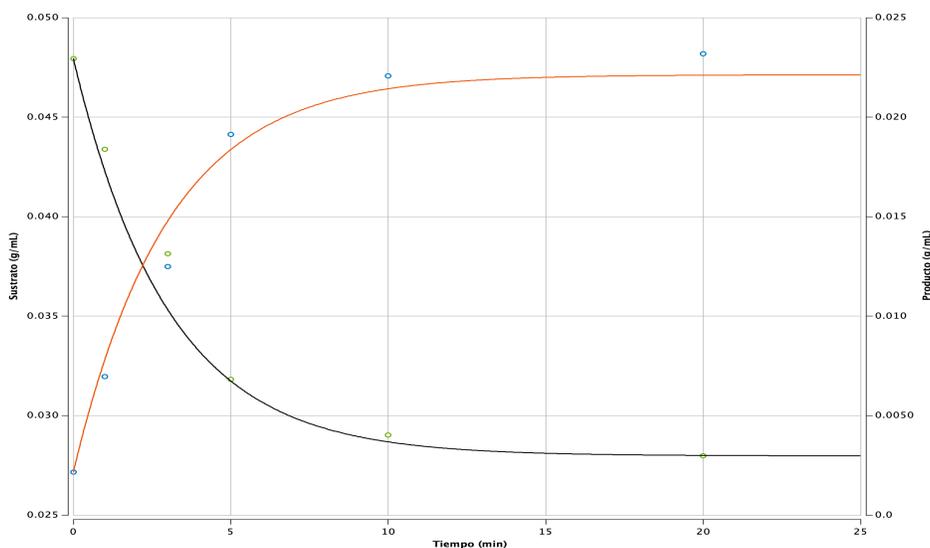
Es el modelo para la corrida 3 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $60 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 140. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a temperatura  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$



Es el modelo para la corrida 4 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $70 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

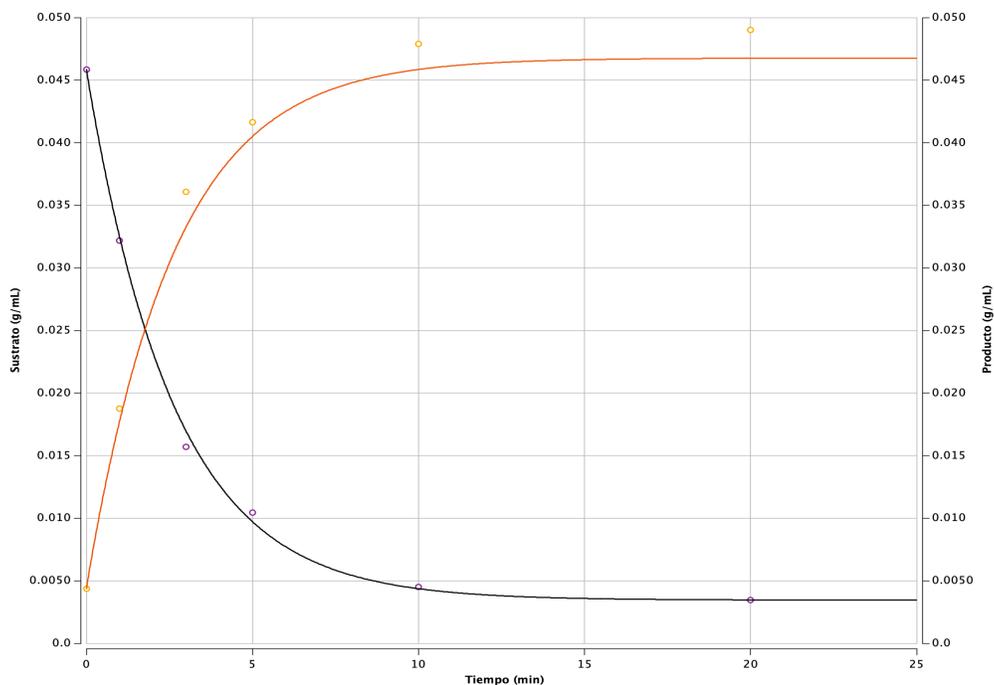
Figura 141. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $\text{pH } 3 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 5 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

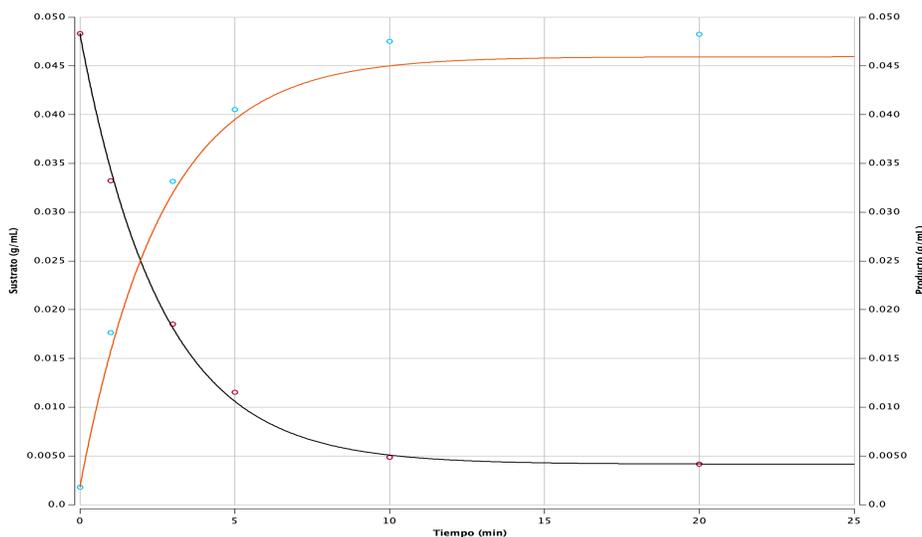
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 3 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 142. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a  $\text{pH } 6 \pm 0.005$



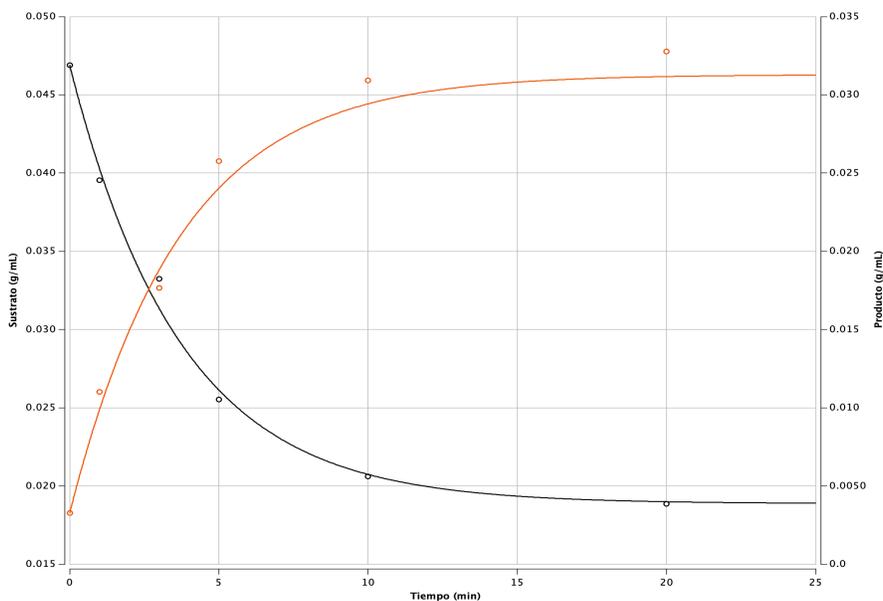
Es el modelo para la corrida 6 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 6 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 143. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH  $7 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 7 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $7 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

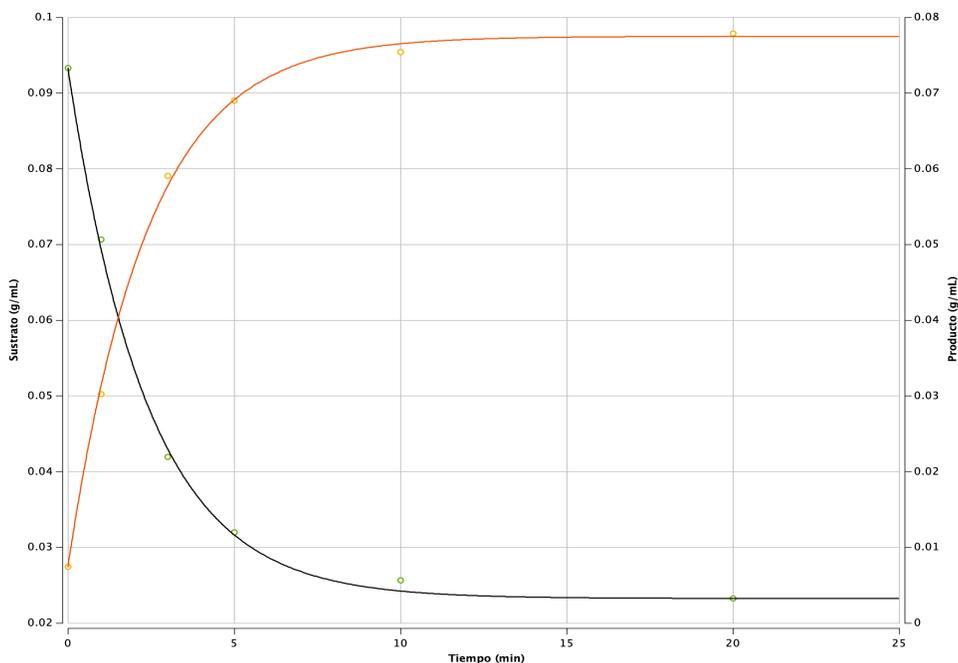
Figura 144. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a pH  $9 \pm 0.005$



Es el modelo para la corrida 8 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

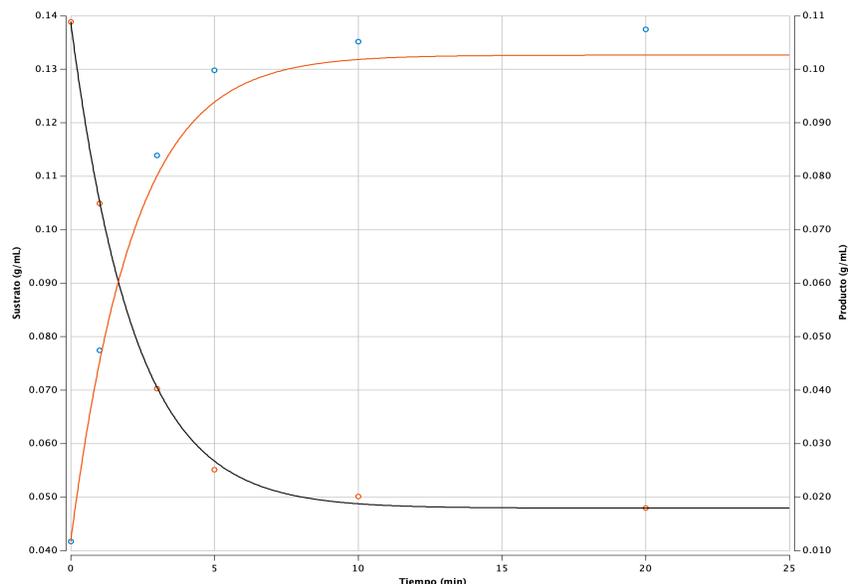
a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.05 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 145. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



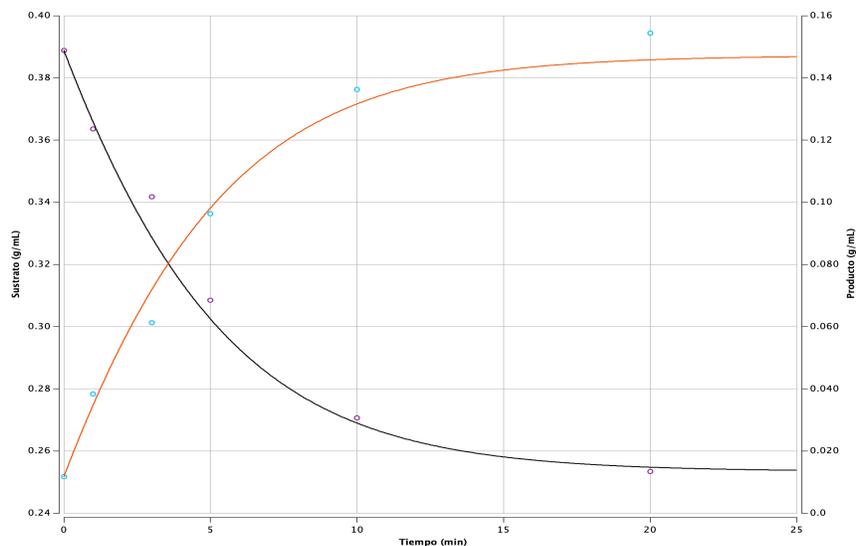
Es el modelo para la corrida 9 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.10 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

Figura 146. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 10 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ$  C, pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005$  g/mL. Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 8. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

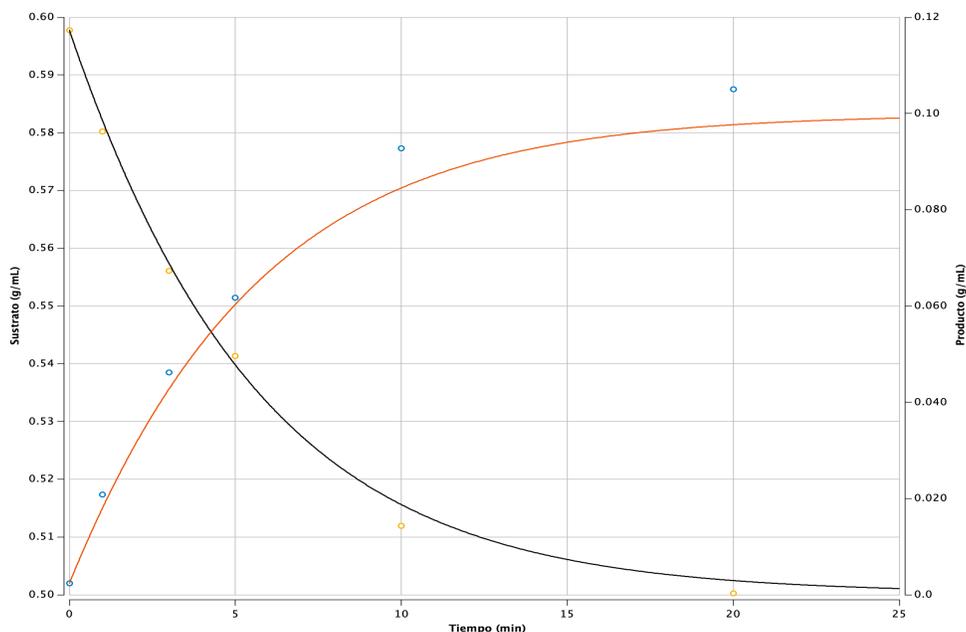
Figura 147. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.40 \pm 0.0005$  g/mL



Es el modelo para la corrida 12 del Cuadro 3, en la cual se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida

a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.40 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

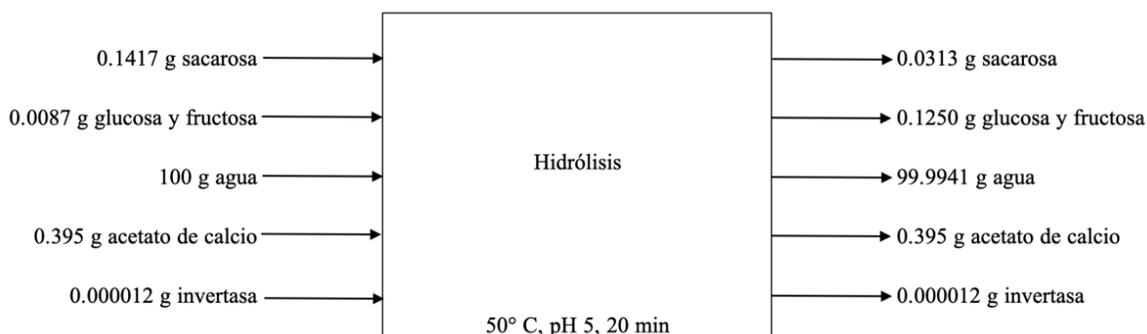
Figura 148. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio a una concentración inicial de sustrato de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$



Es el modelo para la corrida 13 del Cuadro 3, en la cuál se evalúa la temperatura, para determinar el valor óptimo. Este se realizó en Berkeley Madonna, con los datos de la corrida a una temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH } 5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.60 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ . Se obtuvo con el modelo presentado en la ecuación 9. Se pueden observar los puntos de la concentración de sustrato (eje “y” izquierdo) y los puntos de la concentración de producto (eje “y” derecho).

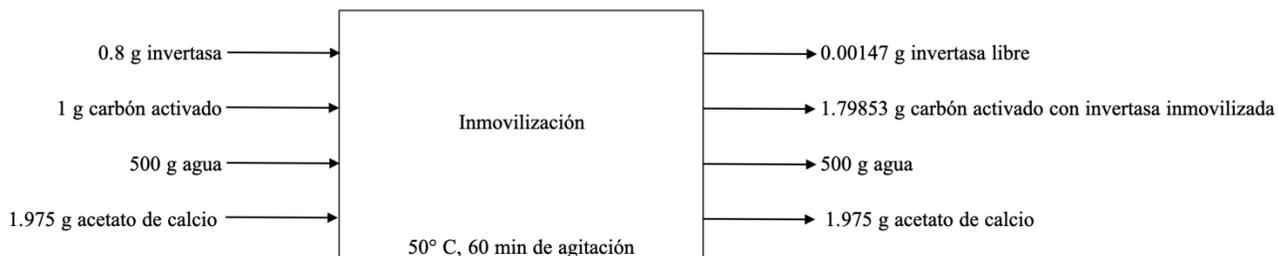
## G. BALANCES DE MASA

Figura 149. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre



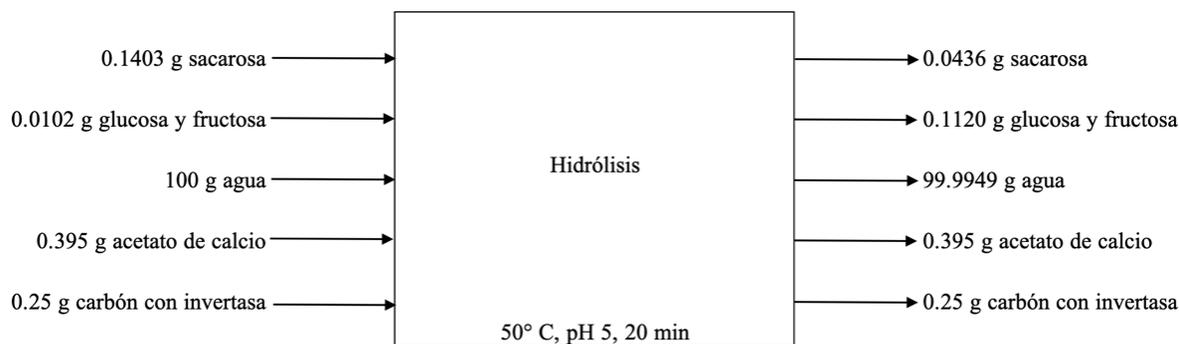
Se realizó un balance de masa para la corrida a las condiciones que presentó una mayor velocidad de reacción. Las condiciones de esta son temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH 5  $\pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

Figura 150. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con carbón activado



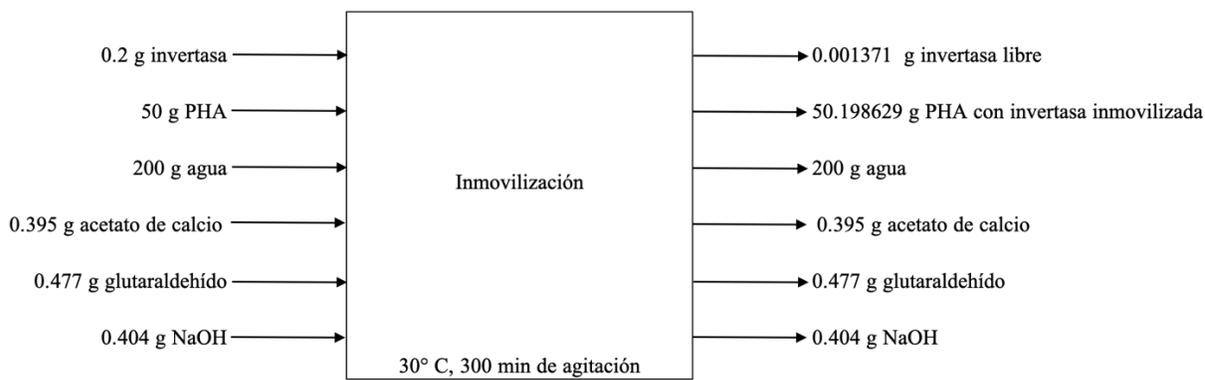
Se realizó una inmovilización por adsorción de invertasa con carbón activado. Esta se realizó en buffer de acetato de calcio, del cual se cuantificó la cantidad de invertasa que no logró ser inmovilizada. La inmovilización se llevó a cabo en un medio con agitación a  $50^\circ \text{C}$  durante 60 min. Se cuantificó la cantidad de invertasa que quedó libre en el remanente de la inmovilización y por diferencia, se determinó la cantidad de enzima que se había inmovilizado.

Figura 151. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con carbón activado



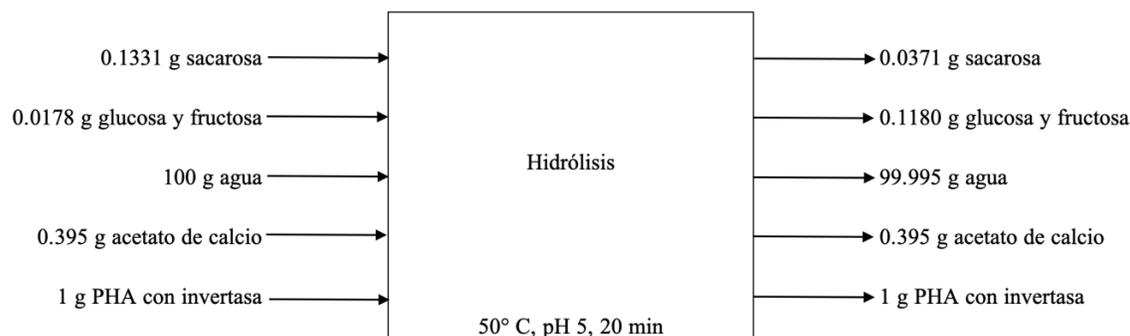
Se realizó un balance de masa para la corrida a las condiciones que presentó una mayor velocidad de reacción. Las condiciones de esta son temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

Figura 152. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado



Se realizó una inmovilización por adsorción de invertasa con PHA funcionalizado. Esta se realizó en buffer de acetato de calcio, del cual se cuantificó la cantidad de invertasa que no logró ser inmovilizada. La inmovilización se llevó a cabo en un medio con agitación a  $30^\circ \text{C}$  durante 300 min. Se cuantificó la cantidad de invertasa que quedó libre en el remanente de la inmovilización y por diferencia, se determinó la cantidad de enzima que se había inmovilizado.

Figura 153. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con PHA funcionalizado



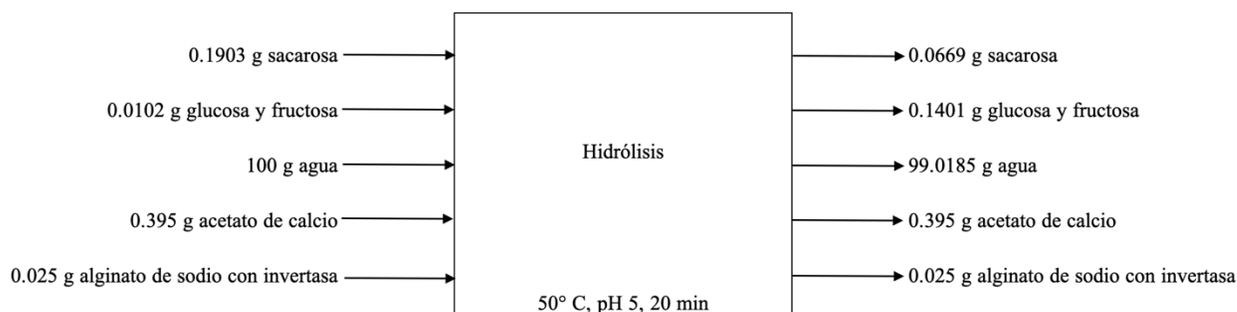
Se realizó un balance de masa para la corrida a las condiciones que presentó una mayor velocidad de reacción. Las condiciones de esta son temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.15 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

Figura 154. Balance de masa de la inmovilización de invertasa con alginato de sodio



Se realizó una inmovilización por adsorción de invertasa con alginato de sodio. Este se realizó en una solución de cloruro de calcio, de la cual se cuantificó la cantidad de invertasa que no logró ser inmovilizada. La inmovilización se llevó a cabo en un medio con agitación a  $20^\circ \text{C}$ . Se cuantificó la cantidad de invertasa que quedó libre en el remanente de la inmovilización y por diferencia, se determinó la cantidad de enzima que se había inmovilizado.

Figura 155. Balance de masa de la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada con alginato de sodio



Se realizó un balance de masa para la corrida a las condiciones que presentó una mayor velocidad de reacción. Las condiciones de esta son temperatura de  $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , pH  $5 \pm 0.005$  y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de  $0.20 \pm 0.0005 \text{ g/mL}$ .

## H. DATOS DE REACTIVOS

Cuadro 40. Datos de la invertasa utilizada durante la experimentación

Reactivo	NuCel® 810 PW
Distribuidor	Procelys
pH	5 - 7
Densidad	0.3 - 0.6 g/mL
Bacterias mesófilas	5000 CFU/g
Coliformes totales	100 CFU/g
Levaduras	50 CFU/g

Cuadro 41. Datos de la sacarosa utilizada durante la experimentación

Reactivo	Sacarosa
Marca	Caña Real
Peso molecular	342.3 g/mol
Densidad	1.6 g/mL

Cuadro 42. Datos de la glucosa utilizada durante la experimentación

Reactivo	Glucosa
Marca	Sigma-Aldrich
Pureza	99.5%
CAS	50-99-7

Cuadro 43. Datos de la fructosa utilizada durante la experimentación

Reactivo	Fructosa
Marca	Merck
Pureza	99%
CAS	57-8-7

Cuadro 44. Datos del cloruro de calcio utilizado durante la experimentación

Reactivo	Cloruro de calcio
Marca	Merck
Pureza	98%
Lote	K37155478 721

Cuadro 45. Datos del acetato de calcio utilizado durante la experimentación

Reactivo	Acetato de calcio hidratado
Marca	Merck
Pureza	94%
Lote	K53849825 226

Cuadro 46. Datos del carbón activado utilizado durante la experimentación

Reactivo	Carbón activado
Marca	Norit
Pureza	99%
CAS	7440-44-0

Cuadro 47. Datos del alginato de sodio utilizado durante la experimentación

Reactivo	Ácido algínico, sal sódica
Marca	Aldrich
Viscosidad	20,000 - 40,000 cps
CAS	9005-38-3

Cuadro 48. Datos del hidróxido de sodio utilizado durante la experimentación

Reactivo	Hidróxido de sodio
Marca	Merck
Pureza	99%
Lote	B0402298

Cuadro 49. Datos del ácido acético utilizado durante la experimentación

Reactivo	Ácido acético
Distribuidor	AL-QUÍMICA
Concentración	95%
Lote	L02-1207

Cuadro 50. Datos del glutaraldehído utilizado durante la experimentación

Reactivo	Glutaraldehído
Marca	Merck
Concentración	25%
Lote	3988408
Condiciones temperatura	15 a 30° C

## I. DATOS DE EQUIPO

Cuadro 51. Datos de la balanza de laboratorio

Equipo	Balanza de laboratorio
Marca	OHAUS
Modelo	T54000
Capacidad máxima (g)	5000
Incertidumbre (g)	± 0.005

Cuadro 52. Datos de la balanza analítica

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110
Incertidumbre (g)	± 0.0005

Cuadro 53. Datos del potenciómetro

Equipo	Potenciómetro
Marca	Dr. Meter
Modelo	PH838
Rango (pH)	0.00 – 14.00
Incertidumbre (pH)	± 0.005

Cuadro 54. Datos del baño térmico

Equipo	Baño térmico
Marca	Precisión
Modelo	180 Series
Rango (° C)	0 – 70
Incertidumbre (° C)	± 0.5

Cuadro 55. Datos del refractómetro

Equipo	Refractómetro
Marca	ATAGO
Modelo	RX-5000
Rango (nD)	1.32700 - 1.58000
Incertidumbre (nD)	± 0.0002

Cuadro 56. Datos del microscopio electrónico de barrido

Equipo	Microscopio electrónico de barrido
Marca	JEOL
Modelo	JSM-IT500
Resolución (nm)	3.0 – 15.0
Magnificación directa (x)	5 – 300,000

## J. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

### 1. Reactivos

Figura 156. Invertasa utilizada durante la experimentación



Figura 157. Acetato de calcio utilizado para preparar el buffer utilizado durante la experimentación

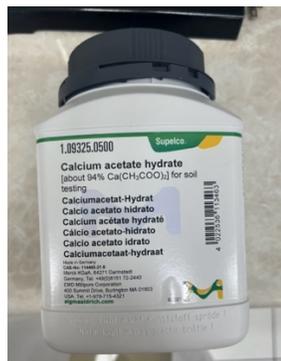


Figura 158. Cloruro de calcio utilizado para la inmovilización por atrapamiento con alginato de sodio

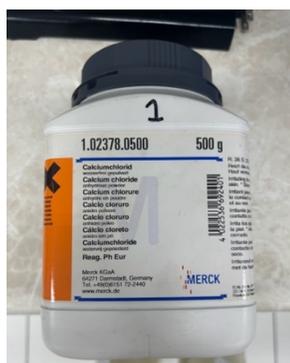


Figura 159. Alginato de sodio utilizado para la inmovilización por atrapamiento

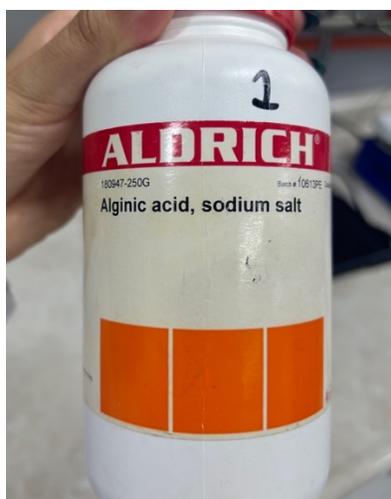


Figura 160. Carbón activado utilizado para la inmovilización por adsorción



Figura 161. Hidróxido de sodio utilizado para la funcionalización del PHA

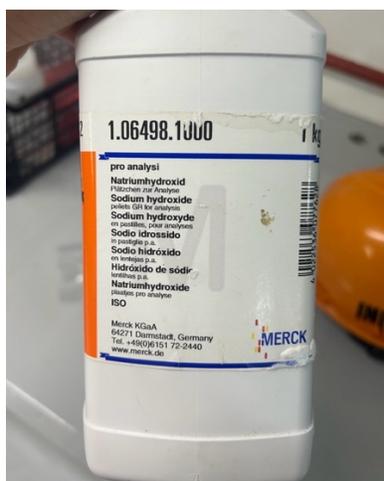


Figura 162. Glutaraldehído utilizado para la funcionalización del PHA



Figura 163. Ácido acético utilizado para ajustar el pH del buffer de acetato de calcio durante la experimentación



## 2. Equipos

Figura 164. Balanza de laboratorio utilizada durante la experimentación

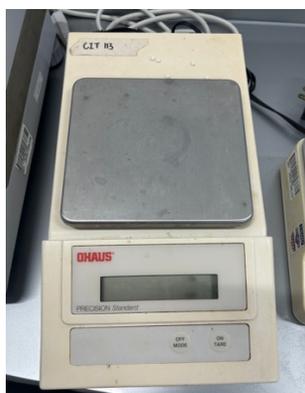


Figura 165. Balanza de laboratorio utilizada durante la experimentación



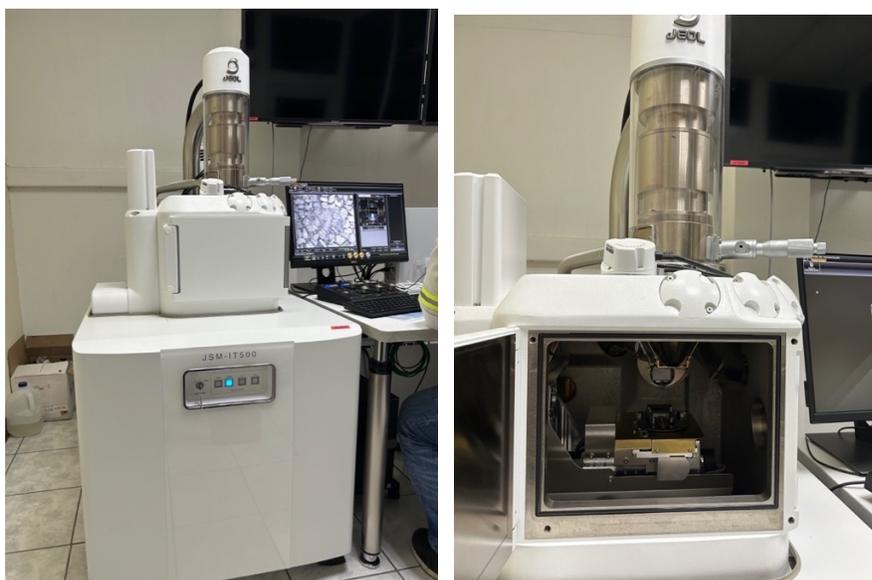
Figura 166. Baño térmico utilizado durante la experimentación



Figura 167. Refractómetro utilizado durante la experimentación



Figura 168. Microscopio electrónico de barrido del Centro de Investigación y Desarrollo de Cementos Progreso



### 3. Inmovilizaciones enzimáticas

Figura 169. Cristalería utilizada para las inmovilizaciones enzimáticas



Figura 170. Proceso de inmovilización de invertasa con alginato de sodio

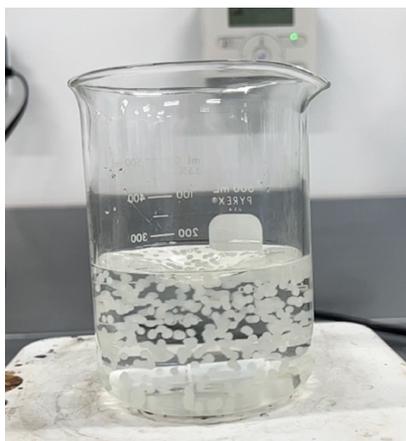


Figura 171. Inmovilización de invertasa con carbón activado



Figura 172. Inmovilización de invertasa con PHA funcionalizado

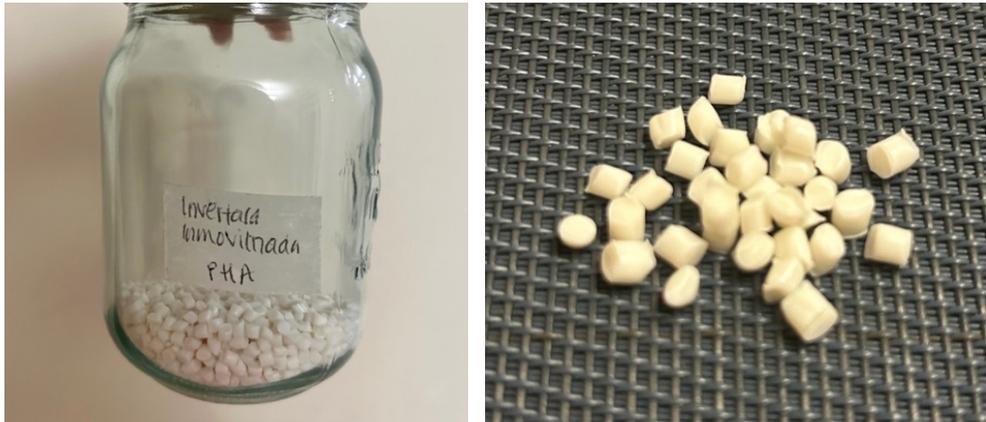


Figura 173. Inmovilización de invertasa con alginato de sodio

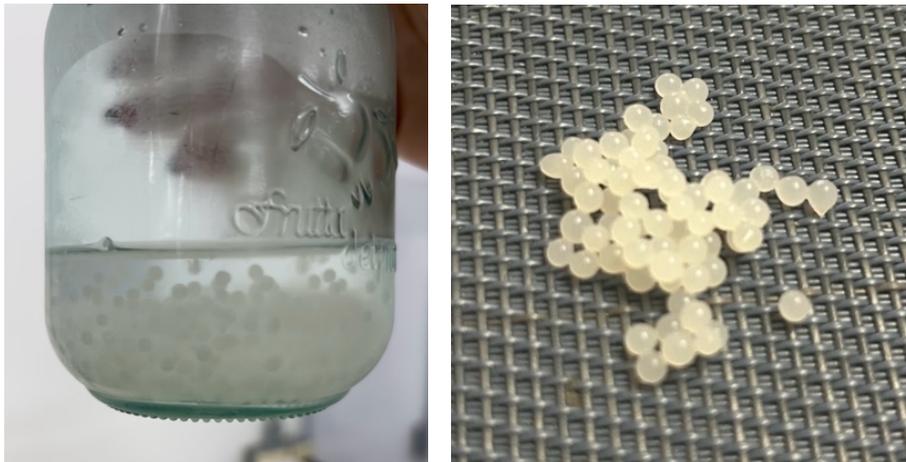


Figura 174. Muestra de la inmovilización con PHA funcionalizado al ser analizada con el microscopio electrónico de barrido



### XIII. GLOSARIO

**ADSORCIÓN.** Proceso mediante el cual átomos, iones o moléculas se unen a una superficie de un sólido o líquido. Este puede ser un proceso físico o químico. En la inmovilización enzimática, este es un método físico en el que la enzima se une a un soporte que no ha sido funcionalizado, mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

**AZÚCARES INVERTIDOS.** Se conocen como jarabe invertido o miel artificial y contiene proporciones de fructosa y glucosa aproximadamente equimolares. Se obtiene mediante la hidrólisis de la sacarosa. Pueden rotar el plano de polarización de la luz en dirección opuesta, en comparación con la sacarosa.

**BERKELEY MADONNA.** Es un software matemático que permite realizar modelos mediante la resolución de ecuaciones diferenciales. Posee diferentes algoritmos de integración como Euler, Runge-Kutta, entre otros y una interfaz que permite construir modelos matemáticos complejos utilizando un código. Además, tiene un conjunto de herramientas gráficas con las cuales se representan los modelos matemáticos ingresados.

**DESNATURALIZACIÓN.** Proceso en el que una biomolécula, como una proteína, pierde su estructura tridimensional debido a factores ambientales o químicos, que alteran las interacciones no covalentes que se encargan de mantener su conformación. Al perder su conformación nativa, esta suele perder su función biológica específica también.

**EFICIENCIA CATALÍTICA.** La capacidad de una enzima para acelerar de manera significativa la velocidad de reacción sin ser consumida en el proceso.

**FUNCIONALIZACIÓN.** Proceso químico que inserta grupos funcionales a un material, que puede facilitar la incorporación de otras moléculas. En este, se crean grupos funcionales necesarios para que se pueda fijar un elemento biológico a la superficie que se está tratando.

**GLUTARALDEHÍDO.** Es un compuesto químico que contiene un grupo aldehído y una cadena de cinco carbonos. Es un líquido incoloro con un olor penetrante, que es soluble en agua. Entre sus aplicaciones más importantes es su uso como desinfectante y esterilizante.

**HIDRÓLISIS.** Reacción química en la que una molécula se descompone en dos o más moléculas de menor tamaño gracias a la adición de una molécula de agua.

**INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.** Proceso mediante el que un inhibidor disminuye o anula la velocidad de las reacciones que catalizan las enzimas. La inhibición puede ser reversible o irreversible, dependiendo del efecto que se tenga sobre la enzima. Existen tres tipos de inhibidores reversibles, competitiva, no competitiva y acompetitiva.

**INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.** Proceso mediante el que las enzimas son confinadas en un soporte que limita su movimiento sin que estas pierdan su poder catalítico. Su estabilidad aumenta y se mantienen de forma insoluble, lo que permite su reutilización.

**INVERTASA.** Es una enzima que hidroliza los restos terminales no reductores  $\beta$ -D-fructofuranosídicos de los fructofuranósidos. Entre los sustratos más comunes en los que se utiliza está la sacarosa, por lo que también se le puede denominar “sacarasa” y se obtiene como producto, un azúcar invertido

**MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.** Un método de análisis que permite obtener imágenes de alta resolución de la superficie de muestras sólidas. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar la imagen.

**PHA.** Los polihidroxicanoatos son biopolíesteres que se sintetizan de manera intracelular en algunos microorganismos como una reserva de carbono y energía cuando estos se encuentran en situaciones de estrés. Al extraerse de la célula, presentan características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo.

**REFRACTOMETRÍA.** Es un método para determinar el índice de refracción de una sustancia para evaluar su composición. El índice de refracción es una propiedad óptica de una sustancia y el número de partículas disueltas en esta, por lo que se define como la relación de la velocidad en un espacio vacío, en relación a la velocidad de la luz que pasa a través de una sustancia.

**UNIÓN COVALENTE.** Es un tipo de enlace químico que se forma cuando dos átomos comparten pares de electrones que les permiten alcanzar una configuración electrónica más estable, lo que los vuelve más estables químicamente. En la inmovilización enzimática, este se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que estos reaccionen con nucleófilos de las proteínas, permitiendo así la unión de ambos.