

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



Evaluación de la estabilidad de invertasa inmovilizada en
polihidroxialcanoato (PHA) a través de ciclos de reacción
enzimática a escala laboratorio

Trabajo de graduación presentado por
Luis Rodrigo Lavarreda Urizar
para optar al grado académico de Licenciado en
Ingeniería Química
Guatemala,

2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



Evaluación de la estabilidad de invertasa inmovilizada en
polihidroxialcanoato (PHA) a través de ciclos de reacción
enzimática a escala laboratorio

Trabajo de graduación presentado por
Luis Rodrigo Lavarreda Urizar
para optar al grado académico de Licenciado en
Ingeniería Química
Guatemala

2025

Vo. Bo.:

(f)  _____

Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

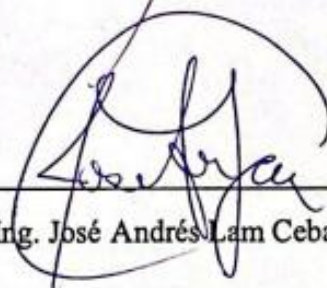
Tribunal Examinador

(f)  _____

Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

(f) _____

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

(f)  _____

Ing. José Andrés Lam Ceballos

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre de 2025

PREFACIO

El presente trabajo de investigación nace de mi interés por las tecnologías que vuelven más rentables los procesos industriales. Entre estas operaciones se encuentra el uso de enzimas, en estos procesos cuando se emplean en forma libre, su recuperación es poco práctica. La enzima suele arrastrarse con el producto, obligando a reponerla en cada ciclo y elevando significativamente el costo operativo. De allí surge mi interés por la inmovilización enzimática como estrategia para incrementar estabilidad y permitir su reutilización. Al revisar la literatura observé la falta de información publicada sobre la estabilidad enzimática al utilizar múltiples veces una enzima inmovilizada, dándome inspiración de obtener información acerca de su uso repetido.

Agradezco profundamente a mi asesor, el Ing. Luis Ernesto Núñez González, MBA y M.Sc., por su apoyo y dirección en la realización de este trabajo, y al Ing. Gamaliel Zambrano, M.Sc., por el apoyo que me brindó durante toda mi formación. También quiero agradecer a mis padres, Luis Fernando e Ivonne, y mi hermano, Fernando José, por darme la oportunidad de estudiar en esta universidad. Finalmente, agradezco a mis amigos del colegio Aldo, Byron, Juani, Luisfer, Gustavo, Santiago y Schoenbeck por el apoyo brindado durante mi carrera, junto a toda la promoción de carné 21 de la carrera de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala.

Contenido

PREFACIO	v
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	ix
LISTADO DE ECUACIONES	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
I. OBJETIVOS	3
II. JUSTIFICACIÓN	4
III. MARCO TEÓRICO.....	6
A. ENZIMAS	6
1. Estructura	6
2. Propiedades.....	8
3. Funciones	9
4. Actividad enzimática.....	10
5. Inhibición	11
6. Cinética enzimática	12
7. Invertasa	14
B. SACÁRIDOS.....	16
1. Monosacáridos	16
2. Oligosacáridos.....	18
3. Polisacáridos	20
4. Azúcar invertido	20
C. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA	21
1. Unión covalente.....	22
D. REFRACTOMETRÍA.....	25
E. REACTORES	26
IV. ANTECEDENTES	29
V. METODOLOGÍA.....	32
A. CREACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN DE REFRACTÓMETRO	32
VI. RESULTADOS.....	38
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
VIII. CONCLUSIONES	53

IX.	RECOMENDACIONES.....	54
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	55
XI.	ANEXOS	58
A.	DATOS ORIGINALES	58
B.	DATOS CALCULADOS	63
C.	MUESTRA DE CÁLCULOS.....	70
D.	ANÁLISIS DE ERROR	73
E.	CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	75
G.	BALANCES DE MASA	92
H.	DATOS DE REACTIVOS.....	94
I.	DATOS DE EQUIPO.....	95
XII.	GLOSARIO	101

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de inmovilización con los distintos tipos de soporte	30
Cuadro 2. Parámetros cinéticos obtenidos para cada corrida utilizando el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa.....	30
Cuadro 3. Volúmenes de solución madre para la creación de curva de calibración.....	33
Cuadro 4. Parámetros cinéticos para cada corrida utilizando el modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre e inmovilizada en PHA	38
Cuadro 5. Rendimiento de inmovilización	38
Cuadro 6. Retención de actividad enzimática	39
Cuadro 7. Concentraciones e índices de refracción de la curva de calibración para refractómetro según la concentración de sacarosa, y fructosa y glucosa.....	58
Cuadro 8. Índices de refracción de las muestras de la corrida de la enzima libre	58
Cuadro 9. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima en el remanente de la inmovilización	59
Cuadro 10. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima inmovilizada restante durante cada ciclo de uso.....	59
Cuadro 11. Índices de refracción promedio y concentraciones de compuestos de las muestras de la corrida de la enzima libre y sobrenadante de la inmovilización	63
Cuadro 12. Índices de refracción promedio y concentraciones de compuestos de las muestras de las corridas de cada ciclo de uso.....	64
Cuadro 13. Parámetros cinéticos para cada corrida utilizando el modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre e inmovilizada en PHA.....	68
Cuadro 14. Concentración de invertasa en cada ciclo	69
Cuadro 15. Pérdida de invertasa relativa por ciclo	69
Cuadro 16. Balances de masa por ciclo de uso de invertasa inmovilizada	93
Cuadro 17. Datos de invertasa empleada durante el trabajo.....	94
Cuadro 18. Datos de sacarosa empleada durante el trabajo	94
Cuadro 19. Datos de glucosa empleada durante el trabajo.....	94
Cuadro 20. Datos de fructosa empleada durante el trabajo	94
Cuadro 21. Datos de glutaraldehído empleada durante el trabajo	95
Cuadro 22. Datos de ácido acético empleada durante el trabajo	95
Cuadro 23. Datos de placa de balanza	95
Cuadro 24. Datos de placa de refractómetro.....	96
Cuadro 25. Datos de placa de potenciómetro	96

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Inhibición por retroalimentación.....	12
Figura 2. Mecanismo enzimático.....	13
Figura 3. Inmovilización por unión covalente	23
Figura 4. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el primer ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	40
Figura 5. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el octavo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	41
Figura 6. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada	42
Figura 7. Invertasa restante relativa a la inicial luego de cada ciclo de uso.....	43
Figura 8. Invertasa relativa perdida en cada ciclo de uso.....	44
Figura 9. Curva de calibración refractómetro	75
Figura 10. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre	76
Figura 11. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con remanente de inmovilización.....	77
Figura 12. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el primer ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	78
Figura 13. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el segundo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	79
Figura 14. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el tercer ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	80
Figura 15. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	81
Figura 16. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el quinto ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	82
Figura 17. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el sexto ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	83
Figura 18. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el séptimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	84
Figura 19. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el octavo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	85
Figura 20. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el noveno ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	86
Figura 21. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	87
Figura 22. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el undécimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	88
Figura 23. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el duodécimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada.....	89
Figura 24. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo tercero ciclo de uso de invertasa inmovilizada	90
Figura 25. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada	91

Figura 26. Balance de masa de la hidrólisis con enzima libre	92
Figura 27. Balance de masa de la inmovilización de invertasa en polihidroxialcanoato funcionalizado	92
Figura 28. Balance de masa de la hidrólisis con enzima inmovilizada en polihidroxialcanoato funcionalizado	93
Figura 29. Hidróxido empleado en la experimentación	96
Figura 30. Fructosa empleada en la experimentación	97
Figura 31. Glucosa empleada en la experimentación	97
Figura 32. Enzima empleada en la experimentación	98
Figura 33. Glutaraldehído empleado en la experimentación	98
Figura 34. PHA empleado en la experimentación	99
Figura 35. Refractómetro empleado en la experimentación	99
Figura 36. Potenciómetro empleado en la experimentación	100
Figura 37. Baño térmico empleado en la experimentación	100

LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modelo cinético de Michaelis-Menten.....	13
Ecuación 2. Modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre.....	38
Ecuación 3. Modelo general de Michaelis-Menten para invertasa inmovilizada.....	38
Ecuación 4. Retención de actividad enzimática dentro en una corrida	71
Ecuación 5. Incertidumbre de una curva de calibración	73
Ecuación 6. Propagación de error de multiplicación y división.....	73
Ecuación 7. Desviación estándar en muestra	74

RESUMEN

La invertasa es una enzima ampliamente utilizada en la elaboración de jarabe invertido en las industrias alimentaria y licorera. Por lo que, al no poder reutilizarlas, representan un mayor costo para las industrias. Este trabajo evalúa, a escala de laboratorio, la estabilidad de invertasa grado industrial inmovilizada por unión covalente multipunto sobre polihidroxialcanoato funcionalizado con glutaraldehído, a lo largo de múltiples ciclos de reacción. Primero, se establecieron las condiciones de operación a las que se llevarían a cabo la reacción (50 °C, pH 5 y 0.15 g/mL de sacarosa). Se determinó un rendimiento de inmovilización de $33.45 \pm 3.17\%$ m/m por balance másico. El análisis de parámetros cinéticos de enzima libre e inmovilizada demostró constantes cinéticas comparables $K_m=1.79 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una leve disminución del número de recambio del $6.25\% \text{ ppm}\cdot\text{min}^{-1}$, coherente con la rigidización por anclaje covalente siendo de $93.8\% \text{ ppm}\cdot\text{min}^{-1}$. Por último, se monitoreó la retención de actividad dentro del ciclo y se comparó la actividad enzimática entre ciclos mostrando disminución en la actividad de $2.59\% \pm 0.62\% \text{ ppm}\cdot\text{min}^{-1}$ por ciclo durante los primeros ocho ciclos y un incremento acelerado de pérdida desde el noveno ciclo de 4.7% a $8.5\% \text{ ppm}\cdot\text{min}^{-1}$, alcanzando un $47.2\% \text{ ppm}\cdot\text{min}^{-1}$ de enzima remanente en el décimo cuarto ciclo. Los resultados indican que el PHA funcionalizado permite la reutilización efectiva de la invertasa superior al reportado para técnicas de atrapamiento en alginato u otros soportes por adsorción. Los resultados indican que el PHA funcionalizado permite la reutilización efectiva de la invertasa, lo que podría traducirse en una disminución del consumo de enzima, dando como resultado la reducción de los costos operativos y el desarrollo de procesos de producción de jarabe invertido más sostenibles y competitivos para las industrias alimentaria y licorera. Se recomienda realizar pruebas reforzando la inmovilización mediante la reducción de los enlaces de anclaje imina a amina con cianoborohidruro de sodio y explorar otras matrices o técnicas para mejorar la estabilidad frente a cizallamiento, pH y temperatura.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento en la demanda de diversos productos a lo largo de los años ha llevado a las industrias a impulsar una mayor necesidad de procesos más eficientes, sostenibles y específicos, lo que ha estimulado el interés por tecnologías más limpias y rentables. En este contexto, los biocatalizadores industriales han emergido como una alternativa estratégica, incrementando significativamente la demanda de enzimas como sustitutos de reactivos químicos tradicionales. Sin embargo, el uso de enzimas libres en solución conlleva altos costos operativos, ya que estas no pueden recuperarse fácilmente y se pierden junto con el producto final. Esta situación obliga a emplear continuamente nuevas cantidades de enzima, lo que limita su viabilidad económica en aplicaciones a gran escala (Basso & Serban, 2019).

Por esta razón, se han desarrollado estrategias enfocadas en la recuperación de dichas enzimas luego de su uso en un ciclo de reacción, con el objetivo de optimizar su aplicación industrial. Una de las más destacadas es la inmovilización enzimática, que implica fijar las enzimas sobre un soporte sólido que restringe su movilidad sin comprometer su actividad catalítica. Este confinamiento favorece una mayor rigidez en su estructura terciaria, lo que les permite soportar mejor condiciones térmicas y químicas adversas (Sheldon & Van Pelt, 2013). Esta técnica mejora significativamente su estabilidad, permitiendo que permanezcan en fase sólida y puedan ser reutilizadas en múltiples ciclos, lo cual incrementa tanto su disponibilidad como su eficiencia en distintos procesos industriales (Datta et al., 2013).

La durabilidad de la inmovilización enzimática depende en gran medida del método utilizado para fijar la enzima al soporte. Por ejemplo, técnicas basadas en adsorción física son más simples y de menor costo que las uniones químicas, pero presentan menor estabilidad, ya que la unión es débil y reversible, lo que facilita la pérdida de enzima durante el proceso. En cambio, métodos como la inmovilización covalente o la reticulación generan enlaces más fuertes y estables, permitiendo una mayor resistencia frente a condiciones extremas y prolongando la vida útil del biocatalizador. Otros enfoques como la encapsulación o el atrapamiento en matrices también pueden ofrecer protección moderada, aunque su efectividad depende del tipo de matriz y del tamaño de los poros (Datta et al., 2013).

La solución obtenida mediante la hidrólisis de sacarosa presenta un poder edulcorante hasta un 30 % mayor al de dicha azúcar, gracias a la alta dulzura de la fructosa. Además de reducir

costos por menor dosificación, su uso mejora la textura y la retención de humedad en productos de panadería y confitería (Pomeranz, 1985). En fermentaciones industriales como las de cerveza y licores, la glucosa y fructosa separadas se aprovechan de forma más rápida por las levaduras, lo que incrementa la eficiencia del proceso. Por estas ventajas, la inversión de soluciones de sacarosa ha ganado importancia en la industria (Verstrepen et al., 2004).

Dado su extenso uso en procesos industriales y la imposibilidad actual de reutilizarla de forma eficiente, ha surgido un creciente interés en la inmovilización de la enzima invertasa. En este trabajo se presenta un estudio de la inmovilización enzimática en donde se analiza la estabilidad de invertasa inmovilizada en polihidroxialcanoato a través de múltiples ciclos de reacción enzimática.

II. OBJETIVOS

A. General

1. Evaluar la estabilidad y actividad enzimática de la invertasa inmovilizada en polihidroxialcanoato funcionalizado a través de ciclos de reacción.

B. Específicos

1. Determinar el rendimiento de inmovilización de invertasa en una matriz polimérica de polihidroxialcanoato (PHA) para cuantificar la concentración inicial de invertasa inmovilizada mediante un modelo cinético.
2. Cuantificar la retención de actividad enzimática específica de la enzima posteriormente de su inmovilización.
3. Utilizar un modelo cinético para cada ciclo de reacción enzimática de la invertasa inmovilizada en polihidroxialcanoato (PHA) para calcular la cantidad de invertasa útil.

III. JUSTIFICACIÓN

La producción global de azúcar aumenta constantemente debido a la creciente demanda de este insumo en la industria alimentaria y de biocombustibles. Se estima que la producción mundial de azúcar alcanzará los 198 millones de toneladas para 2032, con un crecimiento anual proyectado del 1.3% (Michele, 2023, pp. 2024-2033). Solo en Brasil, el mayor productor mundial, la producción anual supera los 40 millones de toneladas, lo que representa más del 20% del suministro global (Foreign Agricultural Service, 2024). La biocatálisis ha impulsado el uso de enzimas en diversas industrias debido a su potencial para optimizar procesos de producción de manera más sostenible y en la reducción del uso de compuestos químicos convencionales (Sheldon & Woodley, 2018). A diferencia de los catalizadores inorgánicos tradicionales, las enzimas destacan por su alta especificidad, lo que permite obtener productos más puros y con menos subproductos no deseados (Buchholz et al., 2012). No obstante, su aplicación industrial sigue siendo limitada debido a desafíos como su estabilidad en diversas condiciones y la dificultad en su recuperación y separación de los sustratos y productos de reacción (Chapman et al., 2018).

La invertasa usada para esta síntesis suele tener un precio alto, por lo que, al no poder reutilizarlas, representan un mayor costo para las industrias (Flickinger, 2010). Entre los mayores obstáculos al momento de utilizar esta enzima en el proceso de producción de jarabe invertido son que no existen formas de recuperarla y esta se va en el producto terminado por lo que se han creado técnicas de inmovilización para su recuperación. Esto hace necesario el uso de soportes catalíticos para la retención de estas moléculas y su posterior recuperación con el objetivo de utilizarla en posteriores ciclos (Manoochchri et al., 2020). Este tipo de avances presentan el reto de conocer cuantas veces es posible reutilizar este compuesto hasta que deja de ser eficiente en la aceleración de la reacción.

Ante la ausencia de estudios previos e información publicada sobre la retención multiciclo de invertasa, este trabajo analiza la estabilidad de la invertasa covalentemente inmovilizada en la superficie de pellets de polihidroxialcanoato (PHA) mediante el uso de glutaraldehído, a lo largo de múltiples ciclos de reacción enzimática, determinando la invertasa remanente tras cada ciclo. Esto pretende ser una investigación inicial para posteriormente analizar la

transición a escala industrial y abrir el campo de estudio para el análisis de estabilidad de esta enzima en las diferentes técnicas de inmovilización.

IV. MARCO TEÓRICO

A. ENZIMAS

Las proteínas son biomoléculas fundamentales para los seres vivos las cuales están constituidas principalmente por los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. En algunos casos pueden incluir elementos como fósforo, cobre, zinc o hierro. Estas macromoléculas son cadenas de aminoácidos, los cuales están formados por un grupo amino y un grupo carboxilo unidos a un carbono alfa. Este carbono central presenta una estructura tetraédrica, en la que también se enlazan un átomo de hidrógeno y un grupo funcional diferente o cadena lateral, que varía dependiendo el aminoácido. La unión de los aminoácidos para formar proteínas se da mediante enlaces peptídicos, los cuales se forman a través de una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Esta reacción se repite sucesivamente, dando lugar a una cadena polipeptídica que, al plegarse adecuadamente, origina una proteína funcional (Nelson et al., 2021).

Estas moléculas actúan como catalizadores en los procesos biológicos. Se caracterizan por su alta especificidad y requieren condiciones adecuadas para funcionar correctamente. Estas sustancias regulan las transformaciones químicas en los sistemas vivos y aumentan la velocidad de las reacciones. Poseen un sitio activo cuya estructura es complementaria al sustrato; al unirse, esta interacción favorece la formación del producto. No obstante, pueden desnaturalizarse al exponerse a factores como el calor, ácidos fuertes, metales pesados o detergentes. Al ser solubles en agua, su recuperación es difícil y no pueden reutilizarse con facilidad, lo que limita su aplicación en procesos industriales (Lundblad & Macdonald, 2018).

1. Estructura

Las proteínas comparten una misma estructura, la cual se divide en múltiples niveles. La estructura primaria se conforma de las cadenas de aminoácidos de longitud variable que va desde unos pocos hasta miles, lo que determina su tamaño. La variación de estas secuencias entre los 20 aminoácidos dicta sus funciones biológicas específicas, que van desde la catálisis

de reacciones bioquímicas hasta el transporte de moléculas a través de las membranas celulares (Berg et al., 2002).

La estructura secundaria se genera a través de plegamientos locales dentro de la cadena polipeptídica, estabilizados principalmente por puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilo del enlace peptídico, generando estructuras como hélices alfa y láminas beta. Las hélices alfa poseen una longitud equivalente de tres aminoácidos y son la base de las proteínas de los tejidos flexibles, en cambio, las placas beta propician una alta resistencia mecánica al encontrarse en forma de zigzag los aminoácidos que componen estas estructuras. Estos elementos estructurales proporcionan un andamiaje inicial para el plegamiento tridimensional de la proteína (Berg et al., 2002).

La estructura terciaria se refiere a la disposición tridimensional completa de la proteína, incluyendo la ubicación espacial de todos los átomos, estabilizada por interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro entre aminoácidos de cisteína. Esta estructura es fundamental ya que determina las propiedades superficiales, actividad catalítica, estabilidad química y mecánica y por último su forma (Berg et al., 2002).

Cuando una proteína está compuesta por más de una cadena polipeptídica, es decir, cuando es una proteína oligomérica, presenta una estructura cuaternaria. Esta se origina por la unión de varias subunidades, las cuales, al integrarse, adquieren propiedades diferentes a las de cada componente individual. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces no covalentes, lo que permite que trabajen de forma coordinada para modular la actividad biológica de la proteína. Si las subunidades se separan, la proteína pierde su funcionalidad. Las fuerzas responsables de estabilizar la estructura terciaria también intervienen en la cohesión de las cadenas en la estructura cuaternaria (Berg et al., 2002).

El centro activo de una enzima es una cavidad localizada en su superficie, compuesta por aminoácidos que no se encuentran próximos en la secuencia lineal de la cadena polipeptídica, sino que se agrupan debido al plegamiento tridimensional característico de la proteína, es decir, su estructura terciaria y cuaternaria. Dentro de este sitio existen dos tipos principales de aminoácidos: los catalíticos, cuyas cadenas laterales permiten realizar la función catalítica, y los de unión, que cuentan con grupos funcionales capaces de establecer interacciones

débiles con los grupos complementarios del sustrato con el objetivo de guiarlo a los primeros. Estos últimos son responsables de posicionar al sustrato correctamente para que los aminoácidos catalíticos puedan actuar de forma efectiva. Los demás aminoácidos de la cadena no forman parte del centro activo, pero son esenciales para mantener la estructura tridimensional de la enzima, la cual es clave para conservar su funcionalidad (Berg et al., 2002).

La forma tridimensional del centro activo se adapta perfectamente a la del sustrato, y ambas presentan una distribución complementaria de cargas en su superficie de contacto. Por ejemplo, una región del sustrato con carga positiva se alinea con una zona cargada negativamente del centro activo, y viceversa. Aunque son pocos los aminoácidos que conforman el centro activo, su cercanía dentro de la enzima depende del plegamiento terciario. En enzimas con estructura cuaternaria, estos aminoácidos pueden incluso encontrarse en diferentes cadenas polipeptídicas (Berg et al., 2002).

2. Propiedades

Las enzimas son catalizadores biológicos capaces de acelerar significativamente la velocidad de las reacciones químicas. Al actuar como tales, reducen la energía de activación necesaria para que ocurra la transformación. La configuración y organización de su sitio activo restringen los movimientos del sustrato, colocándolo en una orientación favorable. Esto facilita la conversión del complejo enzima-sustrato en producto, sin necesidad de alcanzar el estado de transición con alto requerimiento energético. Es importante destacar que las enzimas no modifican el equilibrio químico de la reacción, sino que simplemente aumentan la rapidez con la que se alcanza (Nelson et al., 2021).

Una propiedad clave de las enzimas es su elevada especificidad, ya que, a diferencia de los catalizadores inorgánicos, suelen participar únicamente en una reacción particular y raramente generan productos secundarios. Esta especificidad fue explicada inicialmente por el modelo de llave y cerradura en el cual se sugiere que la enzima y el sustrato poseen formas complementarias. Posteriormente, se planteó el modelo del ajuste inducido, el cual indica que las proteínas presentan cierta flexibilidad estructural y que las interacciones no

covalentes con el sustrato inducen cambios en la conformación tridimensional del sitio activo, adaptándolo a la forma del sustrato (Audesirk et al., 2017).

Adicionalmente, debido a su considerable tamaño, la cantidad de enzimas utilizadas en los diversos procesos pueden ser reguladas con el fin de ajustar la velocidad de reacción deseada. La modulación de la velocidad de las reacciones que catalizan permite a las células ajustarse eficientemente a cambios ambientales. Esta capacidad de regulación es fundamental para conservar tanto energía como recursos dentro de los organismos (Alberts, 2002).

3. Funciones

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) estableció un sistema de nomenclatura para las enzimas basado según el tipo de reacción que catalizan. Cada enzima recibe un nombre sistemático compuesto por dos partes y una clasificación numérica de cuatro dígitos. Este sistema contempla seis clases principales. La primera corresponde a las oxidorreductasas, encargadas de catalizar reacciones de óxido-reducción en las que se modifica el estado de oxidación de uno o más átomos en una molécula. Estas reacciones implican la transferencia de electrones y suelen ir acompañadas por cambios en átomos de oxígeno o hidrógeno (Lehninger et al., 2013).

Otra clase importante son las transferasas, que transfieren grupos funcionales como amino, carboxilo o carbonilo entre una molécula donadora y otra aceptora. Las hidrolasas catalizan reacciones en las que el agua participa rompiendo enlaces como carbono-oxígeno o carbono-nitrógeno. Por su parte, las liasas eliminan grupos de una molécula formando dobles enlaces, o los añaden a estos, si es que promueven la acción contraria sin el uso de agua son llamadas sintasas. Las isomerasas catalizan reordenamientos intramoleculares, e incluyen enzimas como las epimerasas, que invierten la configuración de carbonos asimétricos con el objetivo de producir los diversos isómeros de una molécula, y las mutasas, que transfieren grupos dentro de la misma molécula. Por último, las ligasas facilitan la formación de enlaces covalentes entre dos moléculas, generalmente utilizando energía derivada del ATP (Lehninger et al., 2013).

4. Actividad enzimática

La función de las enzimas es indispensable para todos los organismos, ya que, sin catalizadores, muchas reacciones bioquímicas serían demasiado lentas para sustentar la vida. En medios biológicos, donde las condiciones son estables, las moléculas tienden a no reaccionar espontáneamente; por ello, las enzimas permiten acelerar los procesos sin necesidad de alterar el entorno. Las reacciones químicas que ocurren en los sistemas vivos están regidas por las leyes de la termodinámica, en particular por la segunda ley, de la cual se deriva el concepto de energía libre de Gibbs. Para que una reacción sea espontánea, el cambio en la energía de Gibbs (ΔG) debe ser negativo, lo que significa que la energía libre del producto debe ser menor que la del sustrato. En el caso de las reacciones bioquímicas estas suelen liberar poca cantidad de energía de Gibbs por lo que son poco espontáneas y es necesaria su aceleración (Buchholz et al., 2012).

En cualquier conversión química los reactivos deben una trayectoria de reacción por la cual se encuentra el estado de transición el cual posee un mayor nivel energético que los productos y reactivos. La diferencia entre su nivel energético entre este punto de los reactivos se conoce como energía de activación: cuanto mayor sea la diferencia la reacción sucederá a menor velocidad. Las enzimas aceleran el proceso al reducir disminuir este nivel energético facilitando así la conversión de sustrato en producto sin desplazar el equilibrio que continúa siendo determinado por las leyes de la termodinámica. Al disminuir solo la energía del estado de transición, no alteran la energía libre global de reactivos y productos, de modo que la reacción puede absorber o liberar calor sin que ello cambie su balance termodinámico (Nelson et al., 2021).

El incremento de la temperatura acelera la velocidad de las reacciones químicas catalizadas por enzimas, pero al superar un umbral térmico específico dependiendo de la proteína provoca la desnaturalización de la proteína y la consiguiente pérdida de actividad, esto dificulta fijar con precisión la temperatura óptima. Por ello, las curvas de actividad térmica

suelen mostrar el aumento y disminución de la actividad enzimática debido a la desnaturalización (Berg et al., 2002).

5. Inhibición

Estos biocatalizadores pueden ver reducido su actividad catalítica debido a la presencia de inhibidores, los cuales interfieren en el desarrollo normal de la reacción. Esta inhibición puede clasificarse como reversible o irreversible, según la posibilidad de que la enzima recupere su funcionalidad. La inhibición irreversible suele suceder por la presencia de algún compuesto el cual reacciona con los grupos funcionales en la superficie de la enzima alterando permanentemente el sitio activo, estos pueden ser productos de la reacción o compuestos inorgánicos como metales pesados, siendo un ejemplo de esto el plomo. Dentro de las inhibiciones reversibles se distinguen tres mecanismos principales, inhibición competitiva, no competitiva y acompetitiva (Lehninger et al., 2013).

En la inhibición reversible competitiva el inhibidor presenta una estructura semejante al sustrato natural y compite por el sitio activo de la enzima. La eficacia de este tipo de inhibición está determinada por la concentración relativa de sustrato e inhibidor, ya que una alta cantidad de sustrato puede desplazar al inhibidor, restableciendo parcialmente la actividad enzimática (Lehninger et al., 2013).

Asimismo, la inhibición no competitiva el inhibidor no imita la estructura del sustrato por lo que no compite por el centro activo, sino que se une a una región diferente de la enzima. Aunque esta interacción no impide que el sustrato se una al centro activo, provoca una pérdida de actividad enzimática, haciendo que la enzima se vuelva inactiva independientemente de la presencia del sustrato (Lehninger et al., 2013).

Por último, la inhibición reversible acompetitiva, ocurre cuando el inhibidor se une a la enzima solo después de que esta ha formado un complejo con el sustrato. Esta unión se da en

un sitio diferente al centro activo, y al estabilizar el complejo enzima-sustrato-inhibidor, interfiere con la reacción catalítica, reduciendo tanto la velocidad de reacción como la afinidad aparente de la enzima por el sustrato (Lehninger et al., 2013).

La inhibición por retroalimentación es un método mediante el cual un producto final inhibe la función de la enzima en una etapa inicial de una secuencia de reacciones. En figura a continuación se puede observar secuencia de reacciones catalizadas por enzimas, la primera enzima en la serie es inhibida por el producto F. En las primeras etapas de la reacción, la concentración de F es baja y su efecto inhibitorio es mínimo. A medida que la concentración de F alcanza un cierto nivel, que puede conducir a la inhibición total de la primera enzima y por lo tanto desactiva su propia fuente de producción (Lehninger et al., 2013).

Figura 1. Inhibición por retroalimentación



Fuente: Nelson & Cox, 2021.

La inhibición por sustrato es un fenómeno observado en aproximadamente una cuarta parte de las enzimas, y se presenta cuando un exceso de sustrato en el medio reduce la velocidad de reacción en lugar de mantenerla en su nivel máximo. Esto se debe a que el complejo enzima sustrato puede combinarse, además, con una molécula extra de sustrato para formar el complejo enzima sustrato-sustrato, el cual es inactivo, por consiguiente, no conduce a un producto (Lehninger et al., 2013).

6. Cinética enzimática

La cinética enzimática constituye el estudio medible de la catálisis realizada por enzimas, permitiendo analizar las velocidades de reacción y la afinidad que estas presentan tanto por sus sustratos como por posibles inhibidores. Este estudio además analiza y establece los mecanismos de reacción implicados con el objetivo de comprender los procesos que regulan

las rutas metabólicas. Dentro de este campo, uno de los conceptos fundamentales es el orden de reacción, esto se debe que el orden de reacción suele tener un papel importante en la determinación de los exponentes en las ecuaciones de velocidad de reacción. Esta clasificación permite inferir características del mecanismo catalítico. En el caso de la invertasa esta es una reacción de primer orden la cual depende linealmente de la concentración de un solo sustrato, siendo la sacarosa, lo que sugiere un paso limitante unimolecular (Berg et al., 2002).

a. Modelo Michaelis-Menten

Es un modelo matemático el cual es una de las bases fundamentales de la cinética enzimática y describe cómo varía la velocidad de una reacción enzimática en función de la concentración del sustrato. Este modelo parte del supuesto de que la enzima se une reversiblemente al sustrato para formar un complejo enzima-sustrato, llega al estado de transición, el cual posteriormente reacciona y se descompone para liberar el producto y regenerar la enzima libre (Lehninger et al., 2013).

Figura 2. Mecanismo enzimático



Fuente: Nelson & Cox, 2021.

La ecuación resultante, conocida como ecuación de Michaelis-Menten, es:

Ecuación 1. Modelo cinético de Michaelis-Menten

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_M} = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{[S] + K_M}$$

Por último, en donde v es la velocidad de reacción a través del tiempo, $v_{m\acute{a}x}$ 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 $v_{m\acute{a}x}$ está compuesto por una constante de afinidad.

b. Factores que afectan la velocidad de reacción

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se ve influenciada por factores fisicoquímicos como la temperatura y el pH. Cada enzima presenta un rango óptimo de temperatura en el cual su actividad catalítica es máxima; fuera de este intervalo, la velocidad de reacción disminuye notablemente. Usualmente, se observa un incremento progresivo en la velocidad hasta alcanzar rango entre los 35C y los 45C, en el caso de la invertasa siendo de 50C, momento a partir del cual ocurre una disminución abrupta. Este comportamiento se debe a que el aumento de temperatura aumenta el número de colisiones entre las moléculas de sustrato y la enzima. Se debe tomar en cuenta que a mayores temperaturas se puede inducir la desnaturalización enzimática, lo que disminuye la actividad enzimática, esto suele ocurrir por encima de los 60–70 C, las únicas excepciones son las enzimas que son producidas por organismos termófilos (Wilson, 2013).

En el caso del pH la variación de este puede modificar la conformación tridimensional de la enzima al alterar el estado de ionización de los grupos funcionales del sitio activo. La estructura de la enzima depende del equilibrio entre interacciones electrostáticas, es decir, atracciones y repulsiones entre residuos aminoacídicos con cargas opuestas. Como en el caso de la temperatura, las enzimas poseen un rango de operación óptimo de pH, fuera de dicho rango disminuye la actividad enzimática de la enzima hasta el punto de su desnaturalización total, volviéndola completamente inefectiva. En el caso de las enzimas más resistentes a los cambios de pH, la enzima conserva más del 75 % de su actividad en un margen más amplio alrededor de su pH óptimo (Wilson, 2013).

7. Invertasa

También conocida comúnmente como sacarasa. El producto de esta reacción es una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, conocida como azúcar invertido, término que se origina del cambio en la rotación óptica: la sacarosa, inicialmente dextrorrotatoria, al ser transformada por la enzima, genera una solución levorrotatoria. La invertasa se encuentra ampliamente distribuida en diversos organismos, incluyendo microorganismos, plantas y animales,

desempeñando un papel esencial en el metabolismo de oligosacáridos y polisacáridos que posean fructosa como parte de sus unidades básicas, como lo es el caso de la sacarosa. En cuanto a su estructura, la invertasa intracelular presenta un peso molecular aproximado de 135 kDa, mientras que la forma extracelular alcanza alrededor de 270 kDa (Whitaker, 2018).

La invertasa fue una de las primeras enzimas en ser estudiadas debido a su capacidad para hidrolizar sacarosa en glucosa y fructosa. Su actividad fue observada por primera vez en 1833, cuando el químico francés Jean-Baptiste Biot notó un cambio en la rotación óptica de soluciones de sacarosa tratadas con extractos de levadura. En 1835, el químico Marcellin Berthelot confirmó que esta inversión óptica se debía a la acción de una sustancia presente en la levadura, denominando el producto como “azúcar invertido”. Más tarde, en 1876, Wilhelm Kühne acuñó el término "enzima" para referirse a estos agentes solubles, clasificando a la invertasa dentro de esta nueva categoría, distinta de los fermentos celulares. Ya en el siglo XX, la enzima fue aislada y caracterizada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, consolidándose como un modelo clave en el estudio de la catálisis enzimática y el metabolismo de carbohidratos (Whitaker, 2018).

La invertasa tiene un amplio uso en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica debido a su capacidad para catalizar la hidrólisis de sacarosa en una mezcla de glucosa y fructosa, conocida como azúcar invertido. Esta mezcla es altamente apreciada por su mayor poder endulzante, su resistencia a la cristalización y su estabilidad, lo que la hace ideal para la elaboración de jarabes, confitería, productos de repostería y rellenos de chocolates. En la industria farmacéutica, se utiliza para formular jarabes más estables y de mejor palatabilidad. Además, en procesos biotecnológicos, la invertasa es empleada en la producción de bioetanol y en fermentaciones que requieren la conversión previa de sacarosa (Whitaker, 2018).

B. SACÁRIDOS

Los azúcares, también conocidos como sacáridos o carbohidratos, son biomoléculas formadas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Su estructura básica consiste en unidades de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas cuando se encuentran en sus formas no cicladas, y representan una de las principales fuentes de energía para los seres vivos. En organismos heterótrofos, como los animales y muchos microorganismos, los carbohidratos se degradan mediante rutas metabólicas para liberar energía utilizable en forma de ATP. Además de su función energética, los azúcares desempeñan roles estructurales importantes en plantas, ejemplo de esto es la celulosa en las paredes celulares y la quitina en los exoesqueletos de los artrópodos. Además, estos compuestos participan en procesos de señalización celular, reconocimiento inmunológico y síntesis de biomoléculas esenciales (Lehninger et al., 2013).

Los sacáridos se clasifican en función del número de unidades monoméricas que los componen. Los monosacáridos son las unidades más simples, como la glucosa y la fructosa. Cuando dos monosacáridos se enlazan mediante un enlace glucosídico, forman disacáridos, como la sacarosa y la lactosa. Los oligosacáridos contienen entre dos y diecinueve unidades de monosacáridos, y suelen estar unidos a proteínas o lípidos en las membranas celulares. Por último, los polisacáridos están formados por largas cadenas de monosacáridos; entre ellos se destacan el almidón, el glucógeno y la celulosa, que cumplen funciones de almacenamiento energético o soporte estructural dependiendo del organismo y el contexto fisiológico (Lundblad & Macdonald, 2018).

1. Monosacáridos

Son carbohidratos más simples y constituyen las unidades básicas a partir de las cuales se forman los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Están formados por una sola cadena de átomos de carbono con grupos hidroxilo (-OH) y un grupo carbonilo, que puede ser un aldehído (aldosas) o una cetona (cetosas). Su fórmula general es $C_nH_{2n}O_n$ donde n generalmente varía su valor entre tres y siete, teniendo un valor entre 5 y 6 para los monosacáridos más importantes en la naturaleza. Entre los monosacáridos más comunes se encuentran la glucosa, la fructosa y la galactosa, los cuales desempeñan un papel fundamental

en el metabolismo celular como fuente inmediata de energía. Además, muchos monosacáridos pueden modificarse o combinarse con otras moléculas para cumplir funciones estructurales o de señalización en los organismos vivos. Debido a su solubilidad en agua y su capacidad para formar enlaces glucosídicos, los monosacáridos son altamente versátiles en sistemas biológicos (Lundblad & Macdonald, 2018).

a. Glucosa

La glucosa es un monosacárido no ionizado cuya fórmula molecular es $C_6H_{12}O_6$, clasificado como una aldohexosa debido a que posee seis átomos de carbono en su estructura y un grupo funcional aldehído en uno de sus extremos. Es el azúcar más abundante en la naturaleza y se presenta como un sólido blanco, cristalino y altamente soluble en agua. Su masa molar es de 180.16 g/mol. Se encuentra de forma natural en frutas, vegetales y miel, y también forma parte de productos procesados como cereales y bebidas, donde es empleada como edulcorante por su capacidad de realzar el sabor. En solución acuosa, la glucosa puede adoptar una estructura cíclica en forma de hexágono, lo que le confiere estabilidad química y reactividad adecuada para participar en enlaces glucosídicos con otros azúcares (Lundblad & Macdonald, 2018).

Desde un punto de vista fisiológico, la glucosa representa una fuente esencial de energía para los organismos heterótrofos, incluyendo al ser humano. Su concentración en sangre está estrechamente regulada, y cualquier exceso es rápidamente utilizado o almacenado. Una de sus principales funciones es la obtención de energía, esta molécula se degrada en una serie de reacciones enzimáticas hasta convertirse en piruvato, liberando energía en el proceso. Esta energía se captura en forma de ATP, a través de la fosforilación de ADP, y es utilizada para sostener funciones celulares vitales (Audesirk et al., 2017).

b. Fructosa

Es un monosacárido natural que se encuentra comúnmente en frutas, jugos, algunas hortalizas y en la miel. Químicamente, comparte la misma fórmula molecular que la glucosa $C_6H_{12}O_6$,

pero difiere en su estructura: mientras que la glucosa es una aldohexosa, la fructosa es una cetohehexosa, debido a la presencia de un grupo cetona en el carbono 2. Es el azúcar natural más dulce conocido, y se presenta como un sólido cristalino altamente soluble en agua. Posee una masa molar de 180.16 g/mol y un punto de ebullición elevado, cercano a los 440 °C. Su alta dulzura la hace ideal como edulcorante en la industria alimentaria, especialmente en jarabes de maíz de alta fructosa y productos procesados. En soluciones acuosas, puede adoptar estructuras cíclicas en forma de pentágono lo que aumentan su estabilidad y reactividad química, favoreciendo su uso en formulaciones alimenticias (Lehninger et al., 2013).

Desde un punto de vista metabólico, la fructosa se metaboliza principalmente por la vía de la fructólisis. A diferencia de la glucosa, su captación no está regulada por la insulina, lo que permite su entrada directa a los hepatocitos. Allí se transforma en intermediarios que pueden ser utilizados para la síntesis de glucosa, glucógeno, lactato o ácidos grasos. Sin embargo, un consumo elevado y sostenido de fructosa, especialmente en su forma libre o en jarabes concentrados, puede generar un exceso de producción de triglicéridos, lo que contribuye a la dislipidemia y a trastornos metabólicos como el hígado graso no alcohólico. Además, este desequilibrio energético puede alterar la sensibilidad a la insulina y favorecer el desarrollo de enfermedades crónicas si no se regula adecuadamente (Lehninger et al., 2013).

2. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son carbohidratos formados por la unión de entre dos y diecinueve monosacáridos mediante enlaces glucosídicos. Aunque son menos abundantes que el resto de los sacáridos, desempeñan funciones biológicas altamente especializadas. A menudo se encuentran unidos covalentemente a proteínas (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos), formando estructuras complejas que participan en procesos fundamentales como el reconocimiento celular, la adhesión entre células, la respuesta inmune y la señalización intercelular. En la superficie de las células, los oligosacáridos actúan como "etiquetas" que permiten identificar tipos celulares y detectar la presencia de agentes patógenos. Además, algunos oligosacáridos presentes en los alimentos, como los fructooligosacáridos (FOS),

tienen efectos prebióticos, ya que estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino humano. Debido a su estructura ramificada y diversidad en los enlaces, presentan una gran variabilidad funcional y estructural (Lehninger et al., 2013).

a. Sacarosa

La sacarosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa (aldohexosa) y una de fructosa (cetohexosa) unidas mediante un enlace glucosídico α (1 $\rightarrow$ 2). Su fórmula molecular es $C_{12}H_{22}O_{11}$, con una masa molar de 342.30 g/mol. Se presenta como un sólido cristalino, blanco, soluble en agua y con un sabor dulce característico. Es uno de los azúcares más comunes en la naturaleza y se encuentra en altas concentraciones en la caña de azúcar, la remolacha azucarera, frutas y vegetales. La sacarosa es ampliamente utilizada como endulzante en la industria alimentaria y constituye una fuente rápida de energía. En soluciones acuosas, no posee poder reductor debido a que ambos grupos anoméricos de sus monosacáridos están involucrados en el enlace, lo que impide su apertura a las formas lineales características de azúcares reductores (Whitaker, 2018).

Desde el punto de vista industrial, la sacarosa tiene un papel fundamental en múltiples sectores, especialmente en la industria alimentaria, donde se emplea no solo como edulcorante, sino también como agente de conservación, estabilizante de textura y potenciador de sabor. Se utiliza en la elaboración de productos de panadería, bebidas, golosinas, confitería, mermeladas y productos lácteos. En la industria farmacéutica, es un excipiente común en jarabes y comprimidos, mejorando la palatabilidad de los medicamentos. También se emplea como sustrato en procesos fermentativos para la producción de etanol, ácidos orgánicos y bioplásticos. Su disponibilidad, bajo costo y propiedades fisicoquímicas la convierten en un ingrediente versátil y esencial en la formulación de una amplia gama de productos comerciales (Whitaker, 2018).

La sacarosa se encuentra en altas concentraciones en ciertas plantas que han sido ampliamente utilizadas para la producción industrial de azúcar. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es la principal fuente a nivel mundial, con un contenido de sacarosa que oscila entre el 12 % y el 16 % del peso fresco del tallo. En regiones de clima templado, la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) representa una fuente clave, ya que sus raíces

almacenan entre 15 % y 20 % de sacarosa. Otra planta de interés es el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), cuyo jugo del tallo puede contener entre 7 % y 12 % de sacarosa, siendo evaluado también como materia prima para la producción de biocombustibles (Yahia, 2018).

3. Polisacáridos

Las moléculas poliméricas complejas formadas por la unión de más de dieciocho monosacáridos mediante enlaces glucosídicos, y pueden estar compuestos por cientos o incluso miles de unidades. Se clasifican en homopolisacáridos, si están formados por un solo tipo de monosacárido, como en el caso del almidón o la celulosa, formados únicamente por glucosa, y en heteropolisacáridos cuando contienen distintos tipos de unidades básicas. Cumplen funciones esenciales en los organismos vivos, principalmente como reservas energéticas (como el almidón en plantas y el glucógeno en animales) o como componentes estructurales, como la celulosa en las paredes celulares vegetales o la quitina en los exoesqueletos de artrópodos. A diferencia de los azúcares simples, los polisacáridos no suelen tener sabor dulce y su complejidad estructural los hace menos solubles en agua, aunque más estables y adecuados para funciones biológicas de largo plazo (Whitaker, 2018).

4. Azúcar invertido

El azúcar invertido es una mezcla equimolar de glucosa y fructosa que se obtiene por la hidrólisis de la sacarosa, un disacárido compuesto por estos dos monosacáridos. Esta reacción puede llevarse a cabo mediante hidrólisis ácida o a través de hidrólisis enzimática, principalmente con la enzima invertasa. El término “invertido” proviene del cambio en la rotación óptica de la solución: mientras que la sacarosa es dextrorrotatoria, la mezcla resultante después de la hidrólisis se vuelve levorrotatoria debido a la mayor rotación específica negativa de la fructosa. Este fenómeno fue observado por primera vez por Biot y Berthelot en el siglo XIX, y dio lugar al nombre azúcar invertido (Caballero et al., 2013).

Una de las principales razones por las que el azúcar invertido se utiliza en la industria alimentaria es su mayor poder edulcorante comparado con la sacarosa. La sacarosa tiene un

poder relativo de referencia de 1, mientras que la glucosa tiene un dulzor relativo de aproximadamente 0.7 y la fructosa de 1.2 a 1.8, dependiendo de la temperatura y la concentración. En conjunto, el azúcar invertido puede percibirse entre 20 % y 30 % más dulce que una solución de sacarosa al 100 % (Rippe, 2014).

Respecto al rendimiento del proceso, la hidrólisis enzimática con invertasa ofrece varias ventajas sobre la hidrólisis ácida. Aunque ambos métodos pueden lograr conversiones cercanas al 100 % bajo condiciones óptimas, la vía enzimática es más específica, más eficiente energéticamente y menos agresiva, ya que evita la formación de productos secundarios indeseados como compuestos caramelizados o sustancias que podrían afectar el sabor o el color del producto final. Además, la hidrólisis enzimática puede realizarse en condiciones más suaves de pH y temperatura, lo cual es fundamental en productos alimentarios sensibles al calor o a la acidez elevada (Whitaker, 2018).

C. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La inmovilización enzimática es una técnica que consiste en fijar una enzima a un soporte sólido o dentro de una matriz, con el fin de mantener su actividad catalítica mientras se facilita su recuperación y reutilización. Este proceso puede llevarse a cabo mediante diversos métodos, como la adsorción física, la reticulación con agentes químicos, la encapsulación en geles o la unión covalente a superficies funcionalizadas. Estos métodos buscan estabilizar la enzima sin alterar de forma significativa su estructura tridimensional ni su sitio activo, asegurando su eficacia catalítica a lo largo de múltiples usos (Sheldon & Van Pelt, 2013).

La principal función de la inmovilización enzimática es mejorar la eficiencia y sostenibilidad de los procesos donde se emplean enzimas. Al inmovilizar una enzima, se evita su pérdida durante las etapas de separación, se facilita su incorporación en sistemas de flujo continuo y se reduce el costo operacional, al permitir su uso en múltiples ciclos en sistemas tipo batch. Esto resulta especialmente útil en aplicaciones industriales, como en la producción de alimentos, síntesis farmacéutica o tratamiento de residuos, donde la reutilización y la

estabilidad en condiciones extremas son claves para la viabilidad económica del proceso (Sheldon & Van Pelt, 2013).

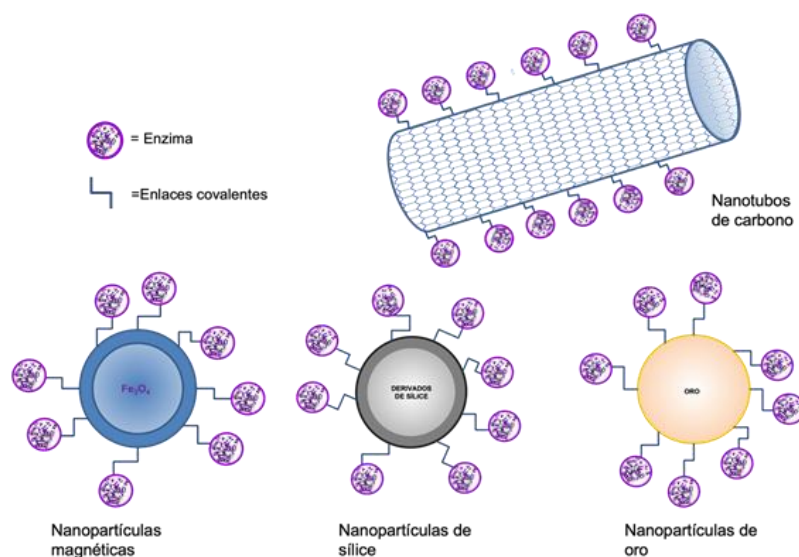
Las enzimas inmovilizadas presentan características únicas que las diferencian de sus contrapartes libres. Estas incluyen una mayor estabilidad térmica y frente a cambios de pH, una mejor resistencia a disolventes orgánicos, y una facilidad notable para su separación del medio de reacción. Además, permiten la operación en reactores enzimáticos de lecho fijo o sistemas continuos, lo cual optimiza el control del proceso y la calidad del producto final. Sin embargo, es importante considerar que la inmovilización puede conllevar una ligera disminución inicial de actividad debido a restricciones de difusión o cambios en la conformación de la enzima (Sheldon & Van Pelt, 2013).

1. Unión covalente

Es un método en el cual la enzima se une de forma permanente a un soporte sólido mediante enlaces químicos covalentes. A diferencia de otros métodos como la adsorción física o el atrapamiento, este tipo de inmovilización garantiza una alta estabilidad de la enzima, ya que el enlace formado entre el grupo funcional de la enzima (generalmente grupos amino, carboxilo, éster, tiol o hidroxilo) y el grupo reactivo del soporte es fuerte y resistente a condiciones extremas (Datta et al., 2013).

En el esquema se muestra una representación ilustrativa de cómo se uniría la enzima de forma covalente a la superficie del soporte sólido a nivel nanomecular.

Figura 3. Inmovilización por unión covalente



Fuente: Parra, et al., 2024.

a. Funcionalización

La funcionalización es un proceso mediante el cual se introducen grupos funcionales reactivos en la superficie de un soporte sólido, con el objetivo de otorgar la habilidad de reaccionar con otras moléculas, como enzimas, anticuerpos o ligandos. En el contexto de la inmovilización enzimática, esta técnica es esencial para convertir superficies químicamente inertes en materiales capaces de formar enlaces covalentes o interacciones fuertes con las enzimas. Los grupos funcionales más comunes introducidos son amino ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), hidroxilo ($-OH$) y aldehído ($-CHO$), ya que permiten realizar uniones estables bajo condiciones controladas, facilitando así una inmovilización eficiente y duradera (Wade, 2017).

Uno de los agentes más utilizados para funcionalizar soportes es el glutaraldehído, un dialdehído que actúa como puente entre el soporte y la enzima. Cuando el soporte posee grupos amino (por ejemplo, en quitosano o sílica tratada con aminosilanos), el glutaraldehído se une primero a estos grupos, dejando libre uno de sus extremos aldehído. Posteriormente, al añadir la enzima, los grupos amino presentes en los residuos de lisina reaccionan con el

grupo aldehído restante, formando enlaces tipo imina ($-C=N-$). De esta manera, la enzima queda firmemente unida al soporte mediante un enlace covalente, lo que reduce significativamente la lixiviación y mejora la estabilidad frente a variaciones de pH, temperatura o solventes. Sin embargo, es importante controlar las condiciones del proceso para evitar una reticulación excesiva que afecte la conformación y actividad de la enzima (Datta et al., 2013).

b. PHA

El PHA, siglas de polihidroxialcanoato, es una familia de poliésteres biológicos producidos por diversas bacterias como material de reserva de carbono y energía, especialmente en condiciones de limitación de nutrientes esenciales y exceso de carbono. Se sintetiza intracelularmente y puede extraerse para aplicaciones industriales. Dentro de esta familia, el polihidroxibutirato (PHB) es el más conocido. Estos polímeros son completamente biodegradables, biocompatibles y termoplásticos, lo que los convierte en alternativas sostenibles a los plásticos derivados del petróleo. Gracias a su origen microbiano, pueden ser producidos a partir de materias primas renovables, incluidos residuos agrícolas o subproductos industriales (Sudesh et al., 2000).

El PHA tiene aplicaciones en múltiples sectores, incluyendo la industria médica (en suturas, matrices para ingeniería de tejidos y sistemas de liberación controlada), empaques biodegradables, y como soporte para inmovilización enzimática, dada su estructura funcionalizable y compatibilidad biológica. Sus principales características incluyen alta resistencia mecánica, bajo grado de toxicidad, posibilidad de ser modificado químicamente, y una degradación ambiental rápida por acción microbiana. Además, su superficie puede ser tratada para permitir la unión covalente de biomoléculas, lo que amplía sus usos en biocatálisis, biosensores y procesos de biotransformación (Chen & Wu, 2005).

Al funcionalizar el PHA, se incorporan grupos químicos activos en su superficie. Esta modificación permite que, al aplicar una técnica de inmovilización, se establezcan enlaces covalentes entre dichos grupos y la enzima, fijándola sobre el material tratado.

c. Lixiviación

Se refiere a la pérdida o liberación de la enzima desde el soporte al medio de reacción. Esto ocurre cuando la enzima no está unida de forma permanente (por ejemplo, cuando está adsorbida físicamente o atrapada débilmente), y factores como el pH, la agitación, la temperatura o la presencia de ciertos solventes provocan que la enzima se desprenda.

Este fenómeno es indeseable, ya que reduce la eficiencia del biocatalizador inmovilizado al impedir su reutilización, contaminar el producto final y provocar variaciones en la actividad catalítica. Por ello, en aplicaciones industriales se prefiere usar métodos de inmovilización más estables, como la unión covalente, precisamente para minimizar la lixiviación (Sheldon & Van Pelt, 2013).

D. REFRACTOMETRÍA

La reflectometría es una técnica analítica dentro del campo de la óptica que se basa en el estudio de la reflexión de la luz cuando incide sobre la superficie de un material. El índice de refracción es una propiedad óptica utilizada para identificar la composición de una sustancia, ya que varía con la temperatura y es único para cada compuesto. Esta propiedad está influenciada por la cantidad de partículas disueltas y se define como la razón entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad al atravesar un medio material. Cuando la luz incide sobre una sustancia, cambia de dirección debido a esta diferencia de velocidades, fenómeno conocido como refracción (Kaushik & Kumar, 2023).

Los refractómetros son dispositivos diseñados para medir este cambio en la trayectoria de la luz. Su funcionamiento se basa en que, a mayor densidad de un material, mayor será su índice de refracción. Existen dos tipos principales de refractómetros: los que operan con sistemas de transmisión de luz, como los modelos portátiles o tipo Abbe, y los que emplean el principio de reflexión, como los refractómetros digitales. Estos últimos pueden llegar a utilizar cantidades muy pequeñas de muestras llegando a ser de 0.2 mL y proporcionan resultados en cuestión de segundos (Kaushik & Kumar, 2023).

El índice de refracción es una magnitud adimensional que depende de parámetros como la longitud de onda de la luz empleada y la temperatura de la muestra. La reflectometría se

aplica para determinar la composición o pureza de sustancias de forma cualitativa y sin destruir la muestra. En el ámbito industrial, esta medición es ampliamente utilizada en el control de calidad (Kaushik & Kumar, 2023).

Entre las aplicaciones de esta técnica se encuentra su uso en laboratorio y en diversas industrias. En la industria alimentaria, se utiliza para controlar el contenido de azúcar en bebidas como refrescos y jugos, mediante la medición del índice de refracción en grados Brix, asegurando así la consistencia del producto final (Nielsen, 2010). En laboratorios bioquímicos, esta técnica permite cuantificar la concentración de enzimas o proteínas en solución, ya que pequeñas variaciones en la composición modifican el índice de refracción, facilitando análisis rápidos y no destructivos (Wilson, 2013). Por otro lado, en la industria petroquímica, se emplea para monitorear la calidad de combustibles y aceites lubricantes, detectando contaminaciones o degradaciones a partir de cambios en el comportamiento óptico de las muestras. Estas aplicaciones demuestran la versatilidad y eficiencia de la reflectometría como herramienta de control de calidad en diversos sectores industriales (Nadkarni, 2005).

E. REACTORES

1. Reactor intermitente

Es un sistema cerrado y agitado en el que los reactivos se cargan al inicio del ciclo y no existen flujos de alimentación ni de descarga durante la etapa de reacción. La composición del medio varía con el tiempo hasta alcanzar un objetivo definido de conversión, tras lo cual se procede a la descarga, limpieza y preparación del siguiente lote. El ciclo típico de un reactor intermitente tiene las etapas de preparación del equipo, carga de materias primas, ajuste de condiciones de reacción, reacción con agitación y control de temperatura y vaciado.

Entre las ventajas que presentan los reactores intermitentes se encuentra en la capacidad permite modificar condiciones a las que se opera como son concentración a la que se ingresan los reactivos, la temperatura de operación de un lote a otro y demás condiciones que intervienen en la reacción. Esto resulta útil en el desarrollo de procesos principalmente en los que la materia prima recibida puede variar de un lote a otro. Esto también facilita la

trazabilidad por lote y la aplicación de controles de calidad en puntos específicos del ciclo (Levenspiel, 1999).

Las variables críticas de operación incluyen la temperatura, el pH, la velocidad de agitación, el tiempo de residencia del lote y la secuencia de adiciones. En sistemas sensibles como los catalizados por enzimas el control estrecho de pH y temperatura es determinante para preservar una actividad catalítica óptima y evitar la desnaturalización de la enzima. La agitación debe ser suficiente para garantizar homogeneidad sin causar degradación del catalizador por esfuerzo cortante (Doran, 2013).

Entre las limitaciones del modo que presentan estos reactores se encuentran los tiempos muertos de carga, descarga y limpieza. Además, se tienen una menor productividad volumétrica frente a procesos diseñados de forma continua (Levenspiel, 1999).

2. Biorreactor enzimático

Esta es una unidad de proceso diseñada para albergar una enzima como biocatalizador y proporcionar el ambiente necesario para maximizar su actividad y mantener su estabilidad con el objetivo de evitar su desnaturalización. Puede operar con enzimas libres en solución o inmovilizadas sobre un soporte. La configuración del equipo y el modo de operación se seleccionan en función de la sensibilidad al esfuerzo cortante, la necesidad de producción continua, los requisitos de pureza del producto y la necesidad económica de separación y reutilización del biocatalizador (Doran, 2013).

En términos de configuración, los biorreactores enzimáticos abarcan desde tanques agitados hasta lechos fijos con enzima inmovilizada, lechos fluidizados que mejoran el contacto entre la solución y la matriz de inmovilización y reactores con membrana que facilitan retener la enzima y obtener efluentes libres de catalizador. Cada alternativa presenta compromisos específicos: los tanques ofrecen control fino y versatilidad. Los lechos fijos favorecen la operación continua y la productividad. Los lechos fluidizados atenúan gradientes y ensuciamientos. Por último, las membranas simplifican la separación, pero exigen gestión del ensuciamiento y la caída de presión (Doran, 2013).

Las condiciones de operación como el pH, temperatura, fuerza iónica, composición del medio y régimen de mezcla o flujo se intentan mantener cerca del valor óptimo de la enzima. La

inmovilización mediante unión covalente sobre soportes funcionalizados reduce la lixiviación y mejora la resistencia a temperatura y pH, a costa de posibles pérdidas iniciales de actividad y de menor difusión de masa en soportes porosos lo cual ralentizaría la velocidad de reacción. La selección adecuada de tamaño de partícula, porosidad y química superficial del soporte contribuye a minimizar dichas limitaciones (Doran, 2013).

La estabilidad operativa se contrala mediante estabilización de temperatura, dosificación de reactivos, selección de materiales compatibles y planes de mantenimiento de la matriz de inmovilización. El sistema de instrumentación y control suele integrar medición y regulación de pH, temperatura y agitación. Se mantiene un control de conversión en línea y control de caudal en operación continua para sostener la calidad y conversión del producto (Levenspiel, 1999).

8. ANTECEDENTES

A. Resistencia a lixiviación a través de los ciclos

La inmovilización enzimática por unión covalente ofrece ventajas técnicas destacadas frente a otros métodos como la adsorción física o el atrapamiento, especialmente por su capacidad de minimizar la lixiviación enzimática. En estudios comparativos, se ha observado que enzimas inmovilizadas mediante adsorción pueden perder hasta 40–70 % de su actividad catalítica en los primeros tres ciclos de uso, debido al desprendimiento de la enzima (Datta et al., 2013). En contraste, la inmovilización covalente reduce esa pérdida a menos del 10 % incluso tras cinco ciclos consecutivos, ya que la enzima queda fuertemente unida al soporte mediante enlaces covalentes estables, como los generados por glutaraldehído al reaccionar con residuos de lisina. Esta fijación química asegura una mayor retención funcional aún bajo condiciones de agitación, variaciones de pH o presencia de disolventes moderados.

Además de la menor lixiviación, la unión covalente proporciona mayor estabilidad térmica y operacional. Por ejemplo, invertasa inmovilizada covalentemente ha mostrado mantener más del 80 % de su actividad original después de 10 ciclos de reutilización a 50 °C, mientras que la forma libre pierde más del 50 % en menos de cinco ciclos (Sheldon & Van Pelt, 2013). Esta mejora se atribuye a la rigidez estructural que aporta la fijación al soporte, lo que protege la conformación nativa de la enzima frente a desnaturalización. Aunque este método puede provocar una leve disminución inicial de la actividad catalítica (entre un 5–15 %) debido a la posible alteración del sitio activo durante el acoplamiento, su ventaja en términos de reutilización, durabilidad y resistencia a condiciones agresivas lo convierte en la opción preferida para aplicaciones industriales que demandan procesos prolongados y eficientes (Sheldon & Van Pelt, 2013).

B. Estudio de comportamiento de invertasa a diferentes condiciones

En 2023, se realizó un estudio en la Universidad del Valle, en la Ciudad de Guatemala, propuesta por Pineda (2023). En este, se hizo un análisis 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 tres métodos de inmovilización, por adsorción utilizando carbón activado, por atrapamiento mediante alginato de sodio y por último por unión covalente empleando PHA funcionalizado con glutaraldehído, donde se determinó que el segundo tenía un mejor rendimiento, por lo que este se utilizó para realizar una comparación con la enzima libre. Con base en esto, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 1. Rendimiento de inmovilización con los distintos tipos de soporte

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

Cuadro 2. 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 (g/mL)	K2 (ppm ⁻¹ min ⁻¹)	Eo (ppm)	
Libre	Temperatura	40° C	0.048	0.003	0.007	2.320	0.045	12.000
		50° C	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000
		60° C	0.048	0.003	0.004	1.919	0.049	12.000
		70° C	0.048	0.002	0.012	2.424	0.042	12.000
	pH	3	0.048	0.003	0.022	2.250	0.044	12.000
		5	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000
		6	0.048	0.002	0.002	1.834	0.059	12.000
		7	0.049	0.001	0.002	1.854	0.056	12.000
	Concentración	9	0.048	0.003	0.017	2.355	0.041	12.000
		0.05 g/mL	0.048	0.002	0.001	1.818	0.062	12.000
		0.10 g/mL	0.093	0.008	0.015	1.813	0.066	12.000

SopORTE	Variable	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 ⁻¹ min ⁻¹)	Eo (ppm)	
Carbón activado	Temperatura	0.15 g/mL	0.142	0.009	0.031	1.793	0.072	12.000
		0.20 g/mL	0.194	0.006	0.064	1.863	0.057	12.000
		40° C	0.049	0.001	0.008	2.320	0.045	13.190
		50° C	0.047	0.003	0.003	1.818	0.062	13.190
		60° C	0.048	0.003	0.003	1.919	0.049	13.190
		70° C	0.047	0.003	0.011	2.424	0.042	13.190
		3	0.047	0.003	0.026	2.250	0.044	13.190
	pH	5	0.047	0.003	0.002	1.818	0.062	13.190
		6	0.047	0.003	0.003	1.834	0.059	13.190
		7	0.047	0.003	0.004	1.854	0.056	13.190
	Concentración	9	0.047	0.003	0.012	2.355	0.041	13.190
		0.05 g/mL	0.047	0.003	0.002	1.818	0.062	13.190
		0.10 g/mL	0.093	0.008	0.019	1.813	0.066	13.190
		0.15 g/mL	0.140	0.010	0.044	1.793	0.072	13.190
0.20 g/mL		0.193	0.008	0.046	1.863	0.057	13.190	
40° C		0.048	0.002	0.008	2.320	0.045	12.580	
50° C		0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580	
PHA	Temperatura	60° C	0.048	0.003	0.002	1.919	0.049	12.580
		70° C	0.049	0.001	0.009	2.424	0.042	12.580
		3	0.049	0.001	0.023	2.250	0.044	12.580
	pH	5	0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580
		6	0.046	0.004	0.002	1.834	0.059	12.580
		7	0.045	0.005	0.002	1.854	0.056	12.580
	Concentración	9	0.046	0.004	0.010	2.355	0.041	12.580
		0.05 g/mL	0.046	0.004	0.002	1.818	0.062	12.580
		0.10 g/mL	0.091	0.009	0.016	1.813	0.066	12.580
		0.15 g/mL	0.133	0.018	0.037	1.793	0.072	12.580
Alginato de sodio	Temperatura	0.20 g/mL	0.197	0.003	0.038	1.863	0.057	12.580
		40° C	0.046	0.004	0.009	2.320	0.045	17.438
		50° C	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438
		60° C	0.047	0.003	0.003	1.919	0.049	17.438
		70° C	0.045	0.005	0.012	2.424	0.042	17.438
		3	0.048	0.002	0.028	2.250	0.044	17.438
		5	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438
	pH	6	0.046	0.004	0.003	1.834	0.059	17.438
		7	0.048	0.002	0.004	1.854	0.056	17.438
		9	0.047	0.003	0.019	2.355	0.041	17.438
	Concentración	0.05 g/mL	0.046	0.004	0.003	1.818	0.062	17.438
		0.10 g/mL	0.093	0.007	0.023	1.813	0.066	17.438
		0.15 g/mL	0.139	0.012	0.048	1.793	0.072	17.438
		0.20 g/mL	0.190	0.010	0.067	1.863	0.057	17.438

9. METODOLOGÍA

A. CREACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN DE REFRACTÓMETRO

- Azúcar comercial (sacarosa)
- Glucosa monohidratada 99% m/m
- Fructosa 99% m/m
- Ácido acético 95% m/m
- Potenciómetro marca OHAUS Aquasearcher
- Hidróxido de sodio industrial
- Espátula analítica
- Balanza analítica marca OHAUS
- Agitadores magnéticos
- Estufa con agitación
- Pipetas de 5 mL
- Beaker de 1 L
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

Procedimiento:

1. Medir 0.286 mL de ácido acético y 0.1 g de hidróxido de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada, para preparar un buffer.
2. Ajustar el pH del buffer a 5. Este se utilizará para realizar las siguientes soluciones.
3. Preparar soluciones madre de 25 mL para realizar la curva de calibración con las siguientes cantidades
 - a. 0 g Sacarosa, 2.171 g glucosa monohidratada y 1.974 g fructosa
 - b. 3.75 g Sacarosa, 0 g glucosa monohidratada y 0 g fructosa
4. Preparar soluciones de 5mL con los siguientes de volúmenes de cada solución madre

Cuadro 3. Volúmenes de solución madre para la creación de curva de calibración

Volumen (mL)	
Solución Madre Sacarosa	Solución Madre Glucosa y Fructosa
5	0
4	1
3	2
2	3
1	4
0	5

B. CORRIDA DE INVERTASA LIBRE Y SOBRENADANTE

Procedimiento basado en lo realizado por Tanriseven & Dogan (2001) y Bargamasco et al., (2000) y modificado para el estudio “Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial” hecho por Gabriela Estefanía Pineda Ramírez (2023):

- Invertasa Grado Industrial
- Azúcar comercial (sacarosa)
- Ácido acético 95% m/m
- Potenciómetro marca OHAUS Aquasearcher
- Hidróxido de sodio industrial
- Espátula analítica
- Balanza analítica marca OHAUS
- Agitadores magnéticos
- Estufa con agitación
- Pipetas de 5 mL
- Beaker de 1 L
- Beaker de 250 mL
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO

Procedimiento:

1. Medir 0.286 mL de ácido acético y 0.1 g de hidróxido de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada, para preparar un buffer.

2. Medir y ajustar el pH del buffer a 5.
3. Pesar 0.1 g de invertasa grado industrial y disolverla en 100 mL de buffer.
4. Pesar 15 g de azúcar y disolverla en 100 mL de buffer
5. Colocar el beaker con la solución en un baño térmico a 50°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 la solución en los tiempos de 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
8. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración para determinar la concentración de sacarosa a lo largo del tiempo.
9. Una vez realizada la inmovilización (Sección C), repetir el procedimiento con 1 mL de la solución con la que se realizó la inmovilización en el PHA.

C. INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA POR UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTO EN POLIHIDROXIALCANOATO FUNCIONALIZADO CON GLUTARLADEHÍDO

Procedimiento basado en lo realizado por El-Sayed et al. (2015) y modificado para el estudio “Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial” hecho por Gabriela Estefanía Pineda Ramírez (2023):

Materiales y equipo

- Invertasa grado industrial
- PHA
- Buffer de acetato 0.05 M
- Glutaraldehído 25% m/m
- Hidróxido de sodio 99% m/m
- Estufa con agitación
- Agitador magnético
- Micropipeta de 100 microlitros
- 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 25% m/m.
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.

D. ENSAYOS DE REUTILIZACIÓN Y ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LA INVERTASA INMOVILIZADA

Procedimiento basado en lo realizado por Tanriseven & Dogan (2001) y Bargamasco et al., (2000) y modificado para el estudio “Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial” hecho por Gabriela Estefanía Pineda Ramírez (2023):

- PHA con invertasa inmovilizada
- Azúcar comercial (sacarosa)
- Ácido acético 95% m/m
- Potenciómetro marca OHAUS Aquasearcher
- Hidróxido de sodio industrial
- Espátula analítica
- Balanza analítica marca OHAUS
- Agitadores magnéticos
- Estufa con agitación
- Pipetas de 5 mL

- Beaker de 1 L
- Beaker de 250 mL
- Tubos de ensayo con tapadera
- Refractómetro marca ATAGO
- Kitasato
- Bomba de vacío
- Embudo Buchner

Procedimiento:

1. Medir 0.286 mL de ácido acético y 0.1 g de hidróxido de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada, para preparar un buffer.
2. Medir y ajustar el pH del buffer a 5.
3. Pesar 15 g de azúcar y disolverla en 100 mL de buffer
4. Colocar el beaker con la solución en un baño térmico a 50°C.
5. Cuando alcance la temperatura deseada, agregar 5 g de polihidroxialcanoato con invertasa inmovilizada a la solución de sacarosa.
6. Dejar reaccionar durante 20 minutos, tomando una muestra de la solución en los tiempos de 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 minutos. Se deben hervir las muestras para desactivar la enzima.
8. Filtrar el PHA en el sistema de filtrado, realizando lavados con el buffer.
7. Medir los índices de refracción de las muestras y utilizar la curva de calibración para determinar la concentración de sacarosa a lo largo del tiempo.
8. Repetir el procedimiento agregando el mismo PHA utilizado en la corrida anterior.

E. ANÁLISIS CINÉTICO

- Berkeley Madonna

Procedimiento:

1. Construir un modelo utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2).
2. Importar datos de concentración de sustrato de cada una de las corridas realizadas.
3. Ajustar el modelo, para que su comportamiento se apegue a los datos experimentales obtenidos
4. Determinar los parámetros cinéticos de constante de Michaelis-Menten y número de recambio para las corridas de enzima libre y primer ciclo de enzima inmovilizada.
5. Para las corridas de sobrenadante y resto de ciclos de reutilización de invertasa inmovilizada dejar las constantes cinéticas fijadas y realizar el ajuste modificando la concentración de invertasa en la solución.

10.RESULTADOS

Cuadro 4. Parámetros cinéticos para cada corrida utilizando el modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre e inmovilizada en PHA

Estado de Enzima	K_m (g*mL ⁻¹)	K_{+2} (ppm ⁻¹ *min ⁻¹)	Conc. Inicial Sacarosa (g*mL ⁻¹)	Conc. Final Sacarosa (g*mL ⁻¹)	E_0 (ppm)
Libre	1.785	0.0752	0.1503	0.026	12.500
Inmovilizada	1.792	0.0705	0.1521	0.032	13.376

Los datos se obtuvieron con el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa (ecuación 1). Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{ C}$, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato inicial promedio de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$.

Ecuación 2. Modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre

$$v = \frac{0.0752 (\text{ppm}^{-1} * \text{min}^{-1}) * [E]_0[S]}{1.785(\text{g} * \text{mL}^{-1}) + [S]}$$

Modelo generado con base en los parámetros cinéticos obtenidos (Cuadro 4) y el modelo general de Michaelis-Menten (ecuación 1).

Ecuación 3. Modelo general de Michaelis-Menten para invertasa inmovilizada

$$v = \frac{0.0705 (\text{ppm}^{-1} * \text{min}^{-1}) * [E]_0[S]}{1.792 (\text{g} * \text{mL}^{-1}) + [S]}$$

Modelo generado con base en los parámetros cinéticos obtenidos (Cuadro 4) y el modelo general de Michaelis-Menten (ecuación 1).

Cuadro 5. Rendimiento de inmovilización

Soporte	Rendimiento
PHA	$33.45 \pm 3.17 \% m/m$

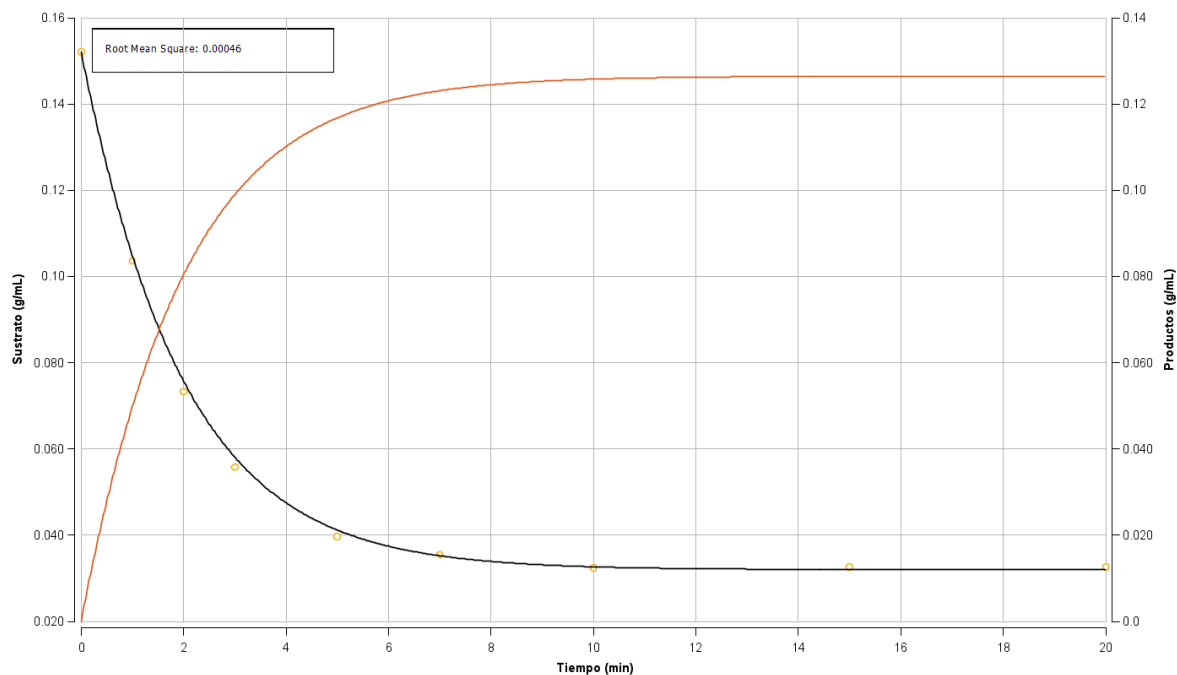
Se evaluó el rendimiento de inmovilización mediante la determinación de la concentración de enzima inicial y restante en el supernatante de la solución de acoplamiento.

Cuadro 6. Retención de actividad enzimática

Tiempo (min)	Retención de actividad (% g*mL ⁻¹ *ppm ⁻¹)	Incertidumbre (±%g*mL ⁻¹ *ppm ⁻¹)
1	79.38	2.96
2	83.63	2.15
3	86.70	1.69
5	94.89	1.66
7	89.46	1.47
10	90.65	1.46
15	90.50	1.45
20	89.41	1.43

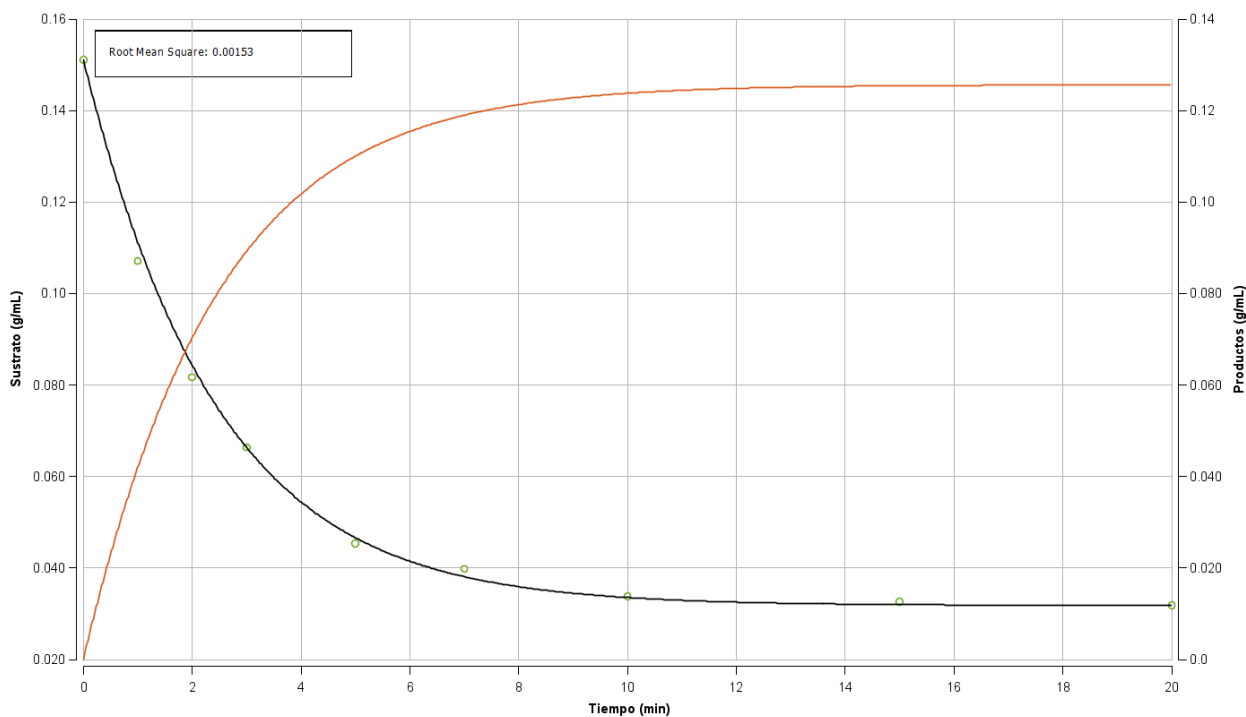
Se evaluó la retención de actividad enzimática de la enzima inmovilizada mediante la comparación del cambio de concentración entre la enzima libre y fijada a lo largo del tiempo. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial promedio de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$.

Figura 4. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el primer ciclo de uso de invertasa inmovilizada



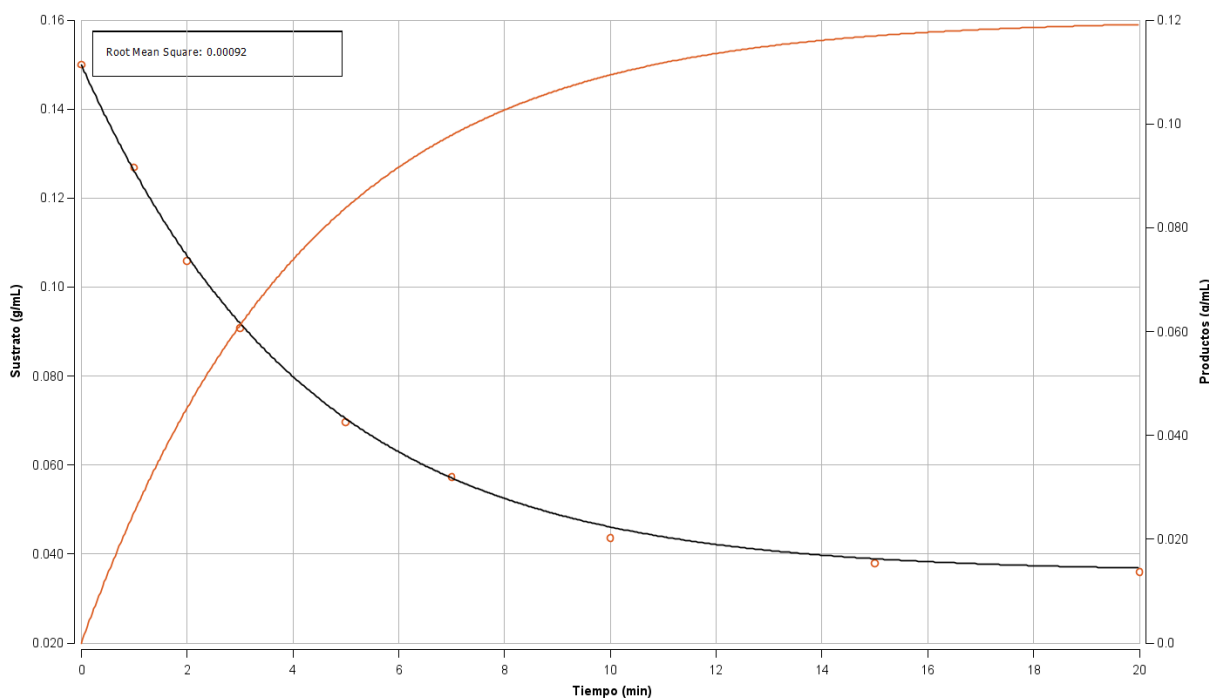
Es el modelo para la primera corrida de invertasa inmovilizada. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1521 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario (línea negra) y la concentración de productos totales en el eje secundario (línea anaranjada).

Figura 5. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el octavo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



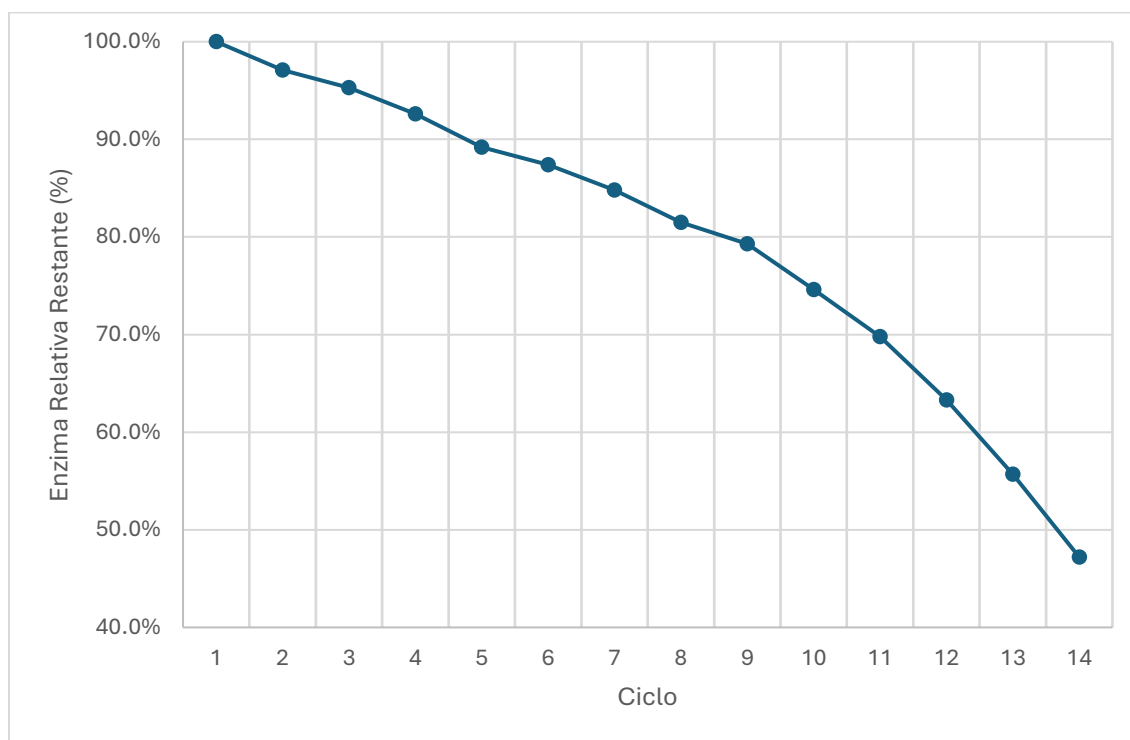
Es el modelo utilizado para determina la concentración del enzima restante del séptimo ciclo. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario (línea negra) y la concentración de productos totales en el eje secundario (línea anaranjada).

Figura 6. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada



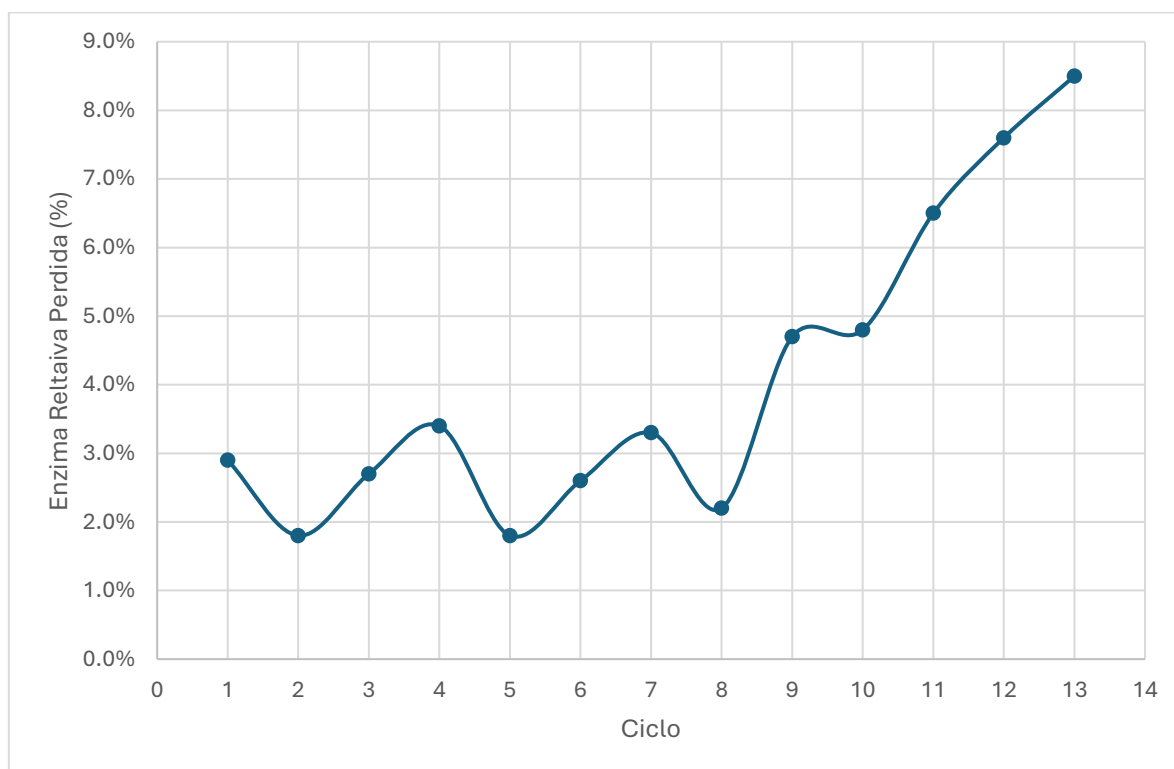
Es el modelo utilizado para determina la concentración del enzima restante del décimo tercer ciclo. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario (línea negra) y la concentración de productos totales en el eje secundario (línea anaranjada).

Figura 7. Invertasa restante relativa a la inicial luego de cada ciclo de uso



La enzima relativa restante se obtiene mediante la división de la concentración de enzima inmovilizada en cada ciclo. La concentración de enzima fijada inicial. Las condiciones de la reacción para todos los ciclos fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial promedio de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$.

Figura 8. Invertasa relativa perdida en cada ciclo de uso



La pérdida de enzima por ciclo se obtiene mediante la resta de la enzima relativa restante de cada ciclo menos la enzima restante del próximo ciclo. Las condiciones de la reacción para todos los ciclos fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial promedio de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$.

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad de invertasa inmovilizada en polihidroxialcanoato a través de ciclos de reacción enzimática. Esto se logró mediante el estudio del cambio de concentración de catalizador a lo largo de múltiples ciclos de uso del mismo soporte enzimático en un sistema simulando un reactor STR con concentración 0.15g/mL de sacarosa, pH 5, 50°C, 500rpm y durante 20 minutos. Para realizar este estudio de cambio de concentración se hizo una inmovilización covalente superficial en la matriz mediante el uso de glutaraldehído como puente químico para la unión del polímero con la enzima teniendo como objetivo determinar el rendimiento de inmovilización para evaluar el éxito de esta mediante un balance de masa con la concentración de enzima restante en la solución usada en la inmovilización. También se analizó la retención de actividad enzimática para determinar la viabilidad de utilización de la enzima inmovilizada y el efecto de la inmovilización sobre la velocidad de reacción.

Fue necesario experimentar varios ciclos para observar no solo la fase inicial de pérdidas bajas y casi lineales, sino también la transición a un régimen de desanclaje acelerado que aparece al superar un umbral de reutilización; de lo contrario, se habría sobreestimado la estabilidad real del biocatalizador. En los primeros durante los ciclos, entre 8 a 10 dependiendo de la matriz, suele observarse una pérdida casi lineal y baja de actividad, asociada al arrastre de fracciones débilmente ancladas y a la hidratación inicial del soporte, lo que puede inducir una sobreestimación de la robustez si el seguimiento se detiene allí. A partir de un umbral crítico de ciclos utilizados, en el cual el número promedio de puntos de anclaje covalentes por molécula de invertasa cae por debajo de un mínimo estructural necesario para mantenerla firmemente fijada a la matriz; a partir de ese punto, la enzima queda sostenida por pocos enlaces, aumenta su movilidad y el desanclaje se vuelve mucho más probable, se observa un desanclaje con incrementos marcados en la tasa de pérdida, causado por la hidrólisis acumulativa de enlaces imina causados por la acidez del medio y la fuerza de cizallamiento experimentada, la fatiga mecánica del soporte, alcanzándose hasta un 50% m/m de enzima restante. Al continuarse reutilizando, se observa la etapa de agotamiento donde se pierde en menor tasa que el umbral crítico pero mayor que la fase

inicial hasta queda con un 30% m/m donde se alcanza la última etapa llamada meseta tardía donde se pierde a una tasa parecida a la etapa inicial, aquí se pierde las enzimas más estables que poseen la mayor cantidad de puntos de anclaje y menos accesibles (Datta et al., 2013).

Se determinó que no es necesario realizar la experimentación múltiples veces ya que se realizó la inmovilización enzimática múltiples veces, obteniéndose valores con una variabilidad entre si menor al 1% m/m. Además, en el estudio llamado “Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial” hecho por Gabriela Estefanía Pineda Ramírez en la Universidad del Valle de Guatemala con los mismos reactivos se obtuvo una variabilidad similar con este método de inmovilización, demostrando consistencia en los datos con esta metodología. Adicionalmente, el alcance del estudio es únicamente sobre la estabilidad enzimática de la enzima a lo largo de múltiples ciclos de uso y no de su comparación con otros grupos de enzima inmovilizada. Asimismo, el experimento se planteó con un diseño longitudinal, en el que el mismo biocatalizador se monitoreó a lo largo de ciclos sucesivos de uso, generando múltiples mediciones independientes en el tiempo, esto genera que el ajuste del modelo de decaimiento entregue parámetros y bandas de confianza a partir de los residuos. Esto indica que la estadística proviene del propio ajuste temporal, no de repetir el mismo ensayo múltiples veces (Boudrant et al., 2020).

El sistema experimental se armó usando de dos beakers (1L y 250ml), uno dentro del otro. Al beaker de mayor volumen se le agregó agua con el objetivo de crear un baño térmico. Dentro del beaker pequeño se le agregó 100mL de solución buffer y 15g de sacarosa, se agitó hasta disolver el sustrato y se calentó a 50°C. Una vez alcanzada la temperatura de experimentación se agregó los pellets de polímero con invertasa inmovilizada y se comenzó la toma de muestras las cuales fueron hervidas para desnaturalizar la invertasa desprendida del soporte. Posteriormente, se determinó el índice de refracción de cada muestra mediante un refractómetro y se calculó la concentración de sacarosa en cada punto del ciclo mediante una curva de calibración para realizar el ajuste del modelo cinético de cada ciclo.

La unión covalente superficial a una matriz funcionalizada ofrece ventajas claras frente a otros modos de inmovilización. Entre las ventajas más relevantes se encuentra la posibilidad de su reutilización por una mayor cantidad de ciclos de hidrólisis. El anclaje covalente reduce de forma drástica la lixiviación de enzima hacia el producto, de modo que la actividad se mantiene a lo largo de campañas repetidas sin necesidad de recargar en cada corrida. Esta pérdida enzimática es mucho mayor en otras formas de inmovilización, como lo es atrapamiento en de alginato y adsorción en carbón activado. Además, el anclaje multipunto suele rigidizar moderadamente la proteína, elevando su estabilidad térmica y mecánica volviendo la inmovilización más resistente al cizallamiento y variaciones de pH y temperatura. Por otro lado, las perlas de alginato son frágiles, llegándose a romper, y el carbón genera finos por desgaste.

Otra ventaja de la unión covalente superficial es la menor a la difusión másica. Esto se debe a que la enzima queda expuesta en el interfaz sólido líquido, de modo que la transferencia del sustrato y producto es más rápida con el medio y la respuesta del biocatalizador es más estable en el tiempo. En cambio, en técnicas atrapamiento o matrices porosas el sustrato debe difundir hacia el interior y el producto salir, generando gradientes de concentración que ralentizan la cinética aparente y hacen el proceso más sensible al tamaño de partícula, viscosidad y agitación. Ahora bien, si la unión covalente no es superficial, si no que se realiza dentro de un medio poroso, como lo pueden ser resinas macro porosas y espumas, también puede aparecer limitación difusional interna. El sustrato debe recorrer la red de poros hasta los sitios anclados y el producto salir, esto impide el uso del modelo cinético de Michaelis-Menten debido a que el parámetro que va a regir la velocidad de reacción es la difusión de masa. Por eso, el anclaje superficial en PHA que se emplea aquí minimiza esas resistencias internas, permitiendo tiempos de residencia más cortos y un perfil de conversión más reproducible.

Las condiciones a realizar la experimentación fueron a $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial promedio de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Las condiciones de temperatura y acidez fueron seleccionadas de las óptimas encontradas en el

trabajo “Evaluación a escala laboratorio de soportes catalíticos para inmovilización de invertasa grado industrial” hecho por Gabriela Estefanía Pineda Ramírez. Estas condiciones óptimas concuerdan con las encontradas en la literatura, siendo de un intervalo de temperatura entre 45 a 50°C y un pH de 5 a 7 (Wilson, 2013). En el caso de la concentración de sustrato se decidió usar una concentración de 0.15 g/mL ya que, con base en la evaluación previa que fundamenta las condiciones operativas de este estudio, la mayor inversión de sacarosa con invertasa inmovilizada se observó precisamente a 0.15 ± 0.0005 g/mL. A partir de una concentración de 0.20 g/mL la reacción se tornó más lenta y a 0.40–0.60 g/mL las curvas de sustrato y producto ya no se intersecan mostrando un comportamiento compatible con el inicio de inhibición por sustrato en exceso.

Se obtuvo un rendimiento de inmovilización de $33.45 \pm 3.17\%$ m/m, como se muestra en el Cuadro 5. Este es un rendimiento esperado el necesitarse crear sitios activos superficiales en los pellets de polímero con el uso de glutaraldehído para poder unir con enlaces covalentes la enzima. En otras matrices poliméricas como lo son las resinas epóxicas y de metacrilato se presentan rendimientos de inmovilización parecidos. Esto se debe a que cuando el anclaje es covalente y, en particular, multipunto, la captura inicial suele ser moderada porque depende de la densidad de grupos reactivos y de las condiciones de acoplamiento. Bajo ese mismo principio, el valor de $33.45 \pm 3.17\%$ m/m en PHA es coherente con lo observado para en otras matrices poliméricas de configuración únicamente por unión covalente y confirma que el sistema implementado prioriza un anclaje robusto sobre la captación masiva.

Para la determinación de este rendimiento de inmovilización se cuantificó la concentración de invertasa mediante el ajuste de las curvas de conversión de sacarosa con el sobrenadante usando los parámetros de las constantes cinéticas obtenidas del modelo ajustado de enzima libre, manteniendo las mismas condiciones de concentración de sustrato inicial para evitar inhibición por exceso de sustrato, temperatura y pH. Se realizó un balance másico de concentración de proteína disponible menos la concentración remanente en el sobrenadante, al ser el mismo volumen de ambas soluciones, dividido entre la proteína utilizable. Esto

permitió saber la concentración de enzima utilizada en el primer ciclo de uso y ajustar el modelo para determinar las constantes cinéticas de la enzima inmovilizada.

Con base en los parámetros cinéticos, encontrados en el Cuadro 4, la inmovilización no modificó de forma significativa la afinidad hacia el sustrato y velocidad de reacción al comparar las constantes obtenidas. Se obtuvo una constante de Michaelis de $1.785 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para enzima libre y $1.792 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de enzima inmovilizada. Además, se obtuvo un cambio de la constante catalítica, también conocida como número de recambio, de 0.0752 a $0.0705 \text{ ppm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ entre la enzima libre e inmovilizada. Existen modelos cinéticos en los que se incluye un factor de efectividad η para comparar el cambio de la velocidad de reacción manteniendo las mismas constantes cinéticas de la enzima libre con el fin de identificar si la inmovilización introduce efectos adicionales, como resistencias difusionales o cambios del microentorno del soporte, que pueden reducir la velocidad aparente de reacción respecto a la enzima libre. En este caso, el factor obtenido en el estudio fue del $93.75\% \text{ ppm} \cdot \text{min}^{-1}$ y se puede explicar por el anclaje covalente multipunto que rigidiza la proteína. Esta inmovilización restringe los micro movimientos necesarios para el ciclo catalítico, con lo cual se gana estabilidad térmica y mecánica, pero perjudica levemente la actividad catalítica. Este patrón donde la constante de Michaelis permanece parecida constante y el número de recambio disminuye de forma leve, siendo en este caso un $6.25\% \text{ ppm} \cdot \text{min}^{-1}$, es precisamente el esperado cuando el microentorno del soporte y la química de acoplamiento, en este caso con glutaraldehído, priorizan robustez estructural sobre velocidad máxima por sitio activo (Rodrigues et al., 2021).

Cuando se analiza la retención de actividad a lo largo del tiempo, cuadro 6, se muestra un acondicionamiento breve característico de una inmovilización. La retención aumenta de $79.38 \pm 2.96\% \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ a un máximo de $94.89 \pm 1.66\% \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ a los 5 minutos, para luego estabilizarse en una meseta cercana al $90\% \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ entre los 7 y 20 minutos con una incertidumbre entre ± 1.43 y $1.47\% \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$. En este soporte, dicho comportamiento se atribuye a la rápida humectación del polímero semicristalino, el establecimiento de la capa de hidratación y del pH interfacial sobre la superficie formado por

las cargas e interacciones entre los diversos grupos funcionales (Bolivar & Nidetzky, 2019). Una vez alcanzado ese equilibrio en la interfaz del PHA con la enzima, el biocatalizador opera en régimen de meseta, demostrando la estabilización de la enzima en el medio, y baja dispersión entre los valores de los minutos 7 a 20, lo que confirma que la inmovilización en PHA no introduce limitaciones difusionales externas que dominen la velocidad de la reacción y sostiene un desempeño estable a escala de ciclo (Wong et al., 2020).

Al analizar los modelos cinéticos de la hidrólisis en diferentes ciclos de uso de invertasa inmovilizada, como se muestra en las figuras 4 a 6. Se puede observar el aumento del tiempo necesario para llegar a conversiones parecidas lo cual es visto como una menor pendiente inicial de consumo de sustrato y un corrimiento a la derecha de las curvas conforme avanzan el número de ciclos de reutilización. Este patrón es coherente con la disminución progresiva de la concentración efectiva de enzima activa estimada por el ajuste cinético de constantes cinéticas ancladas al mantener las mismas condiciones. En términos de una operación, se exigen tiempos mayores de residencia o la reposición parcial del biocatalizador en ciclos tardíos para sostener la conversión objetivo (McKee et al., 2014).

Cuando se evalúa la estabilidad de la enzima en base a la invertasa relativa restante y pérdida relativa por ciclo, figuras 7 y 8. Se logra evidenciar una etapa inicial de los ciclos 1 al 8 en donde se tienen pérdidas bajas y estables que pueden promediarse sin perder representatividad. La pérdida enzimática relativa media es de un 2.59% m/m con una desviación estándar de 0.62% m/m. Esta desviación estándar pequeña indica baja variabilidad entre ciclos, consistente con fenómenos repetibles e indica que la inmovilización mantiene un anclaje multipunto aún íntegro con la mayoría de la enzima. Este valor también respalda que el sistema se comporta de forma cuasi estacionario y que el promedio es una buena medida del régimen real de desgaste durante estos primeros usos (Datta et al., 2013).

Una vez alcanzado el noveno ciclo como se puede observar un aumento en la pérdida de invertasa, Figura 8. Este cambio se puede deber al alcanzar el umbral crítico desde este punto

se empieza a observar un aumento progresivo de pérdida desde 4.7% m/m hasta 8.5% m/m cambiando de un desgaste lineal a uno acelerado, esto se explica por la acumulación de la hidrólisis de enlaces de anclaje y fuerza de cizallamiento ejercida en la matriz. Esta transición se debe al promedio de puntos de anclaje por enzima, el cual es el número de enlaces covalentes que cada molécula conecta con la matriz. Mientras este promedio se mantenga por encima de un mínimo estructural, las tensiones se reparten entre todos los enlaces y limita la movilidad de la proteína. Una vez cruzado ese umbral, cada ruptura redistribuye la carga sobre menos puntos, incrementa la movilidad local de la enzima y facilita nuevas hidrólisis de otros enlaces de anclaje, generando una dinámica en la que cada ruptura aumenta la probabilidad de la siguiente (Mateo et al., 2007).

Con el fin de mejorar la resistencia a la hidrólisis de los enlaces de anclaje se puede realizar una estabilización reductora de las iminas con cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN), debido a su carácter de reductor suave y quimioselectivo hacia enlaces imina bajo condiciones suaves (pH ligeramente ácido–neutro, temperatura ambiente, concentraciones moderadas del reductor), lo que permite estabilizar el anclaje sin promover reducciones extensas de otros grupos funcionales que podrían afectar la actividad enzimática, convirtiéndolas en enlaces amina más estables. Esta reducción se realiza posteriormente a la inmovilización para reforzar el anclaje multipunto de la invertasa al polihidroxialcanoato. Químicamente, las iminas son electrofílicas y susceptibles en medios ácidos. El nitrógeno se suele protonar, permitiendo el ataque nucleofílico del agua creando como resultado un carbonilo y una amina, facilitando el desanclaje. En cambio, las aminas no son electrofílicas, aunque pueda protonarse por la presencia de un ácido, no sufre la misma ruta de hidrólisis al no ser catalizadas por este (Migneault et al., 2004). Una desventaja del uso de este método es la posible modificación de los aminoácidos, principalmente de la lisina, involucrados en la orientación del sitio activo o en la dinámica superficial de la enzima; esa modificación química puede disminuir la actividad catalítica inicial y la afinidad aparente por el sustrato. Por esto es necesario tener un buen control del pH y tiempo de reacción con el agente reductor (Hermanson, 2013).

En resumen, la determinación del rendimiento de inmovilización permitió determinar el éxito de la inmovilización y la cantidad de enzima fijada. Una vez fijada la enzima se procedió al análisis de la retención de actividad enzimática para definir la pérdida de velocidad dada por la rigidización de la enzima. El análisis cinético a través de los ciclos de uso permitió observar la invertasa restante después de cada iteración generando un análisis de comportamiento de la pérdida del biocatalizador. Una vez establecido una eficiencia de inmovilización de $33.45 \pm 3.17\%$ m/m, una retención de actividad media de 90% $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ a lo largo del ciclo y un comportamiento de pérdida de enzima constante a lo largo de los primeros ocho ciclo y creciente a partir del noveno. Se da una solución a la problemática sobre la falta de información sobre la estabilidad de invertasa inmovilizada en polihidroxialcanoato mediante unión covalente multipunto superficial. Este estudio plantea la posibilidad para la investigación sobre la estabilidad enzimática en diferentes métodos y soportes de inmovilización, además, de experimentar sobre la mejora de la técnica empleada como lo es la reducción de los enlaces imina.

12.CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un rendimiento de inmovilización de invertasa de forma covalente multipunto en polihidroxialcanoato funcionalizado con glutaraldehído de $33.45 \pm 3.17\%$ m/m, este valor se encuentra dentro del rango esperado con este tipo de técnica y comparado con inmovilizaciones enzimáticas en diferentes polímeros.
2. El análisis de actividad enzimática por gramo de enzima en un mismo ciclo demostró una fase de acondicionamiento inicial para posteriormente llegar a una fase estable en la que se obtiene una retención de actividad promedio de 90% $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ comparado con la actividad de la enzima libre.
3. Se observó un comportamiento de la pérdida de invertasa constante durante los primeros ocho ciclos de uso, teniendo una media de 2.59% m/m de pérdida por ciclo con una desviación estándar de $\pm 0.69\%$ m/m. A partir del noveno ciclo se notó un aumento progresivo de la pérdida, de 4.7% m/m a 8.5% m/m coherente con el cruce de un umbral de anclaje multipunto.

13.RECOMENDACIONES

1. Evaluar la estabilidad enzimática en otras técnicas de inmovilización a lo largo de múltiples ciclos de uso.
2. Evaluar la retención de actividad y estabilidad enzimática al reforzar la inmovilización mediante la reducción de los enlaces de anclaje imina a amina con cianoborohidruro de sodio.
3. Maximizar la funcionalización del PHA y del acoplamiento covalente mediante un experimento factorial que varíe el pH de acoplamiento, el porcentaje de glutaraldehído y el tiempo de activación.
4. Evaluar la estabilidad enzimática a diferentes esfuerzos cortantes mediante la variación de la velocidad de agitación.
5. Realizar pruebas de co-inmovilización con glucosa isomerasa para reducir inhibición por producto y de diferente poder edulcorante.
6. Evaluar la estabilidad del almacenamiento mediante curvas de retención tras múltiples semanas en seco y en soluciones tampón.
7. Evaluar el efecto del tipo de reactor sobre la estabilidad enzimática a lo largo de múltiples ciclos de uso.
8. Evaluar el efecto de escalamiento del proceso a nivel industrial sobre la estabilidad enzimática a lo largo de múltiples ciclos de uso.

14.BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B. (Ed.). (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed). Garland Science.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2017). *Biología*. Pearson Educación.
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th ed). W.H. Freeman.
- Bolivar, J. M., & Nidetzky, B. (2019). The Microenvironment in Immobilized Enzymes: Methods of Characterization and Its Role in Determining Enzyme Performance. *Molecules*, 24(19), 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules24193460>
- Boudrant, J., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, 90, 66-80.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>
- Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and enzyme technology* (2nd, completely rev., and enl. ed (Online-Ausg.) ed.). Wiley-Blackwell.
- Caballero, B., Allen, L., & Prentice, A. (Eds.). (2013). *Encyclopedia of human nutrition* (3. ed). Academic.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
<https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chen, G.-Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles* (2nd ed). Elsevier/Academic Press.
- Flickinger, M. C. (Ed.). (2010). *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470054581>

- Foreign Agricultural Service. (2024, abril 18). *Brazil: Sugar Annual* | USDA Foreign Agricultural Service. <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-sugar-annual-10>
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate techniques* (Third edition). Elsevier/AP.
- Kaushik, S., & Kumar, B. (Eds.). (2023). *Analytical methods in chemical analysis: An introduction*. De Gruyter.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed). W.H. Freeman.
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical reaction engineering. Hauptbd.* (3. ed). Wiley.
- Lundblad, R. L., & Macdonald, F. M. (2018). *Handbook of biochemistry and molecular biology* (5th ed). CRC press, Taylor & Francis group.
- Manoochehri, H., Hosseini, N. F., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H., & Nouri, F. (2020). A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101599. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2007.01.018>
- McKee, T., McKee, J. R., Araiza Martínez, M. E., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*. McGraw-Hill Interamericana.
- Michele, P. (2023). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790-802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>
- Nadkarni, R. A. (2005). *Elemental Analysis of Fuels and Lubricants: Recent Advances and Future Prospects*. ASTM International.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Hoskins, A. A., & Lehninger, A. L. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (Eighth edition). Macmillan International Higher Education.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food Analysis*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1>

- Pomeranz, Y. (1985). *Functional properties of food components*. Academic Press.
- Rippe, J. M. (Ed.). (2014). *Fructose, high fructose corn syrup, sucrose and health*. Humana Press.
- Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnology Advances*, 52, 107821. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>
- Sheldon, R. A., & Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>
- Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2018). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, 118(2), 801-838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Verstrepen, K. J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2004). Glucose and sucrose: Hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology*, 22(10), 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.08.001>
- Wade, L. G. (2017). *Organic Chemistry, Books a la Carte Edition*. Pearson.
- Whitaker, J. R. (2018). *Principles of Enzymology for the Food Sciences* (2.^a ed.). Routledge. <https://doi.org/10.1201/9780203742136>
- Wilson, K. (Ed.). (2013). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed., 4th print). Cambridge University Press.
- Wong, J. X., Ogura, K., Chen, S., & Rehm, B. H. A. (2020). Bioengineered Polyhydroxyalkanoates as Immobilized Enzyme Scaffolds for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 156. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00156>
- Yahia, E. M. (Ed.). (2018). *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health* (2nd edition). John Wiley & Sons Ltd.

15.ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES

Cuadro 7. Concentraciones e índices de refracción de la curva de calibración para refractómetro según la concentración de sacarosa, y fructosa y glucosa

Conc. de Sacarosa (g/mL $\pm$ 0.001 g/mL)	Conc. de Glucosa (g/mL $\pm$ 0.001 g/mL)	Conc. de Fructosa (g/mL $\pm$ 0.001 g/mL)	Índice de Refracción ($\pm$ 0.00002)
0.15	0	0	1.35361
0.12	0.016	0.016	1.35373
0.09	0.032	0.032	1.35392
0.06	0.047	0.047	1.35409
0.03	0.063	0.063	1.35432
0	0.079	0.079	1.35442

Se crearon múltiples soluciones según la concentración de cada compuesto en el avance de la reacción, 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 8. Índices de refracción de las muestras de la corrida de la enzima libre

Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 ($\pm$ 0.00002)	Índice 2 ($\pm$ 0.00002)	Índice 3 ($\pm$ 0.00002)
0	1.35354	1.35355	1.35352
1	1.35387	1.35389	1.35387
2	1.35396	1.35394	1.35399
3	1.35415	1.35413	1.35410
5	1.35415	1.35417	1.35421
7	1.35426	1.35422	1.35424
10	1.35425	1.35425	1.35426
15	1.35425	1.35425	1.35425
20	1.35426	1.35425	1.35426

Se tomaron muestras de las corridas de enzima libre en el tiempo 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. El índice de refracción fue medido en triplicado en cada muestra. Las condiciones de la corrida fueron temperatura de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.15 \pm 0.001 \text{ g/mL}$.

Cuadro 9. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima en el remanente de la inmovilización

Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 (± 0.00002)	Índice 2 (± 0.00002)	Índice 3 (± 0.00002)
0	1.35357	1.35354	1.35355
1	1.35386	1.35386	1.35385
2	1.35402	1.35404	1.35399
3	1.35417	1.35414	1.35415
5	1.35422	1.35420	1.35422
7	1.35423	1.35422	1.35424
10	1.35425	1.35426	1.35426
15	1.35426	1.35427	1.35427
20	1.35427	1.35427	1.35427

Se realizó la corrida con el remanente del medio utilizado para llevar a cabo la inmovilización. Se tomaron muestras de las corridas en el tiempo 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. El índice de refracción fue medido en triplicado en cada muestra. Las condiciones de la corrida fueron temperatura de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.15 \pm 0.001 \text{ g/mL}$.

Cuadro 10. Índices de refracción de las muestras de las corridas para la determinación de la concentración de enzima inmovilizada restante durante cada ciclo de uso

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 (± 0.00002)	Índice 2 (± 0.00002)	Índice 3 (± 0.00002)
1	0	1.35351	1.35354	1.35353
	1	1.35381	1.35379	1.35382
	2	1.35398	1.35397	1.35397
	3	1.35407	1.35408	1.35410
	5	1.35417	1.35419	1.35416
	7	1.35420	1.35419	1.35421
	10	1.35420	1.35420	1.35422
	15	1.35421	1.35420	1.35423
	20	1.35421	1.35420	1.35422

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 ($\pm$ 0.00002)	Índice 2 ($\pm$ 0.00002)	Índice 3 ($\pm$ 0.00002)
2	0	1.35351	1.35354	1.35354
	1	1.35378	1.35378	1.35379
	2	1.35395	1.35394	1.35391
	3	1.35408	1.35409	1.35406
	5	1.35417	1.35416	1.35420
	7	1.35418	1.35419	1.35418
	10	1.35423	1.35419	1.35421
	15	1.35421	1.35421	1.35425
	20	1.35424	1.35422	1.35421
	0	1.35353	1.35352	1.35353
3	1	1.35385	1.35383	1.35382
	2	1.35394	1.35391	1.35396
	3	1.35406	1.35406	1.35406
	5	1.35417	1.35416	1.35417
	7	1.35418	1.35418	1.35417
	10	1.35419	1.35421	1.35422
	15	1.35422	1.35420	1.35422
	20	1.35422	1.35421	1.35421
	0	1.35355	1.35355	1.35355
	1	1.35382	1.35383	1.35380
4	2	1.35395	1.35394	1.35397
	3	1.35406	1.35406	1.35408
	5	1.35413	1.35411	1.35414
	7	1.35419	1.35420	1.35419
	10	1.35420	1.35420	1.35421
	15	1.35424	1.35419	1.35422
	20	1.35422	1.35423	1.35422
	0	1.35352	1.35355	1.35358
	1	1.35432	1.35436	1.35434
	2	1.35394	1.35393	1.35395
5	3	1.35402	1.35403	1.35402
	5	1.35416	1.35414	1.35419
	7	1.35418	1.35420	1.35416
	10	1.35421	1.35421	1.35420
	15	1.35422	1.35422	1.35420
	20	1.35422	1.35421	1.35421

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 ($\pm$ 0.00002)	Índice 2 ($\pm$ 0.00002)	Índice 3 ($\pm$ 0.00002)
6	0	1.35354	1.35355	1.35354
	1	1.35434	1.35435	1.35433
	2	1.35393	1.35394	1.35392
	3	1.35404	1.35406	1.35402
	5	1.35411	1.35412	1.35411
	7	1.35416	1.35415	1.35419
	10	1.35420	1.35421	1.35420
	15	1.35421	1.35421	1.35419
	20	1.35421	1.35421	1.35420
	0	1.35351	1.35353	1.35355
7	1	1.35376	1.35375	1.35375
	2	1.35394	1.35393	1.35394
	3	1.35401	1.35398	1.35403
	5	1.35413	1.35411	1.35416
	7	1.35419	1.35421	1.35419
	10	1.35421	1.35419	1.35421
	15	1.35422	1.35420	1.35424
	20	1.35422	1.35423	1.35419
	0	1.35354	1.35357	1.35353
	1	1.35379	1.35381	1.35378
8	2	1.35393	1.35392	1.35394
	3	1.35402	1.35402	1.35403
	5	1.35414	1.35415	1.35412
	7	1.35417	1.35417	1.35416
	10	1.35421	1.35422	1.35420
	15	1.35421	1.35423	1.35420
	20	1.35422	1.35421	1.35423
	0	1.35354	1.35354	1.35353
	1	1.35375	1.35375	1.35376
	2	1.35391	1.35390	1.35393
9	3	1.35400	1.35399	1.35403
	5	1.35413	1.35413	1.35414
	7	1.35416	1.35414	1.35418
	10	1.35420	1.35418	1.35421
	15	1.35422	1.35420	1.35425
	20	1.35421	1.35424	1.35418

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 ($\pm$ 0.00002)	Índice 2 ($\pm$ 0.00002)	Índice 3 ($\pm$ 0.00002)
10	0	1.35353	1.35354	1.35352
	1	1.35373	1.35374	1.35371
	2	1.35387	1.35387	1.35386
	3	1.35399	1.35398	1.35398
	5	1.35411	1.35412	1.35409
	7	1.35416	1.35415	1.35418
	10	1.35419	1.35421	1.35416
	15	1.35420	1.35421	1.35420
	20	1.35420	1.35418	1.35421
	0	1.35355	1.35355	1.35355
11	1	1.35374	1.35371	1.35375
	2	1.35386	1.35383	1.35388
	3	1.35397	1.35395	1.35399
	5	1.35409	1.35409	1.35409
	7	1.35416	1.35415	1.35416
	10	1.35419	1.35421	1.35418
	15	1.35422	1.35421	1.35423
	20	1.35422	1.35421	1.35422
	0	1.35354	1.35354	1.35356
	1	1.35371	1.35369	1.35371
12	2	1.35386	1.35386	1.35386
	3	1.35395	1.35395	1.35395
	5	1.35408	1.35410	1.35408
	7	1.35414	1.35413	1.35415
	10	1.35417	1.35416	1.35417
	15	1.35419	1.35419	1.35418
	20	1.35420	1.35422	1.35420
	0	1.35354	1.35352	1.35354
	1	1.35370	1.35368	1.35373
	2	1.35382	1.35381	1.35384
13	3	1.35391	1.35390	1.35392
	5	1.35405	1.35407	1.35402
	7	1.35412	1.35410	1.35412
	10	1.35417	1.35420	1.35416
	15	1.35419	1.35421	1.35418
	20	1.35421	1.35420	1.35421

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice 1 ($\pm$ 0.00002)	Índice 2 ($\pm$ 0.00002)	Índice 3 ($\pm$ 0.00002)
14	0	1.35355	1.35353	1.35355
	1	1.35368	1.35367	1.35370
	2	1.35380	1.35377	1.35382
	3	1.35388	1.35388	1.35388
	5	1.35400	1.35399	1.35399
	7	1.35407	1.35406	1.35408
	10	1.35415	1.35417	1.35414
	15	1.35418	1.35420	1.35416
	20	1.35419	1.35421	1.35416

Se realizó la corrida de cada uno de los ciclos de enzima inmovilizada para determinar el porcentaje de enzima retenida. Se tomaron muestras de las corridas en el tiempo 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 min y cada una se les midió el índice de refracción con un refractómetro marca ATAGO. El índice de refracción fue medido en triplicado en cada muestra. Las condiciones de todas las corridas fueron una temperatura de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.15 \pm 0.001 \text{ g/mL}$.

B. DATOS CALCULADOS

Cuadro 11. Índices de refracción promedio y concentraciones de compuestos de las muestras de la corrida de la enzima libre y sobrenadante de la inmovilización

Solución	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
Enzima libre	0	1.35354	1.53E-05	0.1503	2.68E-03	0.0000
	1	1.35387	1.15E-05	0.0932	2.03E-03	0.0601
	2	1.35396	2.52E-05	0.0765	4.42E-03	0.0777
	3	1.35413	2.52E-05	0.0465	4.42E-03	0.1093
	5	1.35417	3.06E-05	0.0396	5.36E-03	0.1166
	7	1.35424	2.00E-05	0.0285	3.51E-03	0.1283
	10	1.35425	5.77E-06	0.0269	1.01E-03	0.1299
	15	1.35425	2.72E-16	0.0269	4.77E-14	0.1299
	20	1.35426	5.77E-06	0.0254	1.01E-03	0.1315

Solución	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
Remanente	0	1.35355	1.53E-05	0.1496	2.68E-03	0.0000
	1	1.35386	5.77E-06	0.0952	1.01E-03	0.0573
	2	1.35402	2.52E-05	0.0663	4.42E-03	0.0877
	3	1.35415	1.53E-05	0.0431	2.68E-03	0.1121
	5	1.35422	1.15E-05	0.0318	2.03E-03	0.1240
	7	1.35423	1.00E-05	0.0296	1.75E-03	0.1264
	10	1.35426	5.77E-06	0.0239	1.01E-03	0.1324
	15	1.35427	5.77E-06	0.0223	1.01E-03	0.1340
	20	1.35427	2.72E-16	0.0223	4.77E-14	0.1340

Se determinó el índice de refracción promedio y las concentraciones de sustrato (sacarosa) y producto total (fructosa y glucosa) a lo largo del tiempo. Las concentraciones se obtuvieron mediante el uso de una curva de calibración para una concentración de sustrato inicial de 0.15 ± 0.0001 g/mL.

Cuadro 12. Índices de refracción promedio y concentraciones de compuestos de las muestras de las corridas de cada ciclo de uso

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
1	0	1.35353	1.53E-05	0.1521	2.68E-03	0.0000
	1	1.35381	1.53E-05	0.1036	2.68E-03	0.0511
	2	1.35398	5.77E-06	0.0733	1.01E-03	0.0830
	3	1.35408	7.82E+04	0.0558	1.37E+07	0.1014
	5	1.35417	1.53E-05	0.0397	2.68E-03	0.1184
	7	1.35420	1.00E-05	0.0355	1.75E-03	0.1228
	10	1.35422	1.15E-05	0.0324	2.03E-03	0.1260
	15	1.35421	1.53E-05	0.0326	2.68E-03	0.1258
	20	1.35421	1.00E-05	0.0326	1.75E-03	0.1258
	0	1.35354	1.73E-05	0.1511	3.04E-03	0.0000
	1	1.35378	5.77E-06	0.1089	1.01E-03	0.0444
	2	1.35395	2.08E-05	0.0783	3.65E-03	0.0767
	3	1.35408	1.53E-05	0.0567	2.68E-03	0.0994

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
2	5	1.35417	2.08E-05	0.0397	3.65E-03	0.1173
	7	1.35418	5.77E-06	0.0383	1.01E-03	0.1188
	10	1.35421	2.00E-05	0.0338	3.51E-03	0.1235
	15	1.35421	2.31E-05	0.0325	4.05E-03	0.1249
	20	1.35422	1.53E-05	0.0318	2.68E-03	0.1256
	0	1.35353	5.77E-06	0.1518	1.01E-03	0.0000
	1	1.35383	1.53E-05	0.1003	2.68E-03	0.0542
	2	1.35394	2.52E-05	0.0802	4.42E-03	0.0754
	3	1.35406	2.72E-16	0.0599	4.77E-14	0.0968
	5	1.35417	5.77E-06	0.0401	1.01E-03	0.1176
3	7	1.35418	5.77E-06	0.0385	1.01E-03	0.1193
	10	1.35421	1.53E-05	0.0325	2.68E-03	0.1256
	15	1.35422	1.15E-05	0.0318	2.03E-03	0.1264
	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1264
	0	1.35355	0.00E+00	0.1500	0.00E+00	0.0000
	1	1.35382	1.53E-05	0.1009	2.68E-03	0.0517
	2	1.35395	1.53E-05	0.0796	2.68E-03	0.0741
	3	1.35406	1.15E-05	0.0589	2.03E-03	0.0959
	5	1.35413	1.53E-05	0.0472	2.68E-03	0.1082
	7	1.35419	5.77E-06	0.0367	1.01E-03	0.1193
4	10	1.35420	5.77E-06	0.0347	1.01E-03	0.1214
	15	1.35421	2.52E-05	0.0326	4.42E-03	0.1236
	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1245
	0	1.35355	3.00E-05	0.1500	5.26E-03	0.0000
	1	1.35434	2.00E-05	0.0112	3.51E-03	0.1462
	2	1.35394	1.00E-05	0.0799	1.75E-03	0.0738
	3	1.35402	5.77E-06	0.0667	1.01E-03	0.0877
	5	1.35416	2.52E-05	0.0423	4.42E-03	0.1134
	7	1.35418	2.00E-05	0.0392	3.51E-03	0.1167
	10	1.35421	5.77E-06	0.0338	1.01E-03	0.1224
5	15	1.35422	1.15E-05	0.0318	2.03E-03	0.1245
	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1245
	0	1.35354	5.77E-06	0.1511	1.01E-03	0.0000
	1	1.35434	1.00E-05	0.0110	1.75E-03	0.1475
	2	1.35393	1.00E-05	0.0816	1.75E-03	0.0732
	3	1.35404	2.00E-05	0.0624	3.51E-03	0.0934
	5	1.35411	5.77E-06	0.0502	1.01E-03	0.1062
	7	1.35418	5.77E-06	0.0385	1.01E-03	0.1193
	10	1.35421	1.53E-05	0.0325	2.68E-03	0.1256
	15	1.35422	1.15E-05	0.0318	2.03E-03	0.1264
6	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1264
	0	1.35355	0.00E+00	0.1500	0.00E+00	0.0000
	1	1.35382	1.53E-05	0.1009	2.68E-03	0.0517
	2	1.35395	1.53E-05	0.0796	2.68E-03	0.0741
	3	1.35406	1.15E-05	0.0589	2.03E-03	0.0959
	5	1.35413	1.53E-05	0.0472	2.68E-03	0.1082
	7	1.35419	5.77E-06	0.0367	1.01E-03	0.1193
	10	1.35420	5.77E-06	0.0347	1.01E-03	0.1214
	15	1.35421	2.52E-05	0.0326	4.42E-03	0.1236
	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1245

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
7	7	1.35417	2.08E-05	0.0398	3.65E-03	0.1172
	10	1.35420	5.77E-06	0.0345	1.01E-03	0.1228
	15	1.35421	1.15E-05	0.0326	2.03E-03	0.1248
	20	1.35421	5.77E-06	0.0326	1.01E-03	0.1248
	0	1.35353	2.00E-05	0.1518	3.51E-03	0.0000
	1	1.35376	5.77E-06	0.1130	1.01E-03	0.0409
	2	1.35394	5.77E-06	0.0802	1.01E-03	0.0754
	3	1.35401	2.52E-05	0.0685	4.42E-03	0.0877
	5	1.35413	2.52E-05	0.0472	4.42E-03	0.1101
	7	1.35419	1.15E-05	0.0362	2.03E-03	0.1217
	10	1.35421	1.15E-05	0.0326	2.03E-03	0.1255
	15	1.35422	2.00E-05	0.0318	3.51E-03	0.1264
	20	1.35422	2.08E-05	0.0318	3.65E-03	0.1264
	0	1.35354	2.08E-05	0.1511	3.65E-03	0.0000
	1	1.35379	1.53E-05	0.1071	2.68E-03	0.0463
8	2	1.35393	1.00E-05	0.0817	1.75E-03	0.0731
	3	1.35402	5.77E-06	0.0664	1.01E-03	0.0892
	5	1.35414	1.53E-05	0.0454	2.68E-03	0.1113
	7	1.35417	5.77E-06	0.0398	1.01E-03	0.1172
	10	1.35421	1.00E-05	0.0338	1.75E-03	0.1235
	15	1.35421	1.53E-05	0.0326	2.68E-03	0.1248
	20	1.35422	1.00E-05	0.0318	1.75E-03	0.1256
	0	1.35354	5.77E-06	0.1511	1.01E-03	0.0000
	1	1.35375	5.77E-06	0.1143	1.01E-03	0.0388
	2	1.35391	1.53E-05	0.0859	2.68E-03	0.0687
9	3	1.35400	2.08E-05	0.0701	3.65E-03	0.0853
	5	1.35413	5.77E-06	0.0481	1.01E-03	0.1085
	7	1.35416	2.00E-05	0.0418	3.51E-03	0.1151
	10	1.35420	1.53E-05	0.0345	2.68E-03	0.1228
	15	1.35422	2.52E-05	0.0318	4.42E-03	0.1256
	20	1.35421	3.00E-05	0.0326	5.26E-03	0.1248
	0	1.35353	1.00E-05	0.1518	1.75E-03	0.0000
	1	1.35373	1.53E-05	0.1183	2.68E-03	0.0353
10	2	1.35387	5.77E-06	0.0923	1.01E-03	0.0627
	3	1.35399	5.77E-06	0.0711	1.01E-03	0.0850
	5	1.35411	1.53E-05	0.0504	2.68E-03	0.1068
	7	1.35416	1.53E-05	0.0423	2.68E-03	0.1153

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
11	10	1.35419	2.52E-05	0.0360	4.42E-03	0.1219
	15	1.35420	5.77E-06	0.0343	1.01E-03	0.1237
	20	1.35420	1.53E-05	0.0343	2.68E-03	0.1237
	0	1.35355	0.00E+00	0.1500	0.00E+00	0.0000
	1	1.35374	2.08E-05	0.1161	3.65E-03	0.0357
	2	1.35386	2.52E-05	0.0946	4.42E-03	0.0583
	3	1.35397	2.00E-05	0.0762	3.51E-03	0.0777
	5	1.35409	0.00E+00	0.0538	0.00E+00	0.1013
	7	1.35416	5.77E-06	0.0429	1.01E-03	0.1128
	10	1.35419	1.53E-05	0.0375	2.68E-03	0.1185
12	15	1.35422	1.00E-05	0.0318	1.75E-03	0.1237
	20	1.35422	5.77E-06	0.0318	1.01E-03	0.1245
	0	1.35354	1.15E-05	0.1511	2.03E-03	0.0000
	1	1.35371	1.15E-05	0.1206	2.03E-03	0.0321
	2	1.35386	0.00E+00	0.0943	0.00E+00	0.0598
	3	1.35395	0.00E+00	0.0794	0.00E+00	0.0755
	5	1.35408	1.15E-05	0.0553	2.03E-03	0.1009
	7	1.35414	1.00E-05	0.0464	1.75E-03	0.1102
	10	1.35417	5.77E-06	0.0401	1.01E-03	0.1169
	15	1.35419	5.77E-06	0.0360	1.01E-03	0.1212
13	20	1.35420	1.15E-05	0.0343	2.03E-03	0.1230
	0	1.35354	1.15E-05	0.1511	2.03E-03	0.0000
	1	1.35370	2.52E-05	0.1229	4.42E-03	0.0297
	2	1.35382	1.53E-05	0.1016	2.68E-03	0.0521
	3	1.35391	1.00E-05	0.0852	1.75E-03	0.0694
	5	1.35405	2.52E-05	0.0613	4.42E-03	0.0946
	7	1.35412	1.15E-05	0.0483	2.03E-03	0.1082
	10	1.35417	2.08E-05	0.0401	3.65E-03	0.1169
	15	1.35419	1.53E-05	0.0360	2.68E-03	0.1212
	20	1.35421	5.77E-06	0.0326	1.01E-03	0.1248
14	0	1.35355	1.15E-05	0.1500	2.03E-03	0.0000
	1	1.35368	1.53E-05	0.1269	2.68E-03	0.0243
	2	1.35380	2.52E-05	0.1059	4.42E-03	0.0464
	3	1.35388	0.00E+00	0.0908	0.00E+00	0.0623
	5	1.35400	5.77E-06	0.0696	1.01E-03	0.0847
	7	1.35407	1.00E-05	0.0573	1.75E-03	0.0976
	10	1.35415	1.53E-05	0.0436	2.68E-03	0.1120

Ciclo	Tiempo (min $\pm$ 0.00017 min)	Índice ($\pm$ 0.00001)	Desviación Estándar ($\pm$)	Concentración sacarosa (g/mL $\pm$ 0.0035 g/mL)	Desviación Estándar ($\pm$ g/mL)	Concentración total productos (g/mL $\pm$ 0.0037 g/mL)
	15	1.35418	2.00E-05	0.0379	3.51E-03	0.1180
	20	1.35419	2.52E-05	0.0360	4.42E-03	0.1200

Se determinó el índice de refracción promedio y las concentraciones de sustrato (sacarosa) y producto total (fructosa y glucosa) a lo largo del tiempo. Las concentraciones se obtuvieron mediante el uso de una curva de calibración para una concentración de sustrato inicial de 0.15 ± 0.0001 g/mL.

Cuadro 13. Parámetros cinéticos para cada corrida utilizando el modelo general de Michaelis-Menten para invertasa libre e inmovilizada en PHA

Estado de enzima	K_m (g/mL)	K_{+2} (ppm ⁻¹ *min ⁻¹)	Conc. inicial sacarosa (g/mL)	Conc. final sacarosa (g/mL)	E_0 (ppm)
Libre	1.785	0.0752	0.1503	0.026	12.500
Inmovilizada	1.792	0.0705	0.1521	0.032	13.376
Remanente	1.785	0.0752	0.1496	0.022	13.312

Los datos se obtuvieron con el modelo general de la hidrólisis de sacarosa con invertasa (ecuación 1) realizando un ajuste con los datos de las corridas de enzima libre (Figura 10), primer ciclo de inmovilización (Figura 11) y remanente (Figura 12) en el programa Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ$ C, pH 5 ± 0.01 y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial promedio de 0.1500 ± 0.0003 g/mL

Cuadro 14. Concentración de invertasa en cada ciclo

Ciclo	Conc. invertasa (ppm)	Enzima relativa restante (% m/m)
1	13.376	100
2	12.988	97.1
3	12.747	95.3
4	12.386	92.6
5	11.931	89.2
6	11.691	87.4
7	11.343	84.8
8	10.901	81.5
9	10.607	79.3
10	9.978	74.6
11	9.336	69.8
12	8.467	63.3
13	7.450	55.7
14	6.313	47.2

Los datos se obtuvieron mediante el ajuste del modelo general de Michaelis-Menten con los datos de las corridas de cada ciclo de uso de invertasa inmovilizada en el programa Berkeley Madonna dejando fijados los parámetros cinéticos K_M y K_{+2} .

Cuadro 15. Pérdida de invertasa relativa por ciclo

Ciclo	Pérdida de Invertasa Relativa (% m/m)
1	2.9
2	1.8
3	2.7
4	3.4
5	1.8
6	2.6
7	3.3
8	2.2
9	4.7
10	4.8
11	6.5
12	7.6
13	8.5

Datos obtenidos mediante la comparación de invertasa relativa restante luego de cada ciclo de uso de enzima inmovilizada.

C. MUESTRA DE CÁLCULOS

Cálculo 1. Determinación de concentración de sustrato

$$x = \frac{y - b}{m}$$
$$x = \frac{1.35354 - 1.3544}{-0.0057 \frac{mL}{g}} = 0.1503 \frac{g}{mL}$$

Donde:

x = concentración de sustrato

y = índice de refracción

m = pendiente de la curva de calibración

b = intercepto en y de la curva de calibración

Cálculo realizado para cuantificar la concentración de producto a lo largo del tiempo para las corridas de enzima libre, tanto para la determinación de constantes como cuantificación de enzima remanente sin inmovilizar, y para la corrida de cada ciclo de enzima inmovilizada. Para la construcción de la curva de calibración se emplearon los índices de refracción y concentraciones que se encuentran en el Cuadro 7 de datos originales y para el cálculo de concentraciones se usaron los índices de refracción que se encuentran en los cuadros 11 y 12 de datos calculados.

Cálculo 2. Determinación de rendimiento de inmovilización

$$RI(\%) = \frac{E_0 - E_R}{E_0}$$
$$RI(\%) = \frac{0.002 \frac{g}{mL} - 0.001331 \frac{g}{mL}}{0.002 \frac{g}{mL}} * 100\% = 33.45\% m/m$$

Donde:

RI = Rendimiento de inmovilización

E_0 = Concentración de invertasa libre inicial

E_R = Concentración de invertasa libre luego de la inmovilización

Para el cálculo se utilizó la concentración de enzima utilizada en la solución para la inmovilización y la concentración de la solución restante de dicho proceso. Los resultados se encuentran en el Cuadro 5 de la sección de resultados.

Ecuación 4. Retención de actividad enzimática dentro en una corrida

$$AR (\%) = \frac{\frac{C_{i_0} - C_{i_f}}{E_i}}{\frac{C_{l_0} - C_{l_f}}{E_l}} * 100\%$$

Fuente: Zhou et al. (2021)

Cálculo 3. Determinación de retención de actividad enzimática

$$AR (\%) = \frac{\frac{0.1521 \frac{g}{mL} - 0.0326 \frac{g}{mL}}{13.376 ppm}}{\frac{0.1503 \frac{g}{mL} - 0.0254 \frac{g}{mL}}{12.500 ppm}} * 100\% = 89.41\% g * mL^{-1} * ppm^{-1}$$

Donde:

AR = Actividad enzimática retenida

E_i = Concentración de invertasa inmovilizada en la corrida

C_{i_0} = Concentración inicial de sustrato en invertasa inmovilizada

C_{i_f} = Concentración final de sustrato en invertasa inmovilizada

E_l = Concentración de invertasa libre en la corrida

C_{l_0} = Concentración inicial de sustrato en invertasa libre

C_{l_f} = Concentración final de sustrato en invertasa libre

Para el cálculo se utilizó las concentraciones iniciales y finales de ambas corridas junto a la concentración de enzima empleada en cada una. Los resultados se encuentran en el Cuadro 6 de la sección de resultados.

Cálculo 4. Determinación de invertasa relativa restante

$$IRR(\%) = \frac{E_i}{E_0} * 100\%$$

$$IRR(\%) = \frac{12.988 \text{ ppm}}{13.376 \text{ ppm}} * 100\% = 97.1\% \text{ m/m}$$

Donde:

IRR = Invertasa relativa restante

E_i = Concentración de enzima inmovilizada en el ciclo de uso

E_0 = Concentración de enzima inmovilizada inicial

Para el cálculo se utilizó la concentración de enzima en cada ciclo de uso obtenido mediante el análisis cinético en el programa Berkeley Madonna. Para la determinación de la invertasa restante relativa se emplearon las concentraciones de invertasa del Cuadro 14 de datos calculados. Los resultados se encuentran en el Cuadro 14 de la sección de datos calculados.

Cálculo 5. Determinación de pérdida relativa de invertasa por ciclo

$$PR_i(\%) = IRR_i - IRR_{i+1}$$

$$PR_i(\%) = 100\% - 97.1\% = 2.9\% \text{ m/m}$$

Donde:

PR_i = Pérdida relativa de invertasa

IRR_i = Invertasa relativa restante del ciclo evaluado

IRR_{i+1} = Invertasa relativa restante del ciclo posterior

El cálculo se utilizó para determinar la invertasa inmovilizada relativa perdida en cada ciclo de uso. Para la determinación de la perdida relativa se emplearon los valores de invertasa relativa restante del Cuadro 14 de datos calculados. Los resultados se encuentran en el Cuadro 15 de la sección de datos calculados.

D. ANÁLISIS DE ERROR

Ecuación 5. Incertidumbre de una curva de calibración

$$S_c = \left| \frac{S_I}{m} \right|$$

Cálculo 6. Incertidumbre de la concentración de sustrato

$$S_c = \frac{\pm 0.00002}{-0.0057 \frac{mL}{g}} = \pm 0.0035 \frac{g}{mL}$$

Donde:

S_c = Incertidumbre de concentración

S_I = Incertidumbre de refractómetro

m = Pendiente de curva calibración

Ecuación 6. Propagación de error de multiplicación y división

$$S_y = y * \sqrt{\sum_i^n \left(\frac{S_i}{i} \right)^2}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre de resultado

S_i = Incertidumbre de variables

y = Valor de resultados

i = Valores de variables

Cálculo 7. Incertidumbre de inmovilización enzimática

$$S_y = 33.44\% * \sqrt{\left(\frac{0.00001}{0.002}\right)^2 + \left(\frac{0.00001}{0.001331}\right)^2} = \pm 0.30\% m/m$$

Se utilizó la ecuación 4. Se usaron los datos de los cuadros 4 y 13 de datos calculados.

Los resultados se encuentran en el Cuadro 5 de resultados.

Ecuación 7. Desviación estándar en muestra

$$\sigma = \sqrt{\sum_i^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Donde:

σ = Desviación estándar

N = número de muestras

x_i = Valores de los datos

$\bar{x}$ = Promedio de los datos

Cálculo 8. Incertidumbre de inmovilización enzimática

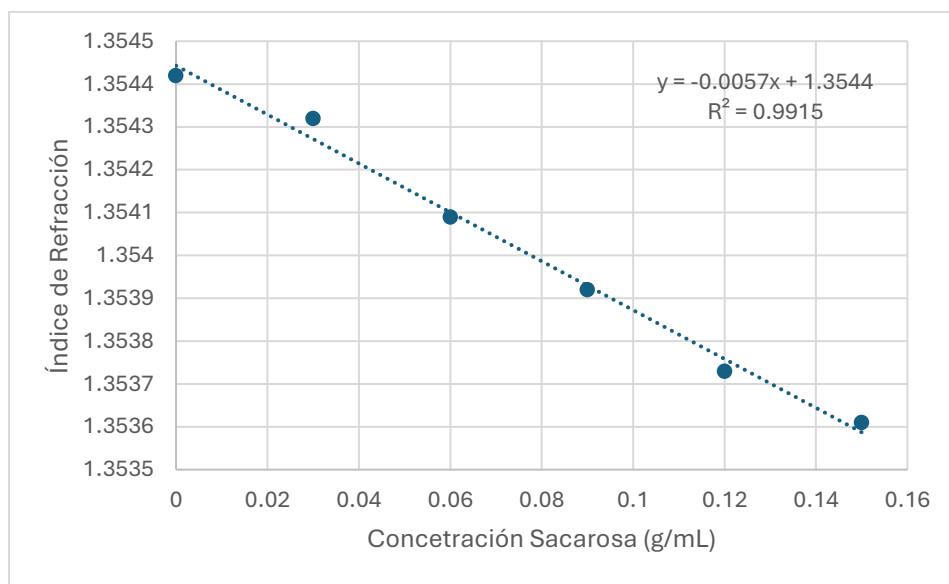
$$\sigma = \sqrt{\frac{(1.35351 - 1.35353)^2 + (1.35354 - 1.35353)^2 + (1.35353 - 1.35353)^2}{3 - 1}}$$
$$= \pm 1.53 \times 10^{-5}$$

Se utilizó la ecuación 5. Se usaron los datos de los cuadros 8, 9 y 10 de datos calculados.

Los resultados se encuentran en los cuadros 11 y 12 de datos calculados.

E. CURVAS DE CALIBRACIÓN

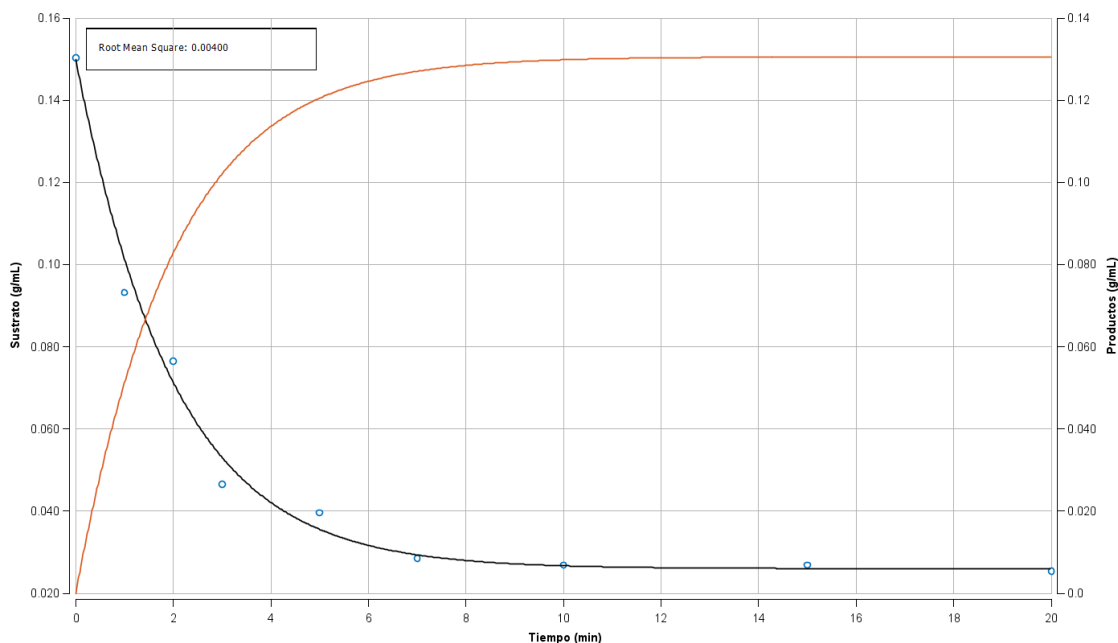
Figura 9. Curva de calibración refractómetro



Se creó una curva de calibración para el refractómetro para una concentración inicial de sacarosa de 0.15 ± 0.00001 g/mL. Se hizo mediante el de las soluciones de sustrato (sacarosa) y productos (fructosa y glucosa) preparadas y su índice de refracción. La curva de calibración permitió calcular las concentraciones sacarosa en diferentes tiempos de las corridas de la enzima libre y cada uno de los ciclos de la enzima inmovilizada.

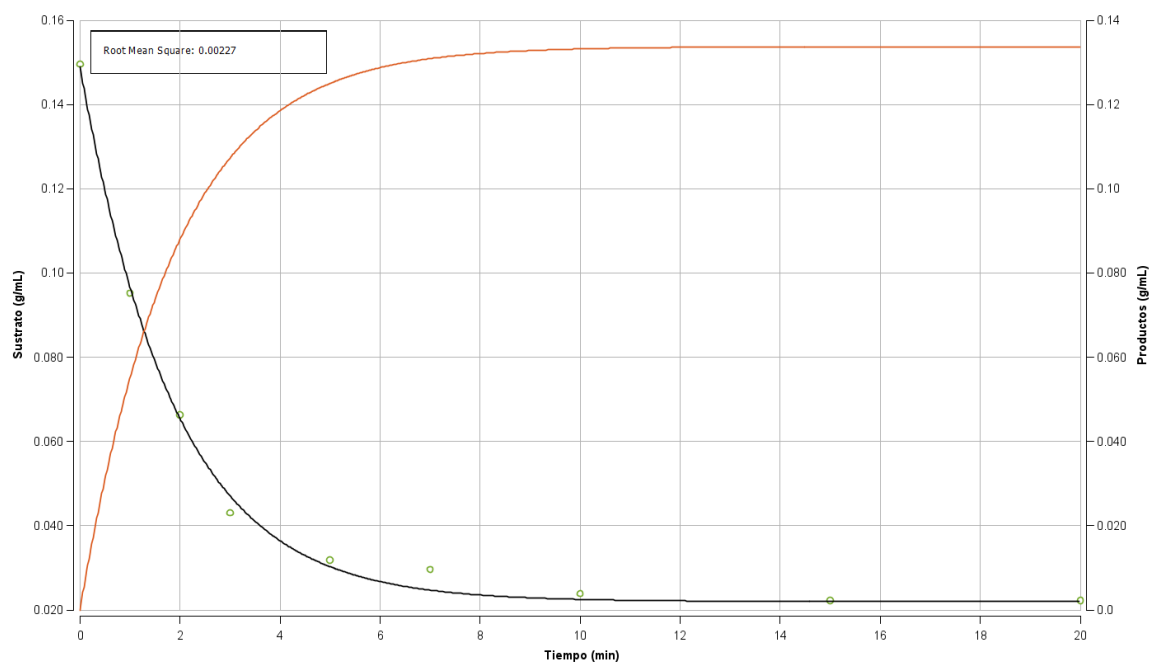
F. MODELOS CINÉTICOS

Figura 10. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre



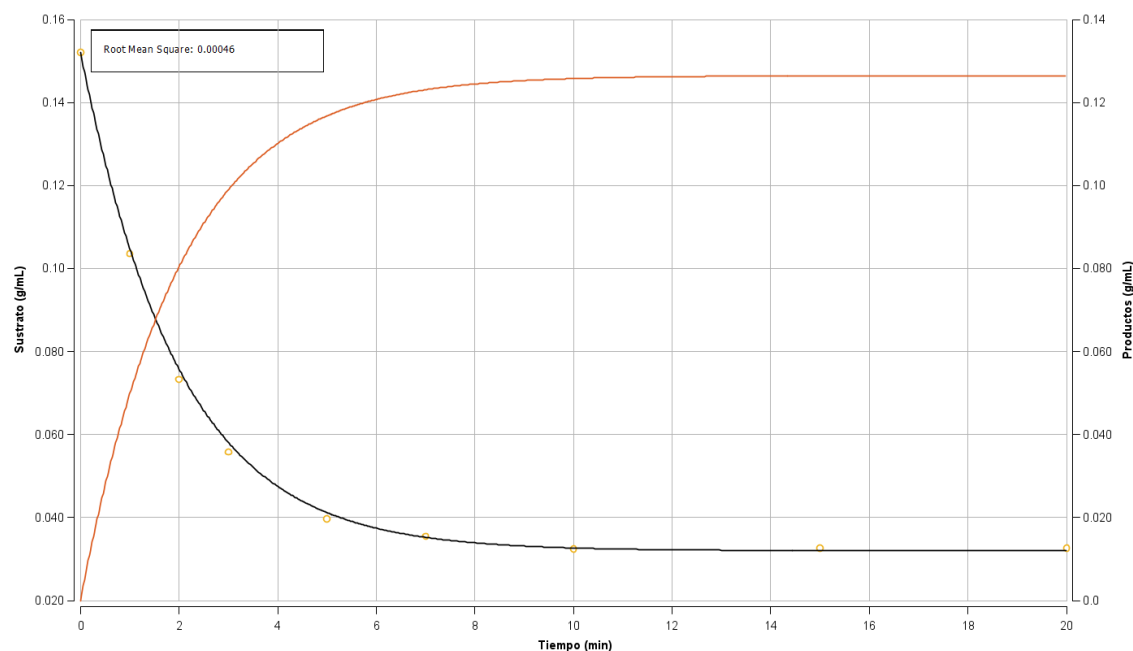
Es el modelo para la corrida de invertasa libre con el cual se determinaron el valor de las constantes catalítica y de Michaelis realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1503 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y se determinaron las constantes cinéticas del Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 11. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa con remanente de inmovilización



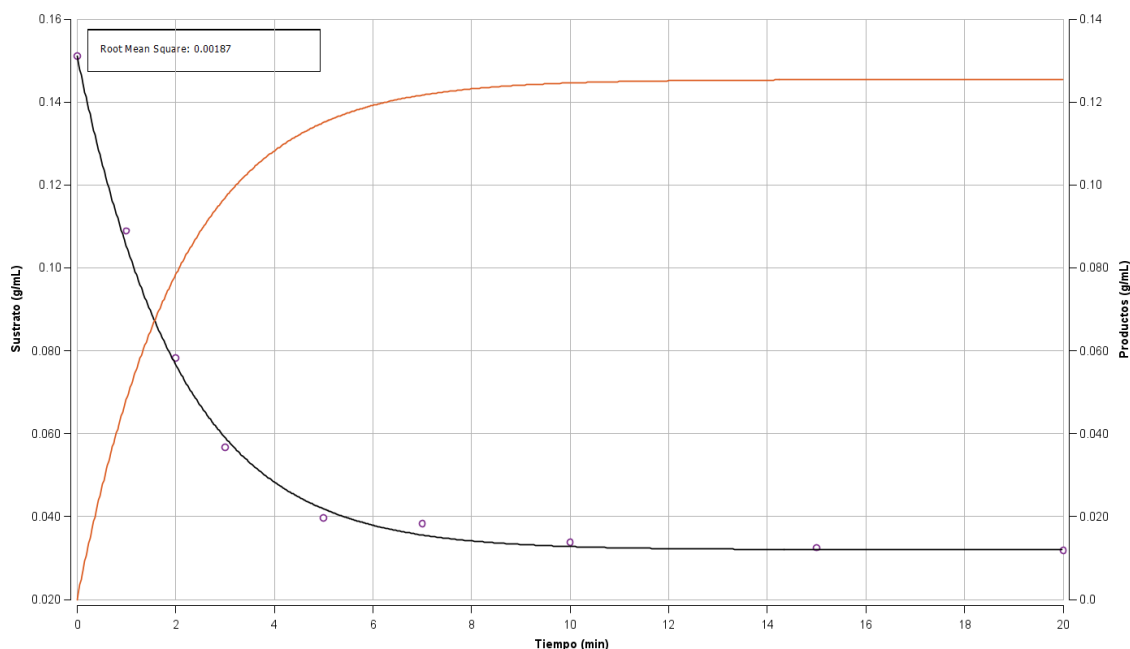
Es el modelo para la corrida de invertasa libre restante en la solución utilizada en la inmovilización enzimática con el cual se determinó su concentración en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1496 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en la enzima libre encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 12. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el primer ciclo de uso de invertasa inmovilizada



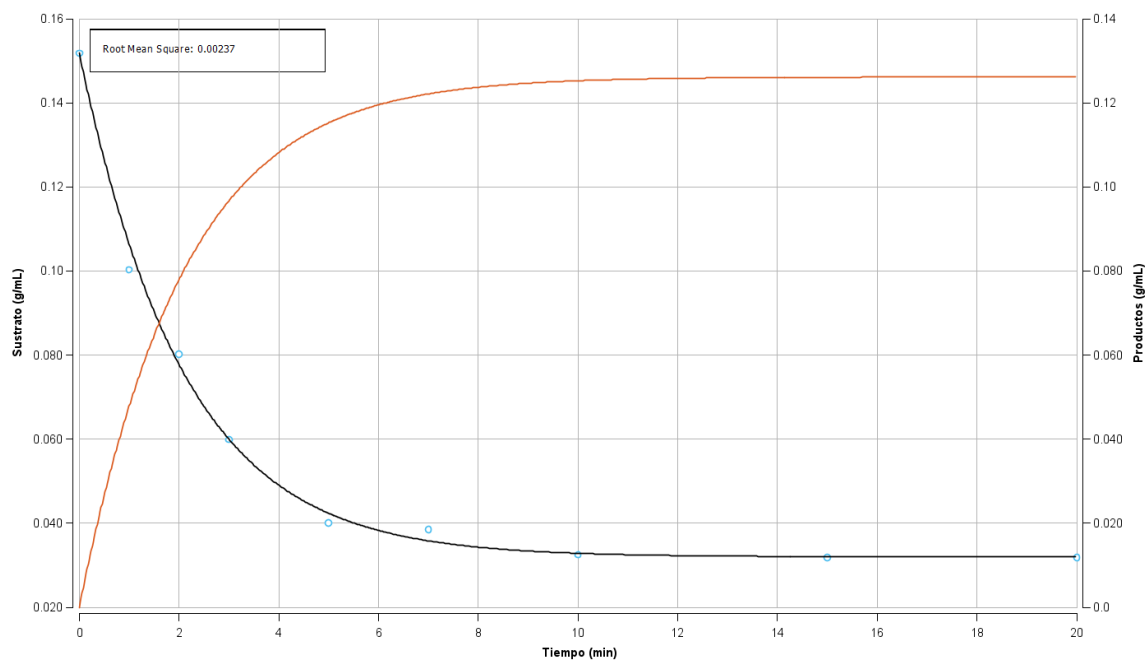
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinaron el valor de las constantes catalítica y de Michaelis realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1521 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y se determinaron las constantes cinéticas del Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 13. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el segundo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



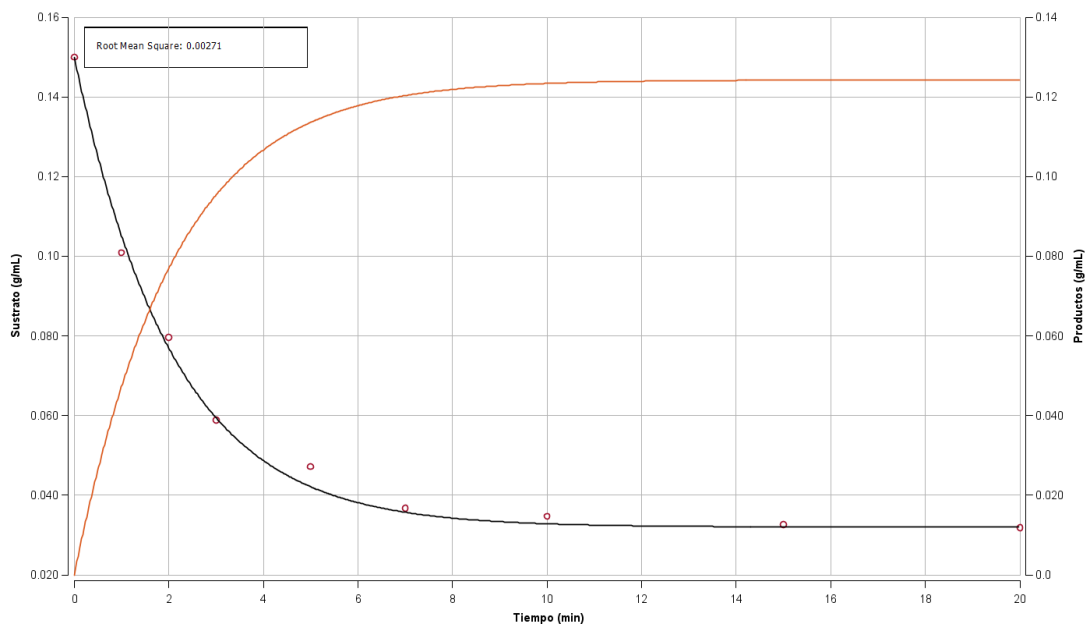
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del primer ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 14. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el tercer ciclo de uso de invertasa inmovilizada



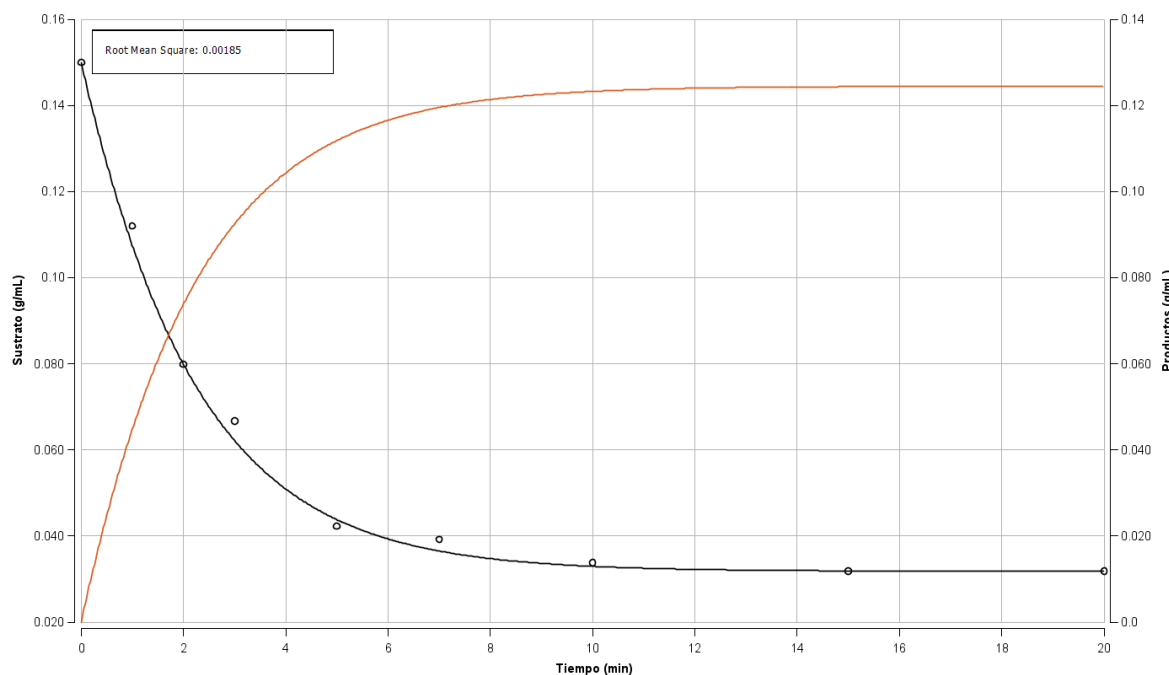
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del segundo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1518 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 15. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada



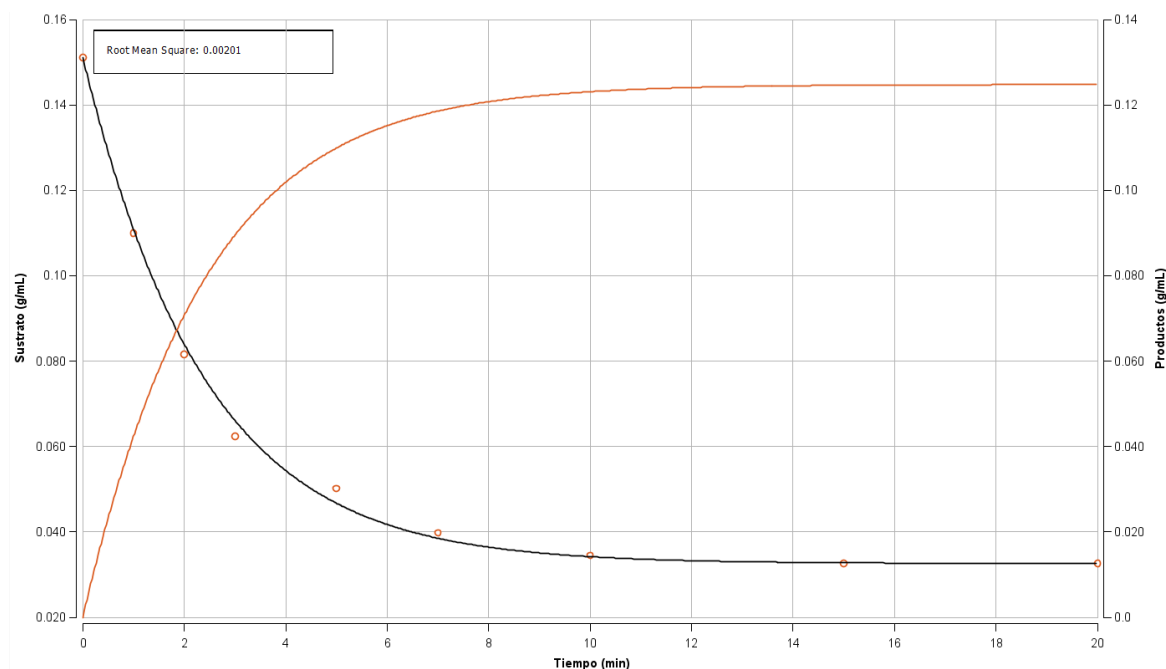
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del tercer ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 16. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el quinto ciclo de uso de invertasa inmovilizada



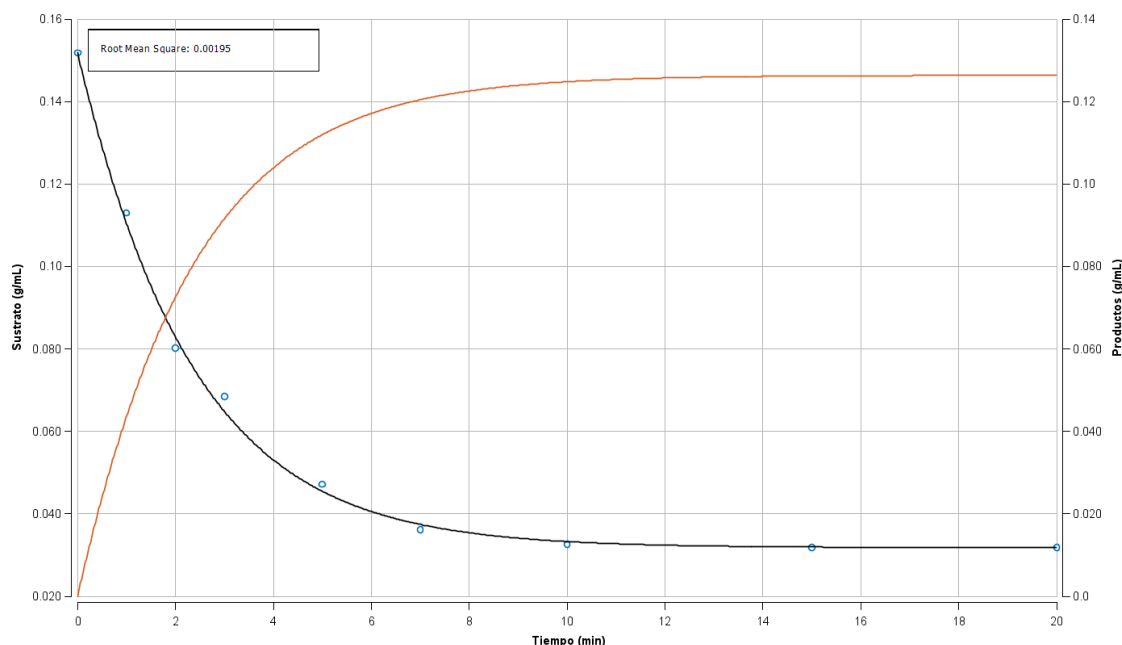
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del cuarto ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 17. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el sexto ciclo de uso de invertasa inmovilizada



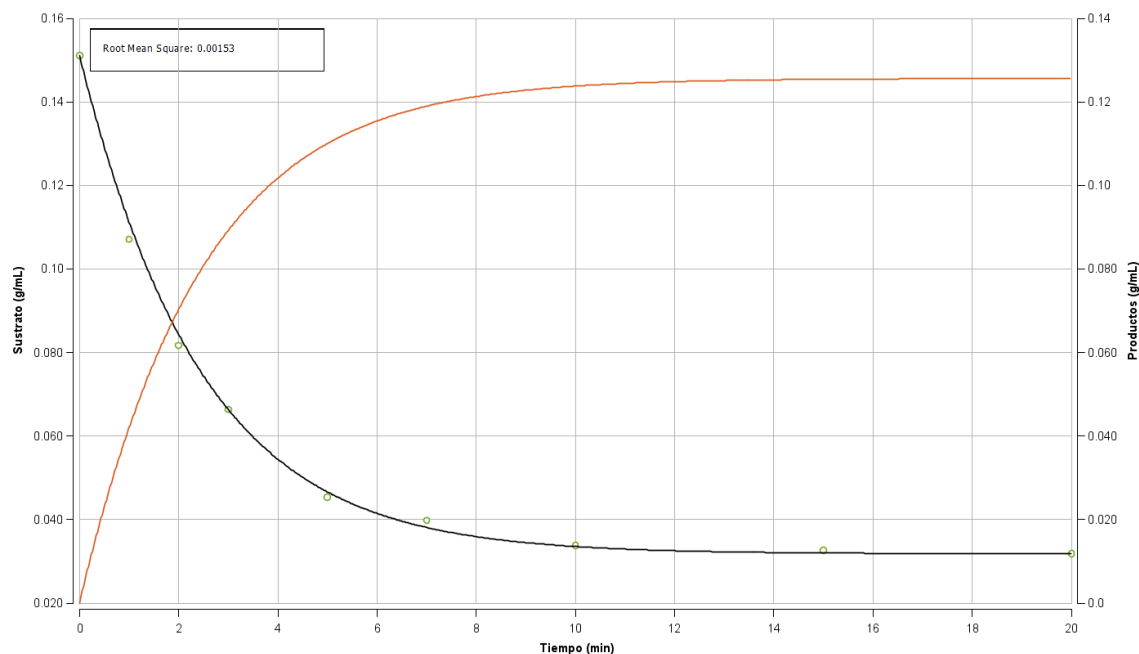
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del quinto ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 18. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el séptimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



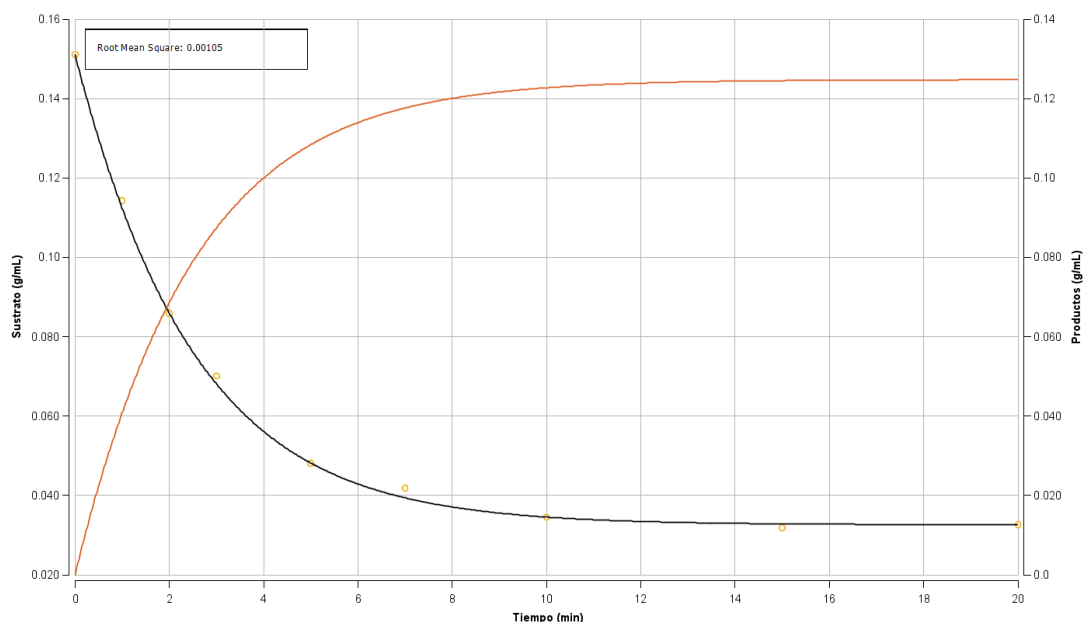
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del sexto ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1518 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 19. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el octavo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



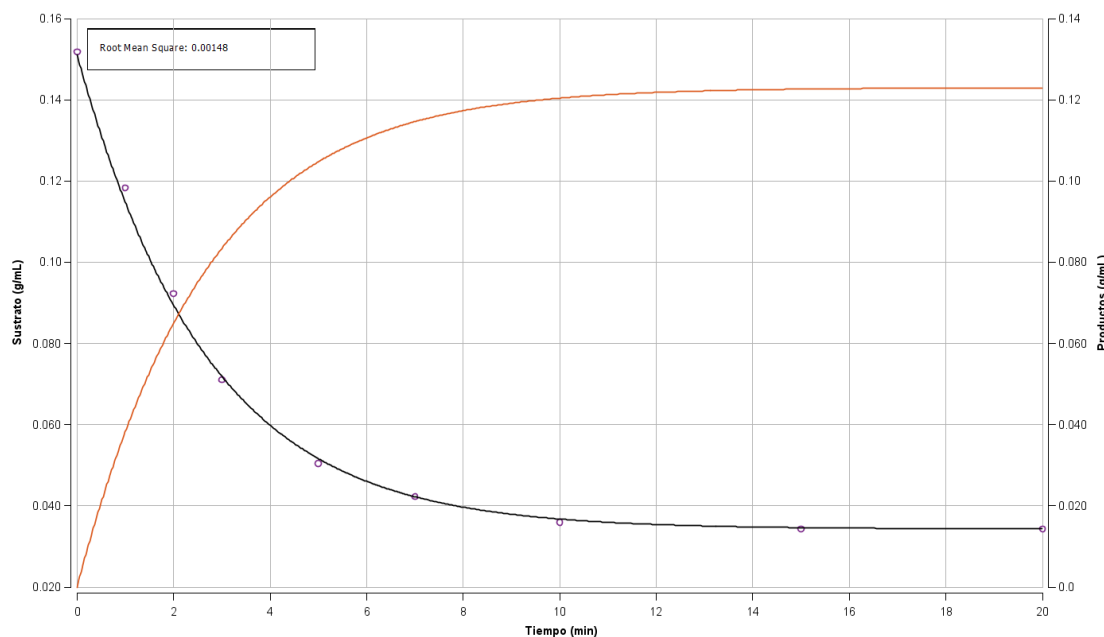
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del séptimo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 20. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el noveno ciclo de uso de invertasa inmovilizada



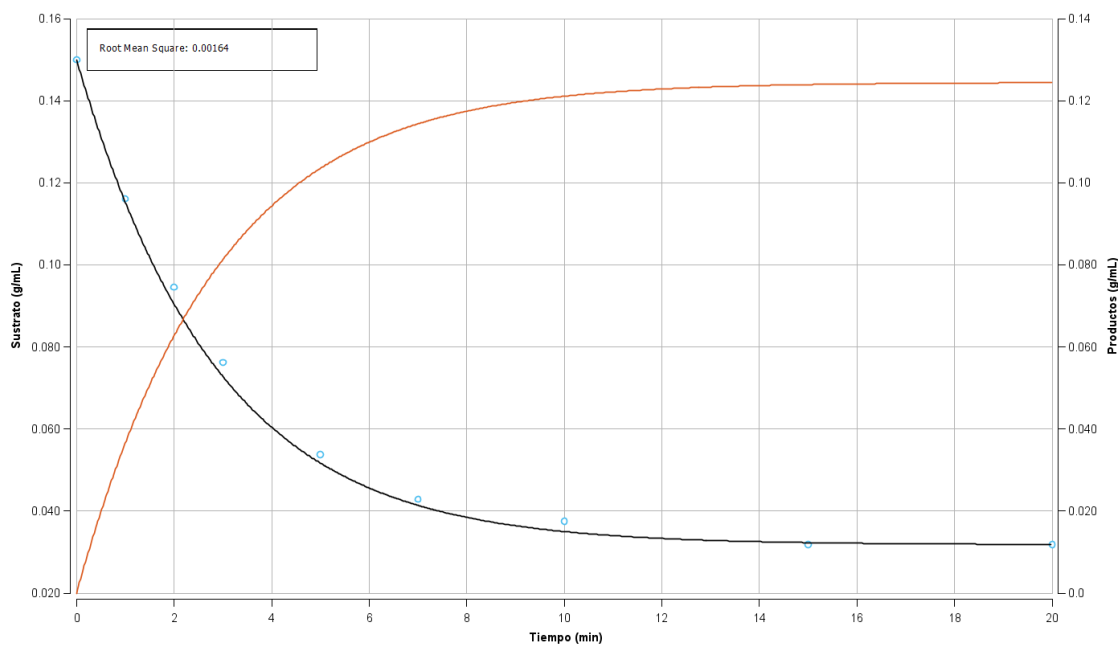
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del octavo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 21. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



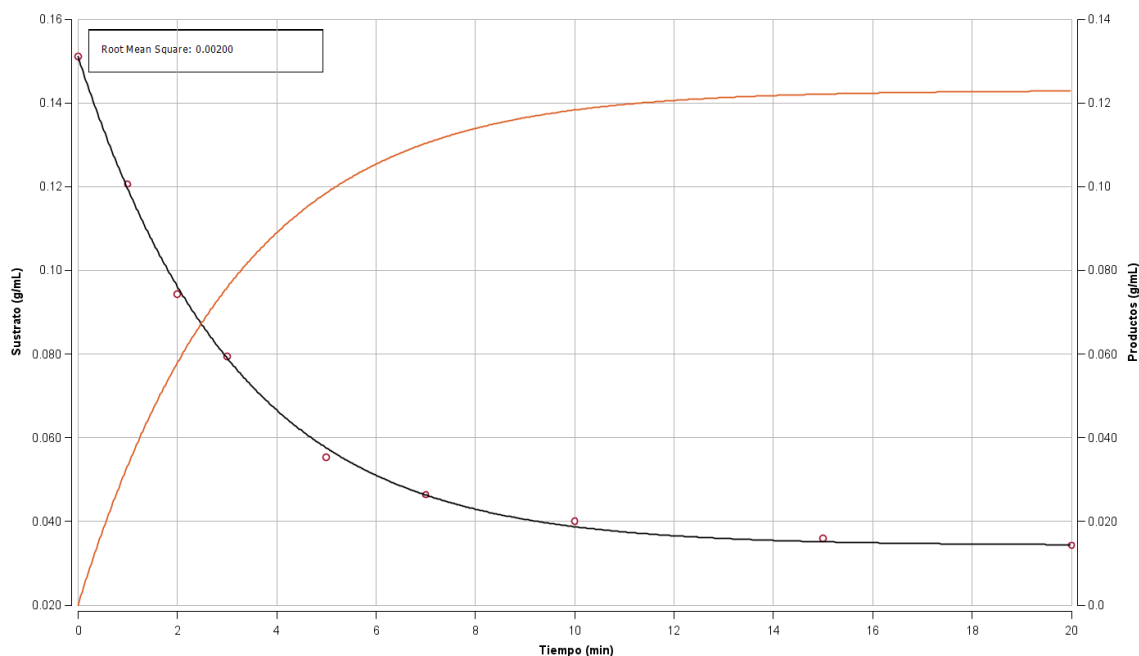
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del noveno ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1518 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 22. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el undécimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



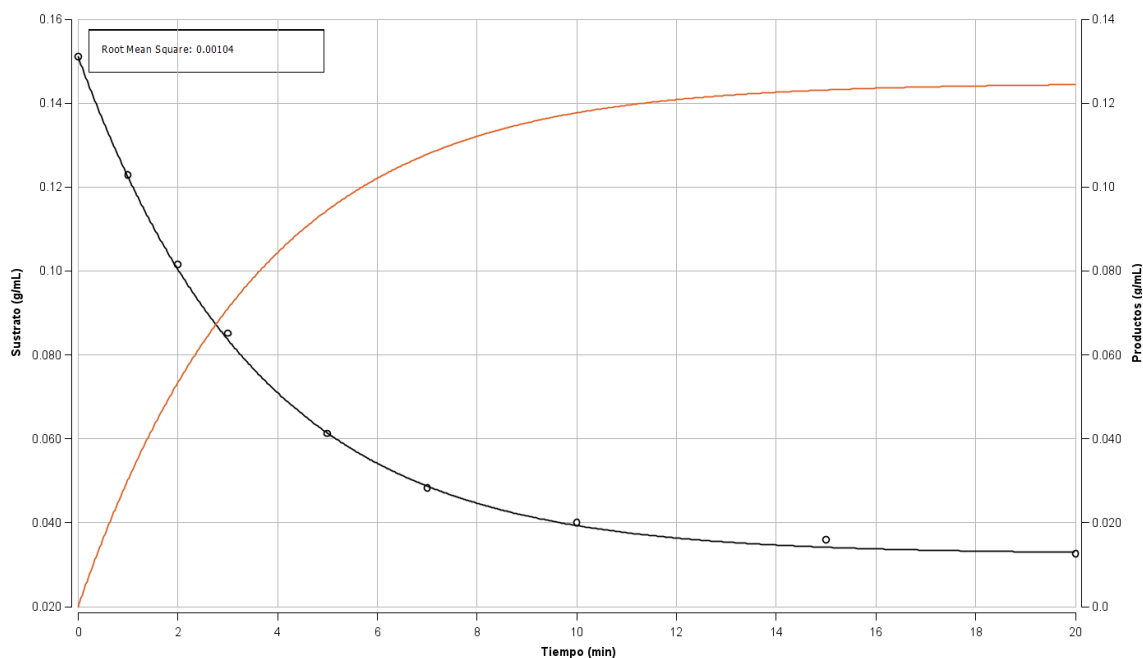
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del décimo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1500 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 23. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el duodécimo ciclo de uso de invertasa inmovilizada



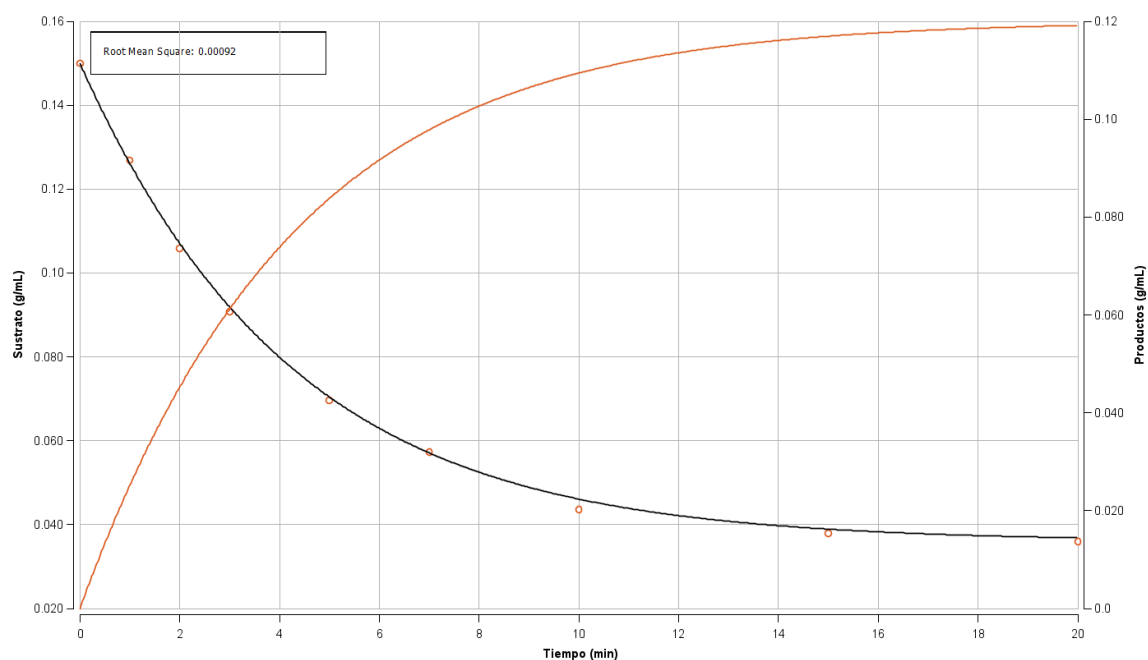
Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del undécimo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

Figura 24. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo tercero ciclo de uso de invertasa inmovilizada



Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del duodécimo ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

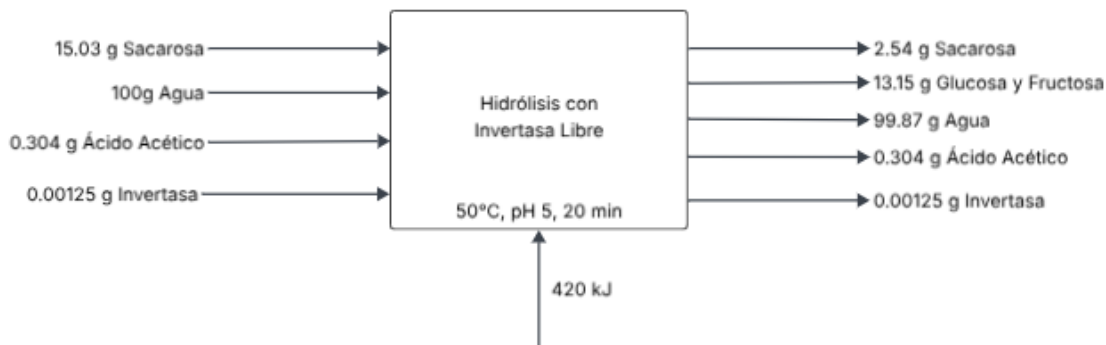
Figura 25. Modelo obtenido para la hidrólisis de sacarosa en el décimo cuarto ciclo de uso de invertasa inmovilizada



Es el modelo para la corrida de invertasa inmovilizada con el cual se determinó la concentración del enzima restante del décimo tercer ciclo realizado en Berkeley Madonna. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1511 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se obtuvo con el modelo encontrado en la ecuación 1 y las constantes cinéticas determinadas en el primer ciclo encontradas en el Cuadro 13. Se pueden observar la concentración de sustrato en el eje primario y la concentración de productos totales en el eje secundario. Así mismo, los puntos son los valores experimentales obtenidos de la concentración de sustrato, la línea negra es el ajuste del modelo a la concentración de sustrato y la anaranjada es a la concentración de productos generada.

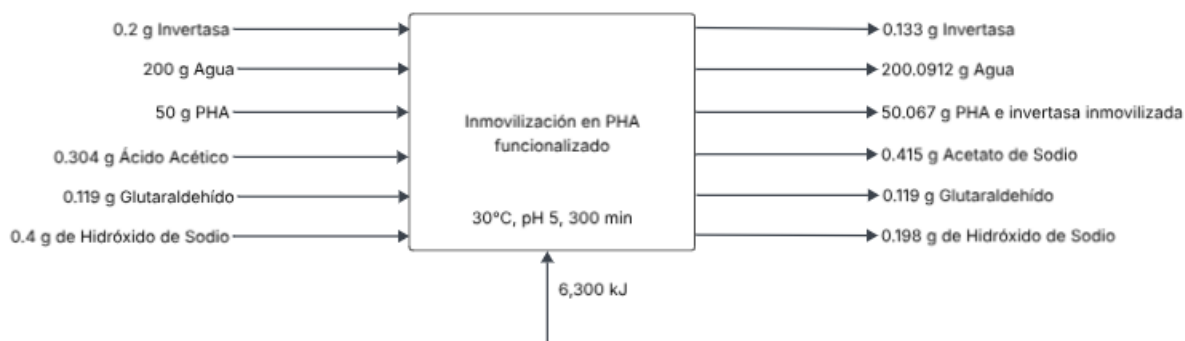
G. BALANCES DE MASA

Figura 26. Balance de masa de la hidrólisis con enzima libre



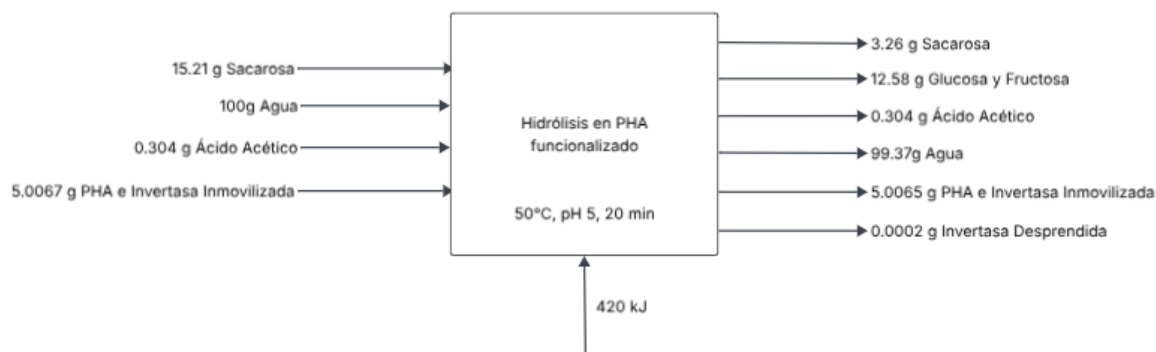
Se realizó el balance de masa para la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1503 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. La estufa utilizada cuenta con una potencia de 350 watts durante todo el proceso.

Figura 27. Balance de masa de la inmovilización de invertasa en polihidroxialcanoato funcionalizado



Se realizó el balance de masa para la inmovilización superficial por unión covalente de invertasa en PHA funcionalizado. La inmovilización se llevó a cabo en un medio con agitación a 30°C durante 300 min. Esta se realizó en buffer de ácido acético y se determinó la concentración de invertasa remanente e inmovilizada mediante una hidrólisis con el remanente de esta. La estufa utilizada cuenta con una potencia de 350 watts durante todo el proceso.

Figura 28. Balance de masa de la hidrólisis con enzima inmovilizada en polihidroxialcanoato funcionalizado



Se realizó el balance de masa para la hidrólisis de sacarosa con invertasa inmovilizada. Las condiciones de la reacción fueron de $50 \pm 0.5^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5 \pm 0.01$ y una concentración de sustrato (sacarosa) inicial de $0.1521 \pm 0.0003 \text{ g/mL}$. Se tomó en consideración la masa de invertasa desprendida en durante la hidrólisis. La estufa utilizada cuenta con una potencia de 350 watts durante todo el proceso.

Cuadro 16. Balances de masa por ciclo de uso de invertasa inmovilizada

Ciclo	Entradas		Salidas		
	Agua (g)	Sacarosa (g)	Agua (g)	Sacarosa (g)	Glucosa y Fructosa (g)
1	100	15.21	99.37	3.18	12.58
2	100	15.11	99.38	3.26	12.56
3	100	15.18	99.37	3.18	12.64
4	100	15.00	99.38	3.18	12.45
5	100	15.00	99.38	3.18	12.45
6	100	15.11	99.38	3.26	12.48
7	100	15.18	99.37	3.18	12.64
8	100	15.11	99.37	3.18	12.46
9	100	15.11	99.38	3.26	12.48
10	100	15.18	99.38	3.43	12.37
11	100	15.00	99.38	3.18	12.35
12	100	15.11	99.39	3.43	12.30
13	100	15.11	99.38	3.26	12.48
14	100	15.00	99.40	3.60	12.00

Los datos anteriores muestran el balance de masa de la hidrólisis realizado para cada uno de los ciclos de uso de la enzima inmovilizada con el objetivo de determinar la enzima fijada restante. Se realizó con los datos del Cuadro 12 de la sección de datos calculados.

H. DATOS DE REACTIVOS

Cuadro 17. Datos de invertasa empleada durante el trabajo

Reactivo	Invertasa
Marca	Procelys by Lessafre
Nombre	NuCel 810 PW
Bacterias Mesófilas	CFU/g
Coliformes Totales	CFU/g

Cuadro 18. Datos de sacarosa empleada durante el trabajo

Reactivo	Sacarosa
Marca	Caña Real
Masa Molar	342.2965 g/mol

Cuadro 19. Datos de glucosa empleada durante el trabajo

Reactivo	Glucosa monohidratada
Marca	Merck
Masa Molar	198.17 g/mol
Pureza	99% m/m
CAS	14431-43-7

Cuadro 20. Datos de fructosa empleada durante el trabajo

Reactivo	Fructosa
Marca	Merck
Masa Molar	180.16 g/mol
Pureza	99% m/m
CAS	57-48-7

Cuadro 21. Datos de glutaraldehído empleada durante el trabajo

Reactivo	Glutaraldehído
Marca	Merck
Lote	3988408
Pureza	98% m/m
Concentración	25% m/m
CAS	111-30-8

Cuadro 22. Datos de ácido acético empleada durante el trabajo

Reactivo	Ácido Acético
Marca	Merck
Masa Molar	60.05 g/mol
Densidad	1.049 g/mL
Pureza	99% m/m
CAS	64-19-7

I. DATOS DE EQUIPO

Cuadro 23. Datos de placa de balanza

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima	110g
Incertidumbre	± 0.0002 g

Cuadro 24. Datos de placa de refractómetro

Equipo	Refractómetro
Marca	ATAGO
Modelo	RX-5000α
Rango de Índice (nD)	1.32700 – 1.58000
Incertidumbre	±0.00004

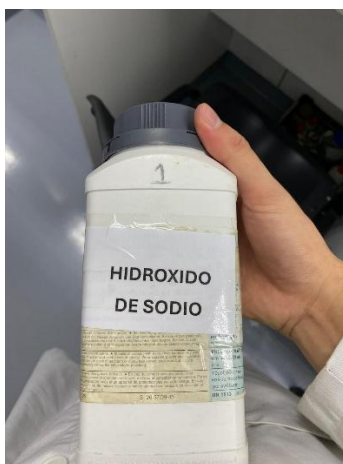
Cuadro 25. Datos de placa de potenciómetro

Equipo	Refractómetro
Marca	OHAUS
Modelo	AB23PH
Rango de pH	0.0 – 14.00
Incertidumbre	±0.01

J. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

1. Reactivos

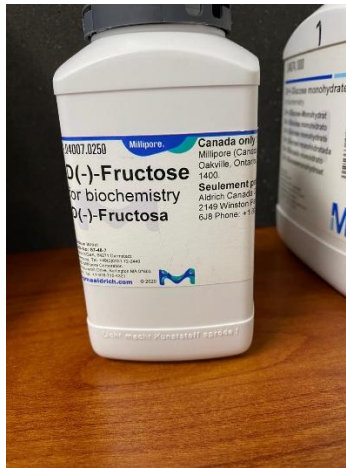
Figura 29. Hidróxido empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

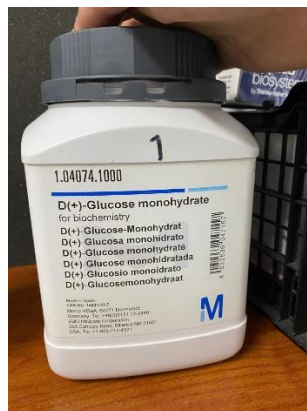
Figura 30. Fructosa empleada en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

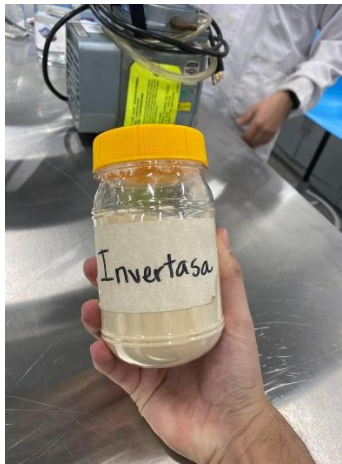
Figura 31. Glucosa empleada en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

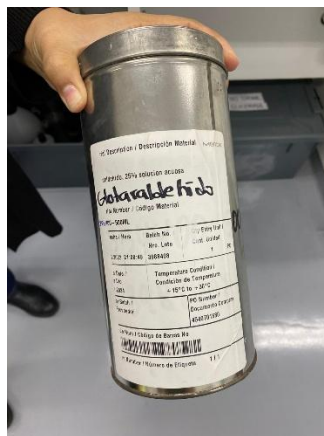
Figura 32. Enzima empleada en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

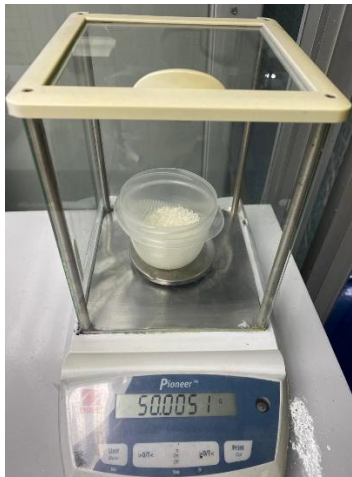
Figura 33. Glutaraldehído empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

Figura 34. PHA empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

2. Equipo

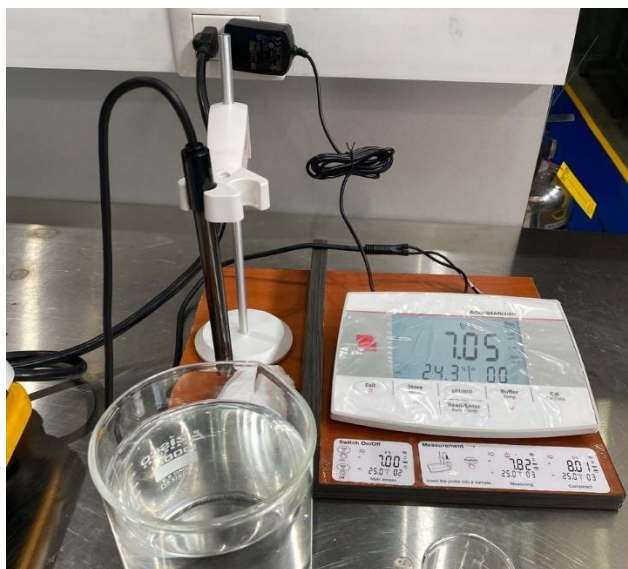
Figura 35. Refractómetro empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

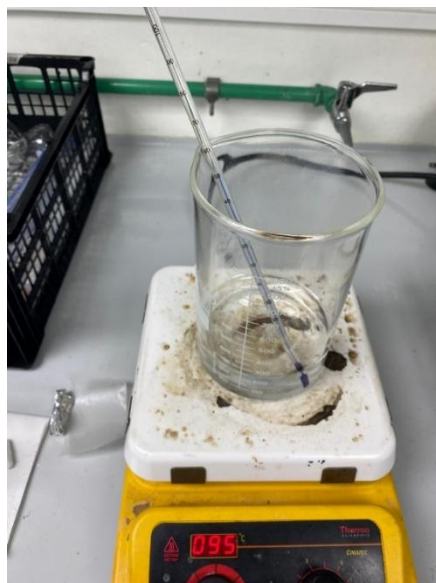
Figura 36. Potenciómetro empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

Figura 37. Baño térmico empleado en la experimentación



Fuente: Propia en el Laboratorio de Operaciones

Unitarias de la Universidad de Guatemala

16.GLOSARIO

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. Propiedad catalítica de una enzima que expresa la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo bajo condiciones definidas; su unidad SI es el katal ($1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) y, de forma tradicional en bioquímica, también se usa la U ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

BERKELEY MADONNA. Software de modelado que permite construir y resolver numéricamente ecuaciones diferenciales ordinarias y de diferencias mediante una interfaz gráfica además del cálculo del valor de diversas constantes de dichos modelos.

ENLACE COVALENTE. Enlace químico en el que dos átomos comparten uno o más pares de electrones por solapamiento de orbitales. Su carácter puede ser no polar o polar según la diferencia de electronegatividad entre los átomos.

FRUCTOSA. Monosacárido encontrado en frutas y miel; participa en rutas metabólicas específicas del metabolismo de hexosas.

FUNCIONALIZACIÓN CON GLUTARALDEHÍDO. Método mediante el cual se activa un soporte con el uso de grupos aldehídos con el objetivo de crear puentes de unión formando enlaces iminas posibilitando anclaje covalente para inmovilización.

GLUCOSA. Monosacárido aldohexosa central en el metabolismo energético de los organismos. Este existe como forma cíclica en solución y es el principal combustible celular durante la glucólisis y sus derivados en el ciclo de Krebs.

INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA. Conjunto de técnicas para restringir el movimiento de una enzima y su pérdida en la solución. Manteniendo su actividad, permitiendo reutilización, mayor estabilidad y operación continua.

INVERTASA. Enzima conocida como β -fructofuranosidasa, esta que hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa; también puede catalizar reacciones de fructotransferencia.

LIXIVIACIÓN. Es la pérdida o liberación de la enzima desde el soporte al medio de reacción. Esto ocurre cuando la enzima no está unida de forma permanente o factores como el pH, la agitación, la temperatura o la presencia de ciertos solventes provocan que la enzima se desprenda del soporte.

POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA): Son una familia de polímeros que microorganismos sintetizan y almacenan como gránulos intracelulares. Son biodegradables y biocompatibles, degradándose por enzimas y microbiota ambiental hasta dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o dióxido de carbono y metano en anaerobias. Pueden producirse desde sustratos renovables como azúcares y aceites y se usan en envases, recubrimientos y aplicaciones biomédicas.

REFRACTOMETRÍA. Técnica analítica que mide el índice de refracción (n) de la luz de una muestra en relación entre la velocidad de la luz en el vacío y en el medio. El valor de n depende de la longitud de onda, la temperatura y la composición. Los Refractómetros especifican el largo de onda y controlan la temperatura. Estos incluyen escalas como grados Brix para concentración de sacarosa. Se emplea en control de calidad, identificación y pureza de alimentos, fármacos, polímeros y solventes.

SACAROSA. Disacárido formado por una molécula de glucosa y fructosa unidos por un enlace glucosídico alfa 1-2. Es el sacárido más común encontrado en el azúcar común de caña y remolacha.