



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

***OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS
UTILIZANDO B-GALACTOSIDASA INMOVILIZADA POR
ATRAPAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LACTOSA
RESIDUAL***

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de
Ingeniería en Alimentos**

Autores

Mogrovejo Dávila Patricia Katherine

Urgiles Jumbo Gabriela del Cisne

Director

Claudio Sánchez Jáuregui.

Cuenca, Ecuador

2009

DEDICATORIA

Esta tesis es una parte de mi vida y comienzo de otras etapas por esto y más, la dedico al ser supremo Dios.

A mis padres por su inmenso amor, comprensión, apoyo y por creer en mí, en uno de mis sueños

A mis hermanos por su cariño incondicional y a Galito por su amor, apoyo y compañía en cada etapa del camino recorrido como también en aquellos momentos difíciles.

“Lo que hoy es utópico mañana es real. Mundos Posibles. La utopía es lo que ha conducido a que seamos posibles”. Jerome Bruner.

Kattee.

El esfuerzo, empeño y dedicación para realizar este trabajo fueron motivados por un grupo de personas que siempre me han apoyado para seguir adelante a pesar de todas las dificultades.

Dedicado a mis padres, quienes con mucha paciencia me educaron y son mi guía y ejemplo a seguir.

A mi querida tía Tamara quien ha sido un apoyo absoluto en mi vida, una gran amiga que ha hecho mucho por mí con su alegría, consejos y apoyo oportunos.

Pero principalmente le dedico este trabajo a Dios porque siempre está conmigo, Él me da la fuerza y todo lo que necesito para seguir adelante, es lo más importante en mi vida, es por eso que le dedico todo mi esfuerzo y empeño plasmados en este trabajo de grado.

Gaby.

AGRADECIMIENTO

A Dios creador del universo y dueño de nuestras vidas que nos permite construir otros mundos mentales posibles.

De manera especial a nuestro Director de tesis, Ingeniero Claudio Sánchez, al Doctor Piercosimo Tipaldi y a la Doctora Rebeca Webster, docentes que conforman el Tribunal de Grado por su asesoría ya que nos han guiado en la realización del presente trabajo con sus conocimientos, dedicación y profesionalismo.

Y el más profundo agradecimiento a todos nuestros verdaderos amigos; Pablo Quinteros, Galo Guzmán, Andrés Pérez, Santiago Reino, Paúl Galán, que nos han colaborado de una u otra forma para la culminación de este trabajo de tesis de grado, que pone fin a un largo camino de estudio y sacrificio en pos de obtener una carrera profesional.

Kattee y Gaby

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue la optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual.

Esta investigación logró determinar los parámetros más relevantes para la preparación y estandarización de las perlas de alginato como también el atrapamiento del catalizador biológico en dichas perlas. Con el objeto de determinar el mejor rendimiento de la enzima inmovilizada en el proceso de hidrólisis de la leche, mediante el diseño experimental se obtuvo el mejor resultado al alcanzar el 1% de lactosa residual demostrando que existe hidrólisis en las muestras, lo cual nos ofrece un método innovador para la industria láctea en general.

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the optimum conditions to hydrolyze lactic substrates using β - Galactosidase at immobilized conditions. Residual lactose was determined as an optimization parameter.

The standardization of alginate pearls and the retention of the enzyme as a biological catalyst were performed, determining the relevant parameters for this purpose. Through experimental design techniques, the optimization of milk hydrolysis process was achieved, reaching 1% of residual lactose in the samples.

The methodology presented will represent an innovative method for dairy industries.

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de contenidos	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Índice de anexos	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO1: LAS ENZIMAS Y SU INMOVILIZACIÓN	3
1.1 Definiciones	3
1.2 Cinética enzimática	5
1.3 Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas	7
1.4 Hidrólisis	8
1.4.1 Hidrólisis enzimática	8
1.4.2 Métodos para determinación de la hidrólisis	9
1.4.3 Determinación de lactosa residual	10
1.5 Métodos de inmovilización	11
1.6 Efectos de la inmovilización	17
1.7 Aplicación de las enzimas inmovilizadas	18
CAPITULO2: LAS ENZIMAS Y SU INMOVILIZACIÓN	21
2.1 Generalidades	21
2.2 Tipos de reactores	23
2.2.1 Reactor tipo Batch (discontinuos)	24
2.2.2 Reactor tipo Plug-Flow	25
2.2.3 Reactor tipo Continuo	26
2.3 Condiciones de operación del Biorreactor	28
CAPÍTULO 3: DISEÑO EXPERIMENTAL	29

3.1 Generalidades	29
3.2 Diseños de screening de variables	30
3.3 Diseños de optimización	31
CAPITULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Preparación del Biorreactor	34
4.2 Preparación de las perlas de alginato	36
4.3 Atrapamiento de β -galactosidasa en las perlas de alginato	39
4.4 Determinación de lactosa	42
CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSION	46
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57

INDICE DE TABLAS:

TABLA N° 1	Variables del proceso y condiciones experimentales	46
TABLA N° 2	Matriz experimental del modelo de Screening	46
TABLA N° 3	Datos tabulados	47
TABLA N° 4	Variables relevantes	47
TABLA N° 5	Matriz del diseño central compuesto	48
TABLA N° 6	Producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato	49
TABLA N° 7	Valores para la curva de calibración	49
TABLA N° 8	Variables de proceso y condiciones experimentales	50
TABLA N° 9	Matriz experimental del modelo de Screening	51
TABLA N° 10	Valores de lactosa residual	52
TABLA N° 11	Respuestas del porcentaje de lactosa	52
TABLA N° 12	Variables relevantes	53
TABLA N° 13	Condiciones óptimas de experimentación en el proceso de hidrólisis	54
TABLA N° 14	Valores de la absorbancia y porcentaje de lactosa en el experimento óptimo	54
TABLA N° 15	Valores obtenidos en el análisis crioscópico de lactosa	54

INDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1	Mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima	3
FIGURA 2	Estructura tridimensional de una enzima digestiva	4
FIGURA 3	Diagrama de energía para una reacción química efectuada .	5
FIGURA 4	Curva de avance de reacción	6
FIGURA 5	Velocidad de reacción enzimática con respecto a la concentración de enzima	7
FIGURA 6	Hidrólisis de lactosa	8
FIGURA 7	Métodos de inmovilización por retención física	12
FIGURA 8	Métodos de inmovilización mediante unión química	14
FIGURA 9	Componentes de un biosensor	19
FIGURA 10	Los tres tipos de reactores ideales	24
FIGURA 11	Reactor tipo Batch discontinuo	25
FIGURA 12	Reactor tipo Plug flow con ganancia o pérdida de calor	26
FIGURA 13	Reactor tipo continuo	27
FIGURA 14	Grafica de superficie de respuesta	31
FIGURA 15	Diseño compuesto central	33
FIGURA 16	Diagrama de bloques del programa en LabView	35
FIGURA 17	Diagrama de la producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato	37
FIGURA 18	Diagrama de atrapamiento de β -galactosidasa en las perlas de alginato	42
FIGURA 19	Curva de calibración de lactosa	50
FIGURA 20	Half Normal plot de los coeficientes de regresión	53

INDICE DE ANEXOS:

ANEXO 1	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 1	61
ANEXO 2	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 2	61
ANEXO 3	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 3	62
ANEXO 4	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 4	62
ANEXO 5	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 5	63
ANEXO 6	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 6	63
ANEXO 7	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 7	64
ANEXO 8	Histograma de distribución granulométrica de las perlas experimento N° 8	64
ANEXO 9	Histograma de distribución granulométrica de las perlas replica N° 1	65
ANEXO 10	Histograma de distribución granulométrica de las perlas replica N° 2	65
ANEXO 11	Histograma de distribución granulométrica de las perlas replica N° 3	66
ANEXO 12	Histograma de distribución granulométrica de las perlas replica N° 4	66
ANEXO 13	Fotografía 1. Preparación de solución alginato de sodio	67
ANEXO 14	Fotografía 2. Proceso de preparación de las perlas de alginato	67
ANEXO 15	Fotografía 3. Reactor discontinuo	68
ANEXO 16	Fotografía 3. Perlas de alginato	68
ANEXO 17	Fotografía 4. Experimentos de prueba	69
ANEXO 18	Fotografía 5. Experimentos iniciales	69
ANEXO 19	Fotografía 6. Réplicas de los experimentos	70
ANEXO 20	Fotografía 7. Plastómetro	70
ANEXO 21	Fotografía 8. Punto óptimo	71

ANEXO 22	Fotografía 9. Levadura	71
ANEXO 23	Fotografía 10. Reactivos: Luff-Schoorl, Carrez 1, Carrez 2 ...	72
ANEXO 24	Fotografía 11. Patrones de la curva de calibración de lactosa	72
ANEXO 25	Fotografía 12 -13. Experimentos	73
ANEXO 26	Fotografía 14. Espectrofotómetro	74
ANEXO 27	Fotografía 15. Inmovilización de enzima	74
ANEXO 28	Fotografía 16. Crioscopio	75

Mogrovejo Dávila, Patricia Katherine

Urgiles Jumbo, Gabriela del Cisne

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Noviembre de 2009

***OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS UTILIZANDO β -
GALACTOSIDASA INMOVILIZADA POR ATRAPAMIENTO Y DETERMINACION
DE LACTOSA RESIDUAL***

INTRODUCCION

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (presentan una gran actividad catalítica muestran una gran especificidad de sustrato, son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica).

A pesar de estas ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Una gran parte de la población mundial sufre de intolerancia a la lactosa, debido a niveles deficientes de β -galactosidasa intestinal lo cual origina síntomas de mala digestión. La lactosa también ocasiona serios inconvenientes en la industrialización de derivados lácteos; su baja solubilidad provoca la formación de duros cristales en los productos concentrados y una textura arenosa en productos lácteos entre ellos helados y dulces de leche.

La leche deslactosada puede ser empleada como base para la fabricación de toda la gama de productos lácteos conocidos, dirigidos hacia el mercado de los consumidores que son intolerantes a la lactosa o tienen problemas con la digestión de la misma. Además es de vital importancia deslactosar la leche para evitar

problemas como la cristalización, la falta de color y para brindar brillo y plasticidad al producto. La dosificación dependerá del producto que se desea fabricar, el pH, la temperatura y el grado de hidrólisis al que se desee llegar.

Además es importante definir una técnica que permita la determinación de lactosa residual para que con ello demostrar la eficacia de la hidrólisis de la enzima β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento.

CAPITULO 1

LAS ENZIMAS Y SU INMOVILIZACIÓN

1.1 Definiciones

Las enzimas son moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas, disminuyendo el nivel de la energía de activación propia de la reacción.

Se entiende por energía de activación al valor de la energía que es necesario aplicar (en forma de calor, electricidad o radiación) para que dos moléculas determinadas colisionen y se produzca una reacción química entre ellas.

Las enzimas no reaccionan químicamente con las sustancias sobre las que actúan (sustrato), ni alteran el equilibrio de la reacción, *figura 1*. Solamente aumentan la velocidad con que éstas se producen, actuando como catalizadores. La velocidad de las reacciones enzimáticas dependen de la concentración de la enzima, de la concentración del sustrato (hasta un límite) y de la temperatura y el pH del medio. [14]

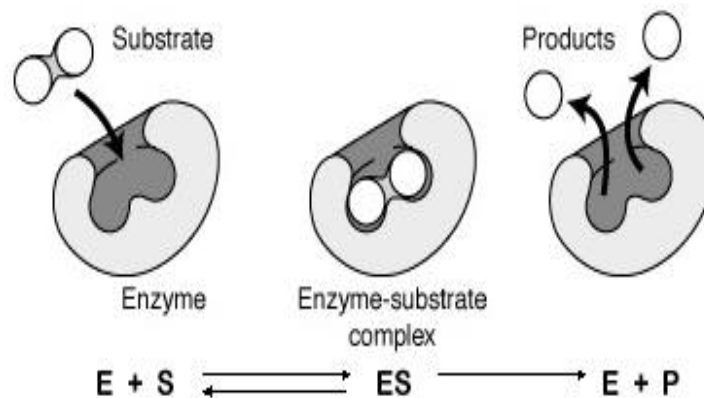


Figura 1. Mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima.

Fuente: http://www.engormix.com/images/s_articles/2457_201.jpg

Cada una de las transformaciones, que experimentan los alimentos en nuestro sistema digestivo, está asociada a un tipo específico de enzima. Estas enzimas son las llamadas enzimas digestivas, *figura 2*.

El proceso normal de digestión de los alimentos, mediante la acción de las enzimas, da como resultados nutrientes elementales (aminoácidos, glucosa, ácidos grasos, etc.) que asimilamos en el intestino y son aprovechados por el organismo. [15] La β -galactosidasa o lactasa desdobla la lactosa en sus correspondientes mono sacáridos y se puede emplear en diversos productos lácteos, sobre todo en los que se elaboran para las poblaciones que no toleran este disacárido. En algunos países existe incluso una preparación a base de la enzima, que se le añade a la leche antes de consumirla para reducir la cantidad de lactosa. En derivados de la confitería también ha encontrado aplicaciones, ya que al hidrolizar la lactosa, evita que ésta cristalice; además, la mezcla de glucosa y galactosa resultante tiene un sabor más dulce que la propia lactosa. También se emplea en la panificación dado que mejora la calidad panaria de los alimentos elaborados con leche. La lactasa B-D-galactosidasa (E. C. 3.2.1.23), es la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa teniendo este último más poder edulcorante que la lactosa. Esta enzima se usa desde hace años en la preparación de productos deslactosados a base de leche y suero. El tratamiento enzimático mejora los problemas de insolubilidad y de baja dulzura del producto. Asimismo mejora la capacidad nutricional de la leche.

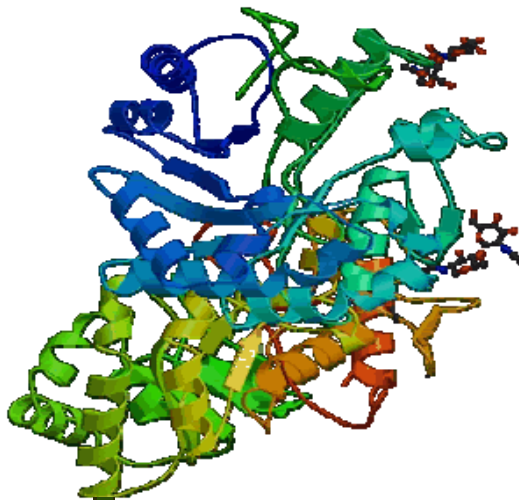


Figura 2. Estructura tridimensional de una enzima digestiva. Fuente:

http://1.bp.blogspot.com/_jo1sdI0vbg8/SgdC5MObh8I/AAAAAAAAAEE/ELf6SSnKrcM/s320/glucanasa%5B1%5D.gif

1.2 Cinética enzimática

Las enzimas catalizan reacciones biológicas, y al igual que otros catalizadores, influyen en la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio sin afectar propiamente el equilibrio global; en estas circunstancias, las transformaciones químicas se llevan a cabo mediante una ruta que requiere menos energía libre de activación.

En la figura 3, se observa el cambio que representa la diferencia de energía libre entre los estados inicial y final de la reacción. Para una misma reacción, si se emplean enzimas se necesita menos energía que cuando se usan catalizadores inorgánicos; si se compara con otras reacciones químicas (la oxidación de lípidos y pardeamiento de Maillard), la transformación enzimática generalmente requiere de menos energía para llevarse a cabo. [14]

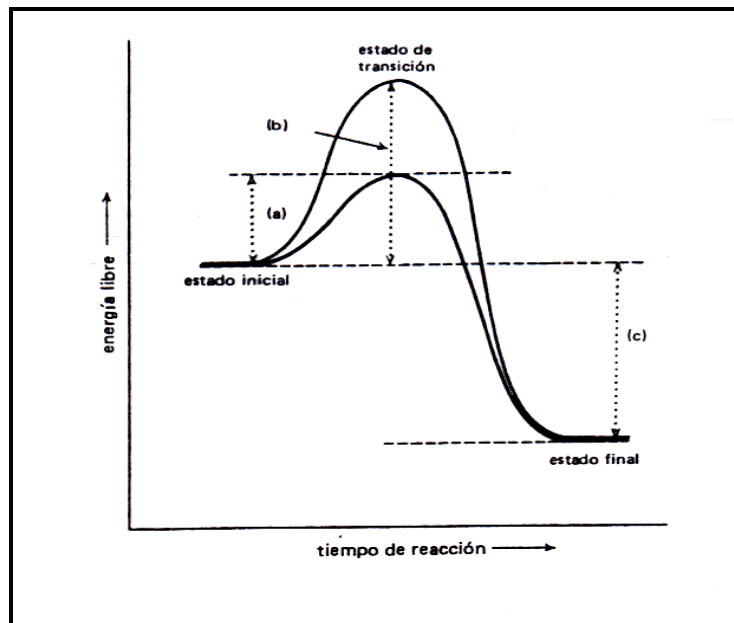


Figura 3. Diagrama de energía para una reacción química efectuada (a) con catalizador y (b) sin catalizador. Fuente:

<http://html.rincondelvago.com/files/9/2/5/0004592525.png>

Según la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo

el sustrato de la reacción, *figura 4*. Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción (v_0). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero. De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la $[S]$ como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.

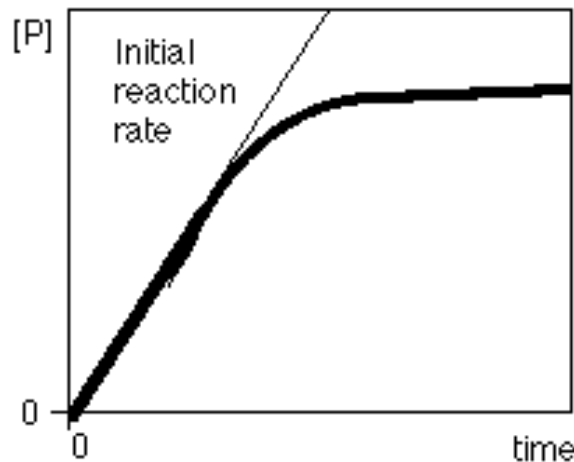


Figura 4. Curva de avance de reacción. Fuente:

http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/cinetica_files/image009.gif

En la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la *figura 5*.

Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]_0$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{\max}).
[16]

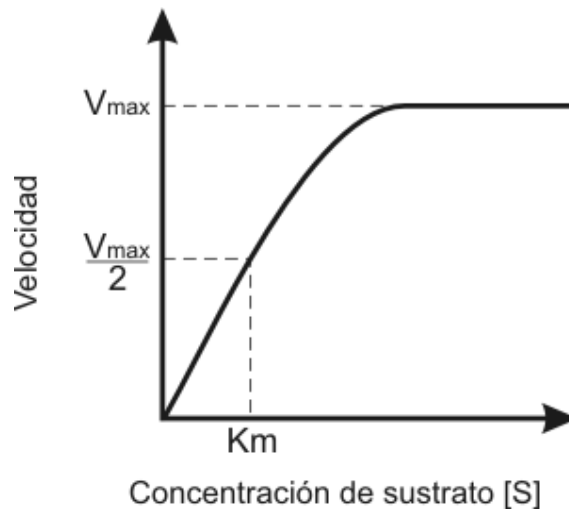


Figura 5. Velocidad de reacción enzimática con respecto a la concentración de enzima. Fuente: <http://www.genomasur.com/lecturas/03-08-G.gif>

1.3 Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas

El enorme número de reacciones catalizadas por enzimas y la especificidad de las enzimas individuales significan que éstas son potencialmente de gran valor industrial. Sin embargo, su costo se agudiza al aplicarlas como reactivos en forma soluble, pues se produce su pérdida, una vez utilizadas. Aunque la enzima por regenerarse en el proceso podría usarse muchas veces, su separación a partir de la mezcla de reacción no es económicamente factible.

De allí que ha significado un avance importante la posibilidad de inmovilizar las enzimas sobre soportes inertes, reteniendo así gran parte de su actividad catalítica original.

Como las reacciones enzimáticas se desarrollan en medio acuoso, la matriz del soporte debe ser insoluble en agua, pero tan hidrófila que garantice un buen contacto con el medio de la reacción.

Su aplicación se basa en sus interesantes propiedades:

a) Son térmicamente más estables que las enzimas nativas y más resistentes a la autólisis.

b) Al final de una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima enlazada puede separarse por simple centrifugación o filtración, sin necesidad de agregar un reactivo de inactivación o precipitación.

c) Una vez recuperada, la enzima enlazada puede volver a usarse las veces que se desea, sin pérdida sustancial de actividad después de un simple lavado con soluciones tampones acuosos y permitiendo realizar así procesos enzimáticos continuos. [10]

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte.

1.4 Hidrólisis

1.4.1 Hidrólisis enzimática

Los disacáridos y los polisacáridos deben ser hidrolizados hasta monosacáridos para poder pasar la pared intestinal para llegar al torrente sanguíneo y poder ingresar al interior de las células para su utilización, *figura 6*.

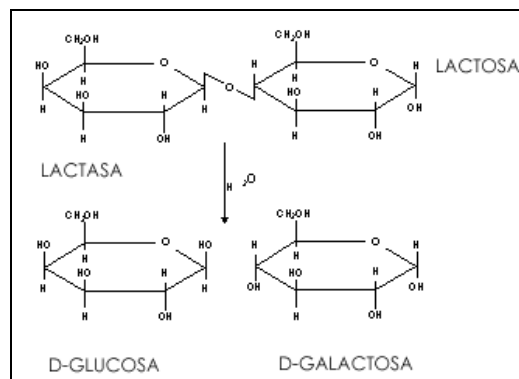


Figura.6 Hidrólisis de lactosa. Fuente: <http://www.alfa-editores.com/carnilac/Octubre%20Noviembre%202005/NOTAS%20DEL%20SECTOR%20Yogurt2.gif>

La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar; el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar.

El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trataba de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trataba de un polisacárido más complejo. [17]



La lactosa, un glúcido que se encuentra exclusivamente en la leche, es hidrolizada por la β - galactosidasa. Cuando ésta no se hidroliza en sus componentes que son más fáciles de absorber, continúa por el tracto digestivo y, por efectos osmóticos produce malestares digestivos.

La lactosa al ser hidrolizada, la leche adquiere un gusto más dulce debido a la presencia de glucosa libre, uno de los productos de la hidrólisis de la lactosa.

El mismo proceso puede utilizarse con suero de queso, producto de desecho que, si no se utiliza, se transforma en un contaminante para el medio ambiente. La posibilidad de hidrolizar la lactosa con β - galactosidasa inmovilizada, permite obtener un producto que luego puede ser secado para ser usado como edulcorante en la producción de helados, bebidas o productos de panadería y confitería. La ventaja de este producto seco, con respecto al que se obtendría secando suero de queso, es que no aparecen cristales de lactosa hecho que es importante sobre todo en la fabricación de helados. [18]

1.4.2 Métodos para la determinación de la hidrólisis

Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre ellos y el sulfato de Cobre. Las soluciones de esta sal tienen color azul. Tras la reacción con el glúcido reductor se forma óxido de Cobre de color rojo. De este modo, el

cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el glúcido presente es reductor.

El método de Fehling requiere del empleo de sulfato cúprico con un amortiguador de pH a base de tartrato de sodio y potasio; al calentar el hidrato de carbono disuelto en esta solución se generan enoles que reducen el ion cúprico a cuproso produciéndose el óxido correspondiente de color rojo. Además de este método existen otros, como el de Benedict y el de Smogiyi, basados en un principio semejante midiendo así el poder reductor de los azúcares.

De igual manera se puede correlacionar el punto de congelación con el porcentaje de hidrólisis determinado en forma absoluta por un método de referencia, en este caso el HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), encontrándose un coeficiente de correlación de 0.997. Lo que permite verificar el comportamiento lineal y la precisión del método de crioscopia, utilizado para seguimiento y control de los porcentajes de hidrólisis de lactosa a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de enzimas.

Históricamente los métodos utilizados como referencia han sido el HPLC o enzimáticos/UV, pero los procedimientos requieren tiempo y equipos sofisticados, además de personal entrenado.

La técnica de determinación del descenso crioscópico es rápida y tiene la ventaja que utiliza equipos usualmente encontrados en la industria láctea, evitando así inversiones adicionales. Además esta metodología se utiliza no sólo para determinar porcentaje de hidrólisis, sino también para conseguir, variando temperaturas de trabajo y concentraciones enzimáticas diferentes condiciones operativas en planta.

También se utiliza fluorimetría siguiendo la hidrólisis enzimática del disacárido. Éstos métodos tienen características que requieren tiempos largos, equipo sofisticado, reactivos caros y corrosivos, una cantidad considerable de material de vidrio y destrezas analíticas

1.4.3 Determinación de lactosa residual

La mayoría de los métodos para el análisis de lactosa en productos líquidos tales como leche y suero de leche, están basados en la reducción de sulfato cúprico a

óxido cuproso insoluble en agua. Éste último se determina entonces gravimétricamente por pesaje directo, por titulación con tiosulfato de sodio, o por degradación electrolítica de soluciones de ácido nítrico. El óxido cuproso determinado se transforma a un equivalente de lactosa con la ayuda de la tabla de Hammond para calcular lactosa sola o en presencia de sacarosa.

La lactosa también se determina polarimétricamente después de una desproteización con I_2Hg (Ioduro mercúrico). Otros métodos se basan en reacciones colorimétricas. En resumen, son accesibles procedimientos enzimáticos basados en la acción combinada de B- galactosidasa en presencia de hexoquinasa y ATP.

La oxidación de glucosa-6-fosfato con glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y TPM o NADP (Nucleótido de trifosfopiridina) sirve como indicador y el TPNH formado se mide por el incremento de la absorción a 340nm.

1.5 Métodos de inmovilización

Métodos de inmovilización por retención física.

- **Atrapamiento**

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano.

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero.

Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética.

El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la

enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína. *Figura 7*

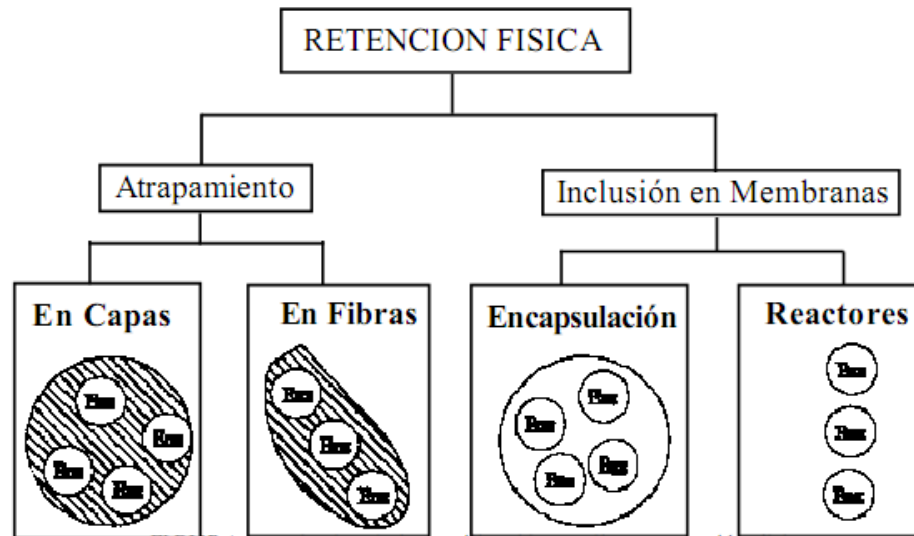


Figura. 7 Métodos de inmovilización por retención física. Fuente:

www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf

- **Inclusión en membranas: Dividida en dos tipos:**

1.-**Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas "micelas reversas"). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm (micrómetro) de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

2.-**Reactores de membrana:** Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la

enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

1. Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana.
2. Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

Métodos de inmovilización de enzimas por unión química

- **Unión a soportes**

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. *Figura 8.*

Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupo:

1.- **Soportes inorgánicos.** Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.), ó materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).

2.- **Soportes orgánicos.** Se pueden clasificar en:

- *Polímeros naturales:* a su vez divididos en:

- Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc).
- Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
- *Polímeros sintéticos*: divididos en:
 - Poliolefinas (como el poliestireno)
 - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
- Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente.

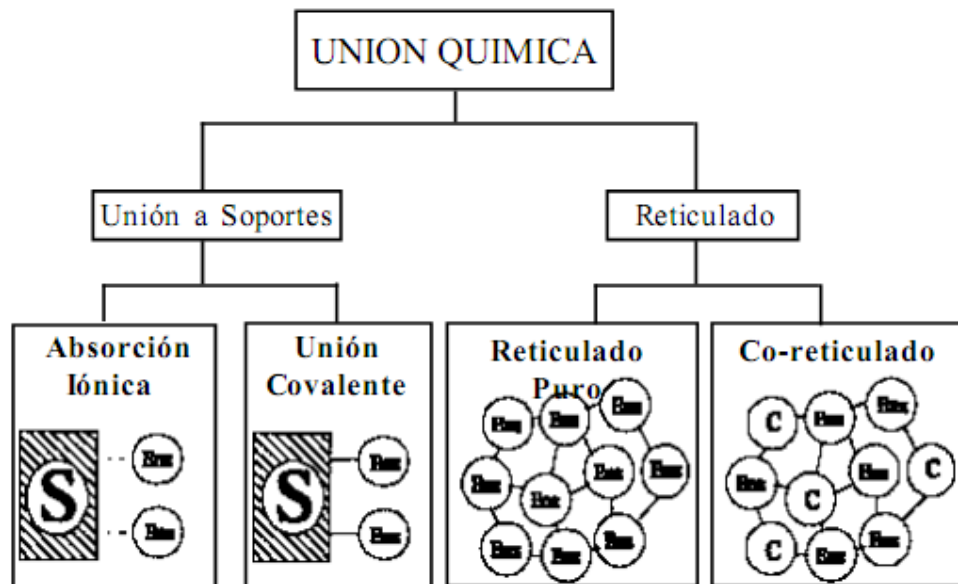


Figura 8. Métodos de inmovilización mediante unión química. Fuente:

www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf

- **Adsorción**

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.

Los principales factores que influyen en la adsorción, son:

1.-**El pH del medio:** controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.

2.-**La fuerza iónica:** al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.

3.-**El diámetro de poro:** debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.

4.-**La presencia de iones:** que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destacan:

- 1.- Su preparación sencilla,
- 2.- Su bajo coste,
- 3.- No hay cambios de especificidad enzimática,
- 4.- Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los inconvenientes de la adsorción son principalmente:

- 1.- La optimización de las variables que controlan la adsorción,
- 2.- Los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico,
- 3.- La unión al soporte es débil.

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear resinas de intercambio iónico, las cuales contienen grupos funcionales y contra-iones móviles. Estos contra-iones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble.

- **Unión covalente**

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.

De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico.

El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes ventajas:

- 1.- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
- 2.- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- 3.- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- 4.- Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

- 1.- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- 2.- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo.

Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.

- **Reticulado**

El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína

sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción.

1.6 Efectos de la inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno.

- **Efectos en la estabilidad**

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones:

1. Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados.

La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

2. Una protección frente a las proteasas en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.

3. Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

4. Existe una alteración del microentorno del enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. El soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima.

- **Efectos en la actividad enzimática**

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.

2. Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.

3. La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.

4. Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

1.7 Aplicación de las enzimas inmovilizadas

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

Aplicaciones analíticas

- **Biosensores**

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental. Generalmente, el biosensor, *figura 10*, contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.).

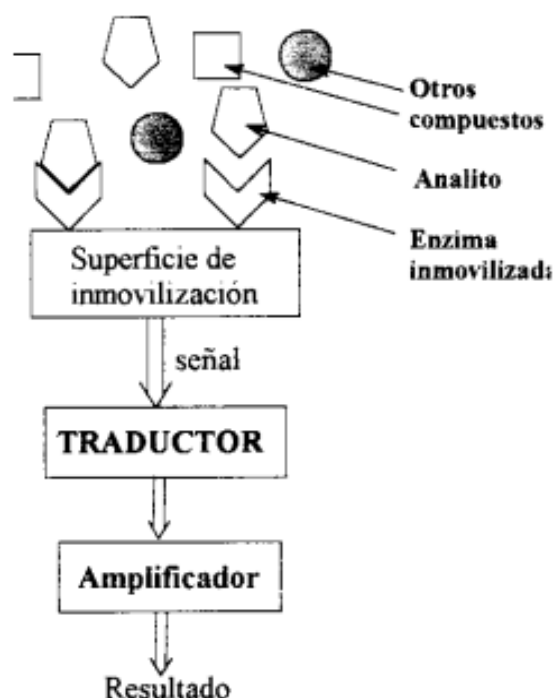


Figura 9. Componentes de un biosensor. Fuente: www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf.

En el caso del control de calidad en las industrias alimentarias, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o por ejemplo, cuantificar el azúcar presente en bebidas.

Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente.

Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

Aplicaciones médicas

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima.

También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistente a la acción de las proteasas.

La tripsina o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel, y también para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Este tipo de enzimas se pueden inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de apósitos y vendas.

Aplicaciones en la Industria Alimentaria

Son muchas las enzimas que se emplean en el procesado, la preparación y la conservación de los alimentos. Normalmente, las enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una vez que el tratamiento ha concluido. En ocasiones se permite que continúe su actividad para que los alimentos desarrollen el aroma y la textura deseados, pero nunca se reutilizan. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas. De todas maneras, existen limitaciones a su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos.

A continuación se resumen algunas de las aplicaciones:

- En la hidrólisis de proteínas.
- En la hidrólisis de hidratos de carbono.
- En el proceso de obtención de jarabes enriquecidos en fructosa, que sirve de edulcorante en bebidas refrescantes
- En la obtención de un zumo menos viscoso, más concentrado, y disminuye el sabor amargo de los cítricos.
- En la desacidificación del vino.
- En la maduración de quesos.
- En la obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios

CAPITULO 2

REACTORES

2.1 Generalidades

Se conoce como reacción química a aquella operación unitaria que tiene por objeto distribuir de forma distinta los átomos de ciertas moléculas (compuestos reaccionantes o reactantes) para formar otras nuevas (productos).

El lugar físico donde se llevan a cabo las reacciones químicas se denominan *REACTOR QUÍMICO*.

Los factores que hay que tener en cuenta a la hora de llevar a cabo o desarrollar una reacción química son:

- Condiciones de presión, temperatura, y composición necesarias para que los materiales entren en estado de reacción.
- Las características termodinámicas y cinéticas de la reacción
- Las fases (sólido, líquido, gaseoso) que se encuentran presentes en la reacción

Formas de cambios químicos:

Descomposición, consiste en que una molécula se divide en moléculas más pequeñas, átomos o radicales.

Combinación, ésta se realiza cuando una molécula o átomo se une con otra especie para formar un compuesto nuevo.

Isomerización, en este caso la molécula no efectúa ninguna descomposición externa o adición a otra, es simplemente un cambio de *configuración* estructural interna.

Un reactor químico es una unidad procesadora diseñada para que en su interior se lleve a cabo una o varias reacciones químicas.

Dicha unidad procesadora está constituida por un recipiente cerrado, el cual cuenta con líneas de entrada y salida para sustancias químicas, y está gobernado por un algoritmo de control.

Los reactores químicos tienen como funciones principales:

- Asegurar el tipo de contacto o modo de fluir de los reactantes en el interior del tanque, para conseguir una mezcla deseada con los materiales reactantes.
- Proporcionar el tiempo suficiente de contacto entre las sustancias y con el catalizador, para conseguir la extensión deseada de la reacción.
- Permitir condiciones de presión, temperatura y composición de modo que la reacción tenga lugar en el grado y a la velocidad deseada, atendiendo a los aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción.

Ecuación de Rendimiento.

Es aquella expresión matemática que relaciona la salida con la entrada en un reactor químico, para diversas cinéticas y diferentes modelos de contacto.

Modelo de Contacto: Está referido a como los materiales circulan a través del reactor y se contactan unos con otros dentro de este, además del tiempo que necesitan para mezclarse, y las condiciones y características de la incorporación de material.

Cinética: Está referido a cuán rápido ocurren las reacciones, el equilibrio dentro del reactor, y la velocidad de la reacción química; estos factores están condicionados por la transferencia (balance) de materia y energía.

El balance de masas está dado por la relación:

$$\text{ENTRA} - \text{SALE} + \text{GENERA} - \text{DESAPARECE} = \text{ACUMULA}$$

El balance de energía está dado por la relación:

$$\text{ENTRA} - \text{SALE} - \text{GENERA} - \text{TRANSMITE} = \text{ACUMULA}$$

2.2 TIPOS DE REACTORES QUÍMICOS

Existen infinidad de tipos de reactores químicos, y cada uno responde a las necesidades de una situación en particular, entre los tipos más importantes, más conocidos, y mayormente utilizados en la industria en función del número de fases presentes en el reactor, pueden distinguirse:

- **Reactores homogéneos:** Son aquellos en los que tanto reaccionantes como productos se encuentran en la misma fase (gas, o líquido en general)

- **Reactores heterogéneos:** Son aquellos en los que hay más de una fase.

También pueden clasificarse según la forma en la que operan:

- **Reactores continuos:** Son aquellos que trabajan en estado estacionario; es decir, aquellos en que en cada instante se introduce alimentación fresca.

- **Reactores discontinuos:** Trabajan por lotes; es decir, se carga una cantidad de alimentación y se deja reaccionar durante un tiempo. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se carga de nuevo otra cantidad de alimentación, y así sucesivamente.

- **Reactores semi-continuos:** Una fase del reactor se comporta de forma continua mientras que otra lo hace de forma discontinua.

Dependiendo del tipo de flujo pueden clasificarse en:

- **Reactores ideales:** Son aquellos en los que el tipo de flujo es ideal (teórico). Se distinguen dos tipos, el reactor de mezcla perfecta y el reactor de flujo en pistón.

- **Reactores reales:** Son aquellos que no son ideales.

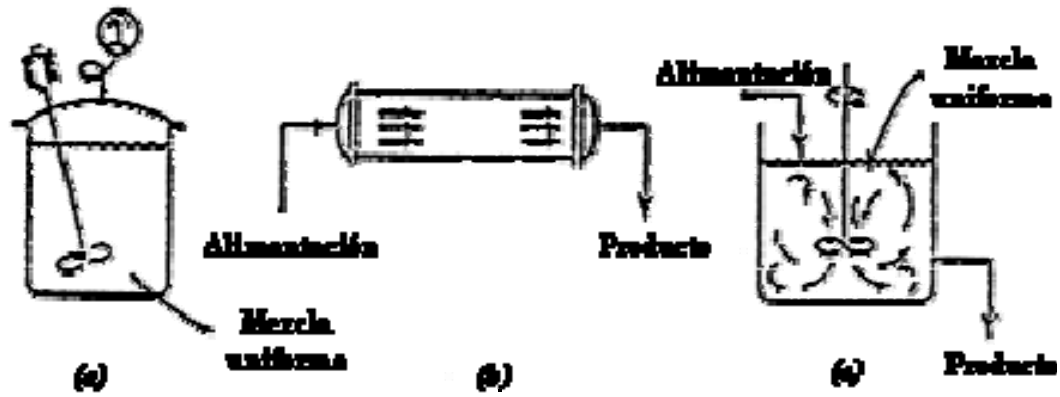


Fig. 10 los tres tipos de reactores ideales: (a) Reactor discontinuo; (b) Reactor de Flujo de pistón; (c) Reactor de mezcla completa. Fuente:

<http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/00118.htm>

2.2.1 Reactor tipo Batch (discontinuos)

Es aquel en donde no entra ni sale material durante la reacción, sino más bien, al inicio del proceso se introducen los materiales, se lleva a las condiciones requeridas, y se deja reaccionar por un tiempo preestablecido, luego se descargan los productos de la reacción y los reactantes no convertidos.

También es conocido como reactor tipo Batch.

En éste reactor el contenido es agitado y su composición es igual en todo el reactor. La composición varía con el tiempo hasta alcanzar una conversión final o de equilibrio del reactivo para las condiciones establecidas (temperatura, concentraciones iniciales de reactivos, presencia de inertes).

Una vez detenida la reacción (velocidad de reacción tendiente a cero), se debe vaciar total o parcialmente el reactor e incorporar nueva corriente de entrada si se quiere seguir produciendo productos de reacción. *Figura. 12.* [16]

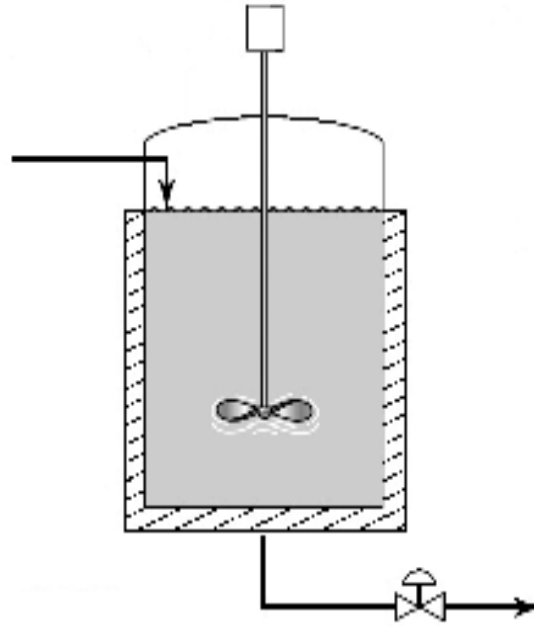


Fig.11 Reactor tipo Batch discontinuo. Fuente:

<http://www.monografias.com/trabajos50/simulador-reactores/Image2216.gif>

2.2.2 Reactor Tipo Plug Flow

El reactor de flujo pistón trabaja en estado estacionario. Esto significa que las propiedades no varían con el tiempo. Se dice que un fluido circula por un tubo en flujo pistón cuando no existen gradientes radiales y cuando no hay ningún tipo de mezcla (no existe aumento del espacio que ocupa algo) axial.

Si no existe gradiente radial los perfiles de propiedad son planos.

Si no existe difusión axial cada elemento de fluido mantiene su individualidad en todo el reactor sin mezclarse con los elementos anteriores o posteriores. El caso del movimiento de un émbolo en un pistón.

El flujo en pistón es una idealización de un determinado flujo, es un modelo matemático. Nos podemos aproximar a esta hipótesis si utilizamos una mezcla de reacción poco viscosa (así eliminamos gradientes radiales). Además si el fluido circula a gran velocidad podemos despreciar el término de difusión axial frente al flujo global.

En un reactor de flujo pistón las propiedades no varían con el tiempo pero sí con la posición en el reactor; visible en la *figura 13*.

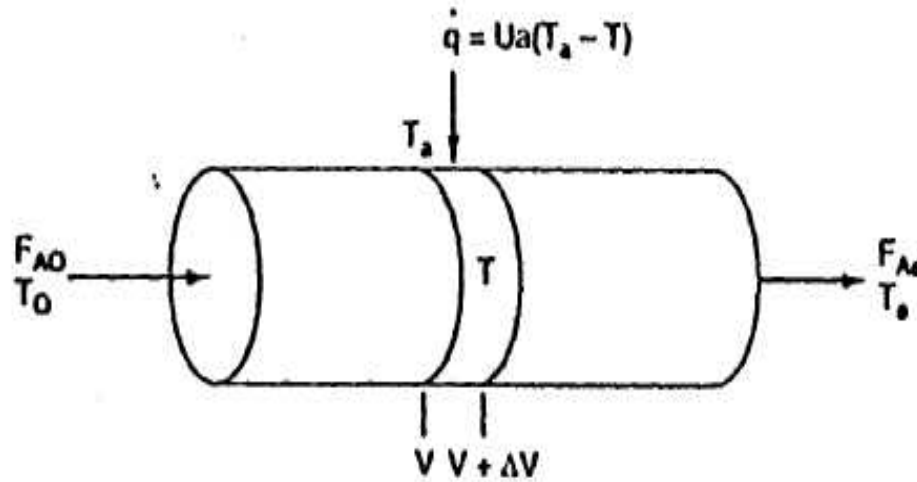


Fig.12 Reactor Tipo Plug Flow, con ganancia o pérdida de calor. Fuente: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Pipe-PFR.svg/380px-Pipe-PFR.svg.png>

2.2.3 Reactor Tipo Continuo

La reacción química se ejecuta al interior del reactor y mientras éste se alimenta constantemente de material reactante, para luego retirar ininterrumpidamente los productos de la reacción.

La composición de la corriente de salida es igual a la composición dentro de cualquier punto del reactor, esta composición no varía en el tiempo, por lo que se considera en estado estacionario.

Este tipo de reactores son ideales para estudios cinéticos o de diseño experimental de reactores puesto que son de sencilla construcción en el laboratorio y además en su cálculo de diseño ofrecen la posibilidad de relacionar el grado de conversión requerido (X), la velocidad de reacción (r), el volumen (V) y las concentraciones iniciales de reactivos (C_0), todo en una expresión resultante de un balance de masa, sin necesidad de integrar, puesto que el reactor se halla en estado estacionario respecto a la posición dentro del reactor y con respecto al tiempo.

Tiene una concentración uniforme en todo su volumen, este puede ser cerrado, su funcionamiento es en régimen no estacionario o transitorio y su rendimiento depende de su tiempo, o abierto, con un caudal volumétrico de entrada y de salida idénticos.

La concentración a la salida del reactor de mezcla perfecta abierto es igual a la concentración uniforme existente dentro del reactor. *Figura 14.*

El tiempo durante el que los elementos de fluido residen en el interior de este reactor abierto, o tiempo de residencia, puede tomar cualquier valor; una partícula puede salir inmediatamente después que entro, o como caso extremo, dar vueltas en el interior del reactor sin poder salir.

Existe por tanto una distribución del tiempo de residencia en torno a un tiempo de residencia medio.

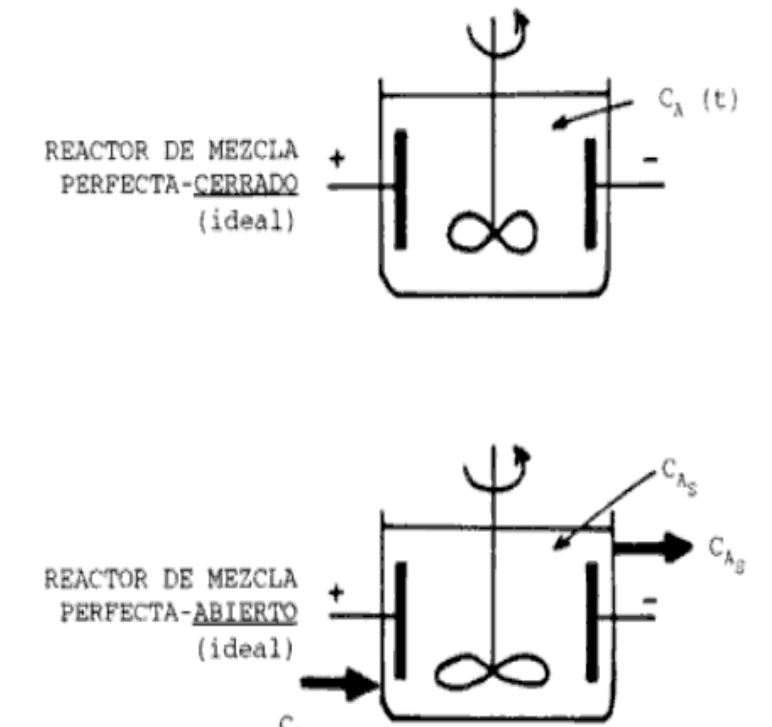


Fig.13 Reactor Tipo Continuo. Fuente:

<http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/imag/materia/teoria/figs/fig019.gif>

2.3 Condiciones de operación del Reactor

Una tecnología enzimática económicamente viable implica el uso de sistemas de reactores con enzimas inmovilizadas que posibiliten su reutilización o desarrollo de procesos continuos con bajo riesgo de contaminación.

La búsqueda de bajos costos en biocatalizadores ha sido el motivo de intensas investigaciones y varios métodos han sido aplicados para su inmovilización incluyendo el atrapamiento en hidrogeles.

En este proyecto, se contó con un reactor tipo discontinuo para trabajar, en el cual se cargó con una cantidad de alimentación y se dejó reaccionar durante un tiempo establecido por el diseño experimental. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se cargó nuevamente con otra cantidad de alimentación, y así sucesivamente hasta ejecución de todos los experimentos requeridos.

Todos los experimentos se llevaron a cabo controlando las siguientes condiciones de operación:

- Temperatura
- Velocidad de agitación
- Concentración
 - Alginato
 - Cloruro de calcio
 - Enzima (β -galactosidasa)

La velocidad mínima del agitador para que las partículas sólidas de alginato de calcio puedan permanecer en suspensión se varió de acuerdo al diseño experimental aplicado, fijándose en revoluciones por minuto.

CAPITULO 3

DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Generalidades

La experimentación juega un papel fundamental en todos los campos de la investigación y el desarrollo. El objetivo de ésta es obtener *información de calidad* que permita desarrollar nuevos productos y procesos, comprender mejor un sistema (un proceso industrial, un procedimiento analítico,...) y tomar decisiones sobre como optimizarlo, mejorar su calidad, comprobar hipótesis científicas, etc. [8]

Cuando se desea medir cómo influyen k factores en un proceso y descubrir si interaccionan entre ellos, es conveniente el uso del diseño factorial completo 2^k . Este diseño permite explorar una zona escogida del dominio experimental y permite una optimización posterior.

En un diseño factorial se estudia la influencia de todas las variables experimentales y sus efectos de interacción sobre una o varias respuestas. Si la combinación de los k factores viene colocados a dos niveles, el diseño factorial se denota como 2^k experimentos. Los niveles de los factores se definen con (-) para el nivel bajo y (+) para el nivel alto, el nivel central es definido por "0".

En estos diseños, cada factor se estudia a sólo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores.

La matriz comprende $2k$ filas ($2 \cdot 2 \dots \cdot 2 = 2^k$ experimentos) y k columnas, que corresponden a los k factores en estudio. Si se construye en el *orden estándar*, cada columna empieza por el signo -, y se alternan los signos - y + con frecuencia 2^0 para x^1 , 2^1 para x^2 , 2^2 para x^3 , y así sucesivamente hasta x^k , donde los signos se alternan con una frecuencia 2^{k-1} . [13]

Una vez definidas cual de los factores anteriormente descritos son significativos ($\alpha=0.05\%$) se procederá mediante técnicas de respuestas polinomial cuadrática a la optimización de las condiciones experimentales.

3.2 Diseño de screening de variables

Función de deseabilidad

Consiste en definir una función en el espacio de factores que mide la deseabilidad global (DG) del producto predicha en cada punto, convirtiendo de esta forma el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado. Basta maximizar dicha deseabilidad global para obtener el punto óptimo.

La deseabilidad global (DG) en un punto $X_0 = (x_1, x_2, \dots, x_p)$ se define como la media geométrica de las deseabilidades individuales (d_1, d_2, \dots, d_k), que a su vez son transformaciones que convierten los valores predichos de cada respuesta bY_1, bY_2, \dots, bY_k a números en el intervalo $[0, 1]$.

Si d_i es igual a 1 significa que la correspondiente respuesta predicha bY_i toma su valor máximo deseable; si $d_i = 0$ la respuesta toma un valor inaceptable y la deseabilidad global $DG = 0$, lo que significa que el todo el producto es inaceptable independientemente de los valores de las respuestas restantes.

Esto último explica el uso de la media geométrica en la definición de la deseabilidad global DG.

Sean los k modelos ajustados dados por:

$$\begin{aligned} \hat{Y}_1 &= \hat{\beta}_{01} + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{i1} X_i + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{ii1} X_i^2 + \sum_{i < j}^p \hat{\beta}_{ij1} X_i X_j \\ \hat{Y}_2 &= \hat{\beta}_{02} + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{i2} X_i + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{ii2} X_i^2 + \sum_{i < j}^p \hat{\beta}_{ij2} X_i X_j \\ &\vdots \\ \hat{Y}_k &= \hat{\beta}_{0k} + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{ik} X_i + \sum_{i=1}^p \hat{\beta}_{iik} X_i^2 + \sum_{i < j}^p \hat{\beta}_{ijk} X_i X_j. \end{aligned}$$

Estos modelos se pueden evaluar en cualquier punto $X_0 = (x_1, x_2, \dots, x_p)$ de la región experimental y resultan los k predichos $bY_1(\mathbf{x}), bY_2(\mathbf{x}), \dots, bY_k(\mathbf{x})$. Cada $bY_i(\mathbf{x})$ se transforma en un valor $d_i(\mathbf{x})$ que cae en el intervalo $[0, 1]$ y que mide el grado de deseabilidad de la respuesta en relación a las especificaciones y valor objetivo.

Una vez calculadas las k deseabilidades individuales, se obtiene la deseabilidad global DG como la media geométrica, siendo adecuada la mas cercana a 1, esto

nos indica las condiciones deseadas para la experimentación definiendo el punto en el que, la granulometría es normal y la deformación es más baja.

Al conjugar todas las respuestas de: skewness con tendencia a 1, granulometría media de las perlas, coeficiente de variación, pendiente y kurtosis con valores cercanos a 0, en cada experimento se obtiene la deseabilidad individual que luego de analizar cada una de las respuestas obtenidas se define como óptimo el experimento que posea un valor cercano a 1, demostrando que dicho experimento tiene un valor máximo deseable y cumple con las características deseadas anteriormente descritas; caso contrario este será inaceptable cuando los valores sean cercanos a 0. [19]

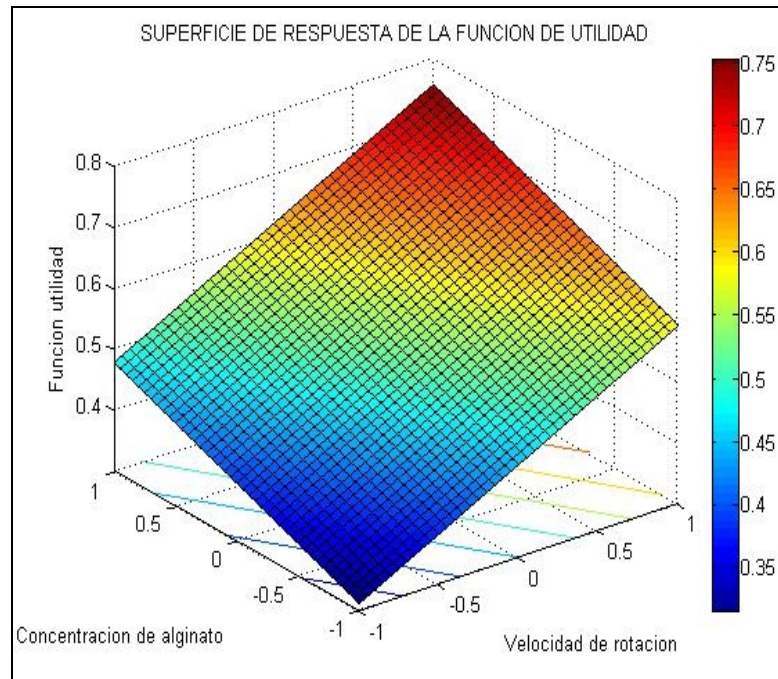


Fig. 14 Gráfica de superficie de respuesta.

3.3 Diseños de optimización

Superficie de respuestas

La metodología de superficies de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema.

En otras palabras, es la estrategia experimental y de modelación que permite encontrar condiciones de operación óptima de un proceso para mejorar la calidad de un producto.

Al decir que un valor de respuesta Y depende de los niveles x_1, x_2, \dots, x_k de k factores, $\xi_1, \xi_2 \dots \xi_k$ estamos diciendo que existe una función matemática de x_1, x_2, \dots, x_k cuyo valor para una combinación dada de los niveles de los factores corresponde a Y , esto es $Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$.

La relación $Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$ entre Y y los niveles de los k factores $\xi_1, \xi_2 \dots \xi_k$ representa una superficie. (pdf capítulo 2)

El número total de corridas al centro y la distancia de los puntos axiales (α) deben escogerse de una manera adecuada, dependiendo de las propiedades que se quieren en el diseño central; se quiere que el diseño sea rotatable se toma:

$$\alpha = (n_F)^{1/4}$$

En donde F es del número de puntos en la parte factorial.

Los diseños factoriales completos, atribuyen la denominación de “tratamiento ganador” a la mejor combinación de niveles de los factores estudiados, y muchas veces resulta ser uno de los que se corrieron en el experimento.

El punto óptimo, implica el mejor tratamiento posible en toda la región de operabilidad. Así, determinar el punto óptimo es un reto más fuerte y requiere de una estrategia más completa, ver *figura 15*, que incluye la posibilidad de necesitar varios experimentos en forma secuencial y el uso de otras técnicas de análisis.

Aunque el tratamiento ganador sea el punto experimental más cercano al verdadero punto óptimo; si el experimento está bien planteado la respuesta tiene un comportamiento suave, hay una congruencia entre el mejor tratamiento y el punto óptimo. En este caso, para poder alcanzar el óptimo se requiere correr otro diseño

experimental, que abarque los puntos en cuestión y permita estudiar los efectos de la curvatura pura.

En práctica, la realidad del proceso no se conoce, por lo tanto no se sabe donde está el punto óptimo y sólo se dispone de información obtenida en la región experimental para inferir hacia dónde se debe continuar explorando. [20]

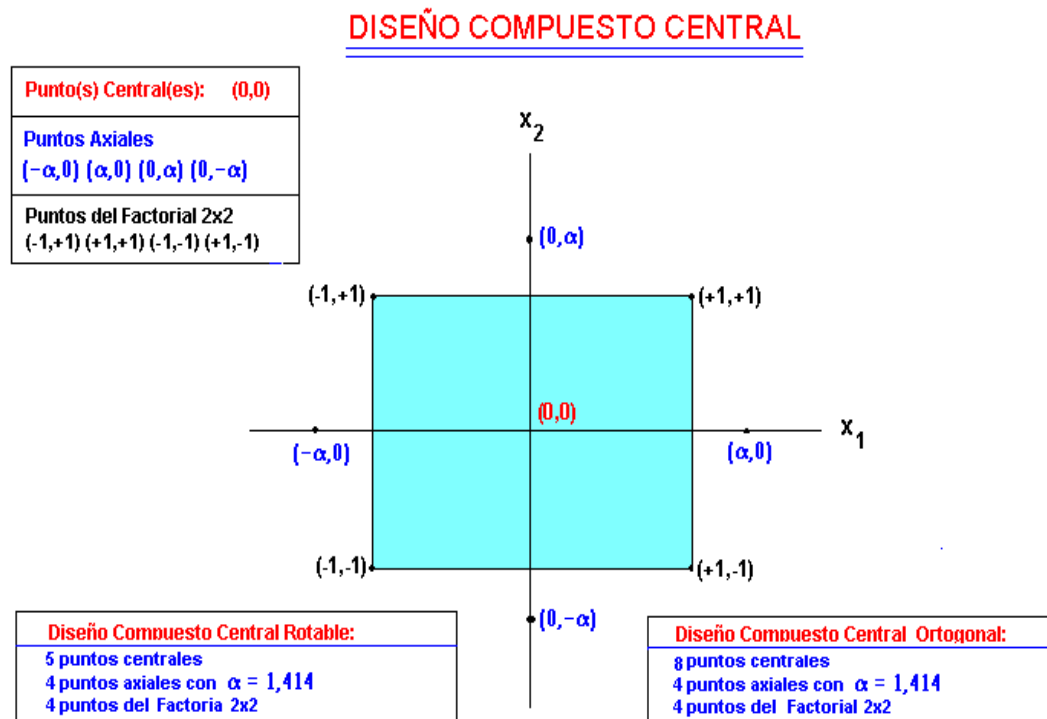


Fig. 15 Diseño compuesto central. Fuente **PULIDO**, Gutiérrez Humberto. Salazar de la Vara Román. 2004. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta la descripción de la metodología experimental usada en la ejecución del presente trabajo de graduación. El método de inmovilización por atrapamiento es detallado a continuación y se describe la técnica para la determinar la lactosa residual en cada uno de los experimentos.

La investigación fue realizada en los laboratorios de la Universidad del Azuay en la Facultad de Ciencia y Tecnología.

4.1 Preparación del reactor

Se usó para la construcción del reactor un recipiente cilíndrico de acero inoxidable de un diámetro de 25cm y altura de 22.5cm; al cual se complementó con un agitador de velocidad regulable como también jeringas de 25ml sostenidas por un soporte universal.

El control de tiempo y temperatura del proceso, se realizó mediante un software desarrollado en Labview, el cual consta de cronómetro y un sistema ON/OFF para cada variable respectivamente.

La medición de temperatura se realizó por medio del transductor lineal LM35C, cuyo circuito de interface entrega $100\text{mV}/^\circ\text{C}$, el programa toma este dato y lo compara con el valor de temperatura deseado, encendiendo una niquelina si este valor está por debajo del setpoint (temperatura deseada), o apagándola en caso contrario.

Este proceso se repite hasta que el cronómetro complete el tiempo establecido inicialmente. Así se logra mantener un rango aceptable en la variación de la temperatura.

DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROGRAMA

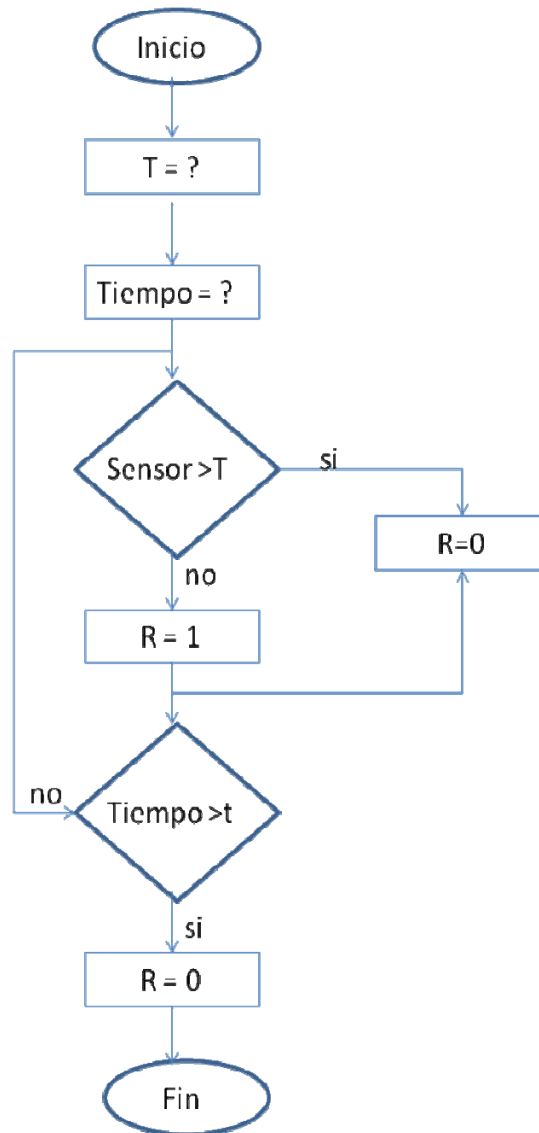


Fig. 16 Diagrama de bloques del programa en LABVIEW

Nomenclatura:

T = Temperatura deseada

Sensor = Temperatura medida

Tiempo = Tiempo del proceso

t = Tiempo transcurrido

R = Niquelina (1 = ON , 0 = OFF)

Reactor construido ver índice de ilustraciones y cuadros.

4.2 Producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato

Para 25cc de alginato

Materiales:

- 1.25 gr. de alginato al 5%
- 14.15 cc. de agua destilada tibia
- 9.6cc de enzima β -galactosidasa
- 2lt. de cloruro de calcio al 2%
- 1 Jeringa (para inyectar ganado) de 30cc
- 1 olla grande de 8lt.
- 1 tamiz

Equipo:

Agitador mecánico de velocidad controlada

Preparación:

1. Calentar el agua destilada a la temperatura de 30° C.
2. Retirar del fuego y colocar el alginato.
3. Seguidamente colocar la enzima.
4. Mezclar.
5. Colocar en la jeringa.
6. Adaptar el agitador a la olla y colocar dentro el cloruro de calcio.
7. Mantener el agitador a una velocidad constante de 812 RPM
8. Dejar caer el total del alginato en la solución.
9. Dejar reposar las perlas en la solución un tiempo de tres minutos.
10. Tamizar las perlas luego de que haya transcurrido el tiempo.
11. Lavar con abundante agua destilada.

Las condiciones de atrapamiento se realizaron mediante diseño experimental 2^3 en la cual se determinó la influencia de la concentración de Cl_2Ca , velocidad de rotación y el tiempo de permanencia de las perlas en el Batch sobre la distribución granulométrica de las mismas.

Una vez definidos cual de los factores anteriormente descritos son significativos ($\alpha=0.05\%$) se procedió mediante técnicas de respuestas polinomial cuadrática a la optimización de las condiciones experimentales.

Para el efecto se utilizará un diseño central compuesto con 4 replicas en el punto central.

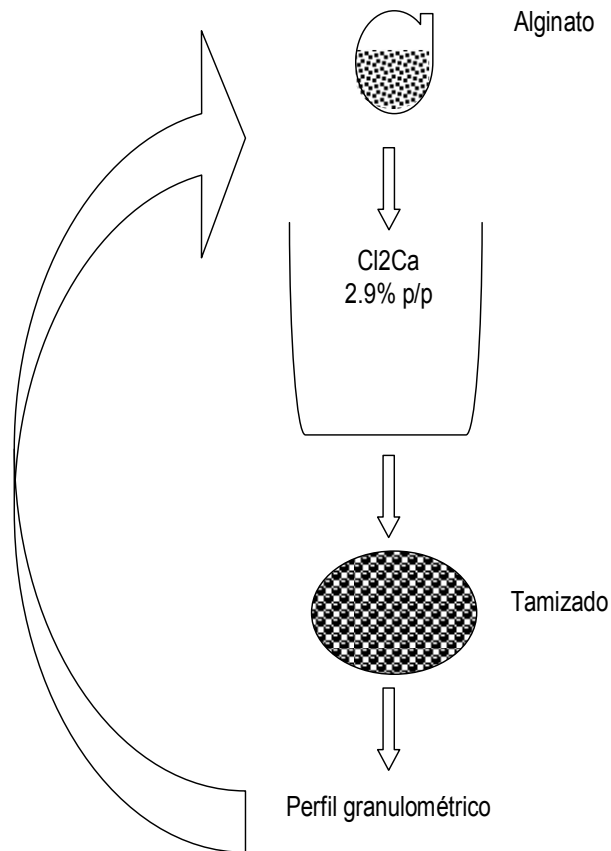


Fig. 17 Diagrama de la producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato.

Para la producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato se estudió los siguientes factores: concentración de cloruro de calcio (X1), velocidad de rotación (X2) y concentración de alginato de sodio (X3) a dos niveles. Se corrieron ocho experimentos definidos en la matriz del diseño (tabla1).

Casi en todos los procedimientos experimentales, muchas variables influyen en el resultado. Un screening permite determinar las variables experimentales y las interacciones que tienen una influencia significativa sobre el resultado [4].

En otras palabras, permite estimar lo más correctamente posible cual puede ser la influencia que tendrá la respuesta al cambiar independientemente alguno de los factores y también la influencia del cambio contemporáneo e independiente de dos o más factores [2], presentados en la (tabla 3):

Se realizaron cuatro réplicas para determinar el error experimental, simultáneamente se ejecutaron los experimentos según la planificación que se muestra en la matriz de diseño, obteniéndose las perlas de alginato sódico.

De cada experimento y réplicas se tomaron un total de 50 perlas para evaluar su granulometría y resistencia mecánica (Módulo de Hencky); así como también, se tomaron 15 perlas de cada experimento y replicas aumentando al peso del plato superior del plastómetro 200gr, 400gr y 500gr, para obtener la deformación de cada muestra.

Además se realizó la determinación de la humedad de los ocho experimentos y las cuatro réplicas a una temperatura de 40° C por 17 horas.

Al obtener la ecuación lineal a partir de los datos de granulometría y deformación se puede establecer la influencia de los factores y de sus interacciones siempre y cuando los coeficientes de los mismos sean mayores a la incertidumbre experimental (U).

La incertidumbre experimental (U) se obtiene a partir de las cuatro replicas realizadas en donde $\alpha=0.05$. Los experimentos en estos diseños están ubicados en las aristas de un cubo, esta estrategia muestra una vía eficiente para visualizar todo el dominio experimental con 3 factores [5, 6]. El diseño factorial permite obtener un polinomio lineal de variables puras e interacciones que representa la influencia de las mismas sobre una respuesta experimental [1].

Superficie de respuesta

A partir del diseño factorial realizado anteriormente se procede a elaborar un nuevo diseño de la matriz experimental con los puntos más relevantes definidos en el polinomio lineal para con ello explorar una nueva región experimental que permita encontrar el punto óptimo de operación para la obtención de las perlas de alginato de sodio.

Entonces, el nuevo diseño de la matriz experimental queda definido por las dos variables más relevantes, obtenidas en el diseño factorial X2 (velocidad de rotación) y X3 (concentración de alginato).

La construcción de la matriz del diseño se obtuvo a partir de un diseño factorial completo 2^k , agregando puntos sobre los ejes y al centro. Este diseño se compone de: n_0 puntos o repeticiones al centro del diseño y dos puntos sobre cada eje, a una distancia α del origen. Estos puntos se llaman porción axial.

Luego se ejecutaron los experimentos acorde a la matriz establecida anteriormente y nuevamente se tomaron un total de 50 perlas para evaluar su granulometría, resistencia mecánica (Módulo de Hencky) con un total de 60 muestras.

Estos datos se tabularon para obtener la media granulométrica de las perlas, coeficiente de variación, kurtosis, skewness y la pendiente de la deformación de las mismas.

Con estos resultados se determinó la función de deseabilidad y con las variables conjuntamente analizadas con la respuesta se obtuvieron los coeficientes de regresión que posteriormente comparados con los respectivos errores experimentales de cada variable indicaron la inexistencia de variables significativas ya que todos los coeficientes resultaron menores a los errores experimentales.

4.3 Atrapamiento de β -galactosidasa en las perlas de alginato

Materiales:

23 a 24gr. de perlas de alginato

2lt. de leche pasteurizada

1 olla grande de 8lt.

1 cocineta

1 tamiz

1 termómetro

Proceso:

1. Colocar la leche en la olla.
2. Subir la temperatura de la leche a 37° C. y mantenerla durante todo el proceso.
3. Colocar las perlas en la leche.
4. Colocar la cocineta bajo la olla
5. Adaptar nuevamente el agitador en la olla.
6. Mantener el agitador a una velocidad constante de 116 RPM
7. Dejar que las perlas en la leche por 7 horas y controlar la temperatura y la agitación.
8. Tamizar las perlas luego de transcurrido el tiempo.
9. Sacar una muestra

La enzima utilizada para este trabajo de tesis fue la ha-lactase de Chr. Hansen que es una combinación enzimática líquida translúcida de color castaño claro, compuesta de lactasa producida por fermentación submersa de cepas seleccionadas de *Kluyveromyces fragilis*, donde el componente activo es una beta-galactosidasa.

Esta enzima promueve la hidrólisis de la lactosa formando una mezcla de glucosa y galactosa, con la finalidad de proporcionar mejor solubilidad y digestibilidad evitando la tendencia a la cristalización de éste azúcar en el producto.

Las concentraciones de enzimas fueron fijadas en función del diseño experimental de exploración de la fase de hidrólisis de la lactosa. El diseño experimental a utilizarse en este estudio involucraron los siguientes factores: pH (fijado a 6.8 según Fosenca et. al.), temperatura, velocidad de agitación, tiempo de reacción, concentración de la B- galactosidasa atrapada.

Los cuatro factores que pueden variar fueron estudiados mediante diseño factorial completo 2^4 por un total de 16 experimentos a los cuales se añadieron 4 experimentos y cuatro replicas centrales para determinar el error experimental.

Con los factores significativos ($\alpha=0.05\%$) se procedió mediante técnicas combinadas de máxima gradiente y superficie de respuesta cuadrática de estrella, a determinar las condiciones óptimas para la hidrólisis de lactosa a glucosa y galactosa.

Para el proceso de hidrólisis se estudió los siguientes factores: temperatura (X1), tiempo de reacción (X2), velocidad de agitación (X3) y concentración de enzima (X4) a dos niveles. Se corrieron dieciséis experimentos, definidos en la matriz del diseño (Tabla 5).

Casi en todos los procedimientos experimentales, muchas variables influyen en el resultado. Un screening permite determinar las variables experimentales y las interacciones que tienen una influencia significativa sobre el resultado [4]. En otras palabras, permite estimar lo más correctamente posible cual puede ser la influencia que tendrá la respuesta al cambiar independientemente alguno de los factores y también la influencia del cambio contemporáneo e independiente de dos o más factores [2], (tabla 6)

Se realizaron cuatro réplicas para determinar el error experimental simultáneamente se ejecutaron los experimentos según la planificación que se muestra en la matriz de diseño.

Luego se procedió a determinar la cantidad de lactosa en cada una de las muestras tomadas al inicio, mitad y final del proceso de cada experimento para constatar la reducción del azúcar presente en la muestra de leche.

Con los datos obtenidos a partir de los análisis se establece la influencia de los factores y de sus interacciones con el programa estadístico Half Normal Plot en donde se observa que uno de los veinte experimentos presenta como respuesta el menor porcentaje de lactosa, con lo que se determina que dicho experimento bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental es el punto óptimo de operación.

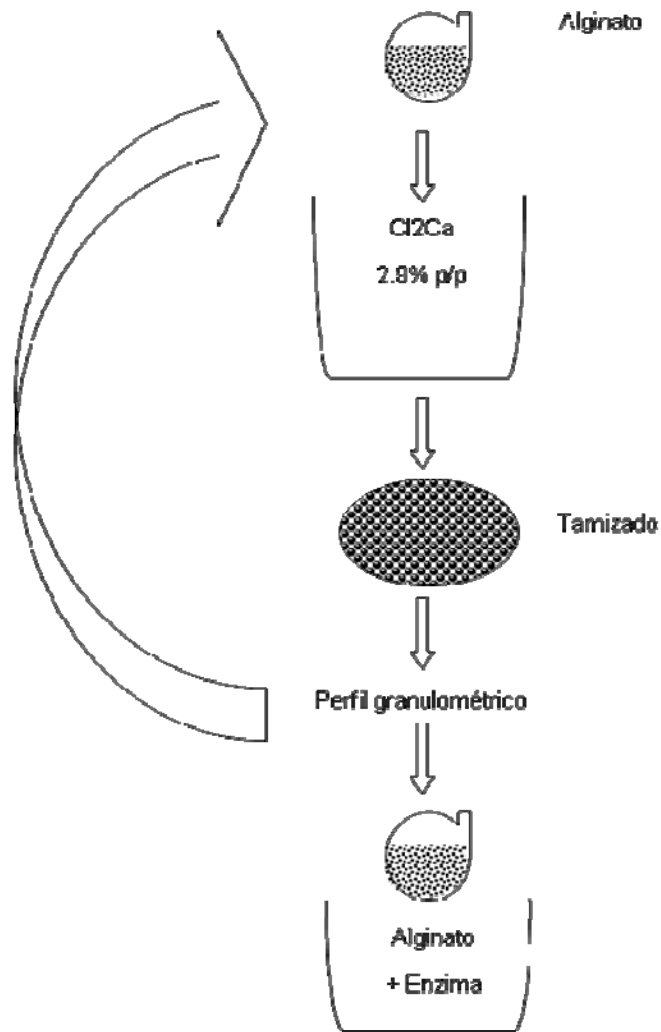


Fig. 18 Diagrama de β -galactosidasa en las perlas de alginato

4.4 Determinación de lactosa

Técnica para la determinación de Lactosa

Principio:

Disolver los azúcares de la leche en agua, hacer actuar la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que deja intacta la lactosa de manera que se pueda determinar el contenido en lactosa de la solución, para después de la floculación y filtración. El contenido en lactosa del filtrado se determina por el método de Luff-Schoorl.

Materiales:

1 pipeta de 2ml.
3 pipetas de 5ml.
3 Balones de aforo de 100ml.
2 ollas pequeñas.
Termómetro.
Cronómetro.
Cocineta.
6 Cartuchos de papel filtro de 10x10cm.
1 pipeta de 25 ml.
1 pipeta de 50ml.
3 Erlenmeyer.
3 balones de aforo de 250ml.
Trozos de piedra pómez.

Reactivos:**Reactivo según Luff – Schoorl**

- a. Disolver 25gr. de Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), para análisis libre de hierro en 100ml. de agua destilada.
- b. Disolver 50gr. De Acido cítrico para análisis ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), en 50ml. de agua destilada
- c. Disolver, en aproximadamente 300ml. de agua destilada caliente, 143.8gr. de Carbonato de sodio para análisis de anhídrido (Na_2CO_3).

Verter **b** en **c** (previo enfriamiento), agitar con cuidado, y añadir a continuación **a**. completar hasta 1000ml., dejar reposar por una noche y filtrar. Deben verificarse el pH del reactivo así obtenido debiendo estar en 10.

Solución Carrez I

- a. Disolver 23.8gr. de Sulfato de zinc, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 gr. de ácido acético glacial en agua destilada, y aforar a 100ml.

Solución Carrez II

- a. Disolver 10.6gr. de Ferrocianuro de potasio $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ en agua destilada y aforar a 100ml.

Suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*

- a. Disolver 25gr. de levadura fresca en 40ml de agua destilada y aforar a 100ml. tiempo de vida útil de la suspensión 5días en el frigorífico.

Procedimiento:

- 1) Pesar 5gr. de la muestra q se va analizar, e introducir la muestra en un balón de 100ml.
- 2) Añadir 30ml. de agua destilada. Llevar a baño maría hirviendo por 30 minutos.
- 3) Enfriar.
- 4) Seguidamente a dicho balón, añadir 5ml. de suspensión de levadura y agitar.
- 5) Llevar el balón a incubación, en baño María, a temperatura ambiente por un tiempo de 2 horas.
- 6) Tras la fermentación, añadir 5ml. de la solución de Carrez I, agitar por 30 segundos; añadir a continuación 5ml. de la solución de Carrez II, agitar nuevamente por 30 segundos más.
- 7) Aforar a 100ml. con agua destilada y homogenizar.
- 8) Filtrar la muestra.
- 9) Tomar con una pipeta de 50ml. del filtrado y colocar en un Erlenmeyer, al mismo que previamente se le debe adicionar 25ml. de la solución de Luff-Schoorl, agregar 5 fragmentos de piedra pómez (para evitar que la ebullición sea turbulenta).
- 10) Llevar a ebullición por 10 minutos, controlar el tiempo y observar el cambio de coloración.
- 11) Enfriar inmediatamente
- 12) Filtrar y aforar a 250ml.

13) Realizar la lectura en el espectrofotómetro a 736nm.

Crioscopía

Principio:

Con ésta técnica se determina el peso molecular y otras propiedades de una sustancia disuelta en un líquido observando el punto de congelación de esta disolución.

Materiales:

Crioscópico
Leche (1ml)
Papel absorbente
Agua destilada

Proceso:

- 1) Tomar un volumen pequeño de la muestra.
- 2) Colocar en los tubos para la medición.
- 3) Colocar en el soporte de tubos para iniciar la lectura.
- 4) Ejecutar enter, esperar la estabilidad.
- 5) Observar y tomar la medida.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato

Se han seleccionado las siguientes variables: (1) Concentración de cloruro de calcio, (2) Velocidad de rotación, (3) Concentración de alginato. Con estos factores se aplicó un diseño factorial completo a dos niveles. Los valores reales se presentan en la siguiente tabla.

Variables	Atributo	Unidad	Máximo (+1)	Mínimo (-1)
X1	Cl2Ca	%	3	1
X2	V. rotacion	rpm	1036	444
X3	Alginato	%	5	3

Tabla 1. Variables de proceso y condiciones experimentales.

El diseño factorial de 2^k se visualizo y estableció, la matriz del modelo experimental y el vector respuestas:

No	I	Variables			Interacciones			
		Cl2Ca	Vel. de rot.	Alginato	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3
		X1	X2	X3				
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
r1		0	0	0				
r2		0	0	0				
r3		0	0	0				
r4		0	0	0				

Tabla 2. Matriz experimental del modelo de screening

Evaluando los resultados mediante diferentes funciones: la media de las perlas, coeficiente de variación, skewness o asimetría, kurtosis o achatamiento y la pendiente de la deformación de la perlas.

No	Mediaperla	COFF.VAR	Skewness	Kurtosis	Pendiente perlas
1	0.42	0.09	0.85	1.037	2.6734
2	0.34	0.023	2.414	14.9	4.1989
3	0.412	0.054	1.4	1.148	2.2783
4	0.382	0.06	0.247	0.424	2.992
5	0.333	0.081	1.439	1.314	6.3488
6	0.362	0.058	0.487	0.583	2.2607
7	0.391	0.035	1.226	0.215	1.5678
8	0.372	0.048	-0.364	0.603	3.3523
r1	0.395	0.022	1.218	0.518	2.6277
r2	0.397	0.019	1.855	1.44	3.5307
r3	0.391	0.033	1.152	0.181	2.91
r4	0.388	0.042	0.901	0.854	3.8294

No	Desirability	Utility	Dominance	Concord. A	Concord. B	Abs.Ref.
1	0	0.38	0.237	0.364	0.184	0.798
2	0	0.243	0.132	0.182	0.161	0.421
3	0.446	0.508	0.303	0.588	0.226	0.696
4	0.612	0.673	0.518	0.602	0.489	0.527
5	0	0.284	0.061	0.187	0.159	1
6	0.647	0.669	0.549	0.809	0.429	0.561
7	0.739	0.773	0.574	0.805	0.623	0.393
8	0.65	0.737	0.54	0.77	0.592	0.455
r1	0.625	0.67	0.532	0.622	0.463	0.513
r2	0.452	0.568	0.259	0.582	0.398	0.532
r3	0.602	0.65	0.541	0.606	0.432	0.55
r4	0.523	0.612	0.401	0.756	0.379	0.576

Tabla 3. Datos tabulados

Las variables más influyentes fueron: la velocidad de rotación y la concentración de alginato de sodio, a partir de las inicialmente establecidas; sin embargo las interacciones no presentaron mayor importancia dentro de la experimentación, es por ello, que se excluyeron para el diseño factorial compuesto.

	I	Variables			Interacciones			
		X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3
COEF	0.38675	0.0905	0.225	0.12225	-0.07125	0.049	-0.0395	-0.11275

Tabla 4. Variables relevantes

Mediante la construcción de la matriz del diseño factorial compuesto, usando las variables mas importantes anteriormente descritas y la ejecución de los experimentos; se llevo a establecer el punto óptimo; es decir, se encontró la mejor combinación de los valores de los factores estudiados, considerando toda región de operabilidad, luego de analizar las respuestas obtenidas en la función de deseabilidad individual.

Exp	Variables		Intracciones			F. DES.
	X2 (v. rot)	X3 (alginato)	X2X3	X2X2	X3X3	
1	-1	-1	1	1	1	0.862
2	1	-1	-1	1	1	0.819
3	-1	1	-1	1	1	0.814
4	1	1	1	1	1	0.789
R1	0	0	0	0	0	0.804
R2	0	0	0	0	0	0.864
R3	0	0	0	0	0	0.81
R4	0	0	0	0	0	0.853
A1	-1.414	0	0	1.999	0	0.831
A2	0	-1.414	0	0	1.999	
A3	1.414	0	0	1.999	0	
A4	0	1.414	0	0	1.999	

Tabla 5. Matriz del diseño central compuesto

Posteriormente, las mejores condiciones de elaboración y obtención de las perlas de alginato de sodio, son aquellas en que las que, a menor velocidad de rotación y a menor concentración de alginato de sodio la función de deseabilidad es la óptima para que la resistencia y granulometría de las perlas de alginato sean las esperadas.

Aplicando regresión de mínimos cuadrados multivariante se determinan los coeficientes que definen el modelo completo de screening:

$$FD = 0.804 - 0.0104X_1 - 0.006X_2 + 0.0045X_1X_2 + 0.0226X_1^2 + 0.036X_2^2$$

Derivando el modelo cuadrático respecto a las dos variables independientes y luego igualando a cero las ecuaciones se obtuvo las coordenadas de pto. Máximo (0.22; 0.07) y reemplazando estos valores en la ecuación cuadrática se alcanzó el valor máximo de la función de deseabilidad.

A partir de ello, se estableció las condiciones favorables para la elaboración y estandarización de las perlas de alginato, siendo las siguientes:

Variables	Atributo	Unidad	Valores
X1	Cl2Ca	%	2
X2	V. rotacion	rpm	1036
X3	Alginato	%	5

Tabla 6. Producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato

Atrapamiento de la enzima en las perlas de alginato

Inicialmente se procedió a la elaboración de la curva de calibración (con el programa estadístico de Cal Tode), fig. 18. A partir de un a leche deslactosada a la que se le adicionó diferentes cantidades de lactosa partiendo desde 0.6% hasta alcanzar el 4.6% de lactosa.

Data			
ID	Level Leche deslact.	X	Y
		Lactosa %	Absorvancia nm
1	1	0.6	0.283
2	2	1.6	0.245
3	3	2.6	0.149
4	4	3.6	0.137
5	5	4.6	0.104

Tabla 7. Valores para la curva de calibración.

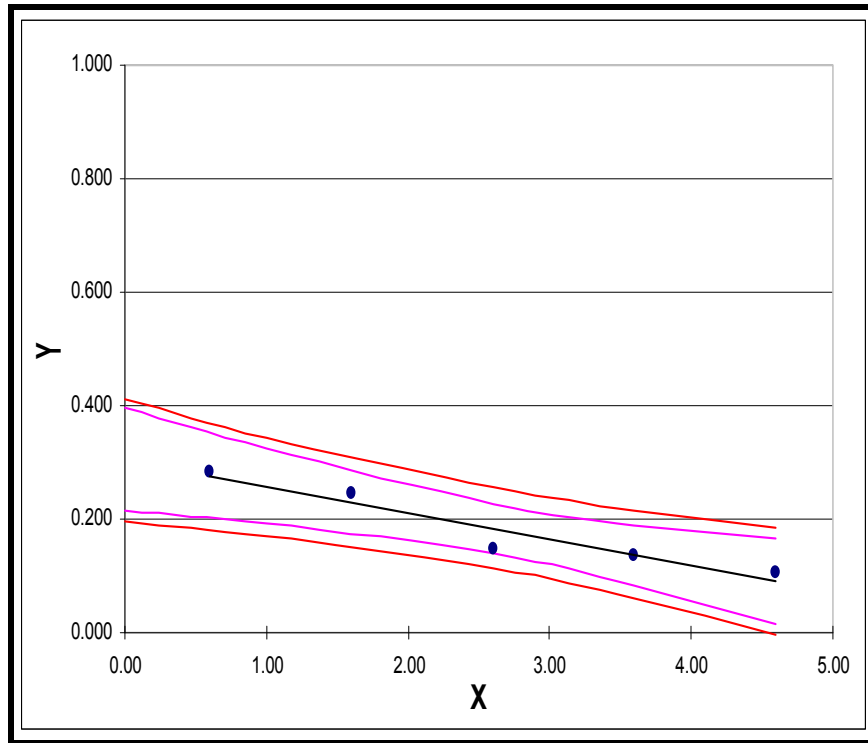


Fig. 19. Curva de calibración de lactosa

Para ésta etapa del proceso, se han seleccionado las siguientes variables: (1) temperatura de reacción, (2) tiempo de reacción, (3) velocidad de agitación, (4) cantidad de enzima.

Nuevamente con estos factores se aplicó un diseño factorial completo a dos niveles. Los valores reales se presentan en la siguiente tabla:

Variable	Atributo	Unidad	Máximo (+1)	Mínimo (-1)
X1	Temperatura	°C	40	20
X2	Tiempo de reaccion	horas	7	1
X3	Velocidad de agitación	rpm	444	148
X4	Concentracion de enzima	%	9.6	4.4

Tabla 8. Variables de proceso y condiciones experimentales.

El diseño factorial de 2^k se visualizó y estableció, la matriz del modelo experimental y el vector respuestas:

No	I	Variables				Interacciones										
		temp	tiempo	rotac	enzima	X1X2	X1X3	X1X4	X2X3	X2X4	X3X4	X1X2X3	X1X3X4	X1X2X4	X2X3X4	X1X2X3X4
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
5	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1
12	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
13	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
14	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
15	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
r1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9. Matriz experimental del modelo de screening

A continuación, se introducen los valores obtenidos a partir del análisis de los experimentos en el programa mencionado anteriormente para determinar la cantidad porcentual de lactosa en cada una de las muestras analizadas, en donde se compara con el valor estandarizado con la normativa mexicana (NMX-F-026-1997) (1% - 0.85% mínimo).

% lactosa	
No	Respuesta
1	4.394
2	3.321
3	3.514
4	3.257
5	3.235
6	2.613
7	1.905
8	1.068
9	2.978
10	3.686
11	3.171
12	1.003
13	2.827
14	3.321
15	2.184
16	2.012
r1	3.643
r2	3.342
r3	3.428
r4	3.321

Tabla 10. Valores de lactosa residual

La función de dominancia representa la respuesta experimental, de esta manera queda establecida la matriz del modelo experimental y el vector respuestas:

No	temp tiempo rotac enzima																% lactosa
	l	X1	X2	X3	X4	X1X2	X1X3	X1X4	X2X3	X2X4	X3X4	X1X2X3	X1X3X4	X1X2X4	X2X3X4	X1X2X3X4	
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	4.394
2	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	3.321
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	3.514
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	3.257
5	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3.235
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	2.613
7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1.905
8	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1.068
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	2.978
10	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	3.686
11	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	3.171
12	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1.003
13	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	2.827
14	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	3.321
15	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.184
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.012
r1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.643
r2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.342
r3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.428
r4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.321

Tabla 11. Respuestas del porcentaje de lactosa (función de dominancia)

Entre las variables relevantes están: el tiempo de hidrólisis (b2) y la velocidad de rotación (b3) y la interacción entre la velocidad de rotación y la concentración de enzima. (b34)

	Variables								Interacciones							
	b0	b1	b2	b3	b4	b12	b13	b14	b23	b24	b34	b123	b134	b124	b234	b1234
Coef	2,78053	-0,245	-0,5164	-0,385	-0,1328	-0,184	0,1033	0,1033	-0,087	-0,039	0,3232	0,07377	0,11937	-0,25885	0,15424	0,202521

Tabla 12. Variables relevantes

La significatividad de los coeficientes de las variables se ha determinado mediante el método gráfico probabilístico del Half-Normal Plot

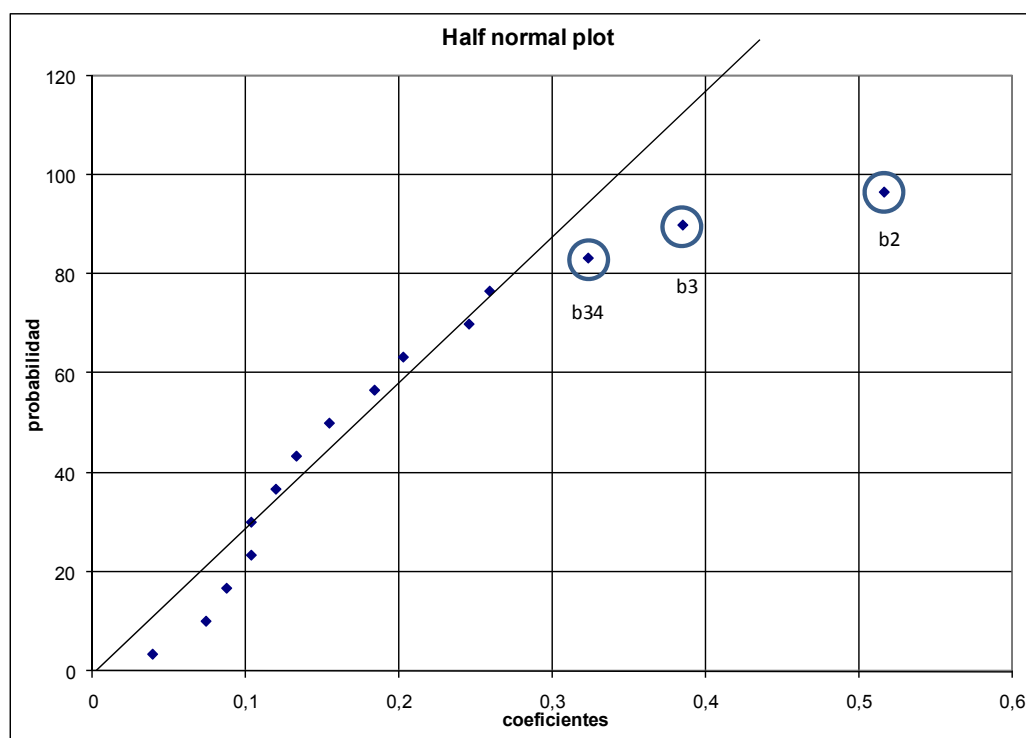


Figura 20. Half Normal-Plot de los coeficientes de regresión

De la gráfica anterior se establece que los coeficientes relevantes corresponden a los de las variables puras, tiempo de hidrólisis, velocidad de rotación. El coeficiente de la interacción que se destaca es la velocidad de rotación y la concentración de enzima, pues su distribución dentro de la curva indica que es muy próximo al ruido experimental.

El polinomio reducido de screening resulta:

$$F. D. = 2,78053 + 0,516X1 + 0,385 X2 + 0,323X3$$

Siendo el experimento que presenta las condiciones óptimas el **Experimento12**.

Definiendo las siguientes:

Variable	Atributo	Unidad	Valores
X1	Temperatura	°C	37
X2	Tiempo de reaccion	horas	7
X3	Velocidad de agitacion	rpm	148
X4	Concentracion de enzima	%	9.6

Tabla 13. Condiciones óptimas de experimentación en el proceso de hidrólisis

N° experimento	Yobs	Xcalc
12	0.258	1.003

Tabla 14. Valores de absorbancia y porcentaje de lactosa residual en el experimento óptimo.

N° Experimento	Temperatura
12	°C
Leche inicial	-0.5152
Leche mitad del proceso	-0.5679
Leche al final del proceso	-0.6063

Tabla 15. Valores obtenidos en el análisis crioscópico de lactosa.

CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este proyecto de tesis se estableció para la producción y estandarización del tamaño de las perlas de alginato como variables de estudio la concentración de cloruro de calcio, la velocidad de rotación y la concentración de alginato de sodio y que, mediante la elaboración de la matriz experimental y el análisis de las medidas de dispersión, la media granulométrica y la pendiente de la deformación, nos permitieron establecer las variables más influyentes del proceso que son: la velocidad de rotación y la concentración de alginato de sodio.

Con las dos variables relevantes, diseño factorial compuesto y función de deseabilidad se estableció el punto óptimo para la producción de las perlas de alginato, resultando que tanto la menor concentración de alginato de sodio y la menor velocidad de rotación son las mejores condiciones de elaboración y obtención de las perlas de alginato.

Mediante regresión de mínimos cuadrados multivariante se definió el modelo completo de screening dando como resultado la ecuación de la función de deseabilidad:

$$FD = 0.804 - 0.0104X_1 - 0.006X_2 + 0.0045X_1X_2 + 0.0226X_1^2 + 0.036X_2^2$$

Luego de derivar este modelo, obtuvimos las coordenadas X_1 y X_2 del punto óptimo que son (0.22 ; 0.07) respectivamente; con éste resultado se procede a determinar el valor máximo de la función de deseabilidad que corresponde a las siguientes condiciones:

- Concentración de cloruro de calcio al 2%.
- Velocidad de rotación 1036rpm.
- Concentración de alginato de sodio al 5%.

Para la etapa final del proceso, es decir, el atrapamiento de la enzima en las perlas de alginato, se definieron como variables de estudio: la temperatura de reacción, la velocidad de agitación y la cantidad de enzima. Mediante la curva de calibración de la lactosa y aplicando los datos obtenidos de su análisis, se logró determinar que

las condiciones favorables para el atrapamiento de la enzima en las perlas de alginato que son:

- Temperatura de 37°C.
- Tiempo de reacción de 7 horas.
- Velocidad de agitación equivalente a 148rpm.
- Concentración de enzima de 9,6ml/ lt.

Finalmente, bajo éstas condiciones, el valor de lactosa residual es del 1,003%; que se encuentra dentro de los parámetros establecidos en normas internacionales para la obtención de leche entera deslactosada.

BIBLIOGRAFIA**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BRAVERMAN, J.B.S. “Introducción a la bioquímica de los alimentos”. México, D.F. Editorial El manual moderno S.A. 1980

BADUI DERGAL, Salvador. “Química de alimentos”. México, D.F. Longman de México Editores. S.A. De C.V.1993. **[14]**

CARLSON, R. “Design and optimization in organic synthesis”. Amsterdam. Netherlands. Elsevier Science Publishers B.V. 1992. **[6]**

COURSE NOTES OF SPIROS N. Agathos. Universite Catholique de Louvain. “How Cells Grow Review of Bioprocess Kinetics”. Belgium. 1990

DERRINGER, G. “A balancing act: optimizing a product’s properties”. Nueva York. Editorial McGraw-Hill/ Interamericana Editores, S.A. de C.V. 1990

HARRINGTON, E. C. Jr. “The desirability function”. Industrial quality control. Michigan. Editorial American Society for Quality Control. 1949.**[19]**

LEWIS, G.A., Mathieu, D., and Phan-Tan-Luu, R. “Pharmaceutical experimental design”. New York . Editorial Marcel Dekker. Inc.1999. **[1]**

LUNDSTEDT, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J. and Bergman, R. “Experimental design and optimization”. Chemometric. Intel. Lab. Syst. Amsterdam. Netherlands. Editorial Elsevier Science Publishers B.V. 1998. **[4]**

MARENGO, E. “Ottimizzazione di processo e pianificazione sperimentale”. Italia. Editorial Talete S.r.l. 1994. **[2]**

MASSART, D.L., Vandeginste, B.G.M. and Buydens, L.M.C. “Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A”. Amsterdam. Netherlands. Editorial Elsevier Science Publishers B.V. 1997 **[5]**

PAVAN, M. “Total and partial ranking methods in chemical sciences”, Ph.D. thesis in chemical sciences. Italy. Editorial Talete S.r.l. 2003. [7]

PULIDO, Gutiérrez Humberto. Salazar de la Vara Román. “Análisis y diseño de experimentos”. México. McGraw-Hill/ Interamericana editores. S.A de C.V. 2004 [20]

TODESCHINI, R. “Introduzione alla chemiometria”. Italia. Editorial S.r.l. Napoli. 1998. [3]

REFERENCIAS ELECTRÓNICOS

ARROYO, Miguel Dr. “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid 28040. España. 1998. [en línea]. Disponible en Internet: <www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>. (visitado el 12 de febrero del 2009).

COMUNIDADES EUROPEAS. “Reglamento de las comunidades europeas”. España. 1988. [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=1988/80063>. (visitado el 26 de abril del 2009).

DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. “Leche. Denominación. Especificaciones comerciales y métodos de prueba”. NMX-F-026-1997. México. 1997. [en línea] Disponible en Internet: <<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-026-1997.PDF>>. (visitado el 27 de abril del 2009).

FERNANDEZ, Fernando Martín. “Principios básicos sobre nutrición y salud”. México. 2006 [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guianutr/enzimas.htm>>. (visitado el 20 de enero del 2009). [15]

GÓMEZ DÍAZ, D., Navaza J. M. “Caracterización Reológica de dispersiones agua-alginato sódico con aplicación en la Industria Alimentaria”. Ciencia y Tecnología Alimentaria. México. 1985 [en línea]. Disponible en Internet: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=72430507>> ISSN 1135-8122>. (visitado el 4 de mayo del 2009).

GONZÁLEZ MAÑAS, Juan Manuel. “Curso de Biomoléculas”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco”. España. 1990 [en línea]. Disponible en Internet:

<<http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#e>>.

(visitado el 16 de febrero del 2009).

JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, “A Method for Rapid Determination of Lactose”. Arizona. 1978. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/61/4/506.pdf>>. (visitado el 29 de mayo del 2008). [11]

LIBRO VIRTUAL. “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones.” España. 1998. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>> . (visitado el 3 de mayo del 2008). [9]

QUÍMICA, “INTRODUCCIÓN AL DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS”. España. 1998. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.quimica.urv.es/quimio>>. (visitado el 10 de mayo del 2008). [12]

QUÍMICA, “INTRODUCCIÓN EL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 2^k”. España. 1998. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.quimica.urv.es/quimio>>. (visitado el 12 de mayo del 2008). [13]

UNIVERSIDAD DE CHILE, “Enzimas inmovilizadas.” Chile. 2002. [en línea]. Disponible en Internet: <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/sc_hmidth02/parte04/02.html>. (visitado el 29 de abril del 2008). [10]

UNIVERSIDAD LA SALLE, “Caracterización Cinética de la Hidrólisis de Lactosa utilizando β -galactosidasa libre e inmovilizada por atrapamiento”. Colombia. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.lasalle.edu.co/investigaciones/inves2001.htm>>. (visitado el 6 de mayo del 2008). [8]

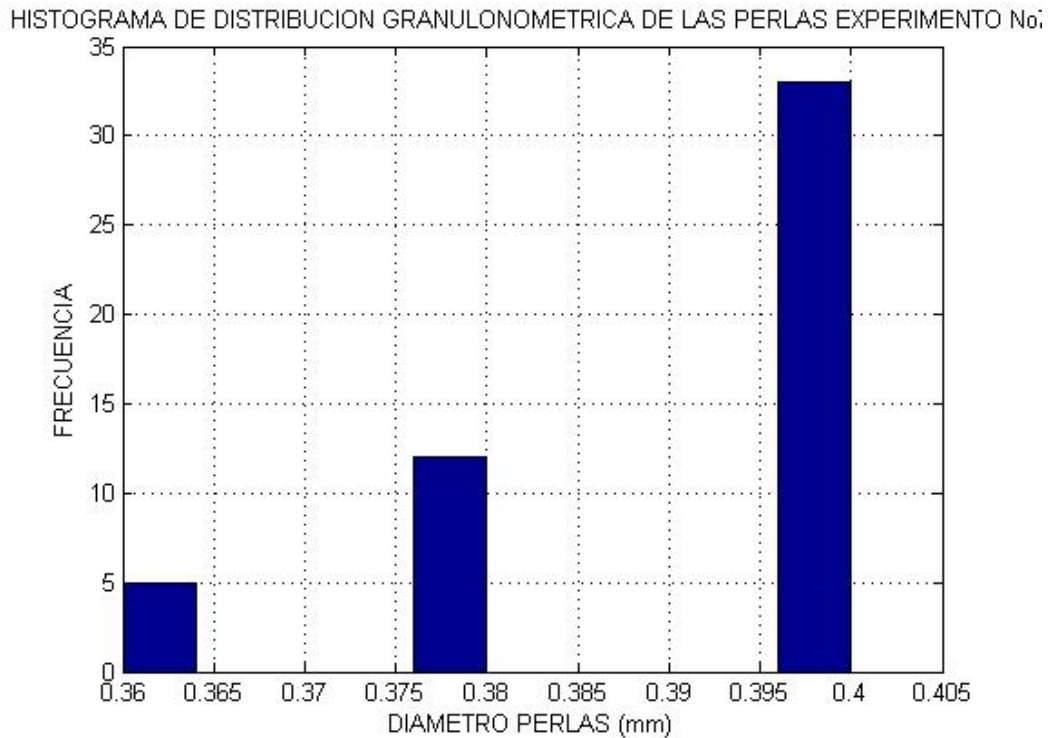
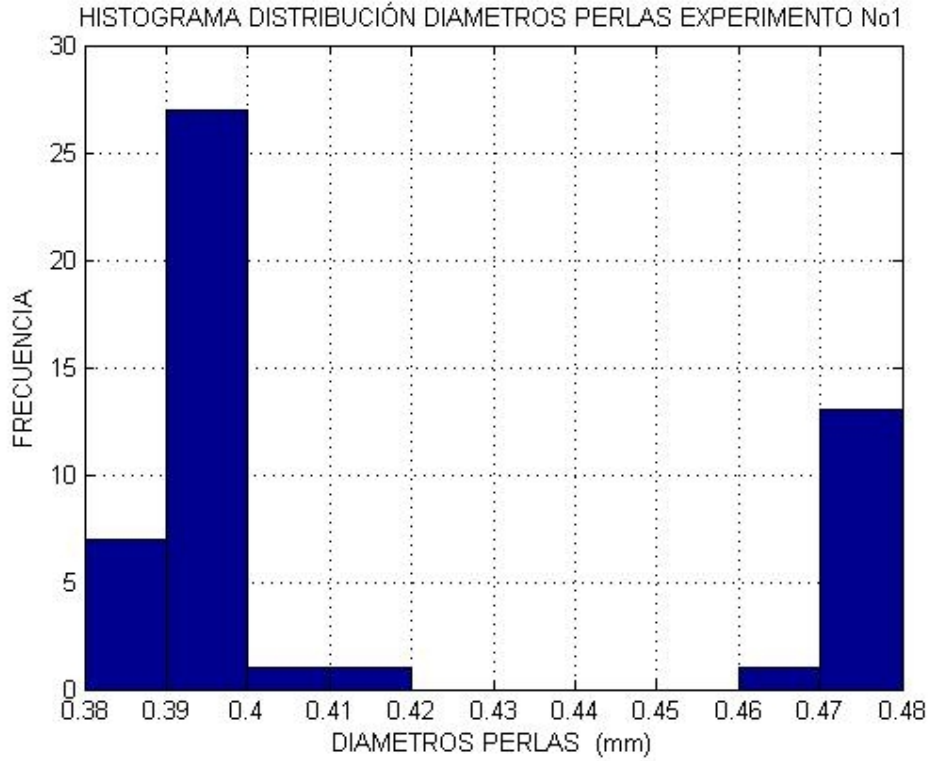
UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO, “Ingeniería de la Reacción Química”. España. 1998. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/00004i.htm>>. (visitado el 4 de mayo del 2009). [16]

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA, Facultad de Agronomía, “Enzimas”. Colombia. 2008. [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.fagro.edu.uy/~bioquimica/docencia/guias/Tema__3_Enzimas.pdf>. (visitado el 4 de febrero del 2009) [18]

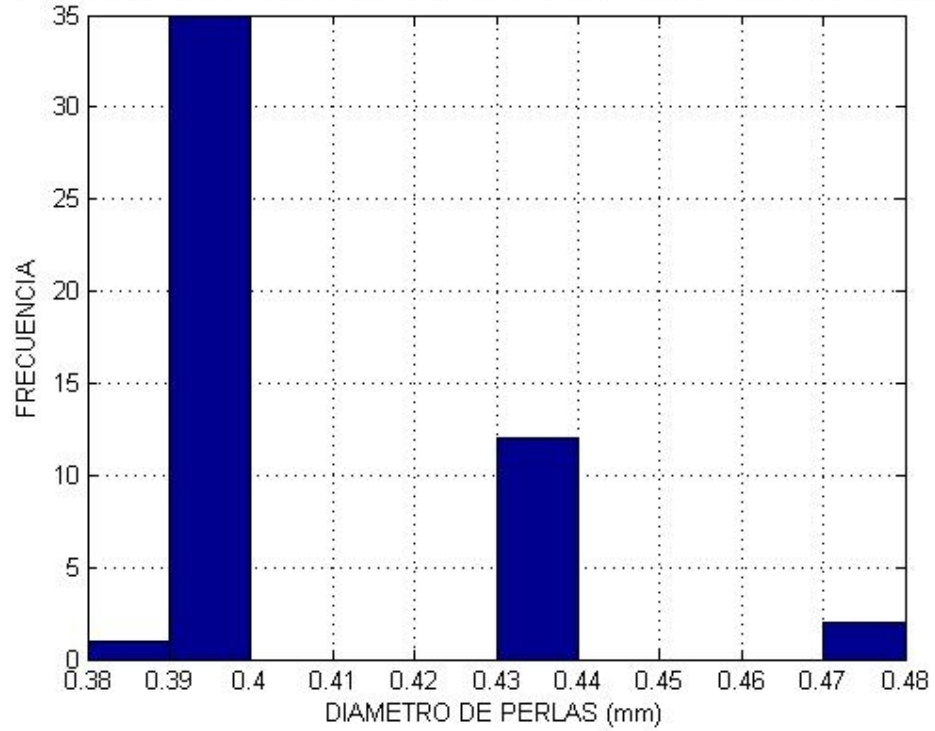
VÁZQUEZ CONTRERAS, Edgar Dr. “Bioquímica y Biología molecular en línea”. México. 2003. [en línea]. Disponible en Internet: <<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html>> (visitado el 4 de febrero del 2009) [17]

ANEXOS

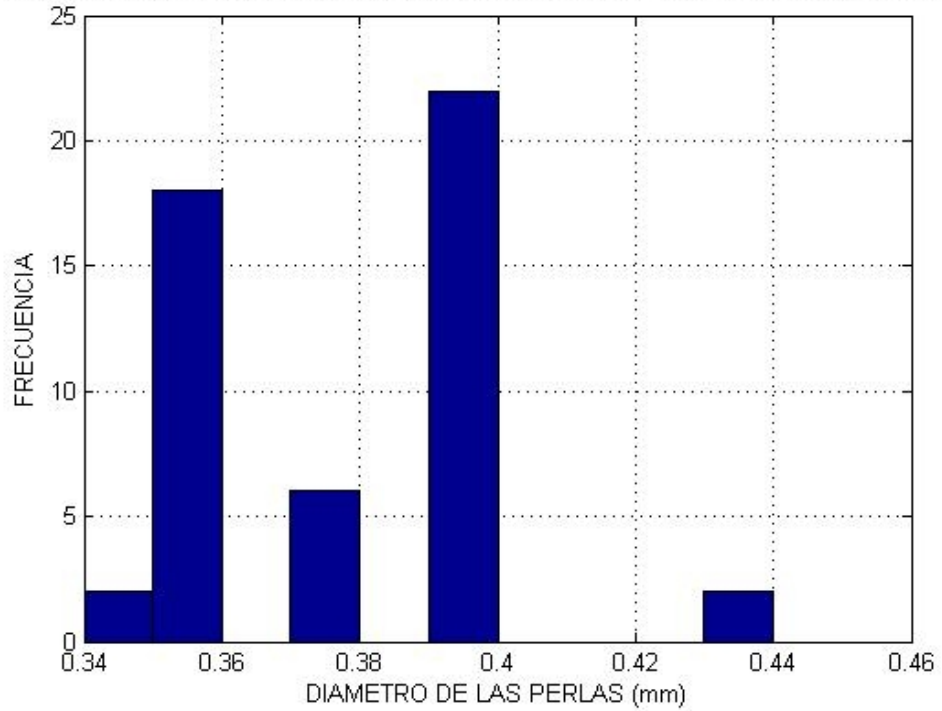
HISTOGRAMAS



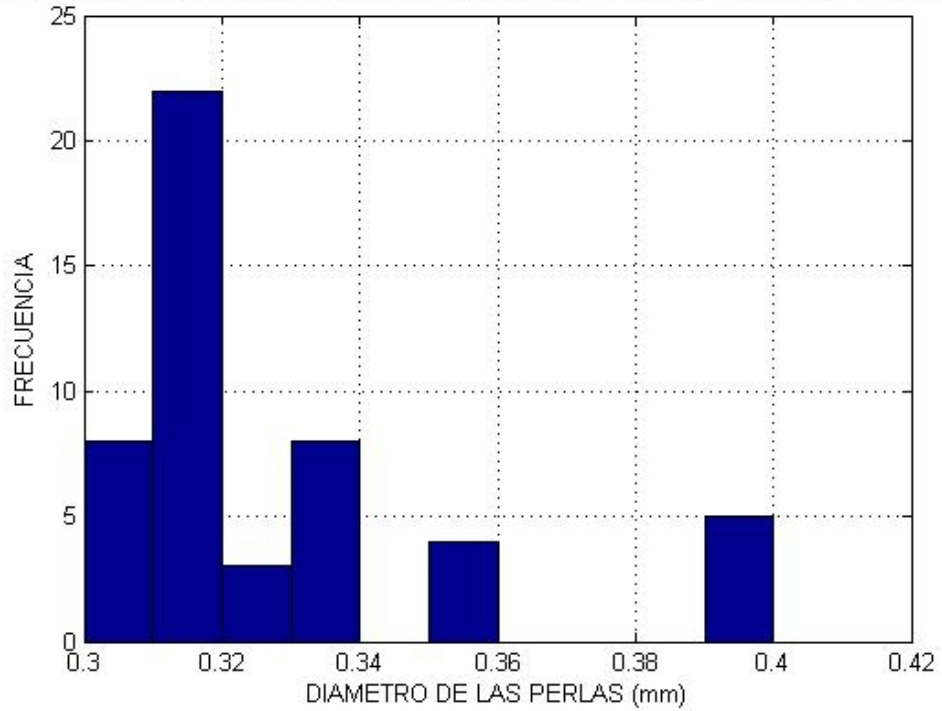
HISTOGRAMA DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS EXPERIMENTO No3



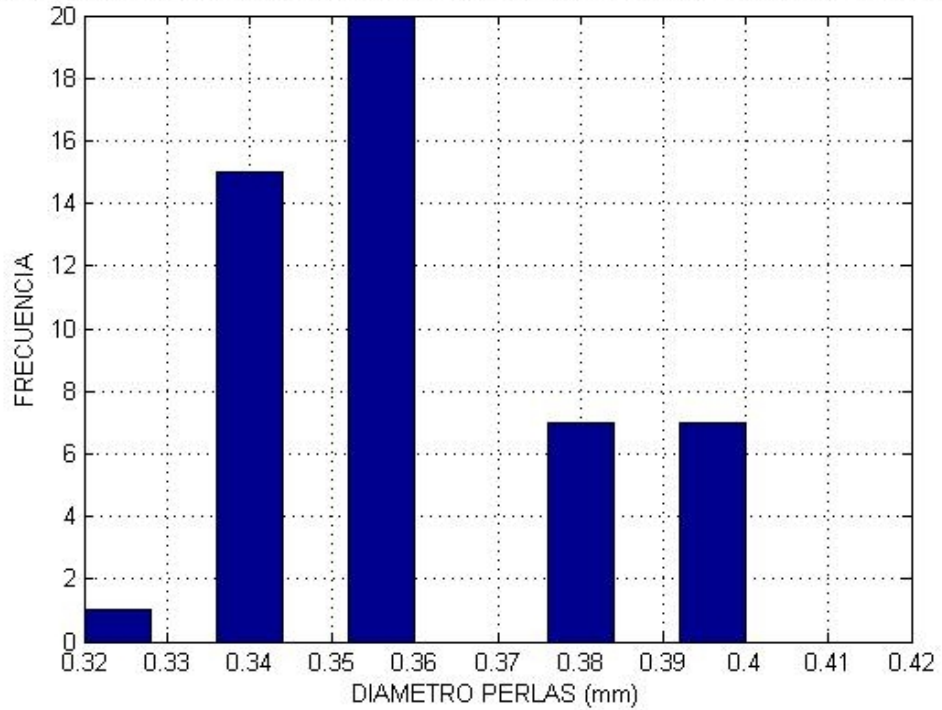
HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE PERLAS EXPERIMENTO No4



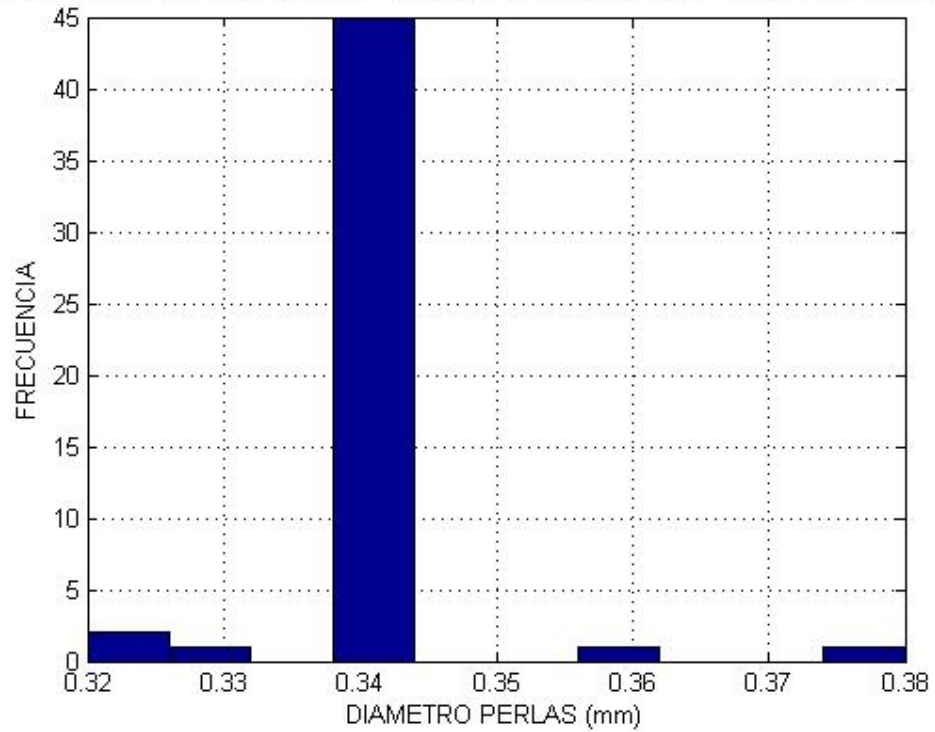
HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS EXPERIMENTO No5



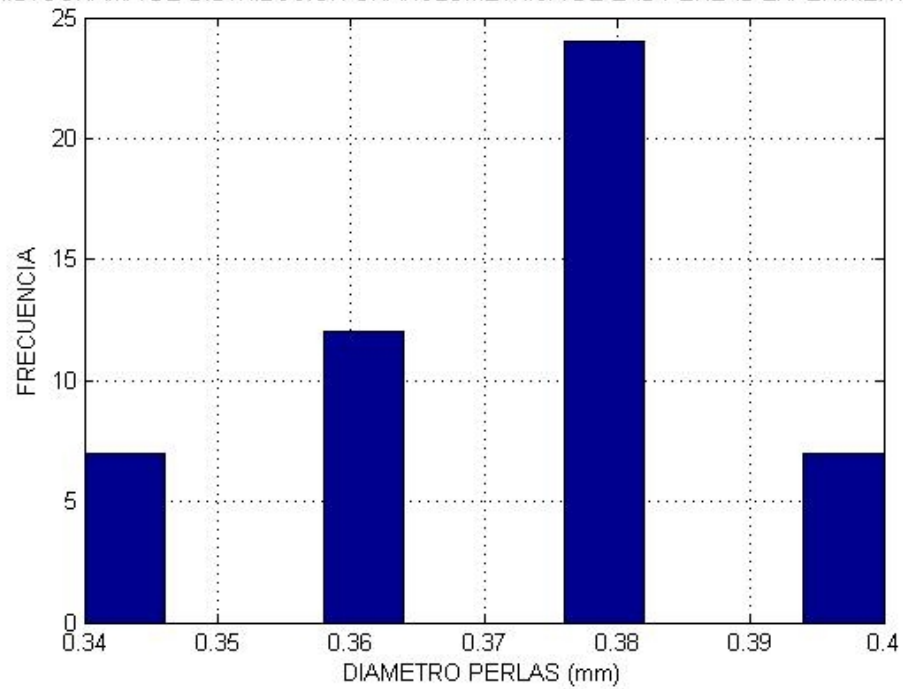
HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS EXPERIMENTO No6



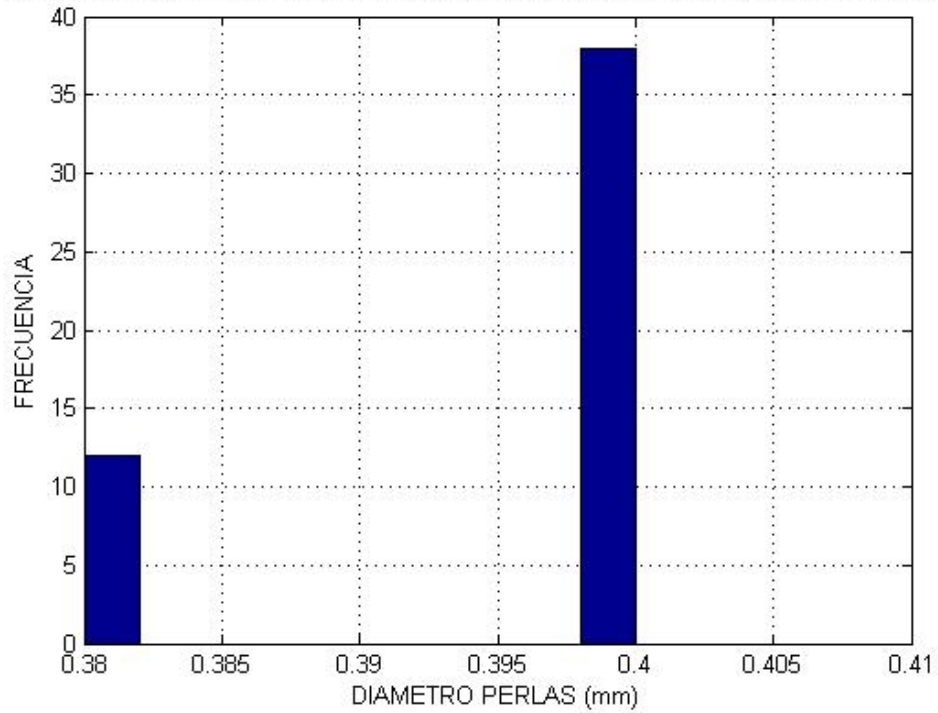
HISTOGRAMA DE LA DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS EXPERIMENTO N



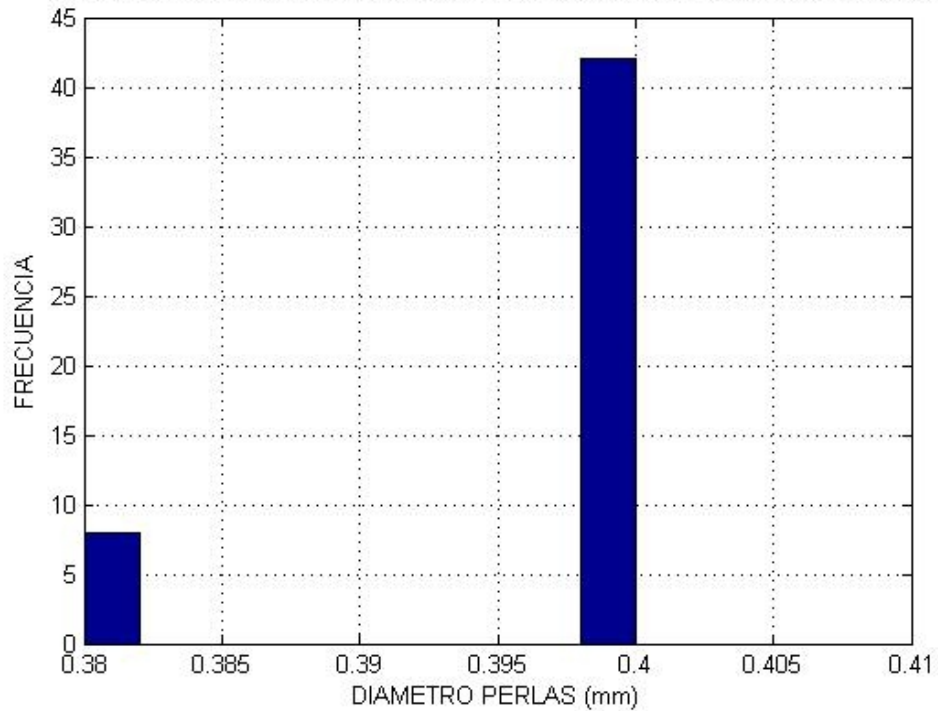
HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS EXPERIMENTO No8

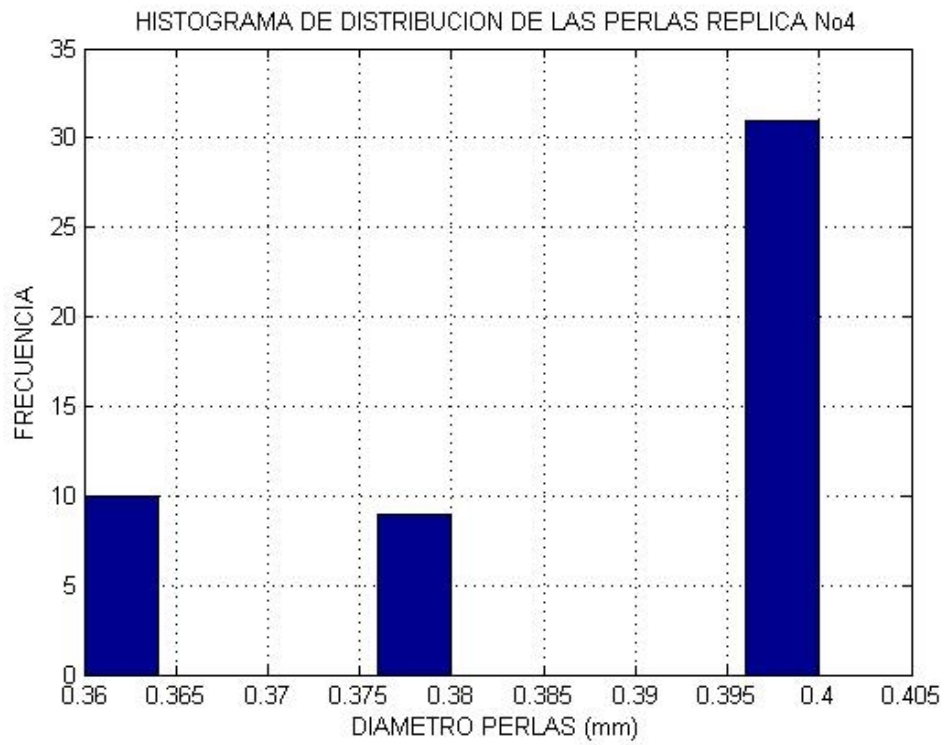
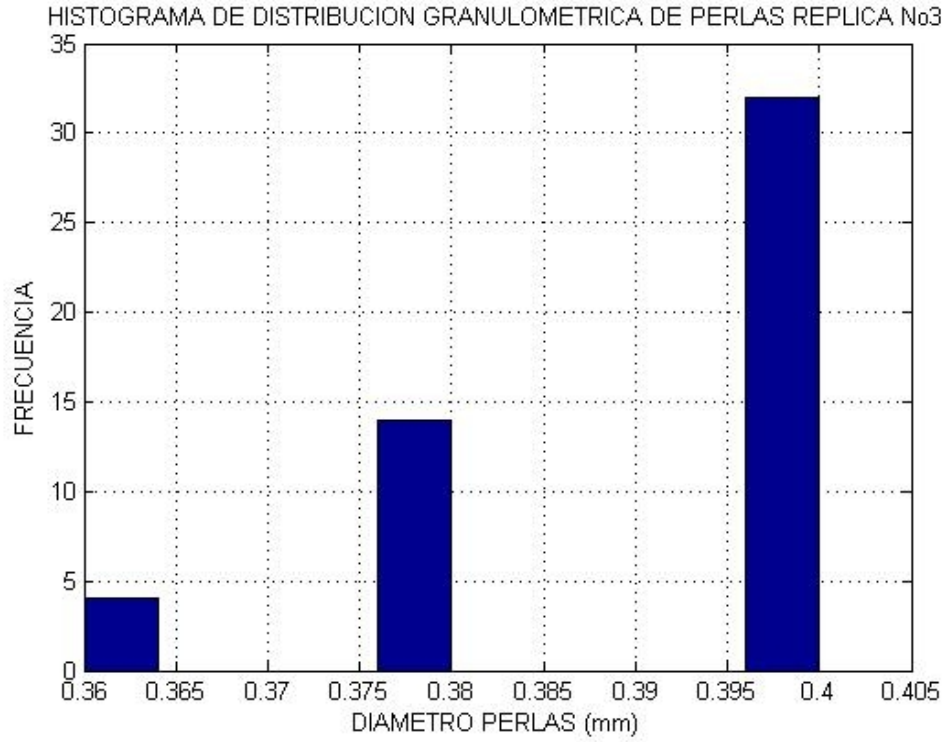


HISTOGRAMA DE LA DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE LAS PERLAS REPLICA No1



HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION GRANULOMETRICA DE PERLAS REPLICA No2





FOTOGRAFIAS:



Fotografía 1. Preparación de solución alginato de sodio.



Fotografía 2. Proceso de preparación de las perlas de alginato.



Fotografía 3. Reactor discontinuo.



Fotografía 3. Perlas de alginato.



Fotografía 4. Experimentos de prueba.



Fotografía 5. Experimentos iniciales.



Fotografía 6. Réplicas de los experimentos



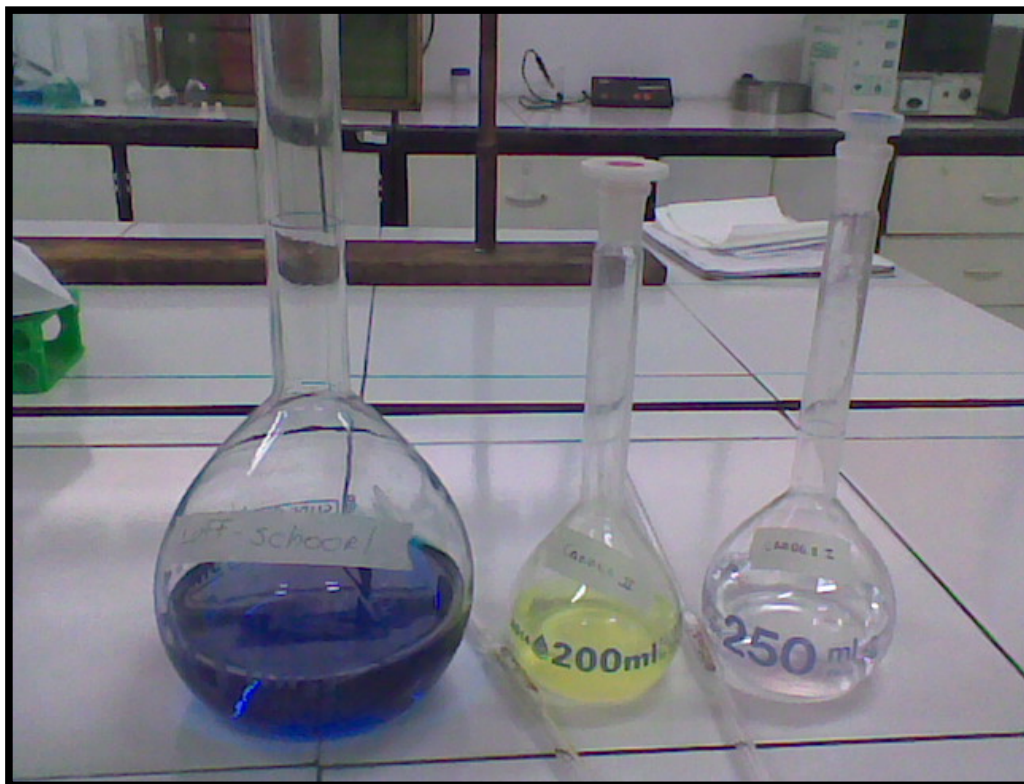
Fotografía 7. Plastómetro.



Fotografía 8. Punto óptimo



Fotografía 9. Levadura



Fotografía 10. Reactivos: Luff-Schoorl, Carrez 1, Carrez 2.



Fotografía 11. Patrones de la curva de calibración de lactosa.



Fotografía 12 -13. Experimentos.



Fotografía 14. Espectofotómetro.



Fotografía 15. Inmovilización de enzima.



Fotografía 16. Crioscopio.