

Caracterización e inmovilización de pectinasa comercial

Characterization and immobilization of a comercial pectinase

Luisa Fernanda Matta-Flórez*, Laura S. Torres-Valenzuela**, Johanna A. Serna-Jiménez**

*Ingeniera Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad La Gran Colombia Grupo de Investigación para el desarrollo Agroindustrial (GIDA)

**Magister en Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad La Gran Colombia, Grupo de Investigación para el desarrollo Agroindustrial (GIDA) torresvallaura@miugca.edu.co, Colombia

***Magister en Diseño y Gestión de Procesos, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad La Gran Colombia, Grupo de Investigación para el desarrollo Agroindustrial (GIDA) . sernajimjohanna@miugca.edu.co, Colombia

Resumen

A través de los avances de la biotecnología se han estudiado las enzimas, las cuales pueden acelerar procesos químicos generando así ahorro de tiempo, dinero y esfuerzo a nivel productivo. En el presente trabajo, se caracterizó una pectinasa comercial y a su vez se evaluó la encapsulación por atrapamiento en alginato. El método de inmovilización por alginato de sodio al 2% donde se atrapó la enzima en pequeñas cápsulas; para evaluar la variación de azúcares reductores por método DNS que es un indicador del rompimiento de los enlaces glucosídicos, lo cual es fundamental en la clarificación de jugos o vinos. La inmovilización por medio de alginato de sodio generó un aumento en los azúcares reductores de la matriz alimentaria. Estos resultados permiten la utilización y la incorporación de la enzima a diversos procesos e industrias como la de clarificación.

Palabras clave: Alginato de sodio, clarificación, enzimas, maltodextrinas, microencapsulación.

Abstract

Through the advances of biotechnology, enzymes have been studied which can accelerate chemical processes, thus saving time, money and effort at a productive level. In the present work, a commercial pectinase was characterized and encapsulation was evaluated by entrapment in alginate. The method of immobilization by 2% sodium alginate where the enzyme was trapped in small capsules; to evaluate the variation of reducing sugars

Recibido: 04/02/2018
Revisado: 16/05/2018
Aceptado: 10/12/2018

Correspondencia de autor:
sernajimjohanna@miugca.edu.co

© 2018 Universidad La Gran Colombia. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

Cómo citar:

Matta-Flórez., L.F., Torres-Valenzuela, L.S., Serna-Jiménez. (2018) Caracterización e inmovilización de pectinasa comercial. *UGCiencia* 23, 40-52.



by DNS method that is an indicator of the breakdown of glycosidic bonds, which is fundamental in the clarification of juices or wines. The immobilization by means of sodium alginate generated an increase in the reducing sugars of the food matrix. These results allow the use and incorporation of the enzyme to various processes and industries such as clarification.

Key words: Sodium alginate, microencapsulation, clarification, enzymes, maltodextrin.

Introducción

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances, entre ellos, aplicados a la industria alimentaria (Rincón, 2007). Dentro de este campo, están las enzimas que, actualmente, son objeto de estudio debido a su alta eficiencia en diferentes procesos. En la actualidad, en el mercado hay diferentes tipos de enzimas empleadas en los procesos de obtención de pulpas de frutas como las pectinasas, las cuales brindan mayores ventajas, ya que permiten estandarizar las condiciones en los procesos, aumentar rendimientos, disminuir costos y mejorar características fisicoquímicas y sensoriales de los productos (Beltrán Gómez, Fonseca y Guerrero, 2007).

El conocimiento de las funciones y las utilidades de las enzimas para conseguir cambios deseables en los alimentos, ha conducido a la producción en gran escala de enzimas comerciales, estas pueden surgir de fuentes animales, vegetales o microbianas (Beltrán Gómez, Fonseca y Guerrero, 2007).

Enzimas como las pectinasas poseen varias aplicaciones en diversas industrias. El uso más antiguo y hoy más difundido es la optimización de procesos de filtración y clarificación de jugos. Por ejemplo, el tratamiento de los jugos de fruta con pectinasas evita su gelificación en la fase de concentración del jugo; también la adición de esa enzima a frutas maceradas ayuda a la extracción de jugo (Rincón, 2007).

Como catalizadores, las enzimas actúan en pequeñas cantidades y se recuperan indefinidamente, estas no llevan a cabo reacciones energéticamente desfavorables, no modifican el sentido de los equilibrios químicos, pero sí aceleran su ejecución haciéndolas instantáneas (Bermúdez Molina, 2005).

Los factores que afectan o modifican la velocidad de una reacción enzimática son la concentración de enzima y de sustrato, el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores; por esta razón, se busca proteger la enzima generalmente por medio de encapsulación y hacer más fácil su manipulación (por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros) (López Córdoba, 2012).

La encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa; esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas. (Huertas Parra, 2010). Con lo anterior, se evidencia la importancia de proteger las enzimas de factores medioambientales que preserven su actividad, para esto existen alternativas como la encapsulación. Las técnicas de encapsulación pueden ser divididas en dos grupos: químicos donde se encuentra la gelificación iónica y mecánicos ubicándose el secado por atomización (Huertas Parra, 2010).

Al realizar investigaciones sobre cómo proteger enzimas de factores externos, se está brindando una alternativa a las industrias que las emplean para sus procesos ya que se presenta como una solución viable para su incorporación sin afectar las propiedades de la misma. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar e inmovilizar una pectinasa comercial.

Materiales y métodos

El desarrollo de la investigación fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia

donde los resultados fueron analizados por medio del Software *Statgraphics® centurion XVI*.

La enzima utilizada fue una pectinasa marca Pectinex® Ultra SP-L obtenida de Novozymes (Dinamarca) proveniente de una cepa de *Aspergillus aculeatus*. Como sustrato se utilizó pectina cítrica comercial, obtenida de un mercado local, este se mantuvo a temperatura ambiente en un lugar seco y sin exposición directa al sol. Para la caracterización de la enzima, se cuantificó el contenido de proteína y azúcares reductores los cuales fueron evaluados por técnicas espectrofotométricas (Espectrofotómetro Thermo Scientific™ Genesys, USA), donde la proteína se efectuó por el método de Biuret, empleando albúmina de suero bovino (Merck, Alemania) para estandarizar la curva patrón y la cuantificación de azúcares se realizó por el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), (Miller, 1959) empleando glucosa (Panreac, España) para realizar la curva patrón. Por otro lado, para determinar la actividad enzimática de la pectinasa se utilizó el protocolo reportado por Arias Vargas y Ríos Alzate (2002) con algunas modificaciones. Las variables a evaluar fueron el efecto del tiempo, temperatura y concentración de enzima.

La pectina se activó a temperatura de ebullición, una vez activa, se procedió a adicionar la enzima. Pasado el tiempo de reacción, se procedió a medir el contenido de proteína, azúcares reductores por el método DNS y la enzima libre a 235 nm, ya que como lo reporta Alzate & Vargas (2002) a esta longitud de onda los enlaces glucosídicos tienen su máxima absorbancia.

Inmovilización con alginato de sodio

Para la encapsulación con alginato de sodio (Panreac, España), se siguió la metodología reportada por Lupo Pasin (2014) con algunas modificaciones; se preparó una solución de alginato de sodio al 2% la cual fue llevada a calentamiento hasta homogenización en baño termostático (Mettler, Alemania), una vez enfriada la solución se añadió la enzima al 20% y se agitó hasta homogenizar. Posteriormente se cargó la solución en una jeringa

de 5 mL y se dejó caer gota a gota en una solución 0,1M de cloruro de calcio (Merck, Alemania) esta solución permaneció en reposo hasta que las cápsulas estuvieran completamente sólidas; una vez pasado este tiempo se procedió a recuperar las cápsulas con un tamiz para posterior cuantificación de diámetro de las partículas utilizando microscopía óptica (Software Único ScopePhoto versión 3.1) y contenido de proteína (Biuret).

Los datos fueron analizados mediante Anova. Se empleó el Software *Statgraphics® centurion XVI*. Además, el procedimiento empleado para discriminar entre las medias fue el de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Seguimiento de la actividad enzimática

Se realizaron ensayos en continuo donde se adecuó el sistema de inmovilización de 3 maneras diferentes para evaluar la variación de los azúcares reductores a través del tiempo.

El primer ensayo fue lecho empacado sin tratamiento que se realizó en una columna de cromatografía (ensayo A) la cual se ubicó en un soporte universal. Se ocupó la tercera parte de la columna con cápsulas de alginato previamente preparadas y luego se vertió dentro 15 mL de sustrato a temperatura ambiente (22°C); cantidad que garantizaba cubrir en su totalidad las cápsulas. Se tomaron muestras abriendo el paso de la columna y dejando caer parte de la muestra en una caja de Petri ubicada debajo del montaje; estas se tomaron cada 5 minutos por una hora (iniciando en tiempo 0), a las cuales se les midió azúcares reductores por el método DNS.

Para el segundo ensayo, el cual fue lecho empacado en agitación, se tomaron las mismas cantidades de sustrato y material del ensayo anterior y esta vez se depositaron en un *beaker* (ensayo B); la muestra se sometió a agitación constante a 200 rpm a temperatura ambiente (22°C ± 1) de igual manera, se extrajo parte de muestra en los intervalos del ensayo anterior para determinación de azúcares reductores.

El tercer y último ensayo, el cual fue lecho empacado a 50°C se realizó de igual manera con las cantidades de los ensayos anteriores; en este la muestra se ubicó en tubos de ensayo los cuales se llevaron al baño termostático a 50°C (ensayo C) todo el tiempo de toma de muestras; ya que a esta temperatura se reporta como óptima para la actividad de la enzima.

Con el fin de definir el efecto del tratamiento enzimático, se realizó un ensayo donde se midieron los azúcares reductores (como parámetro) del sustrato utilizado a lo largo del trabajo (pectina cítrica) antes de la reacción y después de hacerlo. Por medio del protocolo de DNS reportado con anterioridad, se realizó esta prueba a una muestra de sustrato sin la adición de enzima (libre) y posteriormente a una muestra de sustrato con la adición de enzima libre (la cual permaneció por 1 hora en contacto), asimismo, se realizó una tercera toma de muestra del sustrato con la adición de enzima encapsulada, la cual permaneció en contacto el mismo tiempo que el ensayo anterior. De esta manera se realizó dicha comparación para evaluar en qué proporción varió la actividad enzimática del encapsulado.

Resultados y discusión

Con el fin de medir los datos iniciales de la pectinasa en cuanto a proteína por el método Biuret y azúcares reductores por el método DNS se obtuvieron los siguientes valores, los cuales pueden variar dependiendo de la fuente de obtención de la enzima como diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Belén S., 2008).

Tabla 1. Parámetros de la enzima

Enzima	Proteína mg/mL (Biuret)	Azúcares Reductores mg/mL
Pectinasa	0,863	8,853

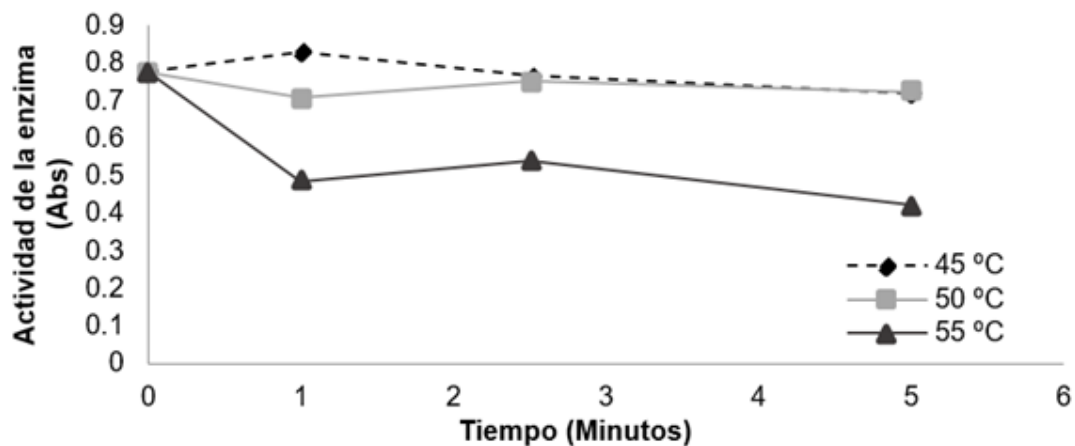
Fuente: los autores

Caracterización de la enzima pectinasa

La variación de la actividad catalítica de la pectinasa se evaluó a dos concentraciones diferentes y 3 temperaturas midiendo las muestras a una absorbancia de 235nm con el fin de observar la respuesta de la enzima frente a la temperatura y la concentración de enzima, para lo anterior se tomó como referencia del trabajo Arias Vargas & Ríos Alzate (2002) donde se empleó el coctel enzimático Naturalzyme® 200 XL proveniente de una cepa de *Aspergillus niger* compuesto principalmente de pectinasa y en grado menor celulasa. A continuación, se muestran los resultados de la reacción.

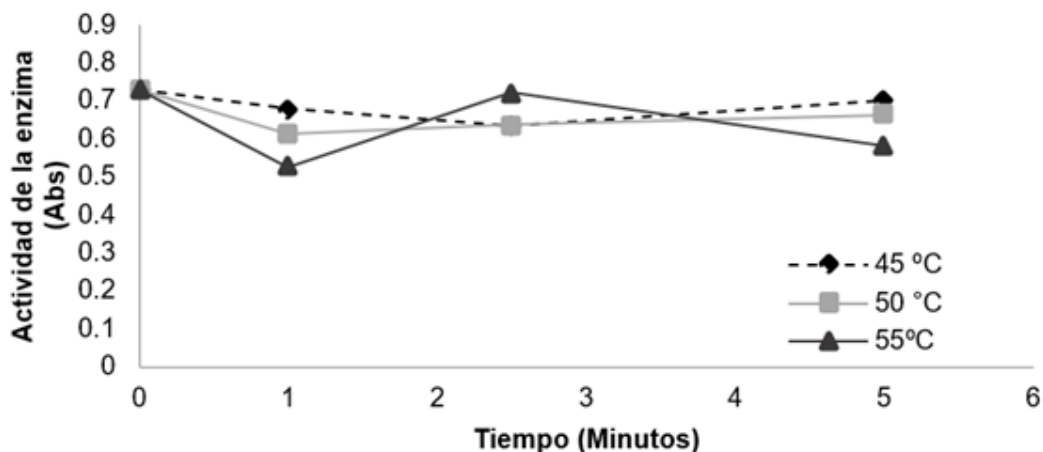
En la gráfica 1 se puede observar cómo la reacción alcanza su pico entre todos los demás valores a 45°C en 1 minuto con una absorbancia de 0,83, sin embargo se observa que a los 2,5 minutos las líneas se tornan paralelas para las temperaturas de 45 y 50°C lo cual significa que la enzima posee su mejor desempeño entre estas temperaturas, lo anterior coincide entre los intervalos reportados por Arias Vargas & Ríos Alzate, (2002) que concluyeron que para su pectinasa la cual fue aislada de una cepa de *Aspergillus niger*

Gráfica 1. Actividad enzimática a través del tiempo con 0,5% de pectinasa.



el desempeño óptimo fue a 37°C y en Ladero Galán, (1999) donde explican que las enzimas aisladas de hongos son funcionales hasta 60°C encontrándose la temperatura del presente trabajo entre los intervalos mencionados. Sin embargo, por medio de la base de datos Brenda, (*The comprehensive enzyme information system*) se obtuvo que el rango de temperatura de la enzima se encuentra entre 30 -80 °C siendo 60°C su temperatura óptima. A continuación, se muestran los datos obtenidos a concentración de pectinasa al 1%.

Gráfica 2. Actividad enzimática a través del tiempo con 1% de pectinasa



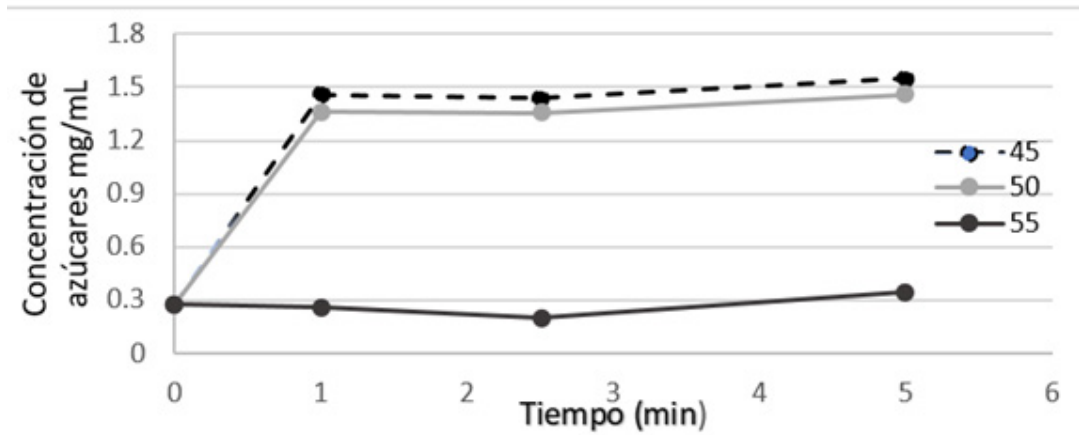
Fuente: los autores

Como se observa con anterioridad en las temperaturas de 45-50°C se evidencia un aumento en los azúcares casi paralelo. Sin embargo, el punto máximo se observa a los 2,5 minutos con la temperatura de 55°C donde su absorbancia fue 0,72 dato que es incluso más bajo que la absorbancia inicial la cual fue de 0,73 lo que indica que no hubo un incremento en los azúcares.

Se observa que ningún punto obtenido entre las 3 temperaturas a la concentración actual (1,0% de enzima) sobrepasa el resultado inicial, lo que quiere decir que a esta concentración no se obtienen los resultados esperados. Esta caída de la velocidad de reacción se debe probablemente a la disminución significativa de la concentración de sustrato, aunque también pueden influir otros factores como menciona Tena & Jorrín (2008) donde su práctica tuvo como finalidad realizar estudios de cinética enzimática, allí se consideran una serie de factores típicos que condicionan claramente la actividad de las enzimas como lo son el aumento de la concentración de producto, cambios de pH, inactivación del enzima. Por otro lado, con respecto a las concentraciones de enzima se evidencia que no se requiere una mayor proporción a 0,5% sobre el sustrato para que aumente la concentración de los azúcares reductores.

Continuando con la caracterización de la enzima, se procedió a realizar una comparación del comportamiento de los azúcares reductores del sustrato empleando concentración de enzima de 0,5% (gráfica 3) frente a 1% de concentración (gráfica 5). Para esto, se emplearon las mismas proporciones de enzima y temperatura del ensayo anterior:

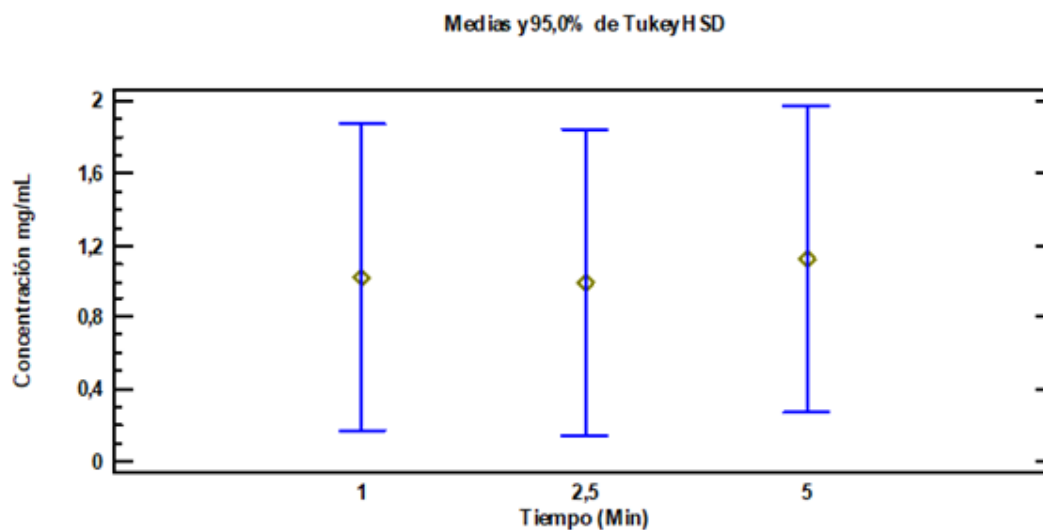
Gráfica.3 Comportamiento de los azúcares del sustrato empleando concentración de enzima de 0,5%



Fuente: los autores

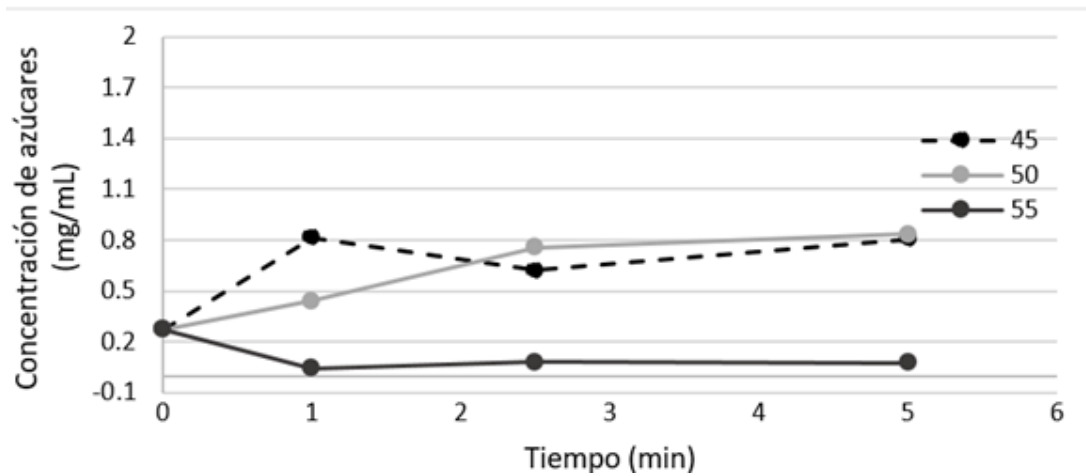
Analizando la gráfica 3, se aprecia un aumento representativo de los azúcares reductores desde el tiempo inicial al primer minuto donde aparentemente se hidrolizan la mayor parte de los azúcares, a excepción de la curva de temperatura de 55°C donde esta estructura por el contrario permaneció casi inerte. También se evidencia que la presencia de azúcares reductores es ligeramente mayor a una temperatura de 45°C sobre la de 50°C; lo cual significa que el rango óptimo para la enzima se encuentra entre estos intervalos, ya que, al parecer, a mayor temperatura su actividad decrece evidentemente; en el trabajo reportado por Arias Vargas & Ríos Alzate, (2002) la temperatura óptima para su pectinasa fue de 37°C la cual es cercana a la obtenida en el presente trabajo. Esto se ratifica en lo reportado por Ladero Galán, (1999) ya que, explica que las enzimas son estables a ciertas temperaturas dependiendo de su procedencia, por ejemplo, en el caso de enzimas provenientes de hongos estas suelen ser estables hasta 60°C (siendo el caso de la enzima actual), las de bacterias hasta 50°C y las de levaduras hasta 40- 45°C; lo cual indica que el intervalo de temperatura óptimo obtenido de los ensayos se encuentra dentro del rango especificado. Con respecto a la variable tiempo, no se aprecia ningún tipo de efecto en el presente ensayo (gráfica 4) (con un valor $P= 0,9746$) como se muestra en la gráfica, ya que entre las 3 temperaturas su variación es mínima.

Gráfica 4. Medias entre concentración y tiempo para 0,5% de enzima



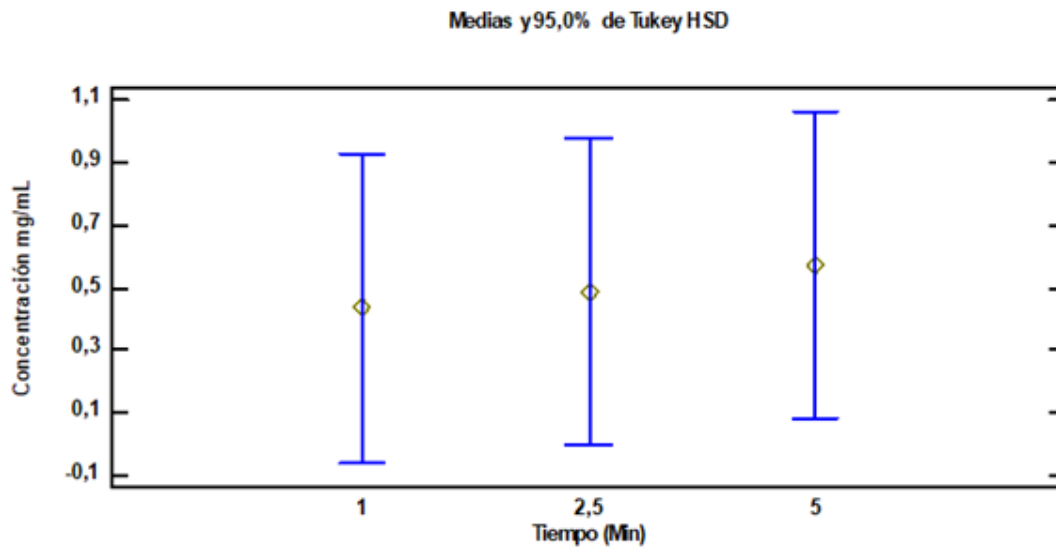
Fuente: los autores

Gráfica 5. Comportamiento de los azúcares reductores del sustrato empleando concentración de enzima de 1%



Fuente: los autores

Gráfica 6. Medias entre concentración y tiempo para 1% de enzima



Fuente: los autores

Comparando así los resultados entre las concentraciones de enzima (0,5 y 1,0 %) y las temperaturas establecidas (45, 50 y 55°C) se encontró que la concentración óptima fue de 0,5%, como se puede apreciar en la gráfica 3, ya que a pesar de haber hecho el mismo ensayo variando solamente las concentraciones de

enzima, el ensayo de concentración a 1% no obtuvo los resultados esperados como a concentración de 0,5%. Por otro lado, se confirmó que el rango de temperatura óptimo de la enzima utilizada en este trabajo fue entre 45 y 50°C. En el trabajo realizado por Arias Vargas y Ríos Álzate, (2002) quienes estudiaron con pectinasas, se encontró que este rango de temperatura estaba cerca a los 37 °C, de igual manera en el mismo trabajo, se tomó un espectro de temperatura más amplio lo cual pudo indicar mejor este resultado.

Frente a la variable tiempo no se aprecia una diferencia significativa para este caso (gráfica 6) (Valor P= 0,9106). En la gráfica 5 se puede apreciar un incremento de azúcares constantemente en la curva de 50°C conforme aumenta el tiempo de interacción entre la enzima y el sustrato, sin embargo, los resultados siguen estando por debajo que los del ensayo de 0,5% de enzima, lo cual significa que a esta última concentración, los azúcares reductores del sustrato presentan un mejor comportamiento. Esto se explica en el trabajo de Arias Vargas y Ríos Álzate, (2002) donde mencionan que, en un proceso de inmovilización, la retención de la actividad catalítica es más importante que la misma cantidad de proteína inmovilizada; ya que, se compararon actividades enzimáticas de proteínas inmovilizadas resultando que en mayor proporción de proteína, la actividad no era tan alta como en los ensayos de menor proporción de proteína, lo cual es el mismo resultado del presente trabajo, esto debido a la aparición de “efectos estéricos” como consecuencia de algunas moléculas las cuales son inmovilizadas en una posición relativa a la superficie del soporte, teniendo como consecuencia que el sitio activo resulta relativamente inaccesible a las moléculas de sustrato.

Inmovilización con alginato de sodio

Para obtener la comparación del contenido de proteína de la enzima libre frente a la inmovilizada se hace necesario la liberación del contenido. Para este ensayo se escogió degradar el material de pared mediante el rompimiento de las cápsulas, así, se llevaron a un mortero para liberar su contenido.

Inmediatamente después de la preparación de las cápsulas, se realizó la toma de la muestra mediante el rompimiento de las mismas como se mencionó para acortar en lo posible el tiempo de liberación de la enzima al medio, ya que las cápsulas al ser preparadas, se mantuvieron en la solución de cloruro de calcio para evitar su deshidratación. El resultado de proteína de la enzima libre frente a la inmovilizada se muestra a continuación (tabla 2).

Tabla 2. Proteína de enzima libre vs inmovilizada

Enzima pectinasa	Proteína en mg/mL (Biuret)
Libre	0,863 ±0,017
Inmovilizada	0,064 ± 0,001

Fuente: los autores

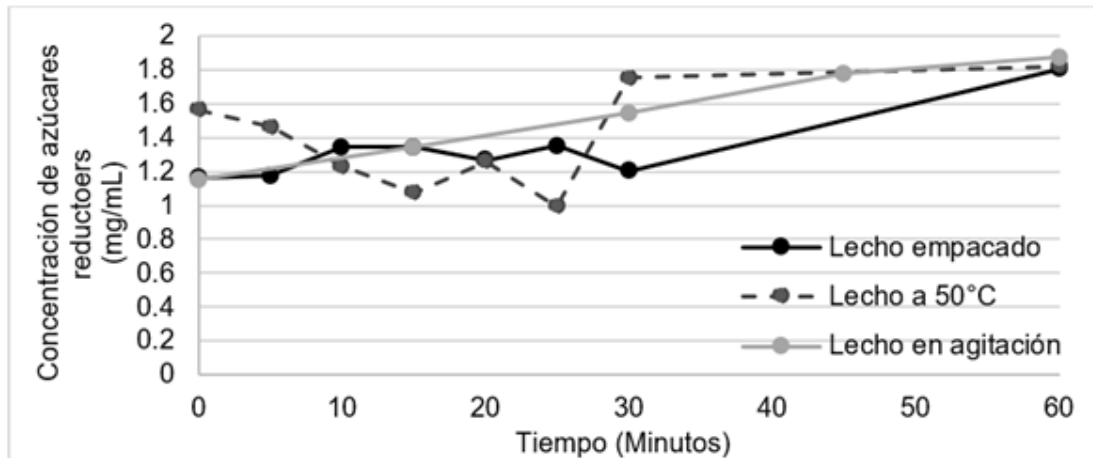
Con los datos anteriores, se evidencia que la enzima inmovilizada frente a la enzima libre disminuye su contenido de proteína en aproximadamente 93% (tabla 4). Pueden haberse presentado varios factores que generaran pérdida, entre ellos el uso de una matriz polimérica simple. En el estudio de Anjani, (2007) se emplearon cápsulas con cocteles enzimáticos para la maduración de quesos donde se ensayaron con diferentes matrices poliméricas, el resultado a este estudio fue una baja eficiencia de encapsulación en los ensayos de matrices, sin embargo, al adicionar quitosano siendo una modificación de la quitina (Polímero ampliamente encontrado en la naturaleza) al baño de calcio, se evidenció un aumento significativo en la retención de las enzimas.

Seguimiento de la actividad enzimática

Como se mencionó se realizaron mediciones por medio de 3 ensayos diferentes (A, B y C por duplicado) para evaluar cuál de ellos genera un

mayor aumento de azúcares reductores del sustrato a una concentración de 0,5% de enzima encapsulada, ya que a este valor se obtuvieron mejores resultados como se explicó, a continuación los resultados de los montajes (gráfica 7).

Gráfica 7. A: Lecho empacado a temperatura ambiente sin agitación, línea punteada. Tratamiento B: Lecho empacado con agitación a 200 RPM en beaker a temperatura ambiente, línea continua oscura. Tratamiento C: Lecho empacado a 50 grados en tubos de ensayo sin agitación, línea gris.

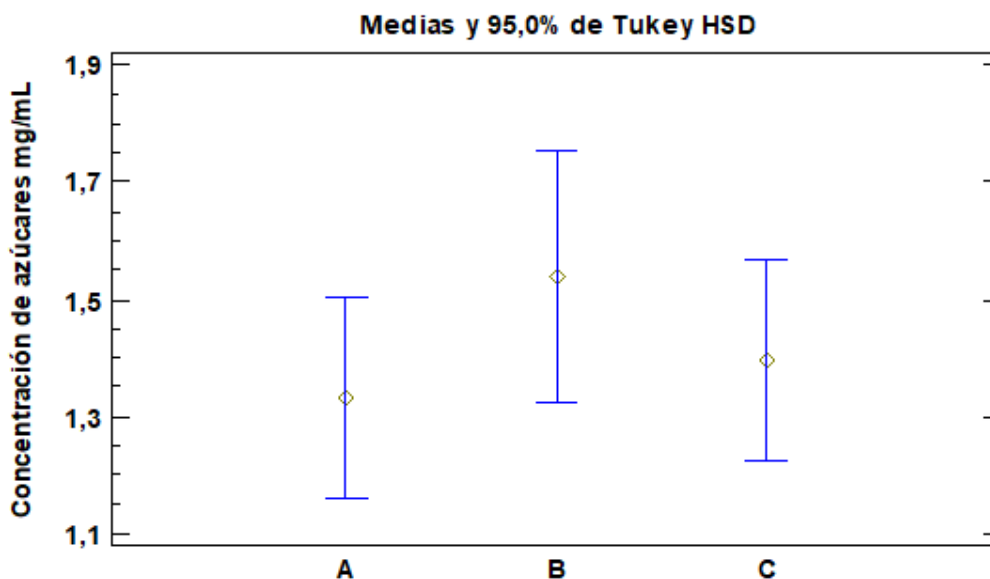


Fuente: los autores

Analizando los resultados anteriores, donde se aprecia un mayor incremento de azúcares reductores en su punto final es en el método de agitación a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) (Ensayo B) iniciando a una concentración de 1,15mg/mL y finalizando en 1,87 mg/mL de azúcares reductores, aumentando así 0,72 mg/mL sus azúcares. Sin embargo, a pesar de las variaciones que se pueden apreciar en la gráfica a través del proceso en los 3 ensayos (A, B y C), el punto máximo que se obtuvo en el menor tiempo posible entre los 3 ensayos, se observa en lecho empacado a 50°C (Ensayo C), sin embargo, al darse ese incremento, se aprecia posteriormente una tendencia de linealidad en los resultados dando a entender según esto, que no se siguió presentando desdoblamiento en su estructura. El incremento que se logró sin agitación y/o temperatura fue el mismo obtenido en el lecho empacado a 50°C en la mitad de su tiempo dando a entender que la aplicación de este factor tiene una gran relevancia para el ensayo.

Posteriormente, se compararon los resultados de los 3 ensayos (A, B y C) para saber cuál fue el más representativo en cuanto a la variación de azúcares reductores y cuanta inferencia existe entre ellos (gráfica 8) y a pesar no haberse obtenido una diferencia significativa en el punto final (minuto 60) del ensayo, se logró obtener casi el mismo resultado en la mitad del tiempo como se aprecia en la gráfica 7 en el minuto 30 para el tratamiento de lecho empacado a temperatura de 50°C

Gráfica 8. Medias entre concentración y ensayos

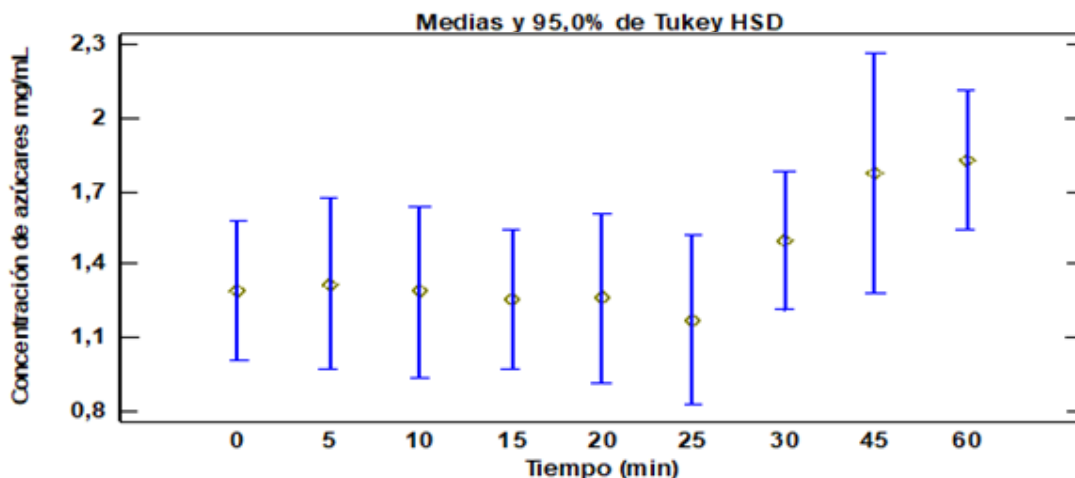


Fuente: los autores

No existen diferencias estadísticamente significativas (Valor $p=0,4152$) entre cualquiera de los 3 ensayos empleados (A, B y C) para evaluar la variación de azúcares reductores sobre el sustrato, con un nivel del 95,0% de confianza.

Se analizó la variación de la concentración de los azúcares reductores del sustrato gracias a la acción de las cápsulas de alginato a través del tiempo. En la gráfica 9 se puede apreciar una diferencia significativa para los tratamientos bajo estudio (A, B y C) (Valor $p=0,0239$). Al incrementarse la cantidad de dichos azúcares con respecto al tiempo quiere decir que su viscosidad baja, debido posiblemente al rompimiento de las cadenas de glucósidos a causa de la acción de la enzima sobre el sustrato. Esto debido a que los compuestos orgánicos no azúcares, tienen un profundo efecto sobre la viscosidad, pues los componentes de alto peso molecular pueden incrementarla considerablemente (Fajardo Castillo y Sarmiento, 2007).

Gráfica 9. Medias entre concentración y tiempos



Para la siguiente fase la cual fue la aplicación del método que se considerara más efectivo a la matriz alimentaria, se opta por descartar el ensayo del lecho empacado a temperatura ambiente sin agitación (Ensayo A) debido a que los resultados no fueron tan favorables a comparación de los otros dos ensayos (Ensayos B y C). Por otro lado, entre los 2 métodos restantes no se obtuvo una diferencia significativa en los datos obtenidos, por ende, se decidió aplicar ambos métodos (lecho empacado con agitación a temperatura ambiente y lecho empacado con agitación y temperatura a 50°C).

Efecto del tratamiento enzimático sobre el sustrato

Una vez teniendo la influencia del tiempo, la temperatura y los métodos de la enzima encapsulada, se procedió a realizar una comparación de la actividad de la enzima libre frente a la inmovilizada, sobre la concentración de azúcares reductores del sustrato, a continuación se presentan los resultados en la tabla 3.

Tabla 3. Incidencia de la enzima libre vs encapsulada sobre el sustrato

Actividad de la enzima	DNS		Aumento
	Inicial (mg/mL)	Final (mg/mL)	%
Libre	0,275	5,54	2000
Encapsulada	0,275	2,47	900

Como se puede observar en la tabla 5, la actividad de la enzima inmovilizada frente a la enzima libre decrece un poco más de la mitad, comportamiento que concuerda con el trabajo de Arias Vargas & Ríos Alzate (2002). Este comportamiento también es corroborado en el trabajo de López Córdoba (2012) donde se menciona que precisamente esto es una de las principales desventajas del método de inmovilización al ser un material tan poroso donde

dice que siempre suele haber pérdida de actividad de la enzima durante su preparación, manipulación o posterior incorporación en una preparación, incluso puede llegar a perderse por completo; una de las causas de esto se precisa cuando el sustrato que se maneja posee un alto peso molecular.

Conclusiones

Los ensayos realizados para caracterizar y establecer las condiciones de operación óptimas de la enzima permitieron determinar el intervalo de temperatura en el que mejor desarrolla su actividad, el cual se encontró entre 45-50°C y la concentración adecuada de enzima fue de 0,5 sobre sustrato. Igualmente, a estas condiciones la concentración de azúcares reductores llega a su punto máximo entre los rangos estudiados. Con respecto al factor tiempo no se aprecia un efecto en los ensayos; lo que quiere decir que la única variable representativa de las estudiadas fue la temperatura.

El método de inmovilización con alginato de sodio redujo en aproximadamente un 93% el contenido de proteína de la enzima, sin embargo, su actividad se mantuvo generando modificaciones sobre el sustrato. La encapsulación de compuestos sensibles a factores externos, es una alternativa llamativa para la industria, ya que permite no solo proteger enzimas sino compuestos de alto interés los cuales aportan en gran medida al desarrollo de diversos procesos productivos.

Referencias bibliográficas

Arias Vargas F. J. y Ríos Alzate L. R. (2002). Inmovilización de pectinasas /o celulasas y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba.

Anjani K. K. (2007). Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. // International Dairy Journal.

Belén S.(2008). Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de

- Geotrichum klebahnii. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/8187/d2753f194b2a4aed53dc01b67bdb-ce384544.pdf>
- Beltrán Gómez, A. Fonseca, O y Guerrero, Y. (2007). Evaluación de la aplicación de la enzima pectinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger*, en el proceso de producción de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* sororia) concentrada al vacío.
- Bermúdez Molina y Lipe Sanabria, R.(2005). Estudio preliminar de la actividad proteolítica de la enzima papaina sobre cicatrices de tipo queloides y estrias.
- Fajardo Castillo E. y Sarmiento Forero S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de pregrado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Huertas Parra, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, 63 (2), 5669-5684. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>
- Ladero Galán M. (1999). *Hidrólisis de lactosa con β -galactosidasas de kluyveromyces fragilis y de Escherichia coli*. (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Linneo, C.(2008). *Species Plantarum*. - [s.l.] : Proyecto Gutenberg.
- López, A. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Lupo Pasin, B. (2014). *Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación. Caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales*. (Tesis de doctorado). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Lupo Pasin B., Gonzáles Azón, C., & Maestro Garriga, A. - (2014). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3 (1): 130-151. Recuperado de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/alginatos_en_alimetnos.pdf
- Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical chemistry. Analytical Chemistry 31 (3), 426-428.
- Rincón, N. (2007). *Evaluar la aplicación de enzima pectinasa aislada del hongo Aspergillus niger durante el proceso de clarificación y fermentación del mosto de vino de uva Vitis labrusca vaiedad isabella para la obtención de vino tinto*. (Tesis de pregrado). Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Tena A y Jorrín N.(2008). Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Recuperado de: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CINETICA.pdf>