

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**“ELABORACION DE UN PREPARADO ABASE DE ENZIMAS INMOVILIZADAS
POR ATRAPAMIENTO EN GEL DE AGAR, PAR A EL TRATAMIENTO DE
DESECHOS ORGANICOS PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES ”**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

**BARBARA LISSETTE CHACON CHACON
VERONICA CARMELINA DIAZ AVILES**

PARA OPTAR AL GRADO DE :
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO 2002

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA:

Dra. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIA GENERAL:

Lic. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA:

Lic. MARIA ISABEL RAMOS DE RODAS

SECRETARIA:

Lic. ANA ARELY CACERES MAGAÑA

SAN SALVADOR

JUNIO 2002

EL SALVADOR

ASESORA:

M.Sc. SONIA MARICELA LEMUS MARTINEZ

JURADO CALIFICADOR:

Dr. RIGOBERTO AYALA

Lic. MARIA CONCEPCION ODETTE RAUDA ACEVEDO

Lic. MARIA ELSA ROMERO DE ZELAYA

SAN SALVADOR

JUNIO 2002

EL SALVADOR

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a Dios por darme la constancia, inteligencia, energía y fortaleza para seguir adelante. Por concederme a mis Padres que me han apoyado en todo.

Gracias Papi y Mami por concederme la oportunidad de conocer más de este mundo, por su apoyo, cariño, paciencia y amor, por darme ánimos cuando más lo he necesitado y principalmente por creer que lo lograría.

Gracias Alex, Alejandra, Raquel y Rebeca por su comprensión y cariño. Elsy, gracias por enseñarme todo lo que tú sabes.

Gracias Alvaro Ibáñez, por permitirme terminar mis estudios, tenerme paciencia, brindarme todo tu apoyo y principalmente todo tu amor.

Gracias a todos los Licenciados y Profesores que me han formado profesionalmente y que me han regalado su amistad y cariño.

Gracias Verónica Díaz por tu paciencia, confianza y cariño brindado a lo largo de este trabajo.

Bárbara Lissette Chacón Chacón.

...Su gratitud, no obstante, no se limita al mundo espiritual; él jamás olvida a sus amigos, porque la sangre de ellos se mezcló con la suya en el campo de batalla.
Paulo Coelho.

Quiero agradecer a las siguientes personas porque de una u otra manera han estado conmigo a lo largo de éste final, de una nueva meta:

A Bárbara Chacón porque juntas logramos vencer todos los obstáculos que se nos presentaron, sin perder la buena voluntad.

A Gustavo Garrido por ser el "contacto clave" para obtener las enzimas y por mostrarme que no existía nada ni nadie que pudiera impedir, imprimir mi Chi a este trabajo.

A mi familia por acompañarme con su paciencia y ánimo. Y por no dudar de lo que estaba buscando a través de este trabajo de investigación. Gracias por esperar...

A mis amigos por estar cuando más necesitaba, para quejarme y para darnos el reláx. En especial a Carolina Rivera (Carola) por ser mi "cómplice".

A Luis Avilés (Foforo) por su ayuda en la elaboración de este documento. Pero sobre todo gracias por tu comprensión, paciencia, compañía y amor a lo largo de todo este trabajo.

Verónica Carmelina Díaz Avilés (Petica).

De manera especial agradecemos a la Lic. Sonia Maricela Lemus Martínez por enseñarnos a descubrir el mundo de las enzimas, por sus sugerencias y confianza en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Gracias al Ing. Arturo García Mazinni, a la Ing. María del Carmen de Medrano y a la Lic. Lorena Margarita Ramírez, pues sin su valiosa colaboración no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A los Señores Mateo Díaz, Oscar Coreas, Wilber Guzmán, Miguel Angel Escalante y Jaime Pascual González les agradecemos su disposición para brindarnos su colaboración en los laboratorios de nuestra Facultad de Química y Farmacia.

A Dios Todopoderoso, porque sin ti nada de esto hubiera sido posible.

A mis Padres: Alex y Elsy; por ser las personas más esenciales de mi vida.

Con mucho amor, Bárbara Chacón.

Con todo mi amor: A la Tutun y al Viejo.

Y a la memoria de mi Abuelo (Yeye). Porque desde lejos tú
sabes cuanto he aprendido de ti y lo mucho que te recuerdo.

Verónica Díaz (Petica).

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	
OBJETIVOS	4
CAPITULO I. MARCO TEORICO	6
1. Generalidades de la Inmovilización de Enzimas	6
1.1. Marco Histórico	6
1.2. Definición	8
1.3. Propiedades de las Enzimas Inmovilizadas	9
1.3.1. Estabilidad	9
1.3.2. Propiedades Cinéticas	11
1.4. Ventajas y Desventajas del Proceso de Inmovilización	13
1.4.1. Ventajas del Empleo de Enzimas Inmovilizadas	13
1.4.2. Desventajas del Empleo de Enzimas Inmovilizadas	14
1.5. Requerimientos Básicos de un Sistema Inmovilizado	14
1.6. Enzimas	15
1.6.1. Generalidades de las Enzimas	15
1.6.2. Nomenclatura y Clasificación de las Enzimas	17
1.6.2.1. Nombres Particulares	17
1.6.2.2. Nombre Sistemático	17

	PAGINA
1.6.2.3. Nomenclatura de la Comisión Enzimática	18
1.6.3. Influencia que Ejerce un Catalizador en una Reacción	20
1.6.4. Efecto de la Concentración del Sustrato o de la Enzima sobre la Catálisis	21
1.6.5. Efecto del pH Sobre la Actividad Enzimática	23
1.6.6. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Enzimática	24
1.6.7. Efecto de los Activadores sobre la Actividad Enzimática	25
1.6.8. Efecto de los Inhibidores Enzimáticos	26
1.7. Soportes Utilizados para la Inmovilización de las Enzimas	27
1.7.1. Agar-Agar	29
1.8. Clasificación de las Técnicas de Inmovilización de Enzimas	30
1.8.1. Técnica de Atrapamiento en Gel	32
1.8.1.1. Ventajas y Desventajas de la Técnica de Atrapamiento en Gel	33
1.9. Análisis y Diseño de Reactores	34
1.9.1 Tipos de Reactores	35
2. α-Amilasa [EC 3.2.1.1] de <i>Bacillus subtilis</i>	38
2.1. Generalidades	38
2.2. Estructura y Clasificación	40
2.3. Propiedades	42
2.4. Sitios Activos	45

	PAGINA
3. Celulasa [EC 3.2.1.4] de <i>Aspergillus niger</i>	46
3.1. Generalidades	46
3.2. Propiedades	47
CAPITULO II. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	49
1. Inmovilización de las Enzimas en Forma Individual	
(α-Amilasa y Celulasa)	49
1.1.Preparación del Soporte	49
1.2.Mezcla Enzima-Soporte	49
1.3.Atrapamiento y Moldeo de la Enzima	50
2. Determinación de la Actividad de las Enzimas	
en sus formas Libres e Inmovilizadas	50
2.1. Ensayo para la Determinación de la Actividad Amilolítica	
a diferentes pH y Temperaturas	50
2.2. Ensayo para Determinar la Actividad Celulolítica a diferentes	
pH y Temperaturas	54
3. Determinación del Tiempo de Actividad de cada una	
de las Enzimas Inmovilizadas	58
3.1. Ensayo para Determinar el Tiempo de Actividad utilizando	
el Bioreactor Enzimático del Inmovilizado a Flujo Discontinuo	
del Sustrato (o Bioreactor por Lote)	58
3.2. Ensayo para Determinar el Tiempo de Actividad, utilizando	
el Bioreactor Enzimático del Inmovilizado a Flujo Continuo	
del Sustrato	60

	PAGINA
3.3. Especificaciones para el Montaje de los Bioreactores Enzimáticos a Flujo Discontinuo y Continuo del Sustrato para la α -Amilasa de <i>Bacillus Subtilis</i> y para la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	61
4. Aplicación del Preparado en Aguas Residuales	64
5. Determinación de la Forma de Presentación del Preparado Enzimático	65
5.1. Almacenamiento del Preparado: en Seco o Húmedo	65
5.2. Efectividad del Preparado al estar las Enzimas en Forma Individual o Mezcladas	66
CAPITULO III. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	69
1. Inmovilización de Enzimas	69
1.1. Preparación del Soporte	69
1.2. Atrapamiento y Moldeo de la Enzima	70
2. Determinación de la Actividad Enzimática de la α-Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en sus formas Libre e Inmovilizada	71
2.1. Actividad Amilolítica en Función del pH	71
2.2. Actividad Amilolítica en Función de la Temperatura	73
3. Determinación del Tiempo de Actividad de la α-Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en diferentes Sistemas de Reacción (Bioreactores por Lote y Continuo)	76
3.1. Reactor Enzimático por Lote para la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	77

	PAGINA
3.2. Reactor Enzimático Continuo para la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	83
4. Determinación de la Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> en sus formas Libre e Inmovilizada	86
4.1. Actividad Celulolítica en Función del pH	87
4.2. Actividad Celulolítica en Función de la Temperatura	89
5. Determinación del Tiempo de Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> en diferentes Sistemas de Reacción (Bioreactores por Lote y Continuo)	91
5.1. Reactor Enzimático por Lote para la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	92
5.2. Reactor Enzimático Continuo para la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	96
6. Aplicación del Preparado en Aguas Residuales	98
6.1 Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Inmovilizada	99
6.2. Actividad de la Enzima Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada	104
7. Determinación de la Forma de Presentación del Preparado Enzimático	105
7.1. Almacenamiento del Preparado (α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>): En Seco o Húmedo	105
7.2. Almacenamiento del Preparado (Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>): En Seco o Húmedo	108
7.3. Efectividad del Preparado al estar las Enzimas en Forma Individual o Mezcladas	110

	PAGINA
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	114
CAPITULO V. RECOMENDACIONES	117
BIBLIOGRAFIA	120
ANEXOS	127

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

TABLAS

	PAGINA
1. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente)	72
2. Actividad Enzimática de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Libre e Inmovilizada a diferentes Temperaturas (a pH óptimo experimental)	74
3. Determinación del Tiempo Optimo de Reacción de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en el Bioreactor por Lote	77
4. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en Bioreactor por Lote	79
5. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en Bioreactor Continuo	84
6. Determinación del Tiempo y Cantidad de Sustrato Optimos para la Cuantificación de la Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	86
7. Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente)	88
8. Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (al pH óptimo experimental)	90
9. Determinación del Tiempo Optimo de Reacción de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> en el Bioreactor por Lote	92
10. Actividad en el Bioreactor por Lote de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada en función del Tiempo.....	94
11. Actividad en el Bioreactor Continuo de Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada	97

	PAGINA
12. Curva Patrón de Almidón	100
13. Datos Experimentales de la Curva Patrón de Almidón Linearizados	101
14. Actividad del Preparado (α -Amilasa Inmovilizada) en Aguas Residuales	103
15. Actividad del Preparado (Celulasa Inmovilizada) en Aguas Residuales	104
16. Monitoreo de la Actividad de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Inmovilizada Almacenada en Seco y Húmedo	106
17. Monitoreo de la Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo	108
18. Actividad de las Enzimas Inmovilizadas en Forma de Presentación Individual y Mezclada	111

CUADROS

	PAGINA
1. Composición en Aminoácidos de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	41
2. Propiedades de α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	42
3. Propiedades de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	47
4. Especificaciones del Sustrato para el Montaje de los Bioreactores Enzimáticos	62
5. Especificaciones Generales (Enzimas y Bioreactores) para el Montaje de los Bioreactores Enzimáticos	63

PAGINA

6. Características del Bioreactor por Lote de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	78
7. Características del Bioreactor Continuo de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	83
8. Características del Bioreactor por Lote de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	93
9. Características del Bioreactor Continuo de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	96
10. Características de los Bioreactores por Lote de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> y de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> en la Determinación de la Actividad en Forma de Presentación Individual	110
11. Características de los Bioreactores por Lote de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> y Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> en la Determinación de la Actividad en Forma de Presentación Mezclada	111

INDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFIAS

FIGURAS

	PAGINA
1. Métodos de Inmovilización Mediante Retención Física	30
2. Métodos de Inmovilización Mediante Unión Química	31
3. Modelos de Bioreactores por Lote	59
4. Modelo del Bioreactor a Flujo Continuo del Sustrato	61

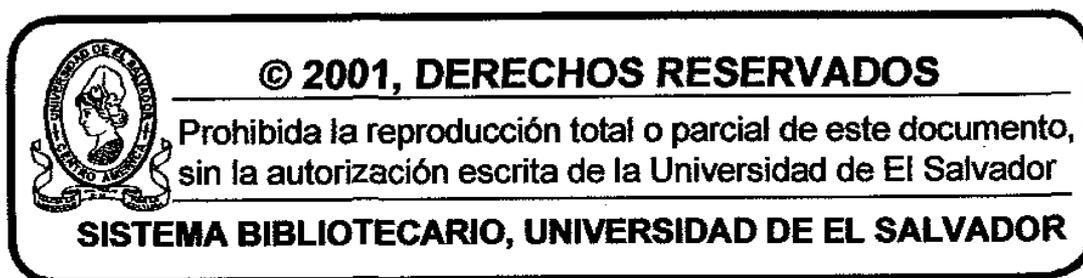
FOTOGRAFIAS

	PAGINA
1. Preparado Enzimático Inmovilizado	70
2. Preparado Enzimático Inmovilizado	70
3. Bioreactor por Lote de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	79
4. Bioreactor Continuo de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	84

INDICE DE GRAFICOS

	PAGINA
1. Influencia que ejerce un Catalizador en una Reacción	21
2. Efecto de la Concentración de la Enzima sobre la Velocidad de Reacción	22
3. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática	23
4. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Enzimática	24
5. Efecto de los Activadores sobre la Actividad Enzimática	25
6. Efecto de los Inhibidores Enzimáticos	27
7. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente)	72
8. Actividad Enzimática de α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> Libre e Inmovilizada a diferentes Temperaturas (a pH óptimo experimental)	75
9. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en Bioreactor por Lotes	82
10. Actividad de la Enzima α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> en Bioreactor Continuo	85
11. Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente)	88
12. Actividad de la Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (al pH óptimo experimental)	90
13. Actividad en el Bioreactor por Lote de Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada en función del Tiempo	95

14. Actividad en el Bioreactor Continuo de Celulasa	
de <i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada	98
15. Curva Patrón de Almidón (datos corregidos)	102
16. Monitoreo de la Actividad de la melasa de <i>Bacillus subtilis</i>	
Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo	106
17. Monitoreo de la Actividad de la Celulasa de	
<i>Aspergillus niger</i> Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo	109



INDICE DE ANEXOS

	PAGINA
I. Secuencia de Aminoácidos que Conforman la Estructura de la α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	128
II. Preparación de Reactivos	131
III. Material, Equipo y Reactivos	138
IV. Certificados de Análisis	146
V. Método de Análisis Estadístico: Distribución "t" de Student	148
VI. Esquema de Cálculo de la Distribución "t" de Student	152
VII. Distribución "t" de Student para los Diferentes Ensayos	155

ABREVIATURAS

I.U.B.	Unión Internacional de Bioquímica
ATP	Adenosín Trifosfato
etc.	Etcétera
UV-VIS	Ultravioleta Visible
GOD	Glucosa Oxidasa
POD	Peroxidasa
A	Absorbancia
Conc.	Concentración
S.A.	Sociedad Anónima
Inhib.	Inhibidores

PESOS Y MEDIDAS

nm.	Nanómetros
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
mg.	Miligramos
mL.	Mililitros
cc.	Centímetros Cúbicos
M	Molaridad
N	Normalidad
Lb.	Libras
mm.	Milímetros
μmol.	Micromol
cm.	Centímetros
g.	Gramos

INTRODUCCION

El agua que bebemos recorre un largo camino hasta llegar a nosotros. En esta travesía sufre cambios en sus componentes físicos, químicos y biológicos, producidos por sales, compuestos orgánicos, nutrientes, diversos tóxicos y otros elementos que la hacen no apta para su consumo directo como bebida.

Aunque el Hombre del campo es el más afectado por la falta de agua tratada, la calidad del recurso en las ciudades se deteriora cada vez más, pues la mayoría de los elementos presentes en el agua que bebemos provienen de vertimientos de aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales, tales como materia orgánica disuelta, precursores de compuestos organoclorados y nutrientes que pueden generar alta producción de algas.

Siendo vital para todos los seres vivos el agua potable, es necesario cuidar este recurso además de darle el tratamiento necesario para su reutilización.

Al iniciar un tratamiento del agua es necesario reducir al mínimo los contaminantes orgánicos producidos, ya que si bien es cierto son compuestos no tóxicos, su presencia hace al agua no apta para ser consumida. Y si una fuente de agua se conserva sin materia orgánica disuelta o no y sin tóxicos (o a niveles que no representen riesgo para la salud) el agua va a requerir sólo de un tratamiento convencional.

Por lo que surge la idea de elaborar un preparado a base de enzimas inmovilizadas (α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger*) por atrapamiento en gel, ya que para las Industrias que tienen como productos de desecho compuestos orgánicos como el almidón y la celulosa, la elaboración de este preparado enzimático podría ser una opción para darle un pre-tratamiento al agua que ahora simplemente desechan.

El preparado fué elaborado a base de enzimas, ya que el empleo de éstas es cada vez mayor. Es un campo de la biotecnología que cada vez está siendo más explotado en diferentes áreas. Sin embargo, no se puede perder de vista que el costo de las enzimas es un importante factor limitante en cuanto a la economía del proceso, por lo que su utilización se ve muchas veces limitado sobre todo en países subdesarrollados.

El método de inmovilización de enzimas seleccionado fué la técnica de atrapamiento en gel de agar, ya que ofrece la ventaja de ser de bajo costo al permitir que el preparado sea reutilizado, pues al restringir el libre movimiento de las enzimas dentro de un soporte, permite mantenerlas en el sistema de reacción por largos períodos de tiempo, tan largos como su estabilidad lo permita.

Teniendo como parámetro, la actividad de las enzimas en su forma libre; por medio de ensayos se determinaron las condiciones óptimas de funcionamiento del preparado en cuanto a las variables de pH y temperatura.

Además, se montaron dos tipos de bioreactores a nivel de laboratorio para determinar la configuración inmovilizada que permitiera la optimización de la actividad enzimática dentro del mismo.

Finalmente se determinó la forma de presentación del preparado enzimático, en base a la forma de almacenamiento (en húmedo o seco) y a la efectividad que presentara al estar las enzimas en forma individual o mezcladas.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar un preparado a base de enzimas inmovilizadas por atrapamiento en gel de agar; para el tratamiento de desechos orgánicos en aguas residuales.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.1. Inmovilizar las enzimas: α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger*, por medio de la técnica de Atrapamiento en Gel utilizando como soporte agar-agar.
- 2.2. Establecer las condiciones experimentales óptimas para lograr la estabilidad de las enzimas en el proceso de inmovilización.
- 2.3. Determinar y comparar las condiciones óptimas de actividad de las enzimas libres e inmovilizadas a diferente pH y temperatura.
- 2.4. Montar dos tipos de minibioreactores a nivel de laboratorio, de acuerdo a las condiciones óptimas de actividad de las enzimas inmovilizadas.

- 2.5.** Determinar el tiempo de actividad enzimática del preparado mediante métodos experimentales.

- 2.6.** Especificar el tipo de desecho en el cual puede ser utilizado el producto enzimático.

- 2.7.** Normalizar el preparado en cuanto al pH y temperatura óptimos de actividad.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. GENERALIDADES DE LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

1.1. MARCO HISTORICO

En lo que a tecnología enzimática se refiere, el costo de las enzimas sigue siendo uno de los factores más importantes en cuanto a la economía de los procesos. Sin embargo, la necesidad de tener un control de calidad estricto de la reacción y/o de obtener productos libres de contaminación, ha hecho necesario buscar opciones diferentes a las del uso tradicional, de manera que estos biocatalizadores se puedan reutilizar en procesos discontinuos o continuos. El uso de procesos continuos es especialmente importante para mantener un medio ambiente constante, factor que se considera determinante en la estabilidad de la enzima inmovilizada.

Es por éstas y otras necesidades que surge la tecnología de la inmovilización de enzimas, lográndose con ésta una mejora significativa en lo referente a la estabilidad de las enzimas, lo cual hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos y farmacéuticos; en la industria de alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones. Además, el costo de estos procesos catalizados por enzimas inmovilizadas pueden reducirse significativamente utilizando esta técnica.

A pesar de que el primer caso reportado de una enzima inmovilizada fue en 1916 cuando Griffin y Nelson inmovilizaron la enzima invertasa sobre carbón, es hasta mediados de la década de los 60's que alcanza un gran auge y acogida la tecnología de enzimas inmovilizadas. De allí la importancia de mencionar las primeras aplicaciones de esta tecnología que lograron convertirse en procesos eficientes que vinieron a reemplazar técnicas más costosas y/o complejas que se utilizaban antes⁽⁹⁾.

Una de las primeras aplicaciones de enzimas inmovilizadas en la Industria se da en 1969 cuando se obtiene ácido aminopenicilánico por medio de la enzima *Penicillium amidasas* inmovilizada⁽⁹⁾.

En los años siguientes hasta la actualidad han sido desarrollados una cantidad significativa de trabajos de investigación acerca de enzimas inmovilizadas que han sido reportados, aunque no todos aplicados en el campo industrial, pero que sin duda son un incentivo para el desarrollo de nuevos productos, mejoras en la calidad y minimización de costos de los mismos.

A nivel internacional, entre las investigaciones–aplicaciones de la técnica de inmovilización de enzimas están: La inmovilización de lipasa de *Cándida rugosa* por absorción dentro de un soporte macropolímero para catalizar la hidrólisis del aceite de

palma. La inmovilización de lipasas para monitorear su actividad como catalizador de ácidos 2-aril-propiónicos que tienen propiedades antiinflamatorias. También se han realizado estudios de sistemas multienzimáticos, formados por las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, inmovilizadas en alginato cálcico; utilizándose la catalasa como protectora de la glucosa-oxidasa, evitando así que esta enzima sea inhibida irreversiblemente por el peróxido de hidrógeno, que es un producto de la reacción de la glucosa-oxidasa. Y otra aplicación, es el empleo de productos bacterianos-enzimáticos aeróbicos o anaeróbicos, los cuales son muy eficaces en letrinas o fosas sépticas, ayudando a licuar los sólidos orgánicos para que fluyan naturalmente por sus drenes^(37, 38).

Y a nivel nacional se han realizado dos trabajos de investigación acerca de la inmovilización de enzimas en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. El primero desarrollado en 1994, en donde se realizaron ensayos para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa por el método de atrapamiento en gel. Y el segundo llevado a cabo en el año 2000, se hizo la normalización de la enzima papaína al ser inmovilizada por la técnica de atrapamiento en gel^(15, 16).

1.2. DEFINICION

La definición varía según el autor que se consulte, pero en esencia todos concuerdan en que la inmovilización de enzimas es el proceso por el cual se restringe, de forma parcial o

completamente, el movimiento de las enzimas por unión a un soporte. Es decir, 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 como su estabilidad lo permita.

1.3. PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

Para hacer el mejor uso de las técnicas disponibles para la inmovilización de enzimas, es esencial conocer los cambios que pueden producirse en las propiedades físicas y químicas de una enzima durante la inmovilización. Los principales cambios observados se relacionan con la estabilidad y propiedades cinéticas de las enzimas, debido al microambiente impuesto por el soporte y los productos de su propia acción⁽¹⁵⁾.

1.3.1. Estabilidad

La estabilidad de una enzima inmovilizada depende en general de la naturaleza intrínseca de la enzima y de las condiciones en las que se inmoviliza.

En la mayoría de los casos la inmovilización confiere algunas ventajas en la estabilidad de una enzima. Sin embargo, éstas son imposibles de predecir de antemano. Por lo que la complejidad global de los factores que afectan a la estabilidad enzimática sugiere que la única aproximación factible es obteniendo datos experimentales bajo las condiciones a utilizar⁽¹⁵⁾.

Aunque es imposible deducir una expresión matemática, generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización. Este incremento se debe principalmente a las siguientes razones:

- Se da 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⁽³⁶⁾.
- En el caso de las enzimas proteolíticas (aunque existen excepciones, tal es el caso de la papaína) se observa a menudo un efecto estabilizante, pudiendo ser atribuido generalmente a una reducción en el grado de autólisis ^(15,36).
- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio⁽³⁶⁾.
- Existe una alteración del microentorno de la enzima debido a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno, como las nitrogenasas e hidrogenasas, se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos 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⁽³⁶⁾.

1.3.2. Propiedades Cinéticas

La cinética enzimática estudia la forma en que factores físicos y químicos influyen en la actividad enzimática, proporcionando mayor conocimiento de la reacción en estudio. Por lo que al llevar a cabo el desarrollo de un sistema enzimático es de suma importancia el monitoreo de su cinética enzimática⁽³⁶⁾.

La actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse. La pérdida total de la actividad enzimática puede deberse a las siguientes razones⁽³⁶⁾:

- Que la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.
- Que los grupos reactivos del soporte reaccionan con alguna fracción del centro activo que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- Que la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Que las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de la actividad no es total después de la inmovilización, los cambios en la disminución o aumento de la actividad enzimática, se deben principalmente a⁽³⁶⁾:

- Efectos difusionales. Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida. Existen diversas maneras de minimizar estos efectos, como por ejemplo: disminuir el tamaño del preparado inmovilizado, aumentar la concentración del sustrato e incrementar la agitación o el flujo en el reactor.
- Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte. De tal manera, que si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción.
- Impedimentos estéricos o de tamaños de sustrato. En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que se dé una pérdida apreciable de su actividad; este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente.
- Efectos en el microentorno. La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, se hace más grande el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. En comparación con la actividad de una enzima libre a varios pH, se ha puesto en evidencia que si una enzima está unida a una matriz

cargada negativamente, el pH óptimo evoluciona hacia la alcalinidad, es decir, la enzima inmovilizada alcanza la actividad máxima a un pH alcalino aparentemente más alto. De forma similar, para una matriz cargada positivamente el aparente cambio de pH óptimo es hacia el lado ácido.

1.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PROCESO DE INMOVILIZACION

1.4.1. Ventajas del empleo de Enzimas Inmovilizadas^(9, 36)

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas destacan:

- Aumento de la estabilidad de la enzima inmovilizada.
- Fácil recuperación de la enzima por filtración o decantación por estar unida a un soporte insoluble, permitiendo ser reutilizada en procesos continuos o discontinuos.
- Disminución de costos del proceso, por la reutilización de la enzima.
- Procesos catalíticos pueden ser automatizados, con la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Permitiendo explotar las diversas ventajas que ofrece la configuración de un reactor, entre las que se incluyen el control rápido de pH y temperatura, la buena transferencia gaseosa en los reactores con agitación y la minimización de la inhibición por el producto en los reactores de lecho empaquetado.
- Distribución uniforme de la enzima por todo el reactor.

1.4.2. Desventajas del empleo de Enzimas Inmovilizadas^(9, 36)

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son:

- Pérdida parcial de la actividad de la enzima durante el proceso de inmovilización, debido a la desnaturalización por el calor, cambios de pH y radicales libres generados durante el proceso.
- Heterogeneidad del sistema enzima–soporte ya que pueden existir distintas fracciones del inmovilizado con un diferente número de uniones al soporte.

1.5. REQUERIMIENTOS BASICOS DE UN SISTEMA INMOVILIZADO

Para el desarrollo de un sistema inmovilizado se requiere de cuatro elementos básicos^(15, 16):

1. La enzima
2. El soporte
3. La técnica de inmovilización
4. El reactor

La elección específica de cada elemento está condicionada por la naturaleza de la enzima, la aplicación que tendrá el sistema, la facilidad de recuperación de la enzima y el costo de la misma.

1.6. ENZIMAS

1.6.1. Generalidades de las Enzimas

Las enzimas son proteínas segregadas por células, que catalizan reacciones químicas en los seres vivos o inducen cambios en otras sustancias. Las enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad; no hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las termodinámicamente posibles. Ello hace posible que bajo ciertas condiciones tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura y/o pH⁽²⁹⁾.

Las enzimas son catalizadores muy específicos, cada enzima cataliza un sólo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

Las enzimas por ser biocatalizadores se caracterizan por tener las siguientes propiedades^(29,31):

- a) Son eficaces en pequeñas cantidades. Una cantidad de enzima dada puede transformar una gran cantidad de sustrato por unidad de tiempo.
- b) No se alteran durante las reacciones que participan, es decir, que la enzima no se consume, sólo acelera la velocidad de reacción.
- c) Aceleran el proceso para la obtención del equilibrio en una reacción reversible.

d) Muestran Alta Especificidad. La acción de la enzima es extremadamente selectiva sobre el tipo de reacción, ya que no son catalizadas reacciones de naturaleza distinta; y respecto al sustrato, debido a que la enzima no puede unirse con cualquier sustrato. La especificidad de las enzimas varía, algunas veces puede ser tan alta que es posible distinguir entre estereoisómeros. La ventaja de la especificidad reside en que se pueden catalizar muchas reacciones a la vez sin reacciones laterales y sin que se acumulen productos secundarios.

En una reacción catalizada por una enzima⁽²⁹⁾:

1. La sustancia sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato.
2. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada centro activo. El centro activo comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.
3. Una vez formados los productos la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción.

1.6.2. Nomenclatura y Clasificación de las Enzimas

Hay varias formas mediante las cuales se asigna un nombre a una enzima⁽³³⁾:

- Nombres particulares
- Nombre sistemático
- Código de la Comisión Enzimática (Enzyme Commission)

1.6.2.1. Nombres Particulares

Antiguamente, las enzimas recibían nombres particulares, asignados por su descubridor. Otras, de manera especial, recibieron nombres ligados al sitio de procedencia anatómica. Dichos nombres no siguen ninguna regla ni sistema. Sin embargo, al ir aumentando el número de enzimas conocidas, se hizo necesaria una nomenclatura sistemática que informara sobre la acción específica de cada enzima y los sustratos sobre los que actuaba.

1.6.2.2. Nombre Sistemático

Al descubrir nuevas enzimas y proceder a su caracterización estricta se aplicaron reglas de nomenclatura basadas en el nombre del sustrato atacado o en el tipo general de sustrato, en la reacción catalizada añadiéndose convencionalmente, la terminación –asa^(31,33).

Esta manera de llamarlas, se demostró que era inadecuada porque al descubrirse varias enzimas, notaron que varias enzimas catalizaban reacciones diferentes del mismo sustrato, por ejemplo, oxidación o reducción de la función alcohol de un azúcar ⁽³³⁾.

1.6.2.3. Nomenclatura de la Comisión Enzimática

Aunque el sufijo –asa continúa en uso, actualmente al nombrar a las enzimas se enfatiza el tipo de reacción catalizada. Por ejemplo: las hidrogenasas catalizan la eliminación de hidrógeno y las transferasas, reacciones de transferencia de grupo. Con el descubrimiento de más y más enzimas, surgieron ambigüedades y con frecuencia no estaba claro cual era la enzima que un investigador deseaba estudiar. Para remediar esta deficiencia, la Comisión para el estudio de las enzimas, formada por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) adoptó, en 1964, un sistema complejo pero inequívoco de la nomenclatura enzimática basado en el mecanismo de reacción⁽³¹⁾.

A continuación se presentan algunos principios generales del sistema IUB⁽⁴²⁾:

1. Las reacciones y las enzimas que las catalizan se dividen en 6 clases principales, cada una con diferentes subclases.

Clases principales de enzimas:

- a) Oxidoreductasas. Catalizan reacciones de oxidoreducción, son reacciones de transferencia de electrones. Tras la acción catálitica quedan modificadas en su grado de oxidación por lo que deben ser transformadas antes de volver a actuar de nuevo.
- b) Transferasas. Catalizan reacciones en donde hay transferencia de grupos funcionales (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras.
- c) Hidrolasas. Verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Ej. celulasas, lipasas, proteasas, amilasas.
- d) Liasas. Realizan la degradación o síntesis de los enlaces denominados fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.
- e) Isomerasas. Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición.
- f) Ligasas. Es un grupo de enzimas que permite la unión de dos moléculas, lo cual sucede simultáneamente a la degradación del ATP, liberando la energía necesaria para llevar a cabo la unión de las primeras.

2. El nombre de la enzima tiene 2 partes: la primera es el nombre del o los sustratos; la segunda, con terminación –asa, indica el tipo de reacción catalizada.

3. Información adicional, si es necesario aclarar la reacción, puede seguir el paréntesis.

4. El nombre de cada enzima puede ser identificado por un código numérico, encabezado por las letras EC (Enzyme Commission), seguidas de cuatro números separados por puntos. El primer número indica a cual de las seis clases pertenece la enzima; el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo; el tercero, es una sub-subclase, se refiere a grupos químicos específicos que intervienen en la reacción y el cuarto dígito denota la enzima específica. Por ejemplo, el ATP o glucosa fosfotransferasa o glucoquinasa se define como EC 2.7.1.2. El número 2 indica que es una transferasa, el 7 que es una fosfotransferasa, el 1 indica que el aceptor es un grupo $-OH$, y el número 2 indica que es un grupo $-OH$ de la D-glucosa el que acepta el grupo fosfato⁽⁴²⁾.

1.6.3. Influencia que ejerce un Catalizador en una Reacción

Un catalizador, aumenta la velocidad de reacción química y disminuye la energía de activación que es la energía necesaria para que todas las moléculas de un mol de sustrato, a una temperatura dada alcancen el estado reactivo, produciendo con la disminución de ésta, que la reacción se lleve a cabo a menor temperatura^(29, 31).

La enzima se combina con el sustrato, formando el complejo de transición, enzima-sustrato, mediante una reacción reversible, cuya energía de activación es menor que la de la reacción no catalizada. Cuando se forma el producto de la reacción, se regenera de nuevo la enzima de forma libre, la cual, puede combinarse de nuevo con otra molécula de sustrato (ver

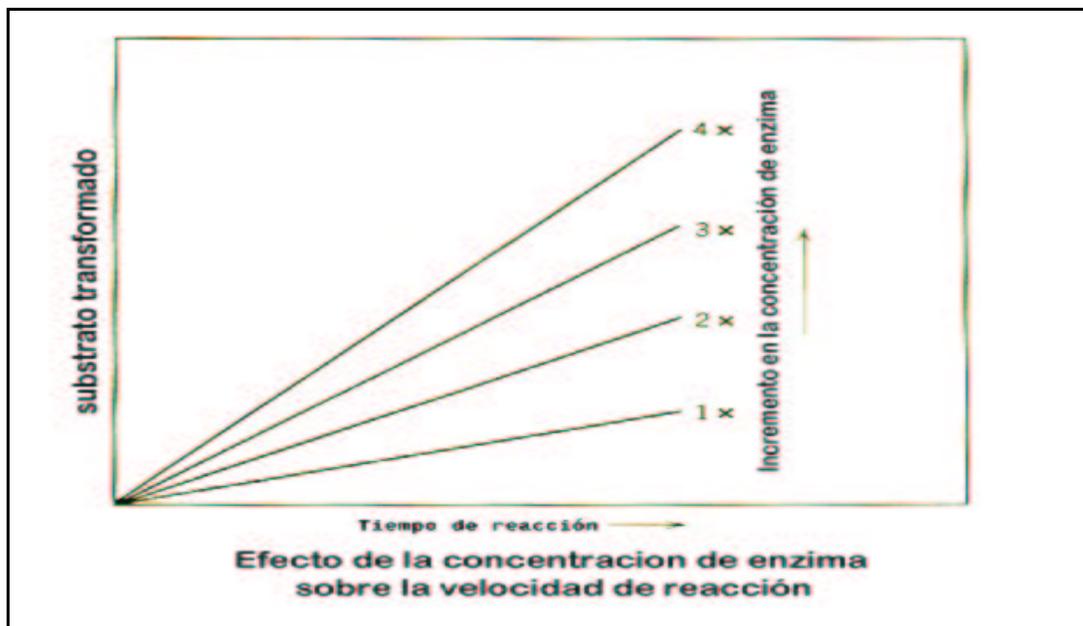
gráfico N°1)^(29, 31).

Gráfico N°1. Influencia que ejerce un Catalizador en una Reacción^(29, 31).



1.6.4. Efecto de la Concentración del Sustrato o de la Enzima sobre la Catálisis

Si la concentración del sustrato es constante y se varía la concentración de la enzima, se observa que el producto de la reacción aumenta a un pH y temperatura constantes (ver gráfico N°2)⁽³¹⁾.

Gráfico N°2. Efecto de la Concentración de la Enzima sobre la Velocidad de Reacción⁽³¹⁾.

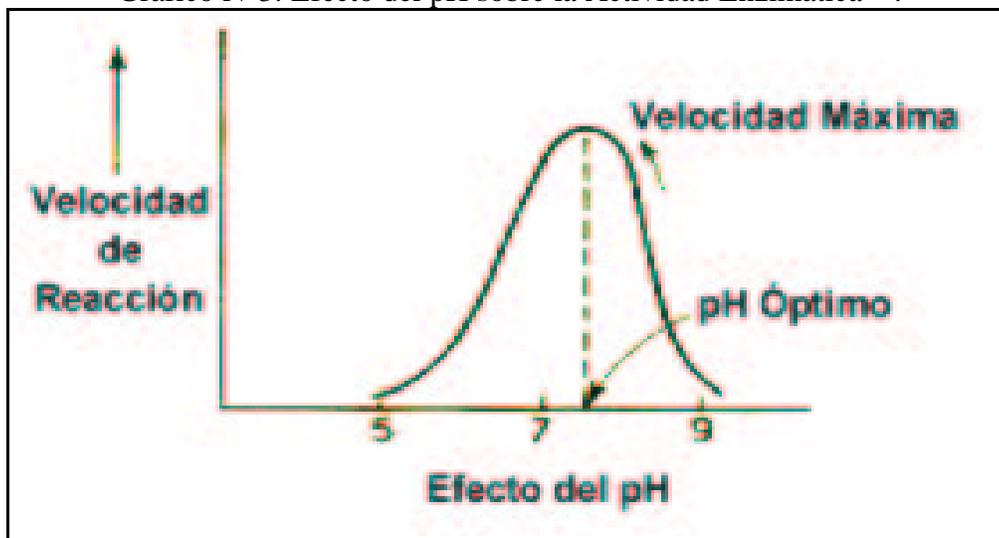
Si se mantiene la concentración de la enzima constante y se varía la concentración del sustrato, al principio se da un aumento rápido de la velocidad de reacción, pero si se sigue aumentando la concentración del sustrato, la velocidad de reacción comienza a disminuir, y a muy altas concentraciones de sustrato se observa que no cambia la velocidad de reacción, esto es debido a que los sitios activos de la enzima están saturados⁽³¹⁾.

1.6.5. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática

Debido a que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie protéica, afectando así las propiedades catalíticas de la enzima. Por lo que existe un pH óptimo, en el cual la conformación de las proteínas es la más adecuada para la actividad catalítica, ya que la conformación de las proteínas depende en parte, de sus cargas eléctricas.

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas sobre o debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad, pudiéndose producir la desnaturalización de la enzima y por lo tanto su inactivación (ver gráfico N°3)⁽³¹⁾.

Gráfico N°3. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática⁽³¹⁾.

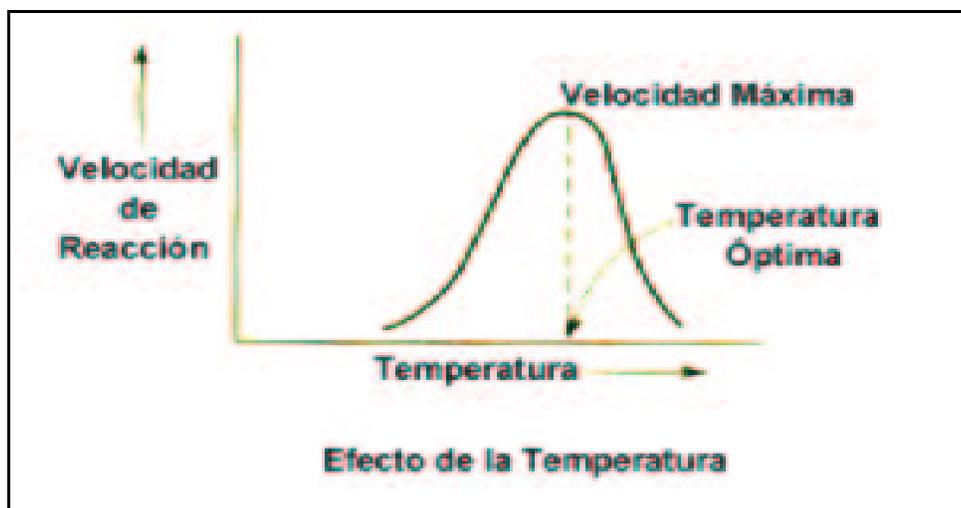


1.6.6. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Enzimática

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas. Cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, por ser proteínas, a partir de los 45°C aproximadamente se comienza a producir la desnaturalización térmica⁽³¹⁾.

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Sobre esta temperatura, es contrarrestado el aumento de velocidad de la reacción por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (ver gráfico N°4)^(31,35).

Gráfico N°4. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Enzimática^(31,35).



1.6.7. Efecto de los Activadores sobre la Actividad Enzimática

Algunas enzimas son secretadas como precursores, siendo completamente inactivas, por lo que requieren para su función de la presencia de sustancias no protéicas, llamadas activadores o co–factores, sin los cuales no puede proceder la reacción química. Por tanto, los co–factores o activadores ayudan a que la reacción enzimática se realice rápidamente (ver gráfico N°5)⁽³²⁾.

Entre los activadores o co–factores están: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido (NADPH +H), Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD⁺), Flavina Adenina Dinucleótido (FAD⁺), etc. Así mismo, muchas enzimas requieren activadores metálicos, de allí la importancia de los minerales para el buen funcionamiento y crecimiento de las plantas⁽³²⁾.

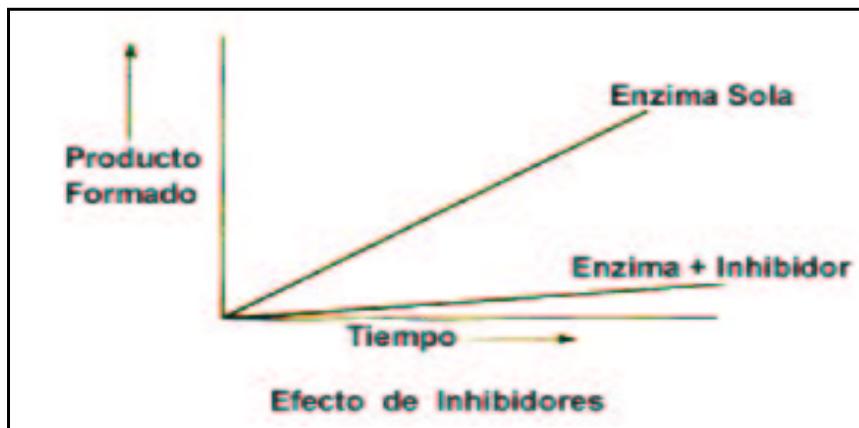
Gráfico N°5. Efecto de los Activadores sobre la Actividad Enzimática⁽³²⁾.



1.6.8. Efecto de los Inhibidores Enzimáticos

Ciertas moléculas pueden inhibir la acción catalítica de un enzima, estos son los llamados inhibidores (ver gráfico N°6), esta inhibición puede ser⁽³²⁾:

1. Inhibición irreversible: Este tipo de inhibidores forman un enlace covalente con las enzimas cerca del centro activo.
2. Inhibición competitiva. Es cuando el inhibidor compite con el sustrato por la unión con el centro activo de la enzima. Formándose en la inhibición un complejo enzima–inhibidor. Este tipo de inhibición puede reducirse si se aumenta la concentración de sustrato.
3. Inhibición no competitiva. Esta inhibición se caracteriza por que no se puede revertir el efecto del inhibidor aumentando la concentración del sustrato.
4. Inhibición por metales. Ciertos metales como el plomo, mercurio y arsénico inhiben enzimas que tienen en su centro activo grupos –SH libres.

Gráfico N°6. Efecto de los Inhibidores Enzimáticos⁽³²⁾.

1.7. SOPORTES UTILIZADOS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Para la inmovilización de enzimas se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma; generalmente se encuentran en forma de cilindros, hojas, fibras o como esferas.

Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos⁽³⁶⁾:

- Soportes orgánicos. Generalmente tienen más sitios de enlace por gramo, pero con frecuencia no poseen propiedades deseables de fluidez, y son a menudo afectados excesivamente por factores ambientales como pH o deterioro por microorganismos. Entre los soportes orgánicos más utilizados se encuentran: Los polímeros naturales, como los polisacáridos (tales como la celulosa, almidón, dextranos, agarosa, agar-agar, alginatos, quitina y quitosán); y proteínas fibrosas (como el colágeno y la

queratina). Y los polímeros sintéticos como las poliolefinas (poliestirenos), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas y polimetacrilatos) y otros polímeros como los basados en el anhídrido maleico, poliamidas y polímeros alifáticos y vinílicos.

- Soportes inorgánicos. Estos son más estables aunque generalmente tienen menos sitios de enlace que los soportes orgánicos. Los soportes inorgánicos con frecuencia tienen mejores propiedades de flujo y algunos son bastante económicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, arena, rocas, tierras diatomeas y sílice) o materiales manufacturados (pantallas de níquel, bolas de acero inoxidable, titanio, óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, cerámicas y gel de sílice). Los soportes porosos ofrecen una mayor área de superficie pero presentan más problemas de difusión en un reactor.

Algunas veces los materiales orgánicos han sido primero unidos o inmovilizados a soportes inorgánicos, con el objetivo de obtener las propiedades más deseables de los dos tipos de soporte ⁽³⁶⁾.

1.7.1. Agar–Agar

El agar (agar–agar) es un hidrocoloide natural que se extrae de las algas *Rodophytas*, especialmente de las especies del género *Gelidium*, *Gracillaria*, *Pterocladia*, *Acanthopeltis* y *Ceranium*. El agar se ubica en la matriz intercelular, formando parte de la pared celular, la que está constituida esencialmente por fibras de celulosa entremezcladas con polisacáridos entre los que se encuentra el agar. Está compuesto por dos fracciones principales: agarosa, un polímero neutro y agarpectina, un polímero sulfatado, con grupos iónicos; la proporción de estos dos polímeros varía ampliamente y el porcentaje de agarosa en algas productoras de agar fluctúa de cincuenta a noventa por ciento^(17, 18).

El agar es el éster sulfúrico de una Galactona lineal. Consta de una cadena larga de residuos de D y L–galactopiranososa unidos por enlaces 1,3–glucosídicos⁽¹⁸⁾.

El agar posee las siguientes propiedades: Es insoluble en agua fría, pero se hincha mucho al absorber agua hasta veinte veces su peso. Se disuelve con facilidad en agua hirviendo y al enfriarse se convierte en un gel firme –el agar es el agente gelificante natural más fuerte, basta un 0.5% de agar en agua para la formación del gel–. Una solución de agar al 1.5% es clara; cuando ésta se calienta a una temperatura entre 32 – 42°C se forma un gel resistente, que una vez formado no se funde, a menos que se someta a una temperatura mayor de 85°C. Las soluciones de agar tienen una viscosidad relativamente baja y una transición de sol a gel

bien definida que se realiza entre los 32 – 42°C, esta transición es reversible a una temperatura de 85°C^(17, 19, 20).

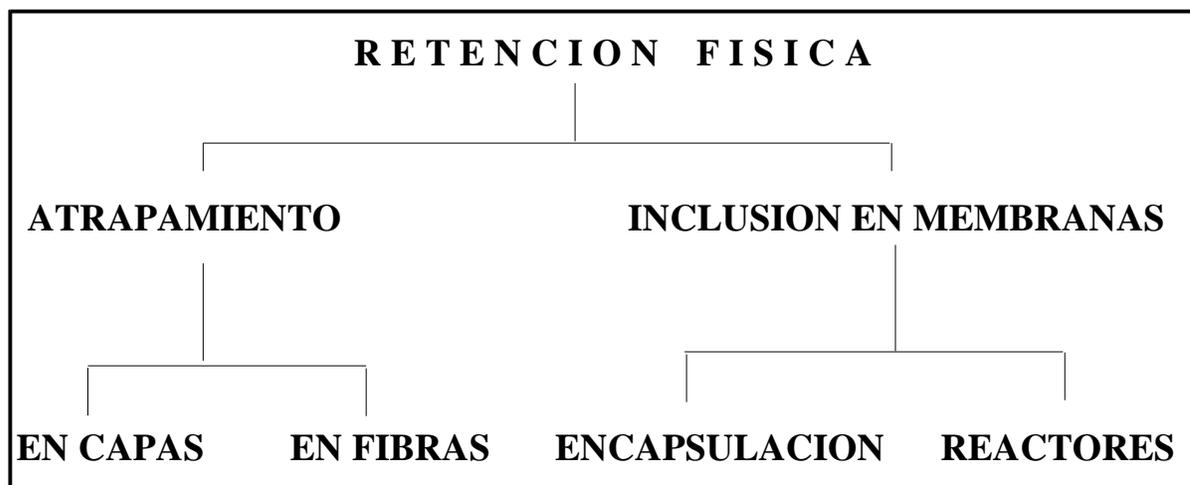
El agar en estado seco no es susceptible a infestarse con insectos ni ha ser atacado por microorganismos. En cambio las soluciones son medios propensos a la proliferación de hongos y bacterias, por lo cual deben tomarse las precauciones pertinentes para evitar el desarrollo de dichos microorganismos⁽²⁰⁾.

1.8. CLASIFICACION DE LAS TECNICAS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS

En general los métodos de inmovilización suelen clasificarse en dos categorías⁽³⁶⁾:

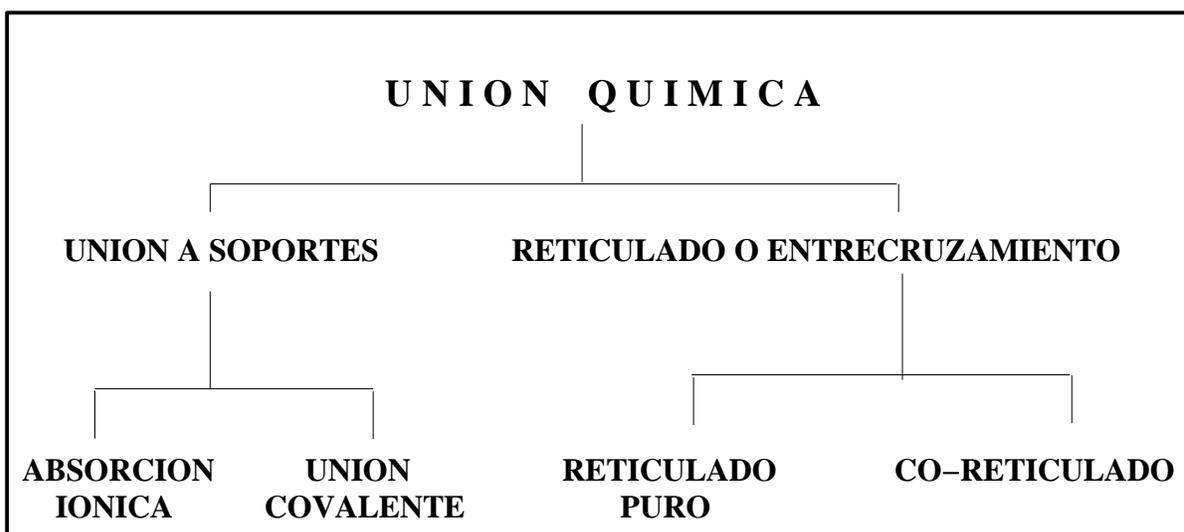
- Métodos físicos, en los cuales se da una retención física (ver figura N°1).

Figura N° 1. Métodos de Inmovilización mediante Retención Física⁽³⁶⁾.



- Métodos químicos, en los que se da una unión química debido a los enlaces covalentes que se forman (ver figura N°2).

Figura N°2. Métodos de Inmovilización mediante Unión Química⁽³⁶⁾.



Para seleccionar el método de inmovilización y su aplicación, es importante reconocer que no existe un método universal válido para todas las enzimas. Sin embargo, gracias a la información disponible en la actualidad, pueden hacerse generalizaciones sobre cada método de inmovilización y seleccionarse el más adecuado según la aplicación específica a la que esté destinada la enzima.

La elección ha de tener en cuenta el tipo de reacción a ser catalizada, el tipo de reactor, el tipo de sustrato a ser procesado, el costo del proceso, la facilidad para llevar a cabo el proceso, la disponibilidad de materiales para desarrollar el método y otros factores.

1.8.1. Técnica de Atrapamiento en Gel

Esta técnica de inmovilización consiste en la formación de un gel en presencia de la enzima, debido a la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato, resinas de poliuretano o agar. Las condiciones deben ser idóneas para producir un gel con poros más pequeños que la enzima, de manera que ésta quede atrapada dentro de la matriz del gel; además estos poros deben ser suficientemente grandes para permitir la difusión y transformación del sustrato, y finalmente la liberación del producto^(15, 36).

Este proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una matriz. Iniciándose el atrapamiento y moldeo por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento de una enzima en gel puede ser de diversas formas: como bloques, fibras, membranas o esferas; generalmente se presentan como esferas, ya que de esta forma se aumenta la superficie de contacto y entre más pequeñas y de tamaño homogéneo, se facilita la difusión^(15, 36).

1.8.1.1. Ventajas y Desventajas de la Técnica de Atrapamiento en Gel

Entre las ventajas de la inmovilización por medio de la técnica de atrapamiento en gel están: la sencillez desde el punto de vista experimental y que se requiere de una pequeña cantidad de enzima para obtener un derivado insoluble en agua. Además, por tratarse de un método físico la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura, por lo que no se espera ninguna modificación química de la enzima ni cambios en las propiedades intrínsecas. Como ventaja adicional, el método permite la elección de un considerable número de soportes insolubles en agua con carga neutra. Y quizás lo más importante de este método es que permite la preparación de derivados enzimáticos insolubles en agua de formas físicas muy variadas⁽³⁶⁾.

Sin embargo, desventajas de la técnica también existen. Operacionalmente, una buena inmovilización requiere de un control riguroso de las condiciones durante el proceso. Las propiedades físicas son con frecuencia de gran importancia para la obtención de una alta actividad. Es necesaria la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los sitios activos de la enzima, puesto que se puede dar la inactivación química y térmica de las enzimas durante la formación del gel. Otra desventaja de este método es la fuga de la enzima desde el interior del retículo polimérico, entre mayor es el tamaño de los microporos (microespacios) que se forman durante la formación de la matriz y el atrapamiento de la enzima mayor será la fuga; por lo que se debe tratar de disminuir el tamaño de estos microporos. También es desventaja, la limitación de su uso a sustratos pequeños; debido a

que enzimas atrapadas en gel muestran en algunos casos muy poca actividad sobre sustratos moleculares⁽³⁶⁾.

Considerando lo anterior, para la inmovilización enzimática se utilizará la técnica de atrapamiento en gel de agar.

1.9. ANALISIS Y DISEÑO DE REACTORES

Para la utilización de enzimas inmovilizadas es necesario ubicarlas en un ambiente apropiado para que se lleve a cabo la reacción química deseada, a este ambiente se le denomina: reactor⁽⁹⁾.

El reactor es el recipiente que contiene a la enzima inmovilizada, y que operando a condiciones determinadas de presión, temperatura, mezclado, y flujo de materiales se le adicionan uno o más sustratos para generar el producto⁽⁹⁾.

Es importante analizar la clase de reactor que se utilizará, con el objetivo de determinar por medio de su configuración, el tiempo de reacción, el tiempo y velocidad de mezclado y el tipo de reactor óptimo, para que se lleve a cabo de manera efectiva una determinada reacción enzimática^(9, 36).

1.9.1. Tipos de Reactores

Los reactores se clasifican de acuerdo a⁽⁹⁾:

- Modo de operación, es decir, de acuerdo a las características de manejo del sustrato en el sistema
- Nivel de mezclado que existe en el interior del recipiente

Existen dos tipos de reactores destinados para la utilización de enzimas inmovilizadas, según el modo de operación⁽⁹⁾:

1. Reactores por lotes o discontinuos o intermitentes.
2. Reactores continuos.

En los reactores discontinuos o intermitentes o por lotes, el sustrato se coloca dentro del reactor, éste se lleva a las condiciones requeridas de temperatura y nivel de mezclado. Luego se le adiciona la enzima inmovilizada y se mantiene dentro del reactor hasta que la reacción se ha completado, formándose la cantidad de producto deseada. En este momento se separa recupera la enzima inmovilizada del producto, para poder ser reutilizada. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que durante este proceso adicional de separación de la enzima inmovilizada es posible que se produzcan pérdidas apreciables de la enzima inmovilizada así como pérdidas de la actividad enzimática⁽⁹⁾.

En los reactores continuos, la enzima inmovilizada se encuentra dentro del reactor y la reacción enzimática se llevará a cabo con la adición continua del sustrato al reactor; obteniéndose a la salida del reactor, mezcla de producto y de sustrato no consumido⁽⁹⁾.

Según el nivel de mezclado en el interior del reactor, los bioreactores más utilizados para llevar a cabo la reacción enzima–sustrato empleando enzimas inmovilizadas son⁽⁹⁾:

1. Reactores de lecho empacado
2. Reactores continuos de tanque agitado

Los reactores de lecho empacado tienen bastante uso en los procesos comerciales. En éstos, el sustrato fluye a través de un lecho empacado que contiene la enzima inmovilizada, en una dirección específica, con lo que se procede a la reacción⁽⁹⁾.

El arreglo más convencional del reactor de lecho empacado consiste en un tubo relleno del soporte a través del cual fluirá el sustrato por los espacios vacíos o intersticios que existen entre las partículas del soporte con la enzima inmovilizada. El soporte utilizado puede ser en forma de esferas, hojuelas, cilindros, hojas, etc. Se recomienda el uso de partículas pequeñas debido a que esto permite que el área expuesta al líquido sea mayor debido al volumen del soporte, contribuyendo así a la reducción de los problemas externos de transferencia de masa^(9,36).

Las desventajas de este tipo de bioreactor son el aumento de la caída de presión y la posibilidad de tamponamiento en presencia de sustratos no solubles; aunque por otro lado, las ventajas de este bioreactor son lo económico de su construcción, que no hay pérdidas de la enzima porque ésta se encuentra en el soporte y que este tipo de equipo permite una alta carga de volúmenes de sustrato⁽⁹⁾.

En los reactores continuos de tanque agitado, el mezclado es perfecto, lo que determina que las condiciones dentro del reactor sean uniformes e iguales a la salida, es decir, que en el reactor se encuentra una mínima cantidad de sustrato y una máxima concentración de producto^(9, 36).

Las ventajas de este tipo de reactor se basan en la facilidad de cambio de la enzima inmovilizada y en que el control del pH y de la temperatura se realiza fácilmente; las desventajas que presenta es que no permite la carga de altos volúmenes de sustrato (como el bioreactor de lecho empacado), además hay desgaste del soporte y pérdida de enzima por el efecto de la agitación⁽⁹⁾.

Los bioreactores de enzimas inmovilizadas ideales son aquellos que cumplen con los siguientes requisitos⁽⁹⁾:

- Mantienen las condiciones isotérmicas dentro del reactor.
- El soporte de enzima inmovilizada está uniformemente distribuido en el recipiente de reacción.
- No existen limitaciones de transferencia de masas externas o internas al soporte con enzima inmovilizada.

Entre las causas que ocasionan que el reactor se aleje de su comportamiento ideal son: las limitaciones de transferencia de masa (por ejemplo, bajas velocidades de flujo o partículas grandes) y la distribución irregular de las partículas que causa acanalamientos⁽⁹⁾.

2. α -AMILASA [EC 3.2.1.1] DE *Bacillus subtilis*

2.1. GENERALIDADES

Las amilasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y por lo tanto son muy utilizadas, para la elaboración de productos como el pan dulce y para la obtención de jarabe y glucosa. Las amilasas tienen la función importante de la degradación de polímeros de glucosa como lo son el almidón y el glucógeno, hidrolizando los enlaces α -1,4-glucosídicos de diferentes formas dependiendo del tipo de amilasa que actúe⁽⁴⁾.

Dependiendo de la parte de la cadena del polisacárido en donde actúen, las amilasas se pueden clasificar en dos grupos^(4, 34):

- α -amilasa (endoamilasa): Es una enzima termolábil, que puede ser estabilizada por los iones calcio. Actúan hidrolizando al azar los enlaces α -1,4-glucosídicos en el interior del sustrato (amilosa), degradando al glucógeno y al almidón para producir dextrinas de peso molecular relativamente bajo y finalmente en forma lenta producir unidades de maltosa y glucosa.
- β -amilasa (exoamilasa): Es una enzima termoestable. Actúa hidrolizando ordenadamente las unidades de amilopectina a partir de los extremos del sustrato no reductores, en los enlaces α -1,4-glucosídicos, degradando al almidón y al glucógeno para producir predominantemente maltosa.

La acción de la α -amilasa sobre la fracción de la amilosa del almidón se lleva a cabo de la siguiente manera^(4, 34):

1. Se da una degradación rápida de la amilosa produciéndose: maltosa y maltotriosa.
2. Luego una hidrólisis lenta de los oligosacáridos, formándose glucosa y maltosa.

Entre los sustratos donde la amilasa ejerce su acción están⁽³⁴⁾:

- Almidón Soluble
- Amilosa
- Maltopentosa
- Maltotriosa

Los productos que se obtienen por la actividad de la amilasa en el sustrato pueden ser^(4,34):

- Glucosa
- Maltosa
- Maltotriosa
- Maltopentosa
- Maltohexosa
- Maltoheptosa

2.2. ESTRUCTURA Y CLASIFICACION

La amilasa se clasifica como una hidrolasa glucosidasa debido a que produce una endohidrólisis de los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos de polisacáridos que contienen tres o más unidades de 1,4- α -D-glucosa⁽⁴²⁾.

Su estructura consta de 618 residuos de aminoácidos (ver en cuadro N°1 la composición en aminoácidos de la α -amilasa y ver anexo I en donde aparece su secuencia de aminoácidos)⁽⁴²⁾.

Cuadro N°1. Composición en Aminoácidos de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.

Aminoácido	Cantidad	Aminoácido	Cantidad
Isoleucina (Ile)	35	Glicina (Gly)	51
Acido Glutámico (Glu)	21	Alanina (Ala)	49
Tirosina (Tyr)	28	Treonina (Tre)	45
Valina (Val)	32	Prolina (Pro)	23
Acido Aspártico (Asp)	44	Asparagina (Asn)	54
Triptófano (Trp)	14	Serina (Ser)	55
Arginina (Arg)	24	Cistina (Cys)	1
Glutamina (Gln)	30	Fenilalanina (Phe)	20
Lisina (Lys)	30	Leucina (Leu)	36
Histidina (His)	16	Metionina (Met)	10
Total: 618 aminoácidos			

2.3. PROPIEDADES

Entre las propiedades que posee la α -amilasa de *Bacillus subtilis* se encuentran las siguientes (ver cuadro N°2)^(34, 40, 42) :

Cuadro N°2. Propiedades de α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.

Propiedad	Valor y/o especificación
Punto isoeléctrico	pH 5.0
Coefficiente de extinción, $E_{1\text{cm.}^{1\%}}$, 280 nm.	26
Peso Molecular	93000 daltons
pH óptimo	El pH óptimo de la α -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> es 7.0. Sin embargo, puede actuar en un rango amplio de pH: 6.5 – 8.0
Estabilidad	Suspensiones cristalinas de la enzima en cloruro de sodio o de calcio son estables por varios meses si se mantienen en refrigeración. También son estables por varios meses las soluciones en buffer de cloruro de sodio pH 7.0. El rango de temperatura para mantener la estabilidad de la enzima es de 20–70°C. Y para que la enzima ejerza una actividad óptima el rango de temperatura debe ser de 60 – 80°C.

Propiedad	Valor y/o especificación
Activadores	<p>El calcio es el cofactor necesario de la amilasa ya que éste activa su acción. Además le proporciona a la enzima mayor estabilidad, debido a que mantiene la configuración óptima de la molécula enzimática sin participar directamente en la formación del complejo enzima–sustrato.</p> <p>Por lo que la enzima se ve afectada con la presencia o ausencia del calcio, ya que el desprendimiento de éste en la enzima produce la pérdida total de la actividad enzimática.</p>
Compuestos que no influyen en la actividad de la enzima	<p>Existen compuestos que no influyen en la actividad de la amilasa debido a que no producen una desviación de la actividad mayor del 3%.</p> <p>Entre estos están: Ba^{2+}, Fe^{2+}, Li^+, Cs^{2+}, Co^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+} y iodoacetamida.</p>

Cuadro N°2. (Continuación)

Propiedad	Valor y/o especificación		
Inhibidores	La actividad de la amilasa se puede ver disminuida por la presencia de los siguientes elementos:		
	Elemento	Concentración	% de Inhib.
	Cu ²⁺	2.0 mg/ml	100%
	Hierro ³⁺	2.0 mg/ml	100%
	Mn ²⁺	2.0 mg/ml	100%
	Hg ²⁺	2.0 mg/ml	100%
	Zn ²⁺	2.0 mg/ml	30.3%
	Pb ²⁺	2.0 mg/ml	38.0%
	Al ³⁺	2.0 mg/ml	38.7%
	Cd ²⁺	2.0 mg/ml	43.0%
Ag ⁺	2.0 mg/ml	61.2%	
EDTA	0.1 mg/ml	61.3%	

2.4. SITIOS ACTIVOS

La interacción entre la enzima α -amilasa y el sustrato, es posible por la presencia imprescindible de iones calcio, elemento que le proporciona la estabilidad y capacidad catalítica a la enzima.

Esta enzima posee tres sitios activos⁽⁴²⁾:

Sitio 1:

Asn101 Tre137 Asp146 His180

Sitio 2:

Gly169 Asp171

Sitio 3:

Glu89 Glu276 Gly313

La reacción de hidrólisis que produce la enzima, cuando interactúan los sitios activos de ésta con el sustrato se da de la manera siguiente: Ataque nucleofílico al grupo glucosídico de la cadena del sustrato, produciéndose un rompimiento de dicho enlace. Simultáneamente se forman puentes de hidrógeno para estabilizar la molécula de glucosa (producto que resulta de la hidrólisis del almidón). Posteriormente se da la regeneración de la enzima⁽⁴²⁾.

3. CELULASA [EC 3.2.1.4] DE *Aspergillus niger*

3.1. GENERALIDADES

La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por microorganismos aeróbicos del suelo y principalmente por los hongos que degradan la madera, debido a que estos producen una enzima en su interior capaz de digerir la celulosa, por esta razón la Biotecnología se ha ocupado de aislar esta enzima a partir de estos microorganismos para poder utilizarla en la industria para la despolimerización de algunos sustratos naturales.

La celulosa es un polisacárido lineal de residuos de glucosa conectados por enlaces β -1,4. La celulosa nativa es insoluble y se encuentra como un paquete denso de fibras, con enlaces de hidrógeno; esta densidad la hace compleja y muy resistente a la degradación por medio de procesos químicos o mecánicos⁽²⁵⁾.

Las celulasas se encuentran distribuidas en la biósfera, siendo su origen bacteriano y fúngico. La reacción que esta enzima ejerce es la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en la celulosa, produciendo celobiosa, que es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace β -glucosídico; enlace que posteriormente se rompe para formar moléculas de glucosa⁽²⁴⁾.

3.2. PROPIEDADES

Entre las propiedades de la celulasa se destacan (ver cuadro N°3)⁽²³⁾:

Cuadro N°3. Propiedades de la Celulasa de *Aspergillus niger*.

Propiedad	Valor y/o especificación
Peso Molecular	30900 daltons
pH óptimo	El pH óptimo de actividad es 7.0. Sin embargo, puede actuar en el rango de pH: 3.5–5.5.
Estabilidad	Para que la enzima se encuentre estable más de 30 días reteniendo más del 50% de su actividad, se debe almacenar a una temperatura de -20°C en buffer citrato a pH 5.5 y con adición de 50% de glicerol (sustancia que previene la degradación). La actividad óptima de esta enzima se presenta entre $50-80^{\circ}\text{C}$.
Compuestos que no influyen en la actividad	Entre los compuestos que no influyen en la actividad celulolítica están: Glutación y L-cisteína a una concentración de 1.0 mg./mL.

Propiedad	Valor y/o especificación			
Inhibidores	Entre los elementos que disminuyen la actividad de la celulasa en un porcentaje mayor del 3% están:			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="570 646 699 688">Sustancia</th> <th data-bbox="764 646 954 688">Concentración</th> <th data-bbox="1008 646 1159 688">% de Inhib.</th> </tr> </thead> </table>	Sustancia	Concentración	% de Inhib.
	Sustancia	Concentración	% de Inhib.	
	Estreptomicina 0.1mg./mL. 19%			
	Viomicina 0.1 mg./mL. 59%			
	Kanamicina 0.1 mg./mL. 24%			
	EDTA 1.0 mg./mL. 18%			
	Arsenito de Sodio 1.0 mg./mL. 9%			
	Los iones Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ sólo la inhiben ligeramente.			
	Existen otros inhibidores de la celulasa como son sus mismos productos de reacción: glucosa y celobiosa. Además, se inhibe completamente por los iones: Hg^{2+} .			

CAPITULO II

METODOLOGIA EXPERIMENTAL¹

1. INMOVILIZACION DE LAS ENZIMAS, EN FORMA INDIVIDUAL (α -AMILASA Y CELULASA)^(15, 16)

1.1. PREPARACION DEL SOPORTE

- a) En una balanza, pesar 10.0 g. de agar.
- b) En un erlenmeyer de 250 mL. colocar el agar y adicionar 100.0 mL. de agua destilada.
- c) Calentar moderadamente y agitar constantemente hasta completa disolución del agar.
- d) Esterilizar la solución homogénea en autoclave a 121°C y 15 lb. de presión durante 15 minutos.
- e) Enfriar hasta una temperatura de 50°C y mantener la solución en Baño de agua.

1.2. MEZCLA ENZIMA-SOPORTE

- a) En balanza analítica pesar 400.0 mg. de enzima.
- b) Mezclar la enzima con la solución de agar a 47°C, agitando moderadamente.
- c) Mantener la mezcla en un Baño de agua a una temperatura de 45°C.

¹ La preparación de reactivos aparece en el Anexo II. Y material, equipo y reactivos en el Anexo III

1.3. ATRAPAMIENTO Y MOLDEO DE LA ENZIMA

- a) En un beaker de 500 mL. colocar una cantidad suficiente de agua destilada estéril y llevarla hasta una temperatura de 5°C.
- b) Llenar una jeringa de 60 cc. con la mezcla enzima–soporte y dejar caer la mezcla bajo presión gota por gota, de manera que éstas caigan sobre el agua destilada estéril (5°C).
- c) Retirar la enzima inmovilizada del agua, lavarla y obtener el peso total.
- d) Almacenar la enzima inmovilizada en una solución de agua destilada estéril a 10°C.

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS EN SUS FORMAS LIBRES E INMOVILIZADAS²

2.1. ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS⁽⁴⁾

Para el análisis de la actividad amilolítica en función del pH es necesario:

- a) Preparar soluciones buffer acetato 0.1 N a los siguientes pH: 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0.
- b) Ajustar la solución de almidón (sustrato) y la solución de la enzima a pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0 con ayuda de las diferentes soluciones buffer.

² Para determinar la actividad de las enzimas a diferentes pH se llevará a cabo la calibración del pHmetro utilizando los buffers de referencia de pH 4, 7 y 9 antes de cada determinación.

- c) Determinar la actividad óptima realizando el Método de Lugol a los pH siguientes: 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0. Manteniendo como temperatura constante, la temperatura ambiente (30–35°C).

Para la evaluación de la influencia de la temperatura sobre la actividad amilolítica, la cuantificación de la actividad se realiza a las temperaturas siguientes: 20°C, 25°C, 30°C, 40°C y 50°C; utilizando el buffer acetato del pH óptimo obtenido experimentalmente, para ajustar el pH de la solución del sustrato y de la solución enzimática.

Para la cuantificación de la actividad enzimática de las amilasas se utiliza el Método de Lugol, que se basa en el rompimiento de las moléculas de almidón debido a la hidrólisis de los enlaces 1,4- α -glucosídicos, produciendo dextrinas de peso molecular relativamente bajo, licuando por lo tanto el almidón y destruyendo su capacidad de dar coloración con el yodo.

Con este método se cuantifica la actividad amilolítica en forma indirecta, ya que se determinan los miligramos de almidón hidrolizados, los cuales son calculados por medio de la ecuación que aparece a continuación.

Para enzima libre:

$$\text{Miligramos de almidón hidrolizado} = \frac{AO (A \text{ tubo P} - A \text{ tubo AL-1})}{A \text{ tubo P}}$$

En donde:

AO: miligramos de almidón original

A tubo AL-1: Absorbancia en tubo AL-1

A tubo P: Absorbancia en tubo P (patrón sin enzima)

Para enzima inmovilizada:

$$\text{Miligramos de almidón hidrolizado} = \frac{\text{AO} (\text{A tubo P} - \text{A tubo AI-1})}{\text{A tubo P}}$$

En donde:

AO: miligramos de almidón original

A tubo AI-1: Absorbancia en tubo AI-1

A tubo P: Absorbancia en tubo P (patrón sin enzima)

Tubo B: Tubo blanco de reactivos

Desarrollo del Método de Lugol:

- a) Preparar una solución patrón de almidón al 1%, en buffer acetato 0.1 N y preparar una solución de cloruro de calcio 0.5 M.
- b) Etiquetar 8 tubos de ensayo de la siguiente manera: AL-1, AL-2, AL-3, AI-1, AI-2, AI-3, P y B.
- c) Adicionar en cada uno de los tubos AL-1, AL-2 y AL-3, 5.0 mL. de solución de

almidón al 1%, 3.9 mL. de buffer acetato 0.1 N, 1.0 mL. de cloruro de calcio 0.5 M y 1.0 mL. de la solución de amilasa libre.

- d) A cada uno de los tubos AI-1, AI-2 y AI-3, agregar 5.0 mL. de solución de almidón al 1%, 3.9 mL. de buffer acetato 0.1 N, 1.0 mL. de cloruro de calcio 0.5 M. y una cantidad de enzima inmovilizada (exactamente pesada) equivalente a 1.0 mL. de la solución de amilasa libre.
- e) Agitar y dejar reposar los tubos AL-1, AL-2, AL-3, AI-1, AI-2 y AI-3 por 15 minutos.
- f) Agregar a dichos tubos 2.0 mL de ácido clorhídrico 1N.
- g) En el tubo P (sin enzima) adicionar: 5.0 mL. de solución de almidón al 1%, 3.9 mL. de solución buffer acetato 0.1 N, 1.0 mL. de solución de cloruro de calcio 0.5 M y 2.0 mL. ácido clorhídrico 1.0 N.
- h) Mezclar y tomar por separado una alícuota de 1.0 mL. de cada tubo (excepto del tubo B) y adicionarlo a 7 balones volumétricos diferentes de 50 mL. (estos deben estar rotulados igual que los tubos).
- i) Adicionar a cada balón 0.5 mL. de ácido clorhídrico 0.1 N y 0.1 mL de Lugol.
- j) Aforar con agua destilada.
- k) Al tubo B, el cual será el blanco, se le adicionará solamente 9.0 mL. de buffer de acetato 0.1 N y 1.0 mL. de solución de cloruro de calcio 0.5 M.
- l) Leer las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

2.2. ENSAYO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD CELULOLITICA A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS

Para el análisis de la actividad celulolítica en función del pH se necesita:

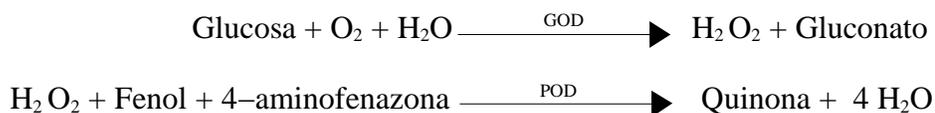
- a) Preparar soluciones buffer citrato 0.05 M de pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0.
- b) Ajustar la solución patrón de hidroxietilcelulosa al 1% y la solución de la enzima a pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 con ayuda de las soluciones buffer.
- c) Determinar el pH óptimo de actividad, realizando la cuantificación de la actividad celulolítica a los pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0.

La determinación de la actividad celulolítica en función de la temperatura se efectúa cuantificando la actividad a las siguientes temperaturas: 20°C, 30°C, 40°C, 50°C y 60°C, utilizando el buffer citrato de pH óptimo obtenido experimentalmente, para ajustar el pH de la solución enzimática y la solución del sustrato.

El fundamento para determinar la actividad celulolítica se basa en poner en contacto la enzima con el sustrato, por cierto tiempo, para que luego de esta interacción (reacción enzima-sustrato), se lleve a cabo la cuantificación de la glucosa producida por medio del test enzimático-colorimétrico GOD-PAP, para determinar así, la actividad de la enzima.

En el test enzimático–colorimétrico GOD–PAP la glucosa es determinada luego de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. En dicha reacción se forma peróxido de hidrógeno, el cual reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4–aminofenazona, formando un complejo rojo–violeta (quinona) como indicador de que se ha efectuado la reacción.

Las reacciones que se verifican durante el procedimiento son las siguientes:



En donde:

GOD: Glucosa oxidasa

POD: Peroxidasa

La actividad celulolítica no es posible expresarla en términos de porcentaje, por dos razones: la primera es que el producto aunque especifica su grado de pureza, 0.2 U/mg. (en donde una U corresponde a la cantidad de enzima que libera 1.0 μmol . de glucosa de la celulosa por minuto) no especifica que cantidad de celulosa se debe colocar como sustrato; no pudiéndose relacionar este sustrato con la cantidad de producto (glucosa) que se forma. Y la segunda es que la celulosa por ser un polímero no se puede determinar su peso molecular, ya

que no se conoce con exactitud de cuantas moléculas de glucosa está formada. La bibliografía consultada sólo reporta que está formada por "n" moléculas de glucosa.

Por lo que la actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* se expresa en términos de la cantidad (en miligramos) de glucosa que se forma por mililitro de muestra.

Para calcular la cantidad de glucosa que se ha formado por la actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* se hace el cálculo que aparece a continuación:

$$\text{mg. glucosa formados por mL.} = \frac{A \text{ muestra} \times \text{Conc. estándar}}{A \text{ estándar}}$$

En donde:

A muestra: Absorbancia de la muestra

Conc. estándar: Concentración del estándar (1.0 mg./mL.)

A estándar: Absorbancia del estándar

Proceso para Cuantificar la Actividad Enzimática de la Celulosa:

- a) Etiquetar 6 tubos de ensayo de la siguiente manera: CL-1, CL-2, CL-3, CI-1 y CI-2 y CI-3.
- b) Adicionar en cada tubo 2.0 mL. de solución de hidroxietilcelulosa al 1%.

- c) Adicionar a los tubos CL-1, CL-2 y CL-3 1.0 mL de solución de celulasa libre, y a los tubos CI-1, CI-2 y CI-3 agregarles la cantidad de celulasa inmovilizada (exactamente pesada) equivalente a 1.0 mL de solución de celulasa libre.
- d) Agitar los tubos y dejar reposar por 2 horas a la temperatura que se esté analizando.
- e) Colocar los tubos a ebullición (en Baño María) por 10 minutos.
- f) Dejar enfriar los tubos.
- g) Rotular 6 tubos de hemólisis como CL-1, CL-2, CL-3, CI-1, CI-2 y CI-3, un tubo con una B (éste será el blanco del reactivo) y uno con una S (éste será el estándar de glucosa).
- h) Añadir en cada uno de los tubos de hemólisis 1.0 mL. de reactivo (que contiene buffer TRIS pH 7.4, fenol, glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona).
- i) Colocar dichos tubos en Baño de Agua a una temperatura de 37°C.
- j) Posteriormente a los tubos de hemólisis CL-1, CL-2, CL-3, CI-1, CI-2 y CI-3 colocarles 10 µL. del contenido de los tubos de ensayo rotulados de igual forma en el literal a). Y al tubo S añadirle 10 µL. de estándar de glucosa (1.0 mg./mL.).
- k) Mezclar e incubar los tubos (incluyendo el blanco) durante 10 minutos a 37°C.
- l) Leer las absorbancias a una longitud de onda de 505 nm. en espectrofotómetro UV-Vis. Es necesario realizar las lecturas de las absorbancias en los 30 minutos siguientes, ya que la coloración se mantiene estable sólo durante este tiempo.

3. DETERMINACION DEL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE CADA UNA DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS^(7,13).

Montar un bioreactor por lote (o de flujo discontinuo) y un bioreactor de flujo continuo a las condiciones óptimas de temperatura y pH obtenidas de manera experimental (en base los numerales 2.2 y 2.4). Para determinar así, el tipo de bioreactor que optimiza la reacción, proporcionando mayor rendimiento en la actividad de cada una de las enzimas inmovilizadas.

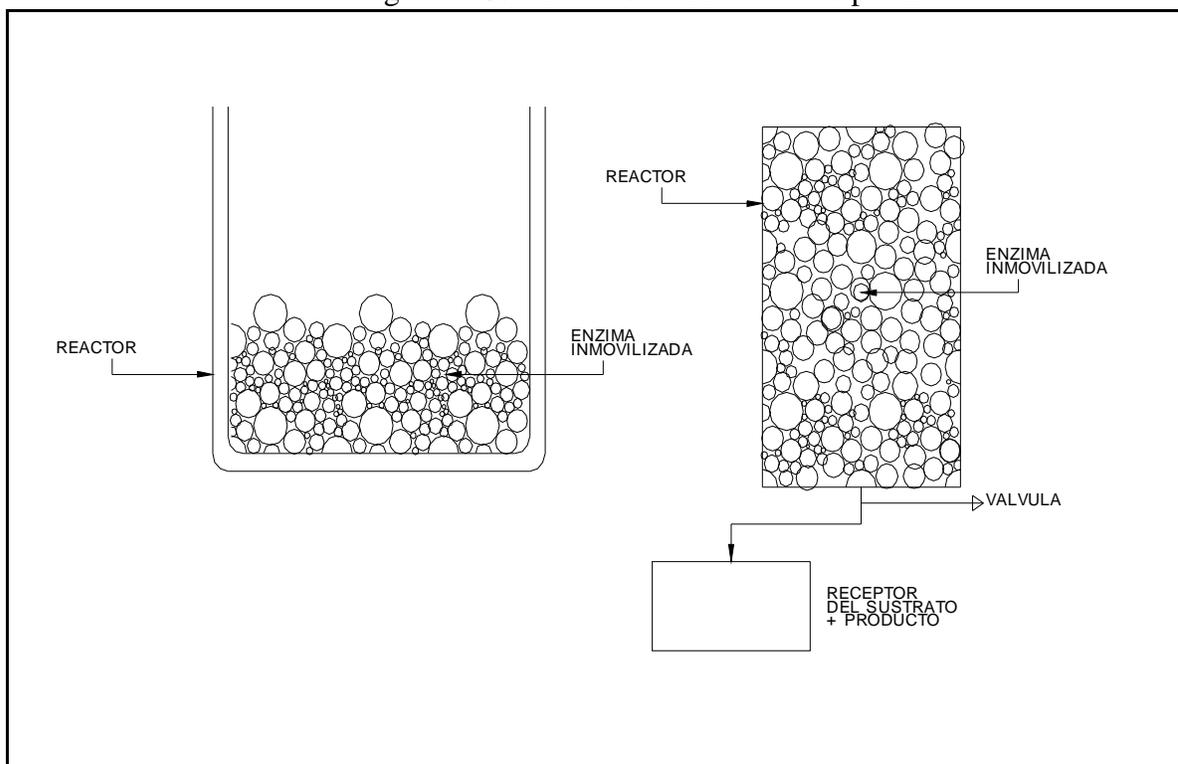
3.1. ENSAYO PARA DETERMINAR EL TIEMPO DE ACTIVIDAD, UTILIZANDO EL BIOREACTOR ENZIMATICO DEL INMOVILIZADO A FLUJO DISCONTINUO DEL SUSTRATO (O BIOREACTOR POR LOTE)

- a) Montar el bioreactor que aparece en la figura N°3 (utilizar como bioreactor de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* una columna de vidrio y un vaso de precipitado para la celulasa de *Aspergillus niger*).
- b) Colocar la solución de sustrato de concentración conocida dentro el bioreactor que contiene la enzima inmovilizada.
- c) Suspender la reacción a los 30 minutos en el caso de la α -amilasa de *Bacillus*

subtilis o cada hora si se trata de la celulasa de *Aspergillus niger*; esto se hace separando las enzimas inmovilizadas de la muestra (parte líquida). A la muestra, realizarle el método correspondiente (según la enzima), para determinar la actividad.

- d) Posteriormente lavar las enzimas inmovilizadas con agua destilada estéril y colocarlas nuevamente en el bioreactor.
- e) Repetir el procedimiento seguido en el literal b y c hasta que ya no exista actividad en el bioreactor.

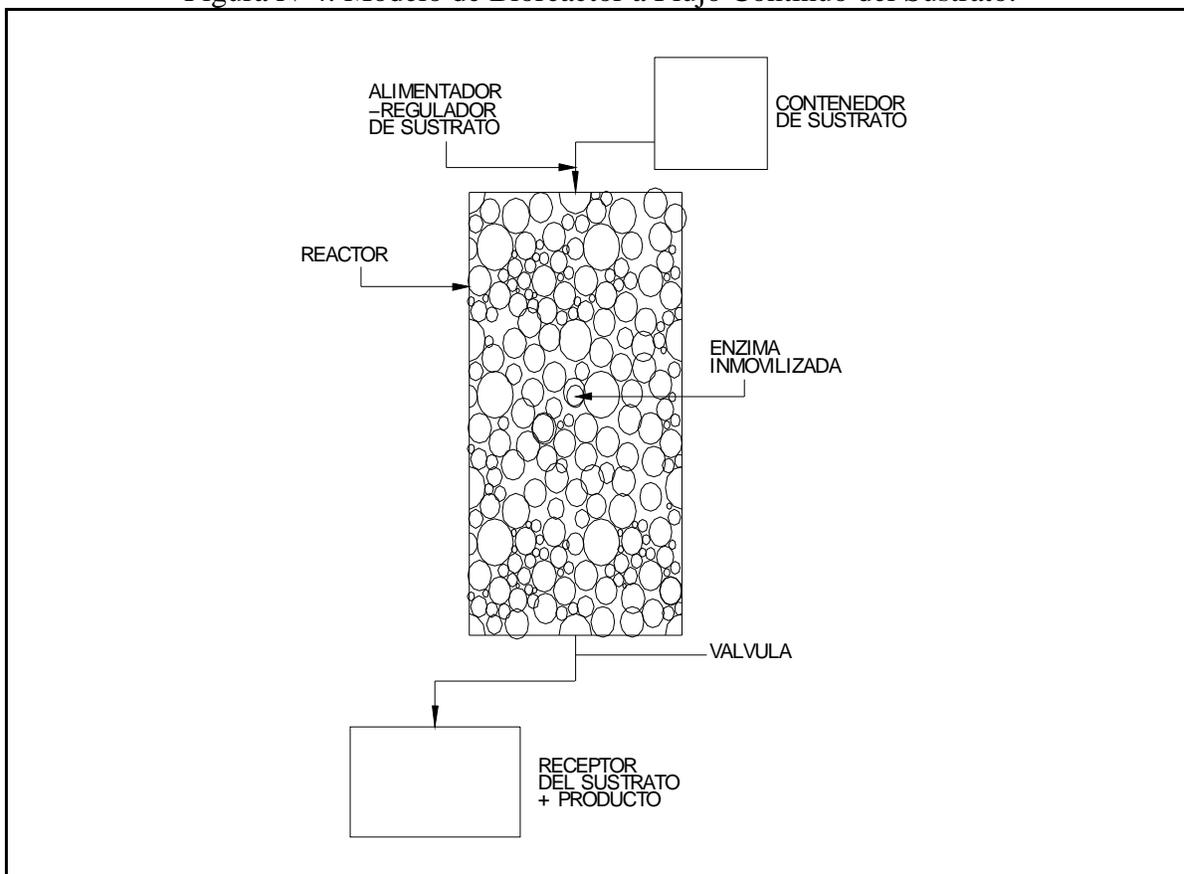
Figura N°3. Modelos de Bioreactores por Lote.



3.2. ENSAYO PARA DETERMINAR EL TIEMPO DE ACTIVIDAD, UTILIZANDO EL BIOREACTOR ENZIMÁTICO DEL INMOVILIZADO A FLUJO CONTINUO DEL SUSTRATO

- a) Montar el bioreactor que aparece en la figura N°4.
- b) Antes del tratamiento enzimático colocar en el depósito con regulador de flujo, una solución de sustrato de concentración conocida.
- c) Regular el flujo a una velocidad de 6–7 gotas (equivalentes a 0.30–0.35 mL.) por minuto.
- d) Regular el flujo, hacer pasar la solución de sustrato a través de la columna empacada de forma continua. Añadiendo más sustrato al depósito contenedor, cuando sea necesario.
- e) Tomar muestras del líquido efluente cada 3 horas hasta que no exista actividad. Realizar a cada una de las muestras el método correspondiente (según la enzima), para determinar la actividad.

Figura N°4. Modelo de Bioreactor a Flujo Continuo del Sustrato.



3.3. ESPECIFICACIONES PARA EL MONTAJE DE LOS BIOREACTORES ENZIMATICOS A FLUJO DISCONTINUO Y CONTINUO DEL SUSTRATO PARA LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis* Y PARA LA CELULASA DE *Aspergillus niger*

Para el montaje de los bioreactores de las enzimas inmobilizadas es necesario tener en cuenta ciertas especificaciones que son esenciales para la actividad enzimática y por tanto para el funcionamiento de los bioreactores.

Entre las especificaciones que dependen del tipo de enzima y de su especificidad tenemos la del sustrato (ver cuadro N°4):

Cuadro N°4 . Especificaciones del Sustrato para el montaje de los Bioreactores Enzimáticos.

SUSTRATO	
α-AMILASA DE <i>Bacillus subtilis</i>	CELULASA DE <i>Aspergillus Niger</i>
Compuesto por una solución de almidón de concentración conocida, buffer acetato de pH óptimo determinado experimentalmente y cloruro de calcio 0.5 M	Solución de hidroxietilcelulosa de concentración conocida ajustada al pH óptimo determinado experimentalmente con buffer citrato
La solución de almidón debe tener el valor de pH óptimo obtenido experimentalmente	El sustrato debe tener fluidez para permitir su completa distribución dentro del bioreactor
Homogenizar la solución de sustrato al adicionarla dentro del depósito contenedor de sustrato del bioreactor continuo	Homogenizar la solución de sustrato al adicionarla dentro del depósito contenedor de sustrato del bioreactor continuo

Otras especificaciones (ver cuadro N°5) que deben tomarse en cuenta en el momento de montar los bioreactores, y que son independientes del tipo de enzima inmovilizada (con las que se está trabajando) son:

Cuadro N°5. Especificaciones Generales (Enzimas y Bioreactores) para el montaje de los Bioreactores Enzimáticos.

ENZIMA	BIOREACTOR
Debe lavarse después de su uso con agua destilada estéril	Deben conocerse las dimensiones: altura y diámetro del bioreactor
Almacenarse a una temperatura de 4–10°C en solución de cloruro de calcio 0.05 M. Para poder ser reutilizada	Lavar el bioreactor después de su uso
Debe colocarse una cantidad conocida de enzima dentro del bioreactor	Para el monitoreo de la efectividad del bioreactor deben tomarse muestras de sustrato de concentración conocida
Debe tener brillo, consistencia sólida y sin presencia de sustancias extrañas u hongos	Debe conocerse la altura generada por la enzima inmovilizada dentro del bioreactor

4. APLICACION DEL PREPARADO EN AGUAS RESIDUALES

La actividad del preparado enzimático se verifica analizando muestras de agua que contengan almidón y celulosa. La actividad es determinada por la cantidad de sustrato o producto (almidón en el caso de la α -amilasa y glucosa en el de la celulosa) que contiene la muestra antes de ser sometida al tratamiento y después de ser tratada con el producto enzimático. Para lo que se realiza la medición de la actividad enzimática de la siguiente manera:

- a) Tomar una muestra no tratada enzimáticamente y realizar ensayo para la cuantificación de la actividad. Esto para determinar la cantidad de almidón o celulosa que contiene la muestra al inicio.
- b) Tratar el agua residual a través del bioreactor considerado como óptimo (según los resultados obtenidos en el numeral 3 de este capítulo).
- c) Tomar un volumen determinado de la muestra ya tratada por el preparado enzimático (el necesario para llevar a cabo el análisis).
- d) A la muestra de agua realizarle las pruebas de actividad enzimática según la enzima que se esté analizando, para corroborar si el proceso ha sido efectivo.

5. DETERMINACION DE LA FORMA DE PRESENTACION DEL PREPARADO ENZIMATICO

En esta parte se monitorean 2 parámetros que permiten determinar la forma de presentación idónea del preparado enzimático.

5.1. ALMACENAMIENTO DEL PREPARADO: EN SECO O HUMEDO

Para poder responder a esta pregunta es necesario evaluar la actividad de cada una de las enzimas inmovilizadas de forma individual de la siguiente forma:

- a) Rotular 2 recipientes plásticos así: "Recipiente 1: Preparado enzimático (con el respectivo nombre de la enzima según sea el caso, α -amilasa de *Bacillus subtilis* o celulasa de *Aspergillus niger*) almacenado en seco"; y "Recipiente 2: Preparado enzimático (también con el nombre de la enzima correspondiente) almacenado en húmedo".
- b) Posteriormente colocar en cada uno de los recipientes cantidades iguales del preparado inmovilizado.
- c) El recipiente 1 cerrarlo bien y mantenerlo en refrigeración.
- d) Al recipiente 2 añadirle cloruro de calcio 0.05 M (si se trata de la α -amilasa de

Bacillus subtilis). Y si se trata de celulasa de *Aspergillus niger*, añadir una solución de buffer citrato (de pH óptimo encontrado experimentalmente) con glicerol (1:1). Se agrega la cantidad necesaria, de manera que el preparado quede totalmente sumergido en la solución. Cerrar bien el recipiente y mantenerlo refrigerado.

- e) Luego, cada 7 días tomar las muestras necesarias de los recipientes y efectuar el ensayo correspondiente, para determinar la actividad de cada una de las enzimas inmovilizadas.

5.2. EFECTIVIDAD DEL PREPARADO AL ESTAR LAS ENZIMAS EN FORMA INDIVIDUAL O MEZCLADAS

Para determinar la efectividad del preparado en una forma de presentación en donde las enzimas estén en forma individual o mezcladas deben realizarse ensayos para definir qué condiciones de trabajo son favorables para tener un alto rendimiento de actividad en ambas enzimas.

La determinación de la actividad del preparado en su forma de presentación individual se lleva a cabo realizando el siguiente procedimiento:

1. Colocar en el bioreactor (columna de vidrio o vaso de precipitado) una cantidad conocida de la enzima que se esté analizando (α -amilasa o celulasa).
2. Añadir una cantidad de sustrato de concentración conocida al bioreactor.
3. Realizar el ensayo correspondiente para determinar la actividad.

Y en el caso de que las enzimas estén en forma mezclada la determinación de la actividad se realizará de la siguiente manera:

1. Colocar en el bioreactor una cantidad exactamente pesada de enzima inmovilizada (50% de α -amilasa de *Bacillus subtilis* y 50% de Celulasa de *Aspergillus niger*).
2. Medir la altura y el diámetro del bioreactor, así también la altura generada por el preparado enzimático.
3. Colocar en el bioreactor una cantidad de solución de sustrato (almidón 5%, buffer y cloruro de calcio 0.5 M) a pH 7.0 (pH óptimo experimental ajustado con buffer acetato pH 7.0) suficiente para cubrir toda la mezcla de enzima. Dejar que la enzima α -amilasa de *Bacillus subtilis* actúe 1 hora y proceder a cuantificar la actividad de

- dicha enzima. Lavar el bioreactor con agua destilada estéril.
4. Cubrir el bioreactor enzimático con un volumen conocido de hidroxietilcelulosa al 0.5% a pH 6.0 (pH óptimo experimental ajustado con buffer citrato pH 6.0). Dejar que la enzima celulasa de *Aspergillus niger* ejerza su acción por 1 hora. Tomar muestra y realizarle el ensayo de cuantificación de actividad correspondiente.
 5. Adicionar sustrato combinado, de almidón y celulosa (50:50) ajustado a pH 7.0 con buffer acetato pH 7.0 hasta que cubra la mezcla enzimática. Dejar actuar por una hora y luego tomar la cantidad de muestra necesaria para realizar la cuantificación de la actividad de cada enzima.
 6. Añadir sustrato compuesto por una mezcla de almidón y celulosa (50:50) ajustada a pH 6.0 con buffer citrato de dicho pH. Dejar actuar las enzimas por 1 hora y luego realizar el procedimiento de cuantificación de la actividad de ambas enzimas.

CAPITULO III

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

1. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

1.1. PREPARACION DEL SOPORTE

En la parte experimental se especifica que en el proceso de inmovilización el porcentaje al que debía utilizarse el agar-agar era al 10%. Sin embargo, se modificó al 6% debido a que en el proceso de elaboración del agar-agar se dificultaba la manipulación de éste.

Para determinar el porcentaje óptimo para la elaboración del soporte (agar-agar) se prepararon soluciones al 6, 8 y 10%.

A un porcentaje del 8 y 10% de agar-agar no había una disolución completa del agar, lo cual afectaba características deseables en el soporte, como son la homogeneidad y la fluidez.

En cambio, a un porcentaje del 6% se lograba la homogeneidad y la fluidez a una temperatura entre 65–70°C (temperatura que se requería al momento de llevar a cabo el proceso de inmovilización). Así también, se logra la consistencia sólida óptima para conservar la integridad de la enzima luego de ser inmovilizada.

1.2. ATRAPAMIENTO Y MOLDEO DE LA ENZIMA

Para llevar a cabo el proceso de atrapamiento y moldeo de la enzima se realizaron ensayos con jeringas de diferente capacidad (60cc., 10cc., 5cc, 3cc. y 1cc.). Con la jeringa de 1cc. es con la que se obtiene forma de gota y un tamaño aproximado de 3.0 mm. de diámetro (ver fotos N° 1 y 2); confiriéndole al preparado inmovilizado una mayor superficie de contacto, lo cual es esencial en la formación del complejo enzima–sustrato, para que la actividad de la enzima inmovilizada se lleve a cabo con eficiencia.

Fotos N° 1 y 2. Preparado Enzimático Inmovilizado.



Luego de ser inmovilizadas las enzimas individualmente, se hizo una separación del preparado según el monitoreo de almacenamiento (en seco o húmedo) al cual serían sometidas posteriormente.

La α -amilasa de *Bacillus subtilis* se almacenó en una solución de cloruro de calcio 0.05M, pues los iones calcio presentes, por ser activadores, son necesarios para que la enzima ejerza su actividad catalítica.

La celulasa de *Aspergillus niger* se almacenó en una solución de buffer citrato pH 6.0 y glicerol (1:1). Debido a que el pH 6.0 que le proporciona el buffer citrato es el óptimo (esto se determinó experimentalmente) y el glicerol estabiliza la solución y previene la degradación de la enzima.

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis* EN SUS FORMAS LIBRE E INMOVILIZADA

2.1. ACTIVIDAD AMILOLITICA EN FUNCION DEL pH

En la determinación de la actividad amilolítica en función del pH se plantean las hipótesis siguientes:

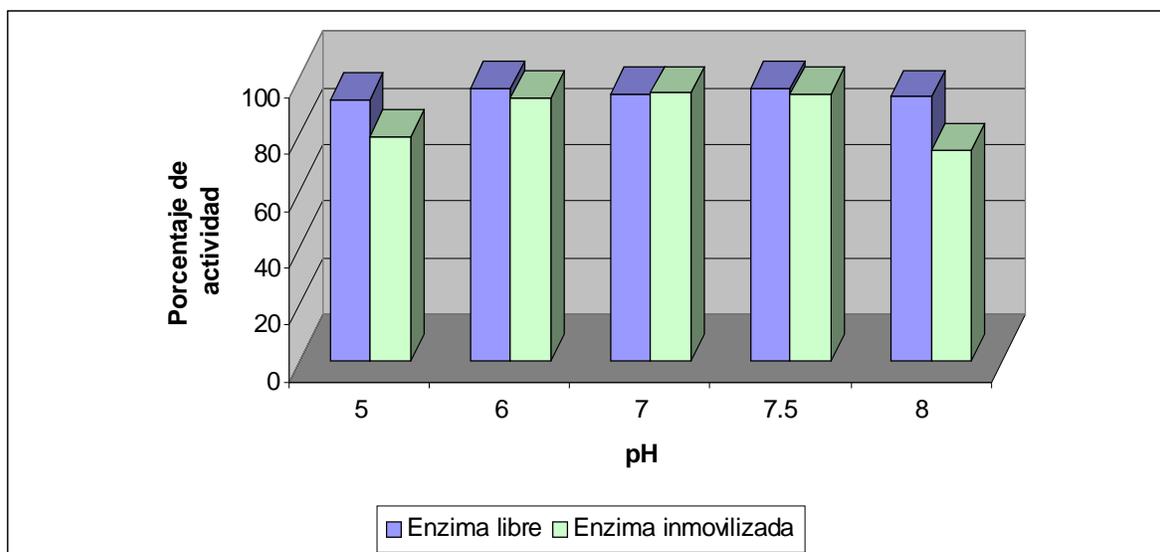
H₀: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

H₁: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

Tabla N°1. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente).

pH	Enzima Libre		Enzima Inmovilizada	
	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)
5.0	46,23	92.46	39.71	79.42
6.0	48.24	96.48	46.43	92.86
7.0	47.20	94.40	47.36	94.72
7.5	48.33	96,66	47.07	94.14
8.0	46.67	93.34	37.26	74,52

Gráfico N° 7. Actividad de la Enzima α - Amilasa de *Bacillus subtilis* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente).



En la tabla N°1 y gráfico N°7 aparecen los resultados de la actividad de la enzima libre e inmovilizada a diferentes pH a temperatura ambiente (30–35°C) observándose que:

- La actividad de la α -amilasa inmovilizada se ve favorecida en un pH neutro (igual valor que el pH óptimo teórico para dicha enzima en su forma libre). Mientras que la α -amilasa en forma libre presenta mayor actividad si el pH se desplaza hacia la basicidad, a un valor de 7.5.
- Los cambios de pH afectan la actividad tanto de la enzima libre como inmovilizada. Siendo más susceptible a estos cambios, la enzima inmovilizada, por lo que en el gráfico muestra una tendencia en forma de campana, restringiendo su actividad a un rango de pH entre 6.0–7.5 (con actividad mayor del 90%). En cambio la α -amilasa en forma libre presenta un porcentaje de actividad aceptable (mayor del 90%) en un rango de pH más amplio, entre 5.0–8.0.
- Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

2.2. ACTIVIDAD AMILOLITICA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

En la determinación de la actividad amilolítica fue necesario ampliar el rango de temperatura de análisis hasta 80°C (ver tabla N°2), ya que la mayor actividad de la enzima

inmovilizada se presentaba en el límite superior de temperatura especificado en la parte experimental (50°C), con lo cual no era posible determinar la tendencia de actividad de la enzima, en función de esta variable.

En la determinación de la actividad amilolítica en función de la temperatura se plantean las hipótesis siguientes:

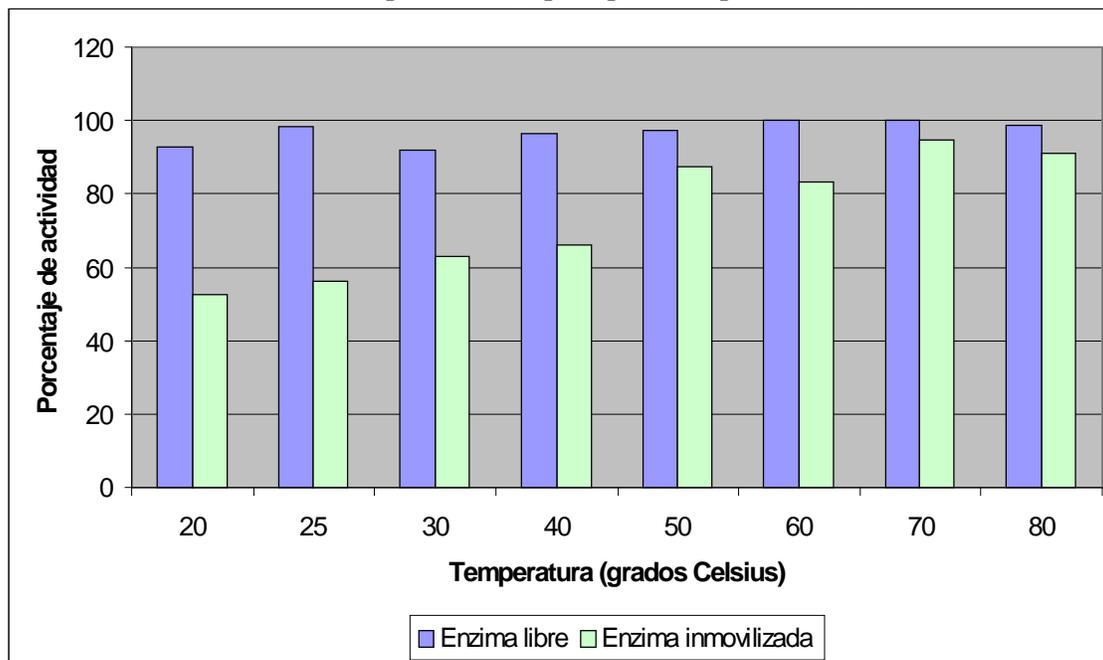
H₀: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

H₁: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

Tabla N°2. Actividad Enzimática de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Libre e Inmovilizada a diferentes Temperaturas (a pH óptimo experimental).

Temperatura	Enzima Libre		Enzima Inmovilizada	
	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)
20°C	46.05	92.98	26.28	52.56
25°C	49.12	98.24	28.16	56.32
30°C	46.05	92.10	31.49	62.98
40°C	48.24	96.48	33.05	66.10
50°C	48.68	97.37	43.68	87.36
60°C	50.00	100.00	41.61	83.22
70°C	50	100.00	47.25	94,5
80°C	49.34	98.68	45.46	90.92

Gráfico N°8. Actividad Enzimática de α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Libre e Inmovilizada a diferentes Temperaturas (a pH óptimo experimental).



En la tabla N°2 y gráfico N°8, en donde aparecen los resultados de la actividad de la enzima libre e inmovilizada a diferentes temperaturas, a un pH constante de 7.0 (pH óptimo determinado experimentalmente para la α -amilasa inmovilizada), se observa que:

- La α -amilasa en forma libre tiene un amplio margen de trabajo en cuanto a temperatura se refiere, pudiendo trabajar desde 20–80°C sin correr el riesgo de cambios significativos en la actividad enzimática. Considerando como temperatura óptima la de 25°C, en la cual se alcanza el 98.24% de actividad.
- A pesar de que se alcance una actividad del 100% a una temperatura entre los 60–

70°C debe valorarse la relación actividad–gasto de energía al poner en funcionamiento a la enzima libre en este rango de temperatura.

- La α -amilasa inmovilizada no puede actuar en un rango de temperaturas, pues su actividad disminuye considerablemente de una temperatura a otra. Considerándose un punto crítico, mantener como temperatura óptima de trabajo 50°C (alcanzando un 87.36% de actividad); aunque los porcentajes de actividad obtenidos a las temperaturas de 70°C y 80°C son más altos, no son tomados en cuenta, debido a que a estas temperaturas se pierde la integridad del preparado (se funde el agar–agar).
- La actividad de la enzima inmovilizada es menor en todas las temperaturas ensayadas si se compara con la enzima libre.
- Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

3. DETERMINACION DEL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis* EN DIFERENTES SISTEMAS DE REACCION (BIOREACTORES POR LOTE Y CONTINUO)

Para determinar la actividad de los bioreactores todas las pruebas y análisis realizados se efectuaron por triplicado. Es de tomar en cuenta que en las tablas aparecen los promedios de los datos obtenidos.

Los bioreactores se hicieron funcionar a temperatura ambiente, debido a que las condiciones del laboratorio y la configuración de los bioreactores no permitía trabajar con las temperaturas óptimas encontradas experimentalmente.

Al sustrato (almidón 5%) fue necesario adicionarle buffer acetato pH 7.0 y cloruro de calcio 0.5 M. Con la solución buffer se creaba el ambiente óptimo para que se produjera la hidrólisis y los iones calcio presentes mantenían activos los sitios activos de la enzima.

3.1. REACTOR ENZIMATICO POR LOTE PARA LA α -AMILASA de *Bacillus subtilis*

Fue necesario determinar el tiempo de reacción en que la enzima es capaz de hidrolizar todo el sustrato (almidón), por lo que el bioreactor se hizo funcionar a diferentes tiempos de reacción (ver tabla N°3).

Tabla N°3. Determinación del Tiempo Optimo de Reacción de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis* en el Bioreactor por Lote.

N° de Prueba	Tiempo de Funcionamiento del Bioreactor (minutos)	Porcentaje de Actividad (%)
1	15	92.98
2	30	100.00

Determinándose que el tiempo óptimo de funcionamiento del bioreactor para que la reacción enzima–sustrato se lleve a cabo de forma completa es de 30 minutos.

La cantidad de mezcla de sustrato adicionada al bioreactor cada vez que se realizaba un análisis era de 30.0 mL. (que contenían 750 mg. de almidón); cantidad determinada como ideal para que todo el preparado enzimático estuviera en contacto directo con la mezcla de sustrato, de manera que la actividad disminuyera de igual manera en toda la enzima presente en el bioreactor.

Las características del bioreactor por lote de la α -amilasa después de su montaje eran las siguientes (ver cuadro N°6 y foto N°3):

Cuadro N°6. Características del Bioreactor por Lote de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.

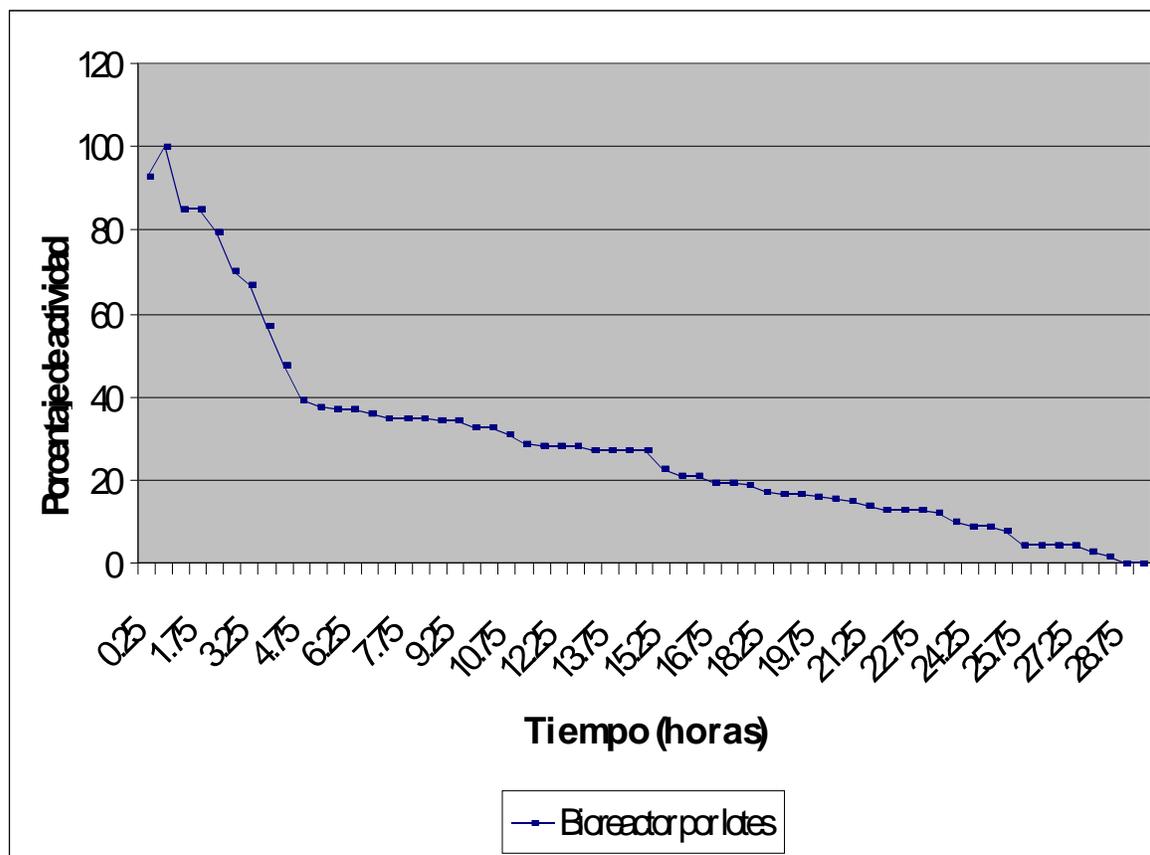
CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR POR LOTE
<ul style="list-style-type: none">• Altura de la columna de vidrio: 29.00 cm.• Diámetro de la columna de vidrio: 2.30 cm.• Cantidad de enzima presente: 0.1684 g.• Altura del preparado dentro del bioreactor: 23.00 cm.

Foto N°3. Bioreactor por Lote de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.Tabla N°4. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* en Bioreactor por Lote.

N° de muestra	Tiempo (horas)	Miligramos de Almidón Hidrolizados	Porcentaje de Actividad (%)
1	0.25	697.37	92.98
2	0.75	750.00	100.00
3	1.25	638.16	85.09
4	1.75	638.17	85.09
5	2.25	598.69	79.83
6	2.75	526.31	70.17
7	3.25	500.00	66.67
8	3.75	427.63	57.02
9	4.25	355.26	47.37
10	4.75	296.05	39.47
11	5.25	282.90	37.72
12	5.75	276.32	36.84
13	6.25	276.32	36.84

N° de muestra	Tiempo (horas)	Miligramos de Almidón Hidrolizados	Porcentaje de Actividad (%)
14	6.75	269.74	35.97
15	7.25	263.16	35.09
16	7.75	263.16	35.09
17	8.25	263.16	35.09
18	8.75	256.58	34.21
19	9.25	256.58	34.21
20	9.75	243.42	32.46
21	10.25	243.42	32.46
22	10.75	230.26	30.70
23	11.25	217.11	28.95
24	11.75	210.52	28.07
25	12.25	210.53	28.07
26	12.75	210.53	28.07
27	13.25	203.95	27.19
28	13.75	203.95	27.19
29	14.25	203.95	27.19
30	14.75	203.95	27.19
31	15.25	171.05	22.81
32	15.75	157.89	21.05
33	16.25	157,89	21.05
34	16.75	145.00	19.33
35	17.25	144.74	19.30
36	17.75	140.00	18.67
37	18.25	130.00	17.33
38	18.75	125.00	16.67
39	19.25	125.00	16.67
40	19.75	118.42	15.79
41	20.25	115.00	15.33
42	20.75	110.00	14.67
43	21.25	105.26	14,03
44	21.75	95.00	12.67

N° de muestra	Tiempo (horas)	Miligramos de Almidón Hidrolizados	Porcentaje de Actividad (%)
45	22.25	95.00	12.67
46	22.75	95.00	12.67
47	23.25	90.00	12.00
48	23.75	75.00	10.00
49	24.25	65.79	8.77
50	24.75	65.79	8.77
51	25.25	59.21	7.89
52	25.75	35.00	4.67
53	26.25	32.89	4.39
54	26.75	32.89	4.39
55	27.25	32.89	4.39
56	27.75	19.74	2.63
57	28.25	13.16	1.75
58	28.75	0.00	0.00
59	29.25	0.00	0.00

Gráfico N°9. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* en Bioreactor por Lotes.

La cantidad total de almidón adicionados en el bioreactor para ser hidrolizados fue de 42.75 g. Siendo hidrolizados 13.01 g. de almidón (cantidad significativa considerando que la cantidad de enzima presente en el bioreactor era de 0.1684 g.) en un tiempo de 28 horas con 15 minutos (como se observa en la tabla N°4 y gráfico N°9).

3.2. REACTOR ENZIMATICO CONTINUO PARA LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis*

En este tipo de bioreactor, al suministrar por goteo la mezcla de sustrato, ésta no se distribuye de manera uniforme en el preparado enzimático, ocasionando una pérdida de la actividad de forma heterogénea.

Las características del bioreactor continuo de la α -amilasa después de su montaje eran las siguientes (ver cuadro N°7 y foto N°4):

Cuadro N°7. Características del Bioreactor Continuo de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.

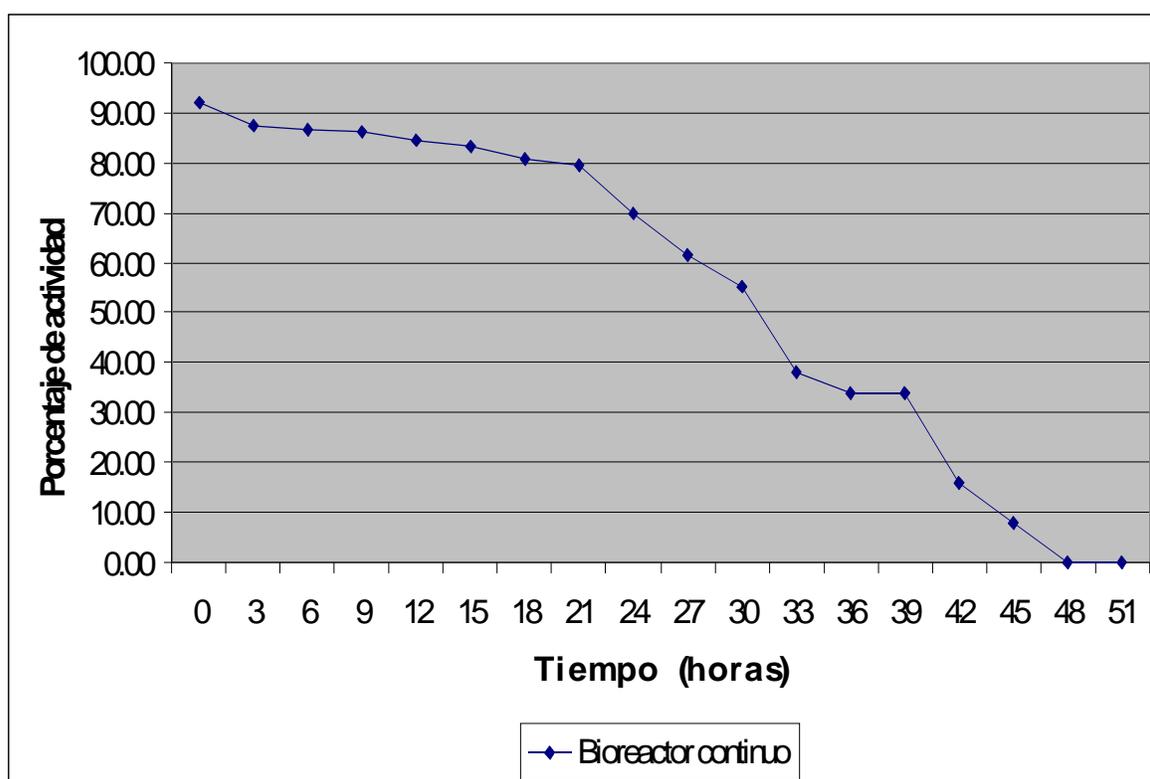
CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR CONTINUO
<ul style="list-style-type: none">• Altura de la columna de vidrio: 29.00 cm.• Diámetro de la columna de vidrio: 2.50 cm.• Cantidad de enzima presente: 0.2435 g.• Altura del preparado dentro del bioreactor: 23.30 cm.

Foto N°4. Bioreactor Continuo de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis*.Tabla N°5. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* en Bioreactor Continuo.

N° de muestra	Tiempo (horas)	Miligramos de almidón hidrolizados	Porcentaje de Actividad (%)
1	0	230.00	92.00
2	3	218.33	87.33
3	6	216.67	86.67
4	9	215.00	86.00
5	12	211.67	84.67
6	15	208.33	83.33
7	18	201.67	80.67
8	21	198.33	79.33
9	24	175.00	70.00
10	27	153,33	61.33

N° de muestra	Tiempo (horas)	Miligramos de almidón hidrolizados	Porcentaje de Actividad (%)
11	30	138.33	55.33
12	33	95.00	38.00
13	36	85.00	34.00
14	39	85.00	34.00
15	42	40.00	16.00
16	45	20.00	8.00
17	48	0.00	0.00
18	51	0	0.00

Gráfico N°10. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* en Bioreactor Continuo.



La cantidad total de almidón adicionados en el bioreactor para ser hidrolizados fue de 25.20 g. (contenidos en los 1008.0 mL. de mezcla de sustrato que se hicieron pasar a través del bioreactor). Siendo hidrolizados 2.49 g. de almidón en un tiempo de 48 horas (ver tabla N°5 y gráfico N°10).

4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CELULASA DE *Aspergillus niger* EN SUS FORMAS LIBRE E INMOVILIZADA

Para determinar la actividad celulolítica fue necesario realizar ensayos previos (ver tabla N°6), para establecer la cantidad de sustrato (hidroxietilcelulosa) y el tiempo de reacción que permitieran obtener resultados satisfactorios para el análisis.

Tabla N°6. Determinación del Tiempo y Cantidad de Sustrato Optimos para la Cuantificación de la Actividad de la Celulasa de *Aspergillus niger*.

Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> 503.30 µg./mL.	Hidroxietilcelulosa 1% (mL.)	Tiempo de Reacción (horas)	Actividad (mg. de glucosa formados/mL.)
1.0	1.0	1	0.60
1.0	1.0	2	0.69
1.0	2.0	1	0.72
1.0	2.0	2	2.36
1.0	5.0	2	0.28
2.0	1.0	1	0.89
2.0	1.0	2	1/01/82

En los resultados se observa que:

- La hidroxietilcelulosa por ser un sustrato de alto peso molecular provocó una disminución en la actividad de la celulasa, cuando éste fue colocado en mayor cantidad. A esto hay que añadir que los productos mismos de la interacción enzima–sustrato (celobiosa y glucosa) pueden inhibir a la celulasa.
- La proporción enzima–sustrato que esté en contacto, influye de forma significativa en la actividad de la enzima.
- Utilizando 1.0 mL. de enzima con 2.0 mL. de sustrato por un tiempo de reacción de 2 horas se obtienen los parámetros idóneos para evaluar la actividad enzimática.

4.1. ACTIVIDAD CELULOLITICA EN FUNCION DEL pH

Para la determinación de la actividad celulolítica se plantean las siguientes hipótesis:

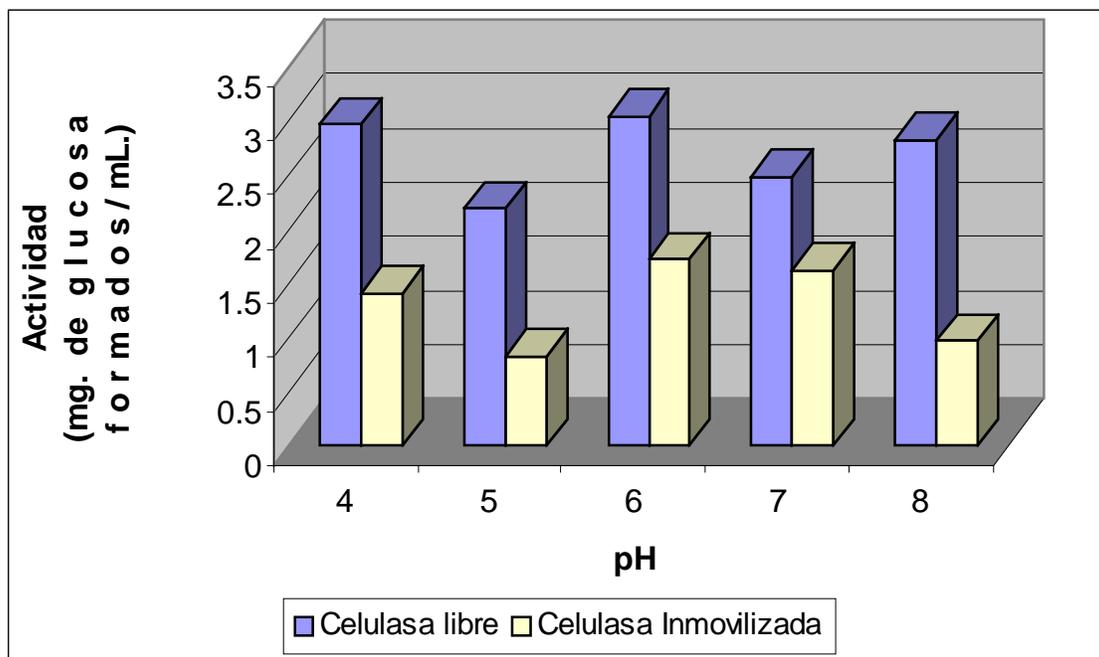
H₀: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

H₁: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

Tabla N°7. Actividad de la Celulasa de *Aspergillus niger* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente).

pH	Actividad Celulasa Libre (mg. de glucosa/ mL.)	Actividad Celulasa Inmovilizada (mg. de glucosa/mL.)
4.0	2.96	1.41
5.0	2.19	0.83
6.0	3.04	1.72
7.0	2.48	1.62
8.0	2.82	0.97

Gráfico N°11. Actividad de la Celulasa de *Aspergillus niger* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (a temperatura ambiente).



En la tabla N°7 y gráfico N°11, en donde aparecen los resultados de la actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* libre e inmovilizada a diferentes pH a temperatura ambiente (30–35°C) se observa que:

- La mayor actividad que presenta la celulasa tanto en su forma libre como inmovilizada se da a un pH de 6.0, difiriendo este valor del pH óptimo teórico (7.0).
- Tanto la actividad de la celulasa libre como inmovilizada se ven afectadas por los cambios de pH, por lo que el pH debe considerarse como un punto crítico al trabajar con esta enzima. Pero es de tomar en cuenta, que estos cambios son más drásticos en la celulasa inmovilizada.
- Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

4.2. ACTIVIDAD CELULOLITICA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

Para la determinación de la actividad celulolítica en función de la temperatura se plantearon las siguientes hipótesis:

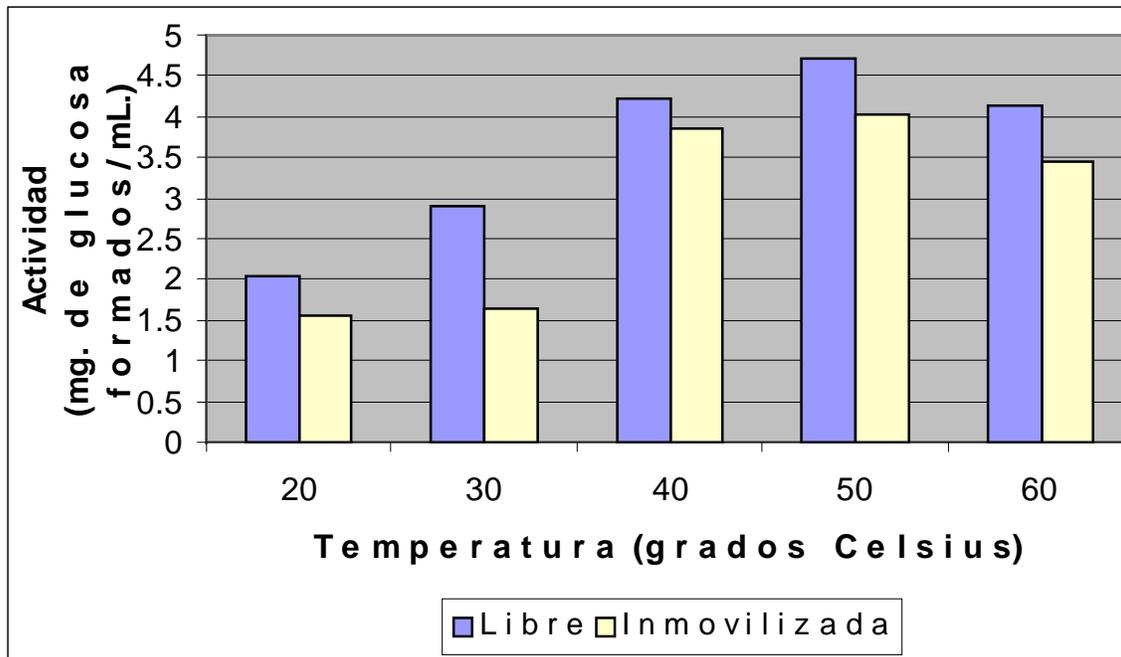
H₀: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

H₁: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

Tabla N°8. Actividad de la Celulasa de *Aspergillus niger* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (al pH óptimo experimental).

Temperatura	Actividad Celulasa Libre (mg. de glucosa/ mL.)	Actividad Celulasa Inmovilizada (mg. de glucosa/ mL.)
20°C	2.05	1.56
30°C	2.90	1.65
40°C	4.21	3.85
50°C	4,7	4.03
60°C	4.14	3.44

Gráfico N°12. Actividad de la Celulasa de *Aspergillus niger* Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (al pH óptimo experimental).



En la tabla N°8 y gráfico N°12, en donde aparecen los resultados de la actividad de la celulasa libre e inmovilizada a diferentes temperaturas, a pH constante de 6.0 (pH óptimo determinado experimentalmente para la celulasa inmovilizada), se observa que:

- La temperatura óptima para la celulasa libre y la inmovilizada es de 50°C, valor que concuerda con el reportado en la teoría.
- La tendencia que muestran los resultados de actividad de la celulasa tanto libre como inmovilizada es en forma de campana, por lo que es importante mantener la temperatura (50°C), ya que cambios en esta variable causan diferencias significativas en la actividad enzimática.
- Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

5. DETERMINACION DEL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE LA CELULASA DE *Aspergillus niger* EN DIFERENTES SISTEMAS DE REACCION (BIOREACTORES POR LOTE Y CONTINUO)

Para determinar la actividad de los bioreactores todas las pruebas y análisis realizados se efectuaron por triplicado. Es de tomar en cuenta que en las tablas aparecen los promedios de los datos obtenidos.

Los bioreactores se hicieron funcionar a temperatura ambiente, debido a que las condiciones del laboratorio y la configuración de los bioreactores no permitía trabajar con las temperaturas óptimas encontradas experimentalmente.

5.1. REACTOR ENZIMATICO POR LOTE PARA LA CELULASA DE *Aspergillus niger*

Fue necesario determinar el tiempo de reacción en que la enzima es capaz de hidrolizar todo el sustrato (hidroxietilcelulosa), para lo que el bioreactor se hizo funcionar a diferentes tiempos de reacción (ver tabla N°9).

Tabla N°9. Determinación del Tiempo Optimo de Reacción de la Celulasa de *Aspergillus niger* en el Bioreactor por Lote.

N° de Prueba	Tiempo de Funcionamiento del Bioreactor (horas)	Actividad (mg. de glucosa formados/mL.)
1	0.5	1.45
2	1.0	1.49
3	2.0	1.33

Determinándose que el tiempo óptimo para que la reacción enzima–sustrato en el bioreactor por lote se lleve a cabo con mejores resultados es de 1 hora.

La cantidad de sustrato adicionada al bioreactor cada vez que se realizaba un análisis era de 20.0 mL. (que contenían 0.10 g. de hidroxietilcelulosa); cantidad necesaria para que todo el preparado enzimático estuviera en contacto con el sustrato, de manera que dentro del bioreactor la actividad de toda la enzima disminuyera uniformemente.

Las características del bioreactor por lote de la celulasa después de ser montado eran las siguientes (ver cuadro N°8):

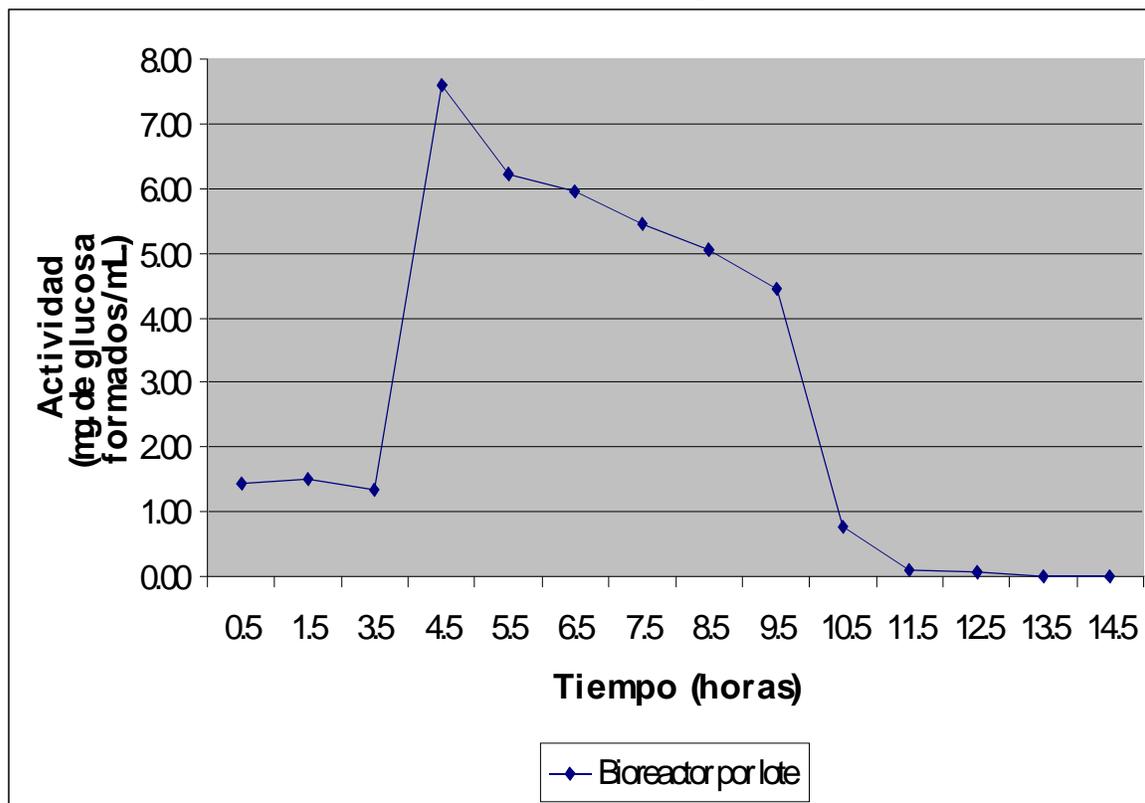
Cuadro N°8. Características del Bioreactor por Lote de la Celulasa de *Aspergillus niger*.

CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR POR LOTE
<ul style="list-style-type: none">• Altura del vaso de precipitado: 7.00 cm.• Diámetro del vaso de precipitado: 4.70 cm.• Cantidad de enzima presente: 0.0686 g.• Altura del preparado dentro del bioreactor: 2.80 cm.

Tabla N°10. Actividad en el Bioreactor por Lote de Celulasa de *Aspergillus niger*
Inmovilizada en función del Tiempo.

N° de muestra	Tiempo (horas)	Actividad (mg. de glucosa formados / mL.)
1	0.5	1.45
2	1.5	1.49
3	3.5	1.33
4	4.5	7.59
5	5.5	6.21
6	6.5	5.96
7	7.5	5.45
8	8.5	5.06
9	9.5	4.46
10	10.5	0.77
11	11.5	0.10
12	12.5	0.07
13	13.5	0.00
14	14.5	0.00

Gráfico N°13. Actividad en el Bioreactor por Lote de Celulasa de *Aspergillus niger*
Inmovilizada en función del Tiempo.



La cantidad total de hidroxietilcelulosa adicionada en el bioreactor fue de 1300 mg. Formándose 39.94 mg. de glucosa en un tiempo de 12 horas con 30 minutos (ver tabla N°10 y gráfico N°13).

5.2. REACTOR ENZIMATICO CONTINUO DE LA CELULASA DE *Aspergillus niger*

En este tipo de bioreactor el sustrato al ser suministrado por goteo, no logra estar en contacto con todo el preparado enzimático al pasar a través del bioreactor, por lo que la pérdida de la actividad no se da al mismo tiempo en todo el preparado.

Las características del bioreactor continuo de la celulasa después de su montaje eran las siguientes (ver cuadro N°9):

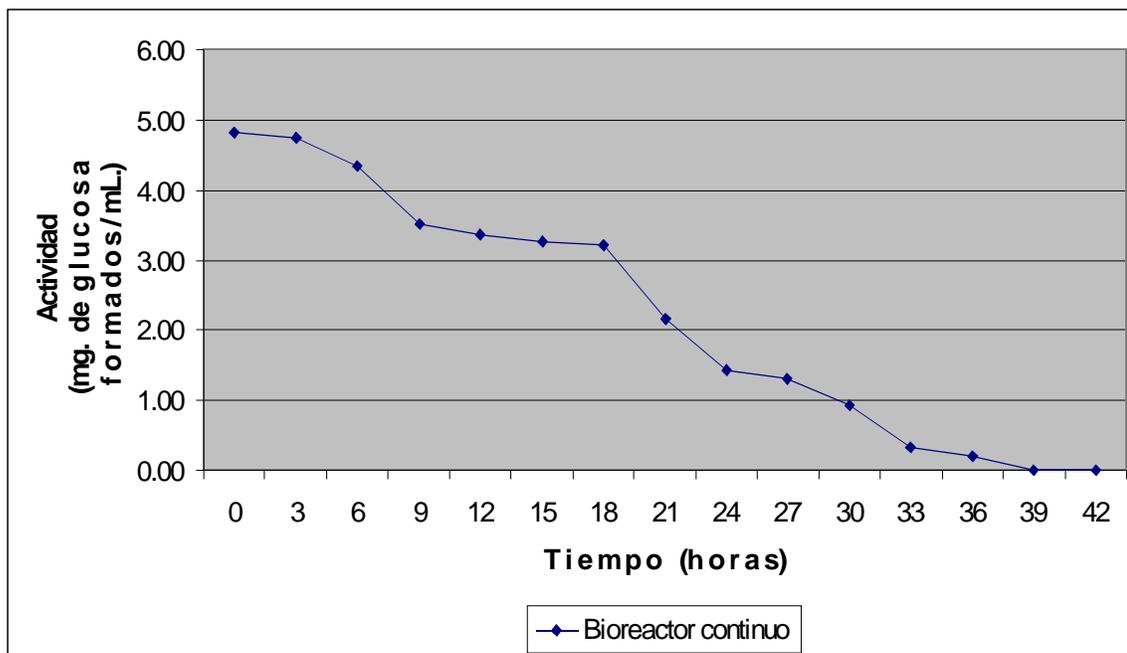
Cuadro N°9. Características del Bioreactor Continuo de la Celulasa de *Aspergillus niger*.

CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR CONTINUO
<ul style="list-style-type: none">• Altura de la columna de vidrio: 27.00 cm.• Diámetro de la columna de vidrio: 2.40 cm.• Cantidad de enzima presente: 0.1228 g.• Altura del preparado dentro del bioreactor: 20.80 cm.

Tabla N°11. Actividad en el Bioreactor Continuo de Celulasa de *Aspergillus niger* Inmovilizada.

N° de muestra	Tiempo (horas)	Actividad (mg. de glucosa formados / mL.)
1	0	4.81
2	3	4.74
3	6	4.34
4	9	3.51
5	12	3.37
6	15	3.26
7	18	3.22
8	21	2.16
9	24	1.44
10	27	1.31
11	30	0.92
12	33	0.32
13	36	0.19
14	39	0.00
15	42	0.00

Gráfico N°14. Actividad en el Bioreactor Continuo de Celulasa de *Aspergillus niger* Inmovilizada.



La cantidad total de hidroxietilcelulosa adicionada en el bioreactor fue de 4410 mg. (contenidos en 882.0 mL. de sustrato que se hicieron pasar a través del bioreactor). Habiéndose formado 33.59 mg. de glucosa en un tiempo de 36 horas (ver tabla N°11 y gráfico N°14).

6. APLICACION DEL PREPARADO EN AGUAS RESIDUALES

Para determinar la actividad del preparado en aguas residuales, todas las pruebas y análisis realizados se efectuaron por triplicado. Mostrándose en las diferentes tablas los promedios obtenidos de los datos experimentales.

6.1. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis* INMOVILIZADA

Habiendo determinado que el bioreactor por lote es más efectivo para llevar a cabo la reacción enzima-sustrato; se procedió a tratar una muestra de agua de desechos de panadería (Panadería X) que contenía harinas, colorantes, edulcorantes y sustancias grasas.

El agua residual de la panadería contenía compuestos grasos que interferían en la cuantificación de la actividad de la enzima. Por lo que se efectuó un pretratamiento a la muestra, que consistió en emplear la sedimentación y la decantación como métodos físicos. La sedimentación valiéndose de las densidades, permitió la separación de las fases (no polar-polar), para luego por medio de la decantación separarlas en recipientes diferentes.

Posteriormente la muestra se ajustó al pH óptimo experimental utilizando buffer acetato de pH 7.0 y además, se le adicionó cloruro de calcio 0.5 M, para activar a la enzima.

Al inicio se tomó una cantidad de muestra para determinar la cantidad de almidón presente en ella. Lo cual sirve como parámetro para determinar la efectividad de la enzima luego de que la muestra es tratada enzimáticamente.

Por ser desconocida la cantidad de almidón presente en la muestra, para determinar la actividad de la α -amilasa fue necesario elaborar una curva de calibración con soluciones estándar de almidón. Esta curva se elabora de la siguiente manera:

1. Colocar en un beaker aproximadamente 15 mL. de agua destilada y llevar a ebullición en un hot plate.
2. Al momento de ebullición del agua, colocar 1.25 g. de almidón previamente pesados. Agitar hasta completa homogenización.
3. Dejar enfriar la solución y luego transferir el contenido del beaker a un balón volumétrico de 25 mL. Aforar (solución madre: 50 mg./mL.).
4. Posteriormente de la solución madre de almidón de 50 mg./mL. tomar alícuotas y preparar las diferentes soluciones patrón de almidón (ver tabla N°12).

Tabla N°12 . Curva Patrón de Almidón.

Solución Madre de Almidón (50.00 mg./mL.)	Volumen Aforado (mL.)	Concentración del Estándar (mg./mL.)	Absorbancia
0.00 mL.	50.0	0.00	0.000
0.80 mL.	50.0	0.80	0.105
1.60 mL.	50.0	1.60	0.135
2.00 mL.	50.0	2.00	0.170
4.00 mL.	50.0	4.00	0.340
5.00 mL.	50.0	5.00	0.400

Al realizar la regresión lineal con los datos de absorbancia obtenidos, se determinaron los siguientes valores:

$R = 0.994842$, el cual indica que los datos tienen tendencia lineal.

$m = 0.078347$ (pendiente)

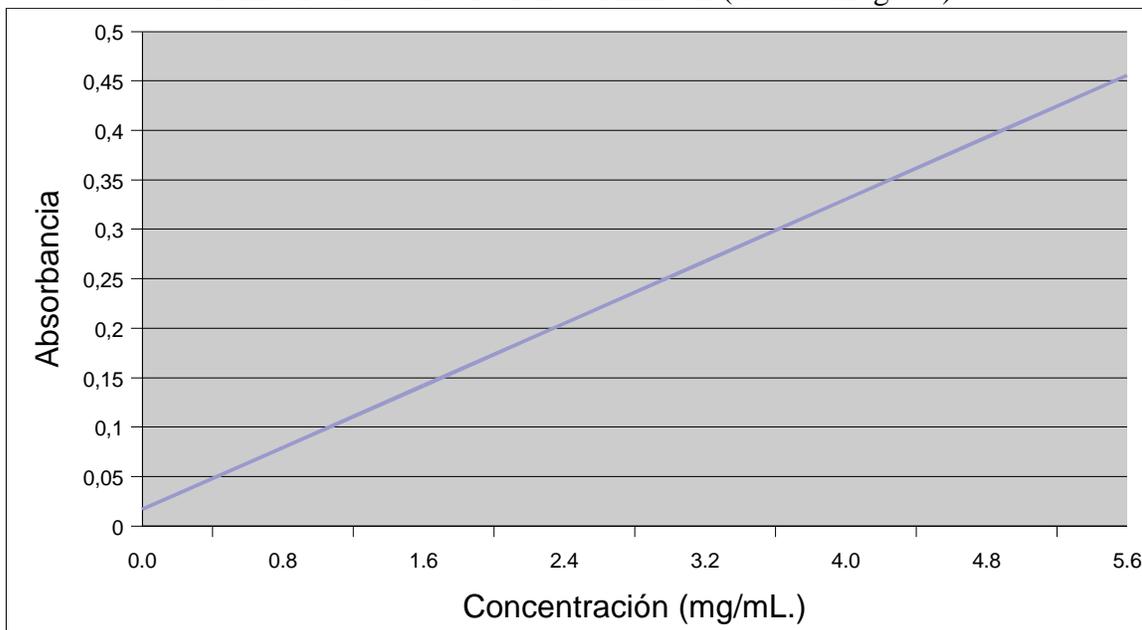
$b = 0.016691$ (intercepto)

Utilizando la ecuación de la línea recta: $y = m x + b$, se corrigieron los datos experimentales (ver tabla N°13), con los cuales se elaboró el gráfico (gráfico N°15).

Tabla N°13. Datos Experimentales de la Curva Patrón de Almidón Linearizados.

N° de patrón	Concentración del Estándar (mg./mL.)	Absorbancia
1	0.0	0.01669
2	0.8	0.07937
3	1.6	0.14204
4	2.0	0.17339
5	4.0	0.33008
6	5.0	0.40843

Gráfico N°15. Curva Patrón de Almidón (datos corregidos).



Con ayuda del gráfico N°15 y los datos obtenidos en la linearización (tabla N°13) fue posible determinar la cantidad de almidón presente en la muestra (ver tabla N°14) de desechos de panadería que se trató enzimáticamente.

Tabla N°14. Actividad del Preparado (α -Amilasa Inmovilizada) en Aguas Residuales.

Muestra	Absorbancia	mg. de almidón presentes en la muestra	ALMIDON HIDROLIZADO DESPUES DEL TRATAMIENTO 55.88%
Inicio (sin tratamiento enzimático)	0.35	4.25	
	0.37	4.50	
	0.37	4.50	
Promedio:		4.42	
Final (luego del tratamiento)	0.15	1.70	
	0.18	2.08	
	0.18	2.08	
Promedio:		1.95	

Según los resultados obtenidos en la determinación de la actividad (ver tabla N°14) puede observarse que hubo disminución en la cantidad de almidón presente en la muestra inicial luego de ser tratada enzimáticamente en el bioreactor por lote de α -amilasa, poniéndose en evidencia que el sistema ejerce su función. Sin embargo, el porcentaje de almidón hidrolizado (55.88%) no fue el esperado, lo cual podría deberse a que las sustancias grasas presentes en la muestra tratada forman una película líquida estacionaria alrededor del soporte, dificultando la formación del complejo enzima-sustrato.

6.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CELULASA DE *Aspergillus niger* INMOVILIZADA

Según los resultados obtenidos experimentalmente al igual que en la α -amilasa el bioreactor por lote es el más efectivo para llevar a cabo la reacción enzima-sustrato. Por lo tanto, éste fue el utilizado para tratar una muestra de desechos que contenía celulosa (muestra obtenida de Fábrica de Papel y Cartón Y).

A la muestra se le ajustó el pH utilizando buffer citrato de pH 6.0, para darle a la enzima las condiciones óptimas de trabajo.

Se tomó una cantidad de muestra previa al tratamiento enzimático para determinar la cantidad posible de glucosa presente en ella. Sirviendo de parámetro para determinar la efectividad de la enzima luego de que la muestra es tratada.

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad fueron (ver tabla N°15):

Tabla N°15 . Actividad del Preparado (Celulasa Inmovilizada) en Aguas Residuales.

Muestra	Actividad (mg. de glucosa formados / mL.)
Inicio (sin tratamiento)	0.50
Final (con tratamiento enzimático)	1.40

Por lo que los miligramos de glucosa que se forman después del tratamiento del agua residual es de 0.90 mg./mL. Cantidad muy baja si se compara con los datos obtenidos en la determinación de actividad del bioreactor por lote utilizando como sustrato hidroxietilcelulosa 0.5%; esto puede deberse a que la muestra que genera esta Industria (Fábrica de Papel y Cartón Y), contenía además de celulosa compuestos orgánicos e inorgánicos (tales como carbonato de calcio, colorantes, hipoclorito de sodio y en gran cantidad iones calcio y magnesio) que podrían ocasionar inhibición parcial de la enzima (aunque esos compuestos en la bibliografía no sean reportados como inhibidores de la celulasa).

7. DETERMINACION DE LA FORMA DE PRESENTACION DEL PREPARADO ENZIMATICO

7.1. ALMACENAMIENTO DEL PREPARADO (α -AMILASA DE *Bacillus subtilis*): EN SECO O HUMEDO

Para la determinación de la forma de presentación de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en base al tipo de almacenamiento (en seco o húmedo) se plantearon las siguientes hipótesis:

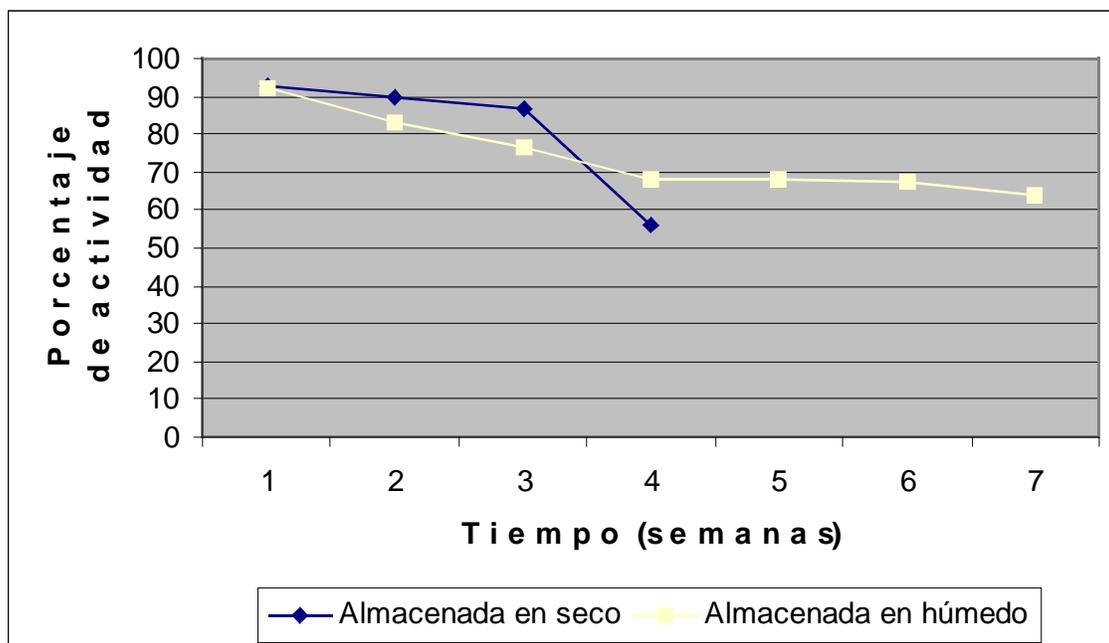
H₀: La actividad de la α -amilasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

H₁: La actividad de la α -amilasa inmovilizada almacenada en seco difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

Tabla N°16. Monitoreo de la Actividad de α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo.

Tiempo (Semanas)	Actividad de la α -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> (%)	
	Almacenada en Seco	Almacenada en Húmedo
1	92.54	92.26
2	89.72	83.22
3	86.68	76.66
4	56.20	68.34
5	---	68.18
6	---	67.56
7	---	63.94

Gráfico N°16. Monitoreo de la Actividad de α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo.



Como puede observarse en la tabla N°16 y gráfico N°16 en las tres primeras semanas del monitoreo, la α -amilasa al estar almacenada en seco presentaba mayor actividad con respecto a la almacenada en húmedo. Decayendo la actividad entre la cuarta y quinta semana, lo cual pudo deberse al desarrollo de hongos que se generó en el soporte de la enzima inmovilizada.

La enzima al estar almacenada en húmedo presenta pérdida parcial de su actividad a medida que transcurre el tiempo. Disminuyendo desde un 92.26% en la primera semana, a un 63.94% en la séptima semana.

Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la α -amilasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

7.2. ALMACENAMIENTO DEL PREPARADO (CELULASA DE *Aspergillus niger*): EN SECO O HUMEDO

Para la determinación de la forma de presentación de la celulasa de *Aspergillus niger* en base al tipo de almacenamiento (en seco o húmedo) se plantearon las siguientes hipótesis:

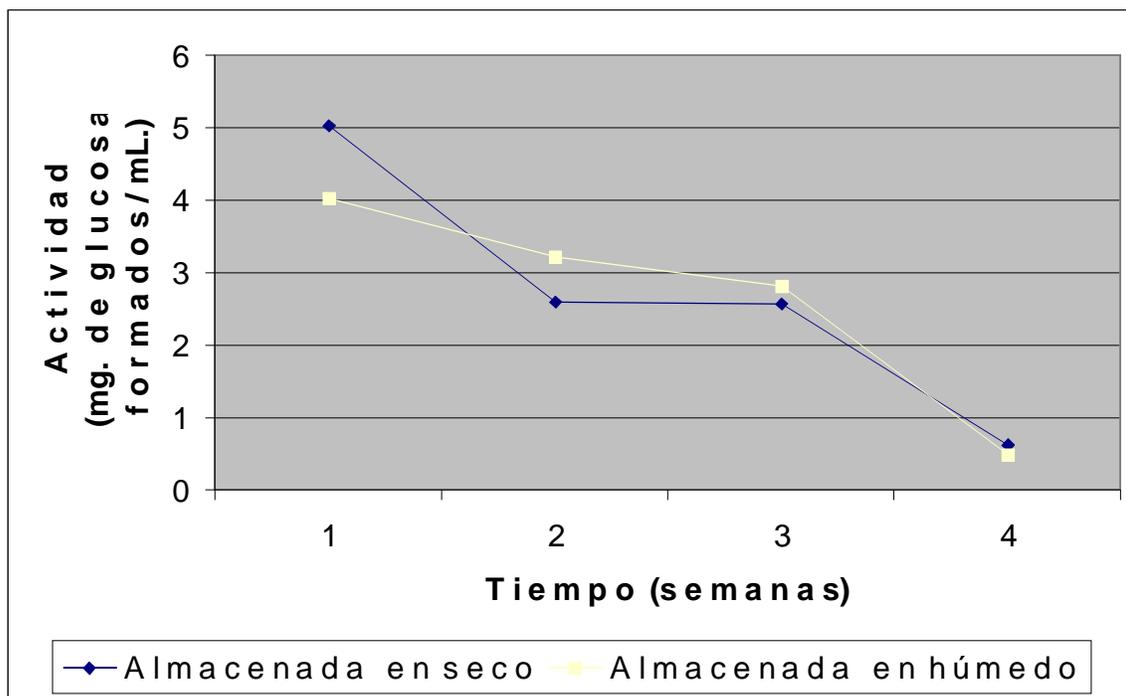
H₀: La actividad de la celulasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

H₁: La actividad de la celulasa inmovilizada almacenada en seco difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

Tabla N°17. Monitoreo de la Actividad de Celulasa de *Aspergillus niger* Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo.

Tiempo (Semanas)	Actividad de Celulasa Inmovilizada (mg. de glucosa formados/mL.)	
	Almacenada en Seco	Almacenada en Húmedo
1	5.03	4.03
2	2.60	3.21
3	2.58	2.80
4	0.62	0,49

Gráfico N°17. Monitoreo de la Actividad de Celulasa de *Aspergillus niger* Inmovilizada almacenada en Seco y Húmedo.



Según los resultados que aparecen en la tabla N°17 y gráfico N°17, la celulasa inmovilizada en refrigeración (entre 8–10°C) almacenada tanto en seco o húmedo es un medio propicio para el desarrollo de hongos; produciéndose entre la cuarta y quinta semana el crecimiento de los mismos. Por lo que no puede ser almacenada por largos períodos de tiempo.

Al aplicar la distribución "t" de student a los resultados obtenidos (ver anexo VI y VII) se acepta que: La actividad de la celulasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

7.3. EFECTIVIDAD DEL PREPARADO AL ESTAR LAS ENZIMAS EN FORMA INDIVIDUAL O MEZCLADAS

Las características de los bioreactores por lote, en forma de presentación individual y mezclada de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* y de la celulasa de *Aspergillus niger* después de ser montados aparecen en los cuadros N°10 y N°11.

Cuadro N°10. Características de los Bioreactores por Lote de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis* y de la Celulasa de *Aspergillus niger* en la Determinación de la Actividad en Forma de Presentación Individual.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EN PRESENTACION INDIVIDUAL	
CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR DE α-AMILASA DE <i>Bacillus subtilis</i>	CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR DE CELULASA DE <i>Aspergillus niger</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Altura de la columna de vidrio: 29.00 cm. • Diámetro de la columna de vidrio: 2.30cm. • Cantidad de enzima presente: 0.3000 g. • Altura del preparado dentro de la columna de vidrio: 23.00 cm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Altura del vaso de precipitado: 6.00 cm. • Diámetro del vaso de precipitado: 9.8 cm. • Cantidad de enzima presente: 0.3000 g. • Altura del preparado dentro del vaso de precipitado: 2.80 cm.

Cuadro N°11. Características del Bioreactor por Lote de la α -Amilasa de *Bacillus subtilis* y Celulasa de *Aspergillus niger* en la Determinación de la Actividad en Forma de Presentación Mezclada.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EN PRESENTACION MEZCLADA
CARACTERISTICAS DEL BIOREACTOR
<ul style="list-style-type: none"> • Altura del vaso de precipitado: 12.00 cm. • Diámetro del vaso de precipitado: 9.8 cm. • Cantidad de enzima presente en el bioreactor: 0.3000 g. de α-amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> y 0.3000 g. de celulasa de <i>Aspergillus niger</i> • Altura del preparado dentro del vaso de precipitado: 6.00 cm.

Tabla N°18. Actividad de las Enzimas Inmovilizadas en Forma de Presentación Individual y Mezclada.

FORMA DE PRESENTACION	SUSTRATO	PARA LA CELULASA: mg. de glucosa formados/mL.	PARA LA α-AMILASA: porcentaje de actividad (%)
Individual (α -amilasa)	Equivalente a 750 mg. de almidón. Ajustado a pH 7.0 con buffer acetato	-----	100.00

FORMA DE PRESENTACION	SUSTRATO	PARA LA CELULASA: mg. de glucosa formados/mL.	PARA LA α-AMILASA: porcentaje de actividad (%)
Individual (celulosa)	Equivalente a 250 mg. de hidroxietilcelulosa. Ajustado a pH 6.0 con buffer citrato	6.34	-----
Mezclada	Equivalente a 2500 mg. de almidón. Ajustado a pH 7.0 con buffer acetato	-----	97.37
	Equivalente a 500 mg. de hidroxietilcelulosa. Ajustado a pH 6.0 con buffer citrato	0.77	-----
	Equivalente a 1250 mg. de almidón y 250 mg. de hidroxietilcelulosa. Ajustados a pH 7.0 con buffer acetato	1.18	41.23
	Equivalente a 1250 mg. de almidón y 250 mg. de hidroxietilcelulosa. Ajustados a pH 6.0 con buffer citrato	1.64	100.00

En base a los resultados obtenidos (ver tabla N°18) se observa que:

- La α -amilasa y celulasa presentan un grado de actividad deseable al ser utilizadas en forma individual, siempre y cuando se mantenga el pH óptimo de actividad.
- Las enzimas en forma de presentación mezclada pueden ser utilizadas si el pH de trabajo es 6.0 (ajustado con buffer citrato).
- Si se utilizan en forma mezclada a un pH de 7.0 (ajustado con buffer acetato) la actividad decayó considerablemente en un 58.77% cuando se encontraban presentes ambos sustratos.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- La técnica de Atrapamiento en gel de agar ofrece varias ventajas a las enzimas que se inmovilizaron (α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger*). Entre ellas están:
 1. La técnica permite que el preparado inmovilizado sea reutilizado, compensando el precio de las enzimas en su forma libre. Por lo que la técnica de atrapamiento en gel se considera un proceso rentable.
 2. La facilidad de moldeo de la enzima con el soporte y la obtención de características físicas deseables en el preparado (apariencia, brillo y consistencia).
 3. No se cambia la estructura de las enzimas puesto que continúan ejerciendo su actividad después del proceso de inmovilización.

- Aunque el método de inmovilización empleado (atrapamiento en gel de agar) da lugar a una pérdida de la actividad de las enzimas, este método permite la reutilización del preparado inmovilizado por un período de tiempo tan largo como su estabilidad lo permita. Se considera que el único camino efectivo para minimizar esta pérdida es la optimización de las condiciones de reacción (el pH, la temperatura, flujo del sustrato y tiempo de reacción).

- Al utilizar la enzima α -amilasa de *Bacillus subtilis* de forma inmovilizada en agar-agar debe ajustarse el pH del sustrato a un valor de 7.0 con buffer acetato y la temperatura debe estar controlada a 50°C.
- Los parámetros de trabajo óptimos, determinados experimentales para la celulasa de *Aspergillus niger* de forma inmovilizada son, pH del sustrato ajustado a 6.0 con buffer citrato y temperatura de trabajo 50°C.
- En base a los resultados obtenidos, la configuración del bioreactor que permite un mejor aprovechamiento de la actividad de las enzimas inmovilizadas, es el bioreactor por lotes.
- En base a los resultados obtenidos a nivel de laboratorio tanto la enzima α -amilasa de *Bacillus subtilis* como la celulasa de *Aspergillus niger* en forma inmovilizada, si se encuentran en forma individual pueden emplearse en bioreactores por lote.

- Según los resultados obtenidos en el laboratorio el bioreactor por lote presenta dos desventajas:
 1. Que el reactor –columna o tanque (según la configuración del bioreactor)– debe llenarse al ser utilizado y vaciado al finalizar cada lote tratado enzimáticamente, lo cual implica tiempo y por tanto pérdida de la productividad del proceso.
 2. Que por la configuración del sistema puede haber compresión del preparado y por tanto obstrucción en el contacto enzima–sustrato. Ocasionando disminución en la efectividad del bioreactor.

- La forma de presentación del preparado debe ser en forma individual. Y deberá almacenarse en forma húmeda para ambas enzimas (a una temperatura entre 4–10°C para evitar la proliferación de hongos). De esta manera, el preparado tiene mayor duración al estar en almacenamiento, ya que estando en forma seca además de verse afectada la actividad de las enzimas podría llegar a resecarse el soporte, ocasionando la pérdida de integridad del preparado.

- Para un mejor aprovechamiento dentro del proceso al emplear bioreactores por lote o en general cualquier tipo de bioreactor con enzimas inmovilizadas, se hace necesario monitorear continuamente la actividad del preparado.

CAPITULO V

RECOMENDACIONES

RECOMENDACION GENERAL

Que sólo la investigación enfocada a solucionar problemas reales, puede causar cambios en la mentalidad de los futuros profesionales de cualquier área, ya que así entra en juego no sólo el cumplimiento de un determinado requisito académico, sino, el desarrollo de una sensibilización ante las necesidades que afrontamos como sociedad.

Y esto puede ser posible en la Facultad de Química y Farmacia, si se cuentan con los recursos necesarios y se incorporan actividades de carácter investigativo en donde exista una relación flexible y creativa entre los docentes y los estudiantes.

RECOMENDACIONES ESPECIFICAS

- Mantener y utilizar el preparado inmovilizado en condiciones asépticas para evitar el crecimiento de hongos que puedan tener un efecto perjudicial sobre el funcionamiento del bioreactor por el ataque directo al preparado enzimático.

- Investigar la posibilidad de añadir alguna sustancia antifúngica al preparado para evitar la proliferación de hongos a la que es susceptible, tomando en cuenta que no debe causar inhibición en la actividad de las enzimas.
- Ensayar la inmovilización con otros soportes en los que se minimizen las desventajas encontradas en este trabajo de investigación, de manera que se tenga un estudio comparado de la actividad de las enzimas α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger* en los diferentes soportes. Para poder así, tener un mejor criterio de selección del soporte en base a datos experimentales.
- Monitorear la actividad enzimática de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger* en bioreactores continuos con recirculación del sustrato. Para determinar si es más efectivo al ser utilizado para el pretratamiento de aguas residuales con respecto a los bioreactores estudiados.
- Realizar estudios a nivel de laboratorio y a nivel industrial, en los que se tomen en cuenta las necesidades específicas de una Industria en donde la utilización de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger* en forma inmovilizada sea una alternativa real para el pre-tratamiento de desechos que contengan almidón y celulosa. Verificando así, la rentabilidad de este proceso a nivel industrial.

- Llevar a cabo investigaciones en donde se experimente a nivel de laboratorio las diferentes posibilidades de aplicación de las enzimas α -amilasa de *Bacillus subtilis* y celulasa de *Aspergillus niger* en diferentes procesos industriales.

BIBLIOGRAFIA

1. BIDLINGMEYER, Brian A. Practical HPLC Metodology and aplicaciones. 1st. Edition. Jonh Wiley & sons, Inc. United States of America. 1992.
2. BONILLA, Gildalberto. Cómo hacer una tesis de graduación con técnicas estadísticas. 1ra. Edición. UCA Editores. El Salvador. 1993.
3. BONILLA, Gildalberto. Estadística, elementos de estadística descriptiva y probabilidad. 4ta. Edición. UCA Editores. El Salvador. 1991.
4. CABELLO VELASCO, A. Manual de Laboratorio: Microbiología Industrial. 1ra. Edición. Imprenta de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 1989.
5. CRUEGER, Wulf y CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 1ra. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1989.
6. DIFCO Laboratorios. Manual Difco: Medios de Cultivo Deshidratados y Reactivos para Microbiología. 10ma. Edición. Madrid, España. 1984.

7. HARROW. Tratado y Prácticas de Bioquímica. 2da. Edición. Editorial Atlante S.A., México, D.F. 1950.
8. HIGUCHI, Brochmann Hanssen. Análisis Farmacéutico. 1ra. Edición. Editorial Interscience Publisher, Inc. Estados Unidos de América. 1961.
9. LOPEZ MUNGUÍA, Agustín y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Tecnología Enzimática. 1ra. Edición. Imprenta de la Universidad Autónoma de México. México, D.F. 1987.
10. OSOL, Arthur y otros. Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th. Edition. Board Mack Publishing Company. Easton, Pennsylvania. 1980.
11. RHODES, Alan. Principios de Microbiología Industrial. 1ra. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1969. SIGMA, Compañía Química. Biochemical Organic Compounds and Diagnostic Reagents. Saint Louis, Estados Unidos de América. 1996.
12. RODRIGUEZ de, Beatriz M. Análisis de Alimentos. Tomo I. 1ra. Edición. Editorial de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1980.

13. WARD, Owen P. Biotecnología de la Fermentación. 1ra. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1989.
14. WILKINSON, J. Henry. The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology. 1st. Edition. Edward Arnold (Publishers) Ltd. United States of America. 1976.
15. CUADRA ZELAYA, Tania Ethel. Normalización de la Enzima Papaína Inmovilizada por la Técnica de Atrapamiento en Gel. El Salvador: Facultad de Química y Farmacia UES. 2000.
16. GARCIA CHACON, Mayra y MONTES GOMEZ, Rosa Linda. Ensayos Preliminares para la Inmovilización de la Enzima Glucosa Oxidasa, por el Método de Atrapamiento en Gel. El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, UES. 1994.
17. Agar–agar.
<http://agar.com/agaragar.htm>
18. Agar–agar.
<http://seaweed.ucg.ie/seaweedusesGeneral/Agars.html>

19. Agar-agar.

<http://www.orst.edu/food-resource/gums/agar.html>

20. Agar-agar.

<http://www.msckorea.com/agar.htm>

21. Biblioteca Electrónica del Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

<http://biblio@inti.gov.ar>

22. Biorremediación enzimática.

<http://www.usach.cl/ima/bioenzim.htm>

23. Cellulase. Worthington Catalog.

<http://www.worthington-biochen.com>

24. Cellulase.

<http://www.serva.de/products/knowledge/061097.shtml>

25. Cellulose Degradation. University of Maryland.

<http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab4.htm>

26. Cinética Enzimática.

<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ3.htm>

27. Depuración de aguas residuales municipales con soluciones ecológicas.

<http://wwwa002.infonegocio.com/244/odour.htm>

28. Efectos de los contaminantes del agua en la salud. La contaminación del agua convertida en un problema de Salud Pública.

<http://sma.df.gob.mx/educacion/agua/agua7.htm>

29. Enzimas.

<http://www.arrakis.es/~lluengo/enzimas.html#GlossC>

30. Enzimas. Aislamiento y purificación de enzimas y otras proteínas. Diseños de procesos con enzimas inmovilizadas.

<http://www.ipct.pucrs.br/istec/UnivPeruch/upchslid/tsld030.htm>

31. Enzimas. Libro Botánica On Line.

<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/index.html>

32. Enzimología. Mecanismos moleculares de la regulación enzimática.

<http://www.lafacu.com/apuntes/química/enzimas/default.htm>

33. Enzimología. Clasificación y nomenclatura.

<http://www.monografias.com>

34. Enzymatic Saccharification of Starch.

<http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1d/t1d.htm>

35. Índice de Biomoléculas.

<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ile>

36. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones.

<http://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>

37. Polisacáridos.

<http://www.redcolombiana.com/Cultura/LACIENCIA/html/poli/htm>

38. Protein Engineering Laboratory.

http://ss.abr.affrc.go.jp/organization/Biotechnology/0707/index_e.html

39. SIGMA-ALDRICH.

<http://www.sigma-aldrich.com/saws.nst/Home?OpenFrameset>

40. SWISS-PROT. Protein Knowledgebase.

<http://www.expasy.org>

ANEXOS

ANEXO I

**SECUENCIA DE AMINOACIDOS QUE CONFORMAN LA
ESTRUCTURA DE LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis*⁽⁴⁰⁾**

.....Leu Thr Ala Pro 45

46 Ser Ile Lys Ser Gly Thr Ile Leu His Ala Trp Asn Trp Ser Phe 60

61 Asn Thr Leu Lys His Asn Met Lys Asp Ile His Asp Ala Gly Tyr 75

76 Thr Ala Ile Gln Thr Ser Pro Ile Asn Gln Val Lys Glu Gly Asn 90

91 Gln Gly Asp Lys Ser Met Ser Asn Trp Tyr Trp Leu Tyr Gln Pro 105

106 Thr Ser Tyr Gln Ile Gly Asn Arg Tyr Leu Gly Thr Glu Gln Glu 120

121 Phe Lys Glu Met Cys Ala Ala Ala Glu Glu Tyr Gly Ile Lys Val 135

136 Ile Val Asp Ala Val Ile Asn His Thr Thr Ser Asp Tyr Ala Ala 150

151 Ile Ser Asn Glu Val Lys Ser Ile Pro Asn Trp Thr His Gly Asn 165

166 Thr Gln Ile Lys Asn Trp Ser Asp Arg Trp Asp Val Thr Gln Asn 180

181 Ser Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Trp Asn Thr Gln Asn Thr Gln Val 195

196 Gln Ser Tyr Leu Lys Arg Phe Leu Asp Arg Ala Leu Asn Asp Gly 210

(Continuación)

211 Ala Asp Gly Phe Arg Phe Asp Ala Ala Lys His Ile Glu Leu Pro 225

226 Asp Asp Gly Ser Tyr Gly Ser Gln Phe Trp Pro Asn Ile Thr Asn 240

241 Thr Ser Ala Glu Phe Gln Tyr Gly Glu Ile Leu Gln Asp Ser Ala 255

256 Ser Arg Asp Ala Ala Tyr Ala Asn Tyr Met Asp Val Thr Ala Ser 270

271 Asn Tyr Gly His Ser Ile Arg Ser Ala Leu Lys Asn Arg Asn Leu 285

286 Gly Val Ser Asn Ile Ser His Tyr Ala Ser Asp Val Ser Ala Asp 300

301 Lys Leu Val Thr Trp Val Glu Ser His Asp Thr Tyr Ala Asn Asp 315

316 Asp Glu Glu Ser Thr Trp Met Ser Asp Asp Asp Ile Arg Leu Gly 330

331 Trp Ala Val Ile Ala Ser Arg Ser Gly Ser Thr Pro Leu Phe Phe 345

346 Ser Arg Pro Glu Gly Gly Gly Asn Gly Val Arg Phe Pro Gly Lys 360

361 Ser Gln Ile Gly Asp Arg Gly Ser Ala Leu Phe Glu Asp Gln Ala 375

376 Ile Thr Ala Val Asn Arg Phe His Asn Val Met Ala Gly Gln Pro 390

391 Glu Glu Leu Ser Asn Pro Asn Gly Asn Asn Gln Ile Phe Met Asn 405

406 Gln Arg Gly Ser His Gly Val Val Leu Ala Asn Ala Gly Ser Ser 420

421 Ser Val Ser Ile Asn Thr Ala Thr Lys Leu Pro Asp Gly Arg Tyr 435

(Continuación)

436	Asp Asn Lys Ala Gly Ala Gly Ser Phe Gln Val Asn Asp Gly Lys	450
451	Leu Thr Gly Thr Ile Asn Ala Arg Ser Val Ala Val Leu Tyr Pro	465
466	Asp Asp Ile Ala Lys Ala Pro His Val Phe Leu Glu Asn Tyr Lys	480
481	Thr Gly Val Thr His Ser Phe Asn Asp Gln Leu Thr Ile Thr Leu	495
496	Arg Ala Asp Ala Asn Thr Thr Lys Ala Val Tyr Gln Ile Asn Asn	510
511	Gly Pro Asp Asp Arg Arg Leu Arg Met Glu Ile Asn Ser Gln Ser	525
526	Glu Lys Glu Ile Gln Phe Gly Lys Thr Tyr Thr Ile Met Leu Lys	540
541	Gly Thr Asn Ser Asp Gly Val Thr Arg Thr Glu Lys Tyr Ser Phe	555
556	Val Lys Arg Asp Pro Ala Ser Ala Lys Thr Ile Gly Tyr Gln Asn	570
571	Pro Asn His Trp Ser Gln Val Asn Ala Tyr Ile Tyr Lys His Asp	585
586	Gly Ser Arg Val Ile Glu Leu Thr Gly Ser Trp Pro Gly Lys Pro	600
601	Met Thr Lys Asn Ala Asp Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Leu Pro Ala	615
616	Asp Thr Asp Thr Thr Asn Ala Lys Val Ile Phe Asn Asn Gly Ser	630
631	Ala Gln Val Pro Gly Gln Asn Gln Pro Gly Phe Asp Tyr Val Leu	645
646	Asn Gly Leu Tyr Asn Asp Ser Gly Leu Ser Gly Ser Leu Pro His	660

ANEXO II

PREPARACION DE REACTIVOS

REACTIVOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

• Solución de α -amilasa libre 500 $\mu\text{g./mL}$.

Material.

- x 0.5 g. de α -amilasa de *Bacillus subtilis*
- x Agua destilada

Procedimiento.

Diluir la enzima con agua destilada, y llevar a una concentración de 500 mg./mL.

• Buffer acetato de sodio 0.1 N pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 (250 mL. de c/u)

Material.

- x 3.40 g. de acetato de sodio
- x Agua destilada
- x 20.0 mL. ácido acético glacial

Procedimiento general.

Pesar 3.40 g. de acetato de sodio para preparar 250 mL. Disolver el acetato de sodio en

100 mL. de agua destilada. Calibrar el potenciómetro. Llevar a pH deseado con ácido acético glacial concentrado o hidróxido de sodio 0.1N. Colocar en balón de 250 mL. y llevar a volumen con agua destilada.

• **Solución de almidón al 1% (100 mL. preparación reciente)**

Material.

x 1.5 g. de almidón soluble

x Agua destilada

Procedimiento.

Adicionar lentamente el almidón soluble a un balón volumétrico de 100 mL. conteniendo 50 mL. de agua caliente a 80°C. Aforar con agua destilada y agitar hasta homogenización completa.

• **Cloruro de calcio 0.5 M (250 mL.)**

Material.

x 13.88 g. de cloruro de calcio

x Agua destilada

Procedimiento.

En un beaker de 100 mL. disolver el cloruro de calcio con agua destilada. Colocar la solución en un balón volumétrico de 250 mL. y aforar con agua destilada.

• **Acido clorhídrico 1 N (500 mL.)**

Material.

- x 42.5 mL. de ácido clorhídrico concentrado
- x Agua destilada
- x 0.75 g. de carbonato de sodio anhídrido
- x Rojo de metilo TS

Procedimiento.

Colocar aproximadamente unos 300 mL. de agua destilada en un balón volumétrico de 500 mL. Luego colocar el balón volumétrico en baño de hielo y comenzar a añadir el ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente llevar a volumen con agua destilada.

La solución preparada debe estandarizarse de la siguiente manera: Pesar el carbonato de sodio anhídrido (previamente calentado a una temperatura de 270°C por 1 hora). Disolver el carbonato de sodio anhídrido en 100 mL. de agua y añadir 2 gotas de rojo de metilo TS. Colocar el ácido en una bureta y añadirlo lentamente a la solución del estándar primario con constante agitación hasta que la solución se torne rosado pálido. Calentar nuevamente y seguir

titulando hasta que el color rosado pálido obtenido no se vea afectado por la ebullición. Calcular la normalidad. Cada 52.99 mg. de carbonato de sodio anhidro es equivalente a 1 mL. de ácido clorhídrico 1 N.

• **Rojo de metilo TS (100 mL.)**

Material.

- x 100 mg. de rojo de metilo
- x Alcohol

Procedimiento.

Disolver el rojo de metilo con alcohol en un balón volumétrico de 100 mL. Agitar y posteriormente aforar con alcohol.

• **Acido clorhídrico 0.1 N (250 mL.)**

Material.

- x 2.15 mL.. de ácido clorhídrico concentrado
- x Agua destilada

Procedimiento.

Colocar aproximadamente unos 200 mL. de agua destilada en un balón volumétrico de 250 mL. Luego colocar el balón volumétrico en baño de hielo y comenzar a añadir el ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente llevar a volumen con agua destilada.

Posteriormente estandarizar la solución tal como aparece en la preparación de ácido clorhídrico 1 N. Calcular la normalidad. Cada 5.299 mg. de carbonato de sodio anhidro es equivalente a 1 mL. de ácido clorhídrico 0.1 N.

• Lugol (45 mL)

Material.

- x 0.3 g. de yoduro de potasio
- x 0.15 g. de yodo metálico
- x Agua destilada

Procedimiento.

Mezclar el yodo metálico con el yoduro de potasio en un mortero y triturar a polvo fino; añadir un poco de agua destilada y transferir a un vaso de precipitado tarado a 45 mL. Llevar a volumen, agitar y mezclar completamente.

REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA**• Solución de celulasa libre (503.30 µg./mL.)**Material.

- x 0.0503 g. Celulasa de *Aspergillus niger*
- x Agua destilada

Procedimiento.

Disolver la enzima en agua destilada y llevar la solución a una concentración de 503µg./mL.

• Buffer de citratos 0.1 M pH 4.0 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 (100 mL. c/buffer)Material.

- x 14.71 g. de citrato de sodio
- x Agua destilada
- x 10.51 g. de ácido cítrico

Procedimiento general.

En un balón volumétrico de 1000 mL. conteniendo 600 mL. de agua, adicionar el citrato de sodio. Mezclar hasta completa disolución. Llevar a volumen con agua destilada.

En otro balón volumétrico de 1000 mL. conteniendo 600 mL. de agua, adicionar el ácido cítrico y mezclar hasta completa disolución. Luego llevar a volumen con agua destilada.

Posteriormente mezclar volúmenes de las dos soluciones, hasta alcanzar el pH de la solución amortiguadora que se desee. Después de ajustado el pH que se desee. Adicionar ésta mezcla de solución en un balón de 100 mL. y llevar a volumen con agua libre de CO₂.

• **Solución patrón de carboximetilcelulosa 1% (200 mL. preparación reciente)**

Material.

- x 3.0 g. de carboximetilcelulosa
- x Agua destilada

Procedimiento.

En un balón volumétrico de 200 mL. colocar 50 mL. de agua destilada caliente a 80°C. Adicionar la carboximetilcelulosa y disolver. Aforar y homogenizar con agitación ligera.

ANEXO III

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

1. INMOVILIZACION DE LAS ENZIMAS, EN FORMA INDIVIDUAL (α -AMILASA Y CELULASA)

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Balanza Analítica	Vasos de precipitado	α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> SIGMA 10070
Hot Plate	Colador plástico	Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> SIGMA 22174
Refrigerador	Microespátulas	Agar-agar
Baño de Agua	Agitadores de vidrio	Agua destilada estéril
Balanza Granataria	Vidrios de reloj	Glicerina
Mechero	Termómetro	Buffer citrato
	Jeringas de 30, 10, 5, 1cc.	Cloruro de calcio 0.05 M
	Matraces Erlenmeyer	

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS EN SUS FORMAS LIBRES E INMOVILIZADAS

2.1. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
pHmetro	Tubos de ensayo con tapón de rosca	Solución de α -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>
Baño de María	Termómetro	α -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> SIGMA 10070 inmovilizada en agar-agar.
Balanza Granataria	Balones volumétricos	Solución de almidón al 1%
Balanza Analítica	Agitadores de vidrio	Buffer acetato de sodio 0.1 N pH: 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0
Refrigerador	Celdas para leer en Espectronic 20D	Cloruro de calcio 0.5 M
Hot Plate	Microespátulas	Cloruro de calcio 0.05 M

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Espectronic 20D	Pipetas volumétricas	Acido clorhídrico 1.0 N
	Vasos de precipitado	Acido clorhídrico 0.1N
	Pipetas Mohr	Lugol
	Vidrio de reloj	Agua Destilada
	Espátulas	
	Pizeta	

2.2. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 12	Tubos de ensayo con tapón de rosca y tubos de hemólisis	Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> SIGMA 22174 inmovilizada en agar-agar

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Hot Plate	Micropipeta de capacidad variable, hasta 100 μ L.	Solución de Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>
Balanza Granataria	Celdas para leer en espectrofotómetro UV–Vis Lambda 12	Buffer citrato 0.05 M pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0
Baño de Agua	Vasos de precipitado	Solución de hidroxietilcelulosa 1%
pHmetro	Balones volumétricos	Test enzimático–colorimétrico GOD–PAP SPINREACT
Balanza Analítica	Microespátulas	Agua destilada
	Termómetro	
	Gradillas	
	Vidrios de reloj	
	Pipetas volumétricas	
	Pipeteador	

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
	Agitadores de vidrio	
	Pizeta	

3. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS PARA DETERMINAR EL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

3.1. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DEL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA DE *Bacillus subtilis*

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Balanza	Columna de vidrio	α -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i> SIGMA
Granataria		10070 inmovilizada en agar-agar
Hot Plate	Balones volumétricos	Solución de almidón al 5%
Espectronic 20D	Pipetas volumétricas	Acido clorhídrico 0.1 N
Refrigerador	Pipetas de Mohr	Cloruro de calcio 0.05 M
	Probeta	Cloruro de calcio 0.5 M

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
	Vasos de precipitado	Buffer acetato de pH óptimo determinado experimentalmente
	Agitadores de Vidrio	Lugol
	Espátulas	Agua estéril
	Microespátulas	Agua destilada
	Soporte metálico	
	Pinza de sostén	
	Pinza de extensión	
	Celdas para leer en Espectronic 20D	
	Contenedor para sustrato con regulador de flujo	

3.2 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS PARA DETERMINAR EL TIEMPO DE ACTIVIDAD DE LA CELULASA DE *Aspergillus niger*

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
Balanza Granataria	Columna de vidrio	Celulasa de <i>Aspergillus niger</i> SIGMA 22174 inmovilizada en agar-agar
Hot Plate	Balones volumétricos	Solución de hidroxietilcelulosa 0.5%
Baño de Agua	Pipetas volumétricas	Buffer citrato de pH óptimo determinado experimentalmente
Refrigerador	Tubos de hemólisis	Agua estéril
Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 12	Micropipeta de capacidad variable, hasta 100 µL.	Test enzimático-colorimétrico GOD-PAP SPINREACT
	Celdas para leer en espectrofotómetro UV-Vis Lambda 12	Agua destilada
	Agitadores de Vidrio	
	Termómetro	

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
	Gradillas	
	Microespátulas	
	Soporte metálico	
	Pinza de sostén	
	Pinza de extensión	
	Vasos de precipitado	
	Contenedor para sustrato con regulador de flujo	

ANEXO IV
CERTIFICADOS DE ANALISIS

ANEXO V

METODO DE ANALISIS ESTADISTICO: DISTRIBUCION "t" DE STUDENT^(2, 3)

La prueba de la hipótesis es una rama de la inferencia estadística, en la cual se decide si una afirmación o conjetura acerca de un parámetro poblacional es o no verdadera.

En el análisis de una hipótesis, se sabe que los valores estadísticos de la muestra, tales como las medias y las varianzas, son muy útiles, como estimaciones puntuales de los parámetros poblacionales correspondientes.

Para el análisis de una muestra, el proceso básico para la prueba de significación se debe seguir de la siguiente manera:

- Formulación de dos hipótesis. La primera es la hipótesis nula (H_0), la cual afirma la verdad, expresa que el parámetro de la población es como se ha especificado; la segunda es la Hipótesis alternativa o hipótesis de investigación (H_1), la cual contradice a la primera, es decir es falsa, ya que ofrece una alternativa a la proposición.
- Identificación de una distribución de muestreo apropiada, según el tamaño de muestra. Utilizando para muestras mayores de 30 la "distribución normal" y para menores de 30 la "distribución t de student".

- Cálculo del valor estadístico de la prueba.
- Comparación del valor estadístico de la muestra con el valor crítico de la distribución teórica apropiada, según el riesgo de error que se esté dispuesto a asumir. Rechazándose la hipótesis nula si el valor estadístico de la prueba excede (en valor absoluto) los valores críticos de la distribución teórica; en caso contrario se acepta la hipótesis nula.

Al tomar una decisión a partir de una hipótesis basada en la teoría de la probabilidad se pueden cometer dos tipos de errores, presentándose posibilidades de la siguiente forma:

ACCION A TOMAR	SI H_0 ES VERDADERA	SI H_0 ES FALSA
Aceptar H_0	Decisión correcta	Error tipo II
Rechazar H_0	Error tipo I	Decisión correcta

Los valores críticos que generalmente se relacionan en las pruebas de significación son los valores que corresponden a los riesgos del 1% y 5% de rechazar la hipótesis nula, cuando es verdadera, por lo tanto el investigador debe decidir cual es el error que está dispuesto a asumir, de acuerdo a la naturaleza del fenómeno que se investiga. La probabilidad de rechazar una hipótesis nula (Error tipo I) recibe el nombre de nivel de significación (α) de la prueba.

DISTRIBUCION "t" DE ESTUDENT

Este tipo de distribución se realiza cuando se necesita analizar muestras pequeñas (muestras menores de 30), por razones de economía de tiempo y reducción de costos.

Se debe señalar que no existe solo una, sino varias distribuciones t. Cada una está asociada con los grados de libertad (ν), el cual se refiere al número de valores libres para variar después de haber impuesto ciertas restricciones a los datos y se definen como el número de muestras observadas (n) menos uno.

$$\nu = n - 1$$

PRUEBAS DE SIGNIFICACION PARA DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES

Los grados de libertad utilizados en éste tipo de distribución se calculan de la siguiente manera:

$$\nu = (n_1 + n_2) - 2$$

En donde:

n_1 = número de muestras analizadas de la primera serie

n_2 = número de muestras analizadas de la segunda serie

La prueba t no relacionada se usa para diseños en los cuales se estudia una variable independiente bajo dos condiciones, cuando hay diferentes sujetos en las dos condiciones.

Utilizando la ecuación siguiente:

$$t_c = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

En donde : $S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$ Es la varianza

\bar{X}_1 = Media aritmética para la primera serie analizada

\bar{X}_2 = Media aritmética para la segunda serie analizada

n_1 = número de muestras analizadas de la primera serie

n_2 = número de muestras analizadas de la segunda serie

El contraste se hace comparando el valor t de la prueba con el valor crítico de t para un determinado nivel de significación. La diferencia entre las dos medias muestrales se considera significativa al 5%, si el valor absoluto observado de t excede al valor de $t_{0.05}$ o $t_{0.025}$, dependiendo si la prueba es de uno o dos extremos. Si el nivel de significación es del 1%, la diferencia entre las medias se encontrara significativa, si el valor observado de t_c es mayor, en valor absoluto, que el valor crítico de $t_{0.01}$ ó $t_{0.005}$, ya sea si es de uno o dos extremos.

ANEXO VI

ESQUEMA DE CALCULO DE LA DISTRIBUCION "t" DE STUDENT

A partir de los datos obtenidos en la tabla N°1 en análisis de resultados se puede obtener los datos de la media aritmética y la varianza de los porcentajes de actividad de la enzima libre e inmovilizada.

$$\text{Media Aritmética: } \bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

En donde: $\sum X$ es la sumatoria de los valores de actividad enzimática

y n es el número de muestras

Tabla N°1. Actividad de la Enzima α -Amilasa de *Bacillus subtilis* Libre e Inmovilizada frente

a los cambios de pH (a temperatura ambiente).

pH	Enzima Libre			Enzima Inmovilizada		
	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)	$\Sigma (X_i - \bar{X})^2$	mg. de almidón hidrolizado	Porcentaje de Actividad (%)	$\Sigma (X_i - \bar{X})^2$
5.0	46.23	92.46	4.88	39.71	79.42	59.44
6.0	48.24	96.48	3.28	46.43	92.86	32.83
7.0	47.20	94.40	0.07	47.36	94.72	57.61
7.5	48.33	96.66	3.96	47.07	94.14	49.14
8.0	46.67	93.34	1.77	37.26	74.52	159.01
		$\bar{X} = 94.67$	13.96		$\bar{X} = 87.13$	358.07

Calculando la Varianza:

$$S_1^2 = \frac{\sum (X_1 - \bar{X})^2}{n_1 - 1}$$

Para la enzima libre:

$$S^2 = \frac{13.96}{4}$$

$$S^2 = 3.49$$

Para la enzima inmovilizada:

$$S^2 = \frac{358.07}{4}$$

$$S^2 = 89.52$$

Luego se procede a la determinación de la t de prueba, utilizando la fórmula de distribución de muestras independientes no relacionadas siguiente:

$$t_c = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = 1.57$$

En donde:

t = distribución ''t'' de student

n_1 = número de muestras analizadas (enzima libre)

n_2 = número de muestras analizadas (enzima inmovilizada)

S^2 = Varianza

\bar{X} = Media aritmética

Luego se determinan los grados de libertad de muestras independientes no relacionadas:

$$v = (n_1 + n_2) - 2$$

Siendo t crítico con grados de libertad de 8 y grado de significación al 1%: 2.90.

Y t crítico con grados de libertad de 8 y grado de significación al 5%:1.86

Al comparar el valor de t de prueba, con el valor de t crítico tanto a un nivel de significación del 5% como de un 1% se acepta que: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

ANEXO VII

DISTRIBUCION "t" DE STUDENT PARA LOS DIFERENTES

ENSAYOS

- **Distribución "t" de student del ensayo de actividad amilolítica en función del pH**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Libre	94.67	3.49	5	1.57
Enzima Inmovilizada	87.13	89.51	5	

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 1%: 2.90

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 5%: 1.86

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=8)}$ se acepta que: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

- **Distribución "t" de student del ensayo de actividad amilolítica en función de la temperatura**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Libre	96.67	8.99	8	3.52
Enzima Inmovilizada	74.25	275.09	8	

Valor crítico de t con $v = 14$ con un nivel de significación del 1%: 2.62

Valor crítico de t con $v = 14$ con un nivel de significación del 5%: 1.76

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=14)}$ se acepta que: La actividad de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

- **Distribución "t" de student del ensayo de actividad celulolítica en función del pH**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Libre	2.70	0.13	5	5.13
Enzima Inmovilizada	1.31	0.16	5	

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 1%: 2.90

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 5%: 1.86

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=8)}$ se acepta que: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada difiere de forma significativa frente a los cambios de pH.

- **Distribución "t" de student del ensayo de actividad celulolítica en función de la temperatura**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Libre	3.60	1.19	5	0.86
Enzima Inmovilizada	2.91	1.46	5	

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 1%: 2.90

Valor crítico de t con $v = 8$ con un nivel de significación del 5%: 1.86

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=8)}$ para un nivel de significación del 1% se acepta que: La actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* en forma libre e inmovilizada no difiere de forma significativa frente a los cambios de temperatura.

- **Distribución "t" de student de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* en el ensayo de determinación de la forma de presentación del preparado: en seco o húmedo**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Inmovilizada Almacenada en Seco	81.29	285.40	4	0.77
Enzima Inmovilizada Almacenada en Húmedo	74.31	105.57	7	

Valor crítico de t con $v = 9$ con un nivel de significación del 1%: 2.82

Valor crítico de t con $v = 9$ con un nivel de significación del 5%: 1.83

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=9)}$ se acepta que: La actividad de la α -amilasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

- **Distribución "t" de student de la celulasa de *Aspergillus niger* en el ensayo de determinación de la forma de presentación del preparado: en seco o húmedo**

	Media Aritmética	Varianza	Número de Muestra	Valor de "t" de la Prueba
Enzima Inmovilizada Almacenada en Seco	2.71	3.26	4	0.59
Enzima Inmovilizada Almacenada en Húmedo	2.63	2.30	4	

Valor crítico de t con $v = 6$ con un nivel de significación del 1%: 3.14

Valor crítico de t con $v = 6$ con un nivel de significación del 5%: 1.94

Al comparar el valor de t_c de prueba con el valor crítico de $t_{(v=6)}$ se acepta que: La actividad de la celulasa inmovilizada almacenada en seco no difiere de forma significativa de la almacenada en húmedo.

