



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Desarrollo de inmovilizados de naringinasa  
en criogeles de PVA-PEG y en membranas  
de ultrafiltración para la reducción del  
amargor en zumo de pomelo**

TESIS DOCTORAL

Yaiza González Temiño

Burgos, 2020



## AGRADECIMIENTOS

Todo el trabajo que ha supuesto el desarrollo de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo de numerosas personas a las que quiero dedicar estas páginas.

En primer lugar, a mis directoras de proyecto, las Dras. Natividad Ortega y M<sup>a</sup> Dolores Busto, por vuestras enseñanzas y consejos, y por tener siempre tiempo para atender mis dudas. Sois para mí un ejemplo de dedicación y esfuerzo.

A todos los miembros del Área de Bioquímica y Biología Molecular por su colaboración y apoyo. Especialmente a mis compañeros de laboratorio, las charlas durante los cafés o improvisadas por los pasillos han hecho mucho más llevaderos los problemas surgidos a lo largo de esta Tesis. Mención especial se merecen todos aquellos que me han ayudado con la manipulación de la naringinasa, a la que he desarrollado alergia.

También quiero acordarme de mis amigos, os he dedicado durante estos años menos tiempo del que me gustaría. Gracias por vuestro apoyo y comprensión.

Finalmente, quiero dar las gracias a toda mi familia, especialmente a a mis padres, Miriam y Fernando, por apoyarme siempre y animarme a continuar mis estudios. Sin vuestro soporte a nivel económico y emocional este trabajo no habría sido posible. Y a mi pareja, Saúl, porque sin tus ánimos durante este último año hubiese sido mucho más difícil culminar esta dura, pero enriquecedora etapa del Doctorado.

*Yaiza*



# Índice general

---

## **Introducción y objetivos**

Introducción y objetivos..... 1

## **Capítulo I**

Fundamentos teóricos.....7

## **Capítulo II**

Inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol.....51

## **Capítulo III**

Inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración ..... 113

## **Capítulo IV**

Aplicación de naringinasa inmovilizada para la reducción del amargor en zumo de pomelo ..... 169



# Introducción y objetivos

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Las enzimas juegan un papel fundamental en la industria alimentaria como auxiliares o coadyuvantes de fabricación para la mejora de los procesos, el incremento de los rendimientos y el desarrollo de nuevos productos. En el sector de las industrias procesadoras de cítricos, estos biocatalizadores se emplean para mantener la estabilidad de la pulpa, incrementar el rendimiento en la recuperación de aceites esenciales, pelar el fruto, mejorar la clarificación y reducir la viscosidad de los zumos concentrados sin afectar a su turbidez. Una línea de investigación de creciente interés en los últimos años se centra en la aplicación de enzimas como alternativa a los procesos tradicionales de reducción del amargor de los zumos cítricos.

La creciente popularidad de los zumos de cítricos entre los consumidores, debido a sus características organolépticas, nutritivas y bioactivas, ha hecho que el mercado de estos zumos haya crecido rápidamente en los últimos años. Según el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) la producción mundial de cítricos fue de unos 102 millones de toneladas en el periodo 2018/2019. El zumo de naranja es el más demandado habiéndose incrementado su producción un 36% en este periodo. Así, de las 54,3 millones de Tm de este fruto producidas en el último año, aproximadamente el 40% (23,4 millones de Tm) se procesaron para elaboración de zumo. En el caso del zumo de pomelo, con una menor demanda, se destina tan sólo el 8% de la producción de este cítrico (6,9 millones de Tm). Uno de los principales problemas para la comercialización de zumo de pomelo es su alto grado de amargor provocado fundamentalmente por el flavonoide naringina. Tradicionalmente, la industria procesadora de cítricos ha empleado resinas de adsorción para la eliminación de los compuestos amargos. Esta tecnología puede alterar la composición y calidad del producto final ya que también se eliminan vitaminas, compuestos fenólicos y componentes responsables del aroma, sabor y color de los zumos.

Una alternativa biotecnológica para reducir el amargor en los zumos es el tratamiento con naringinasa. La actuación específica de la enzima sobre el compuesto amargo (naringina) tendría un menor impacto en la composición del zumo. Sin embargo, la aplicación directa de naringinasa en el procesado de zumo de pomelo tiene como limitación la reducción de su actividad por el pH ácido y la presencia de inhibidores. Estos inconvenientes pueden verse reducidos mediante la tecnología de inmovilización enzimática, si se genera entorno a la enzima un microambiente más favorable que las condiciones del zumo. Adicionalmente, la inmovilización de la enzima facilita su separación del producto final y posibilita su reutilización, abaratando los costes globales del proceso.

En este contexto, el **objetivo general** de la investigación desarrollada ha sido la obtención de naringinasa inmovilizada activa y estable para su aplicación en la eliminación del amargor en zumo de pomelo.

Para la consecución de este objetivo general se han establecido una serie de **objetivos específicos**, que se desarrollan en tres de los cuatro capítulos en los que se ha estructurado la Tesis:

▪ **Inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol (Capítulo II).** Se aborda en este capítulo el estudio de las características de la matriz soporte, peso molecular, grado de hidrólisis y grado de polimerización del alcohol polivinílico (PVA) y peso molecular del polietilenglicol (PEG), y su efecto en los rendimientos de inmovilización y estabilidad mecánica de los inmovilizados. Aplicando la metodología de superficie de respuesta y la función de deseabilidad se han analizado y optimizado las condiciones de inmovilización (pH y concentraciones de PVA y PEG) para conseguir una mayor eficacia de inmovilización y estabilidad operacional del inmovilizado. También se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de la naringinasa inmovilizada en comparación con su contrapartida soluble.

▪ **Inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración (Capítulo III).** Para la consecución de este objetivo específico, se ha aplicado la técnica de ensuciamiento inducido en membranas de ultrafiltración de polietersulfona. Se ha estudiado el efecto del tamaño de poro, configuración de la membrana y los parámetros, presión transmembrana, concentración de enzima y pH de inmovilización. Se han aplicado también alternativas de inmovilización como la incorporación de glutaraldehído, para producir el entrecruzamiento adicional de la enzima, o la funcionalización previa de la membrana con polietilenimina. De estos estudios se han seleccionado los inmovilizados enzimáticos en base a los rendimientos de inmovilización y la conversión de naringina.

▪ **Aplicación de naringinasa inmovilizada para la reducción del amargor en zumo de pomelo (Capítulo IV).** En esta fase de la investigación se ha estudiado la capacidad de degradación de naringina y estabilidad operacional en zumo de pomelo de los inmovilizados con actividad naringinasa desarrollados en los anteriores bloques de experiencias (Capítulo II y III). Se han realizado estudios previos en medio tamponado y en zumo sintético, seleccionando los inmovilizados con mayor capacidad catalítica y estabilidad operacional para aplicar al zumo natural. Por último, se ha llevado a cabo la caracterización físico-química del zumo tratado enzimáticamente y la determinación de su capacidad antioxidante.

Se ha incorporado un primer capítulo de **Fundamentos teóricos (Capítulo I)**, en el que se incluye una revisión bibliográfica sobre la enzima naringinasa en cuanto a mecanismo de reacción, fuentes de obtención y principales aplicaciones biotecnológicas. También se abordan, en este primer capítulo, las fuentes de amargor en los zumos cítricos, junto con las principales estrategias de eliminación de los compuestos amargos. En un último apartado se describen las principales tecnologías de inmovilización de enzimas y los efectos de la inmovilización sobre las propiedades y características bioquímicas de las enzimas. Adicionalmente a este primer capítulo de fundamentos teóricos, en cada uno de los capítulos siguientes (Capítulo II, III y IV) se incluyen breves introducciones teóricas de la temática concreta que se aborda en cada uno de ellos.



# Fundamentos teóricos



## **Capítulo I: Fundamentos teóricos**

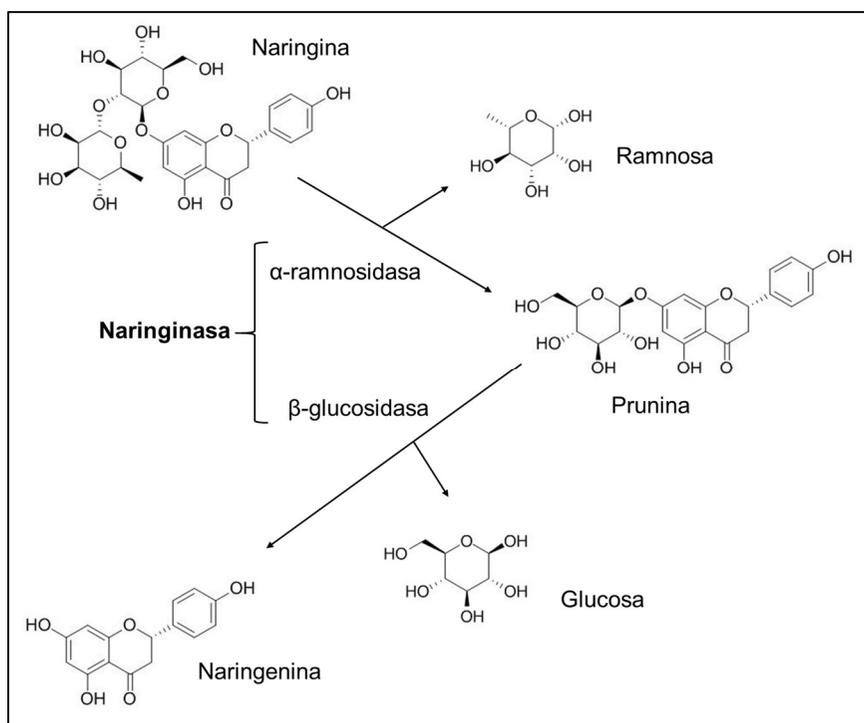
<b>1. NARINGINASA .....</b>	<b>11</b>
1.1. Complejo enzimático y características bioquímicas .....	11
1.2. Principales aplicaciones biotecnológicas .....	13
<b>2. ELIMINACIÓN DEL AMARGOR EN ZUMOS CÍTRICOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Fuentes de amargor en los zumos cítricos.....	15
2.2. Técnicas de reducción del amargor.....	16
2.2.1. Procesos físico-químicos .....	17
2.2.2. Técnicas biotecnológicas .....	18
<b>3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Técnicas de inmovilización enzimática .....	22
3.1.1. Inmovilización en membranas .....	25
3.2. Inmovilización de naringinasa .....	26
3.3. Efecto de la inmovilización sobre las propiedades de las enzimas .....	30
3.3.1. Características cinéticas.....	31
3.3.2. Estabilidad enzimática .....	32
<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>45</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>	<b>47</b>
<b>LISTADO DE TABLAS .....</b>	<b>49</b>



# 1. NARINGINASA

## 1.1. Complejo enzimático y características bioquímicas

La naringinasa es un complejo enzimático responsable de la hidrólisis del flavonoide naringina (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicósido) en su aglicona, la naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona). La reacción se lleva a cabo en dos pasos: primero la  $\alpha$ -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) transforma la naringina en prunina y ramnosa, y después la  $\beta$ -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza la prunina en naringenina y glucosa (Figura 1). Además de la naringina, pueden actuar como sustratos de la naringinasa otros glucósidos que contengan  $\alpha$ -ramnosa y  $\beta$ -glucosa terminal, como la rutina, la quercetina, la hesperidina, la diosgenina y los ter-fenil glucósidos (Ribeiro, 2011).



**Figura 1.** Hidrólisis enzimática de naringina.

El aislamiento de naringinasa fue descrito por primera vez en 1938 a partir de semillas de apio (Hall, 1938) y, más tarde, en hojas de pomelo (Thomas *et al.*, 1958; Ting, 1958). Desde entonces, se han referenciado diferentes microorganismos para la producción de esta enzima (Tabla 1). La mayoría de los estudios se han centrado en la obtención de naringinasa a partir de hongos, principalmente de *Aspergillus* sp., en especial, de *Aspergillus niger*. Sin embargo, los preparados comerciales de

naringinasa más utilizados son de *Penicillium* sp. (Nobile *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2011a; Ribeiro, 2011; Nunes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2016a). También se ha obtenido naringinasa, aunque en menor medida, a partir de bacterias como *Staphylococcus xylosus* (Puri *et al.*, 2011) o *Bacillus methylotrophicus* (Mukund *et al.*, 2014). Recientemente, Zhu *et al.* (2017a) han purificado y aislado una naringinasa de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 y Borzova *et al.* (2018) de *Cryptococcus albidus*.

**Tabla 1.** Fuentes microbianas de producción de naringinasa.

Microorganismos	Referencias
<i>Aspergillus niger</i>	Bram y Solomons (1965)
<i>Penicillium decumbens</i>	Fukumoto y Okada (1973)
<i>P. decumbens</i> PTCC 5248	Norouzian <i>et al.</i> (1999)
<i>A. terreus</i> CECT 2663	Soria <i>et al.</i> (2004)
<i>A. niger</i> MTCC 1344	Puri y Kalra (2005) Puri <i>et al.</i> (2005a)
<i>A. niger</i> CECT 2088	Busto <i>et al.</i> (2007)
<i>A. oryzae</i> JMU316	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>Staphylococcus xylosus</i> MAK2	Puri <i>et al.</i> (2010)
<i>A. niger</i> VB07	VinothKumar <i>et al.</i> (2010)
<i>A. sojae</i>	Chang <i>et al.</i> (2011)
<i>Williopsis californica</i> Jmudeb007	Ni <i>et al.</i> (2011)
<i>S. xylosus</i> MAK2	Puri <i>et al.</i> (2011)
<i>A. niger</i> MTCC 1344	Shanmugaprakash <i>et al.</i> (2011)
<i>A. brasilensis</i> MTCC 1344	Shanmugaprakash <i>et al.</i> (2015)
<i>A. niger</i>	Awad <i>et al.</i> (2016)
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pandove <i>et al.</i> (2016)
<i>B. methylotrophicus</i>	Raval <i>et al.</i> (2017)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 11568	Zhu, <i>et al.</i> (2017a)
<i>A. oryzae</i> 11250	Zhu <i>et al.</i> (2017b)
<i>Cryptococcus albidus</i>	Borzova <i>et al.</i> (2018)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Housseiny y Aboelmagd (2019)

A nivel estructural se ha descrito la naringinasa como un heterodímero compuesto por subunidades de  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, con tamaños que varían, dependiendo de la fuente microbiana, desde 60 hasta 240 kDa (Puri y Kalra, 2005; Zhu *et al.*, 2017a).

Las características de la naringinasa están influenciadas por el origen microbiano, los nutrientes y los compuestos empleados como inductores de su biosíntesis. La glucosa, fructosa y ramnosa ejercen un efecto inhibitorio sobre este complejo enzimático (Tsen, 1984; Norouzian *et al.*, 2000). Martearena *et al.* (2008) señalaron que la ramnosa es uno de los inhibidores más potentes de la actividad  $\alpha$ -ramnosidasa del complejo naringinasa. Sin embargo, azúcares como la sacarosa o el sorbitol no tienen efecto inhibitorio (Tsen, 1984). El ácido cítrico e iones metálicos como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  actúan también inhibiendo la actividad de la enzima (Norouzian *et al.*, 2000).

El pH óptimo de la naringinasa oscila entre 4 y 5, y la temperatura óptima para la enzima obtenida de *A. niger* entre 45 y 60 °C (Puri *et al.*, 2005a; Busto *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2012), mientras que para la enzima obtenida de *P. decumbens* es de 55 a 70 °C (Norouzian *et al.*, 2000; Şekeroğlu *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2010).

## 1.2. Principales aplicaciones biotecnológicas

La mayoría de los estudios sobre naringinasa se centran en su aplicación en la **eliminación del amargor en zumos cítricos** mediante la hidrólisis de naringina, principal compuesto amargo, en naringenina, que es insípida. La aplicación de la naringinasa en el procesado de zumos se detalla con más profundidad en el apartado 2 de este capítulo.

Además, la naringinasa es objeto de investigación y de interés por su potencial utilización en diferentes procesos industriales. Entre otras aplicaciones, este biocatalizador se ha empleado para la **despolimerización de goma gellan** con el fin de mejorar su viscosidad (Puri, 2012; Yadav *et al.*, 2018). Este polisacárido se utiliza en la industria alimentaria como aditivo (E-418) con funciones estabilizantes, espesantes y gelificantes.

Por otra parte, la actividad naringinasa combinada con arabinosidasa libera compuestos volátiles que contribuyen a la **mejora del aroma en vinos** (Gallego *et al.*, 2001). La naringinasa de *Cryptococcus albidus* purificada por Borzova *et al.* (2018) demostró una alta tolerancia al etanol y la glucosa por lo que podría resultar de interés en la industria del vino.

La **digestión de pulpa de tomate** mediante el empleo de ramnosidasas de *Lactobacillus plantarum* fue investigada por Beekwilder *et al.* (2009). Estas enzimas se aplicaron con el fin de mejorar la biodisponibilidad de los flavonoides en los productos

procesados de tomate. También se ha empleado naringinasa para la **desglicosilación de flavonoides** con el fin de mejorar la actividad biológica y la biodisponibilidad de estos compuestos (Ribeiro, 2011). Bouriche y Arnhold (2010) descubrieron que la desglicosilación de flavonoides en extractos de hoja de *Cleome arabica* por naringinasa, mejoraba el efecto beneficioso de los extractos sobre los leucocitos polimorfonucleares. Esto tiene importancia terapéutica ya que la reducción de la quimiotaxis en neutrófilos humanos puede usarse como tratamiento de enfermedades crónicas.

Con el fin de aprovechar los subproductos de la industria de los cítricos, se ha utilizado una ramnosidasa recombinante de *E. coli* para el **tratamiento de piel de mandarina “kinnow”** (Puri, 2012).

La **biotransformación de esteroides** para la obtención de fármacos y precursores de fármacos es otro de los campos en los que se ha empleado la naringinasa. El tratamiento con este biocatalizador de semillas de fenogreco (*Trigonella foenum graecum*) dio lugar a la obtención de sapogeninas y diosgenina, precursores de medicamentos esteroideos (Elujoba y Hardman, 1987).

La naringinasa se puede aplicar, además, en la **producción de ramnosa, prunina y naringenina**. La ramnosa es un intermediario quiral en la síntesis de agentes farmacéuticos y protectores de plantas (Ribeiro, 2011). Los flavonoides prunina y naringenina, por su parte, han demostrado tener efecto antioxidante, antiinflamatorio y capacidad para reducir el colesterol en sangre (Ribeiro *et al.*, 2008; Orhan *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2019). También se ha descrito que la naringenina puede tener efecto antimutagénico y neuroprotector (Vila-Real *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2017) y la prunina actividad antiviral y antiinflamatoria (Puri, 2012). Además, la prunina podría ser usada como edulcorante en el tratamiento de la diabetes (Ribeiro, 2011; Jung *et al.*, 2017).

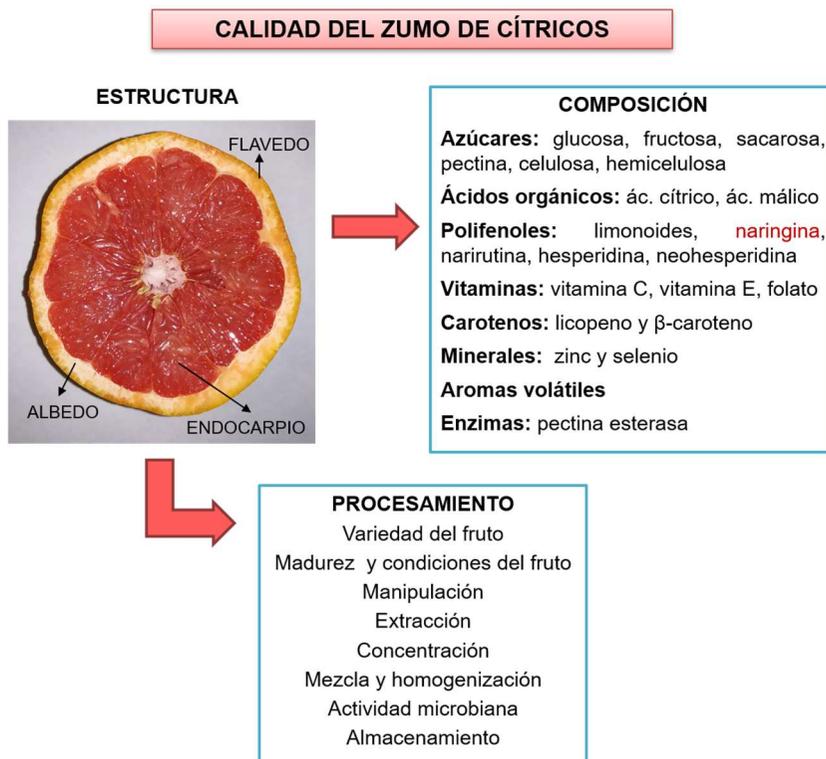
La **producción del compuesto K** a partir de su precursor mediante el tratamiento con naringinasa ha sido estudiada recientemente por Zheng *et al.* (2019). Este compuesto se absorbe mejor que su precursor y tiene importantes funciones farmacológicas.

Otro de los campos en los que puede ser de utilidad la naringinasa es en la **hidrólisis de glucolípidos** con el fin de obtener ácidos grasos especiales y nuevos glucolípidos con propiedades bioactivas mejoradas (Saerens *et al.*, 2009; Ribeiro, 2011; Puri, 2012). En este sentido, Magario *et al.* (2009) hidrolizaron di-ramnolípidos en mono-ramnolípidos mediante la naringinasa de *P. decumbens* mejorando las capacidades surfactantes de estos compuestos.

## 2. ELIMINACIÓN DEL AMARGOR EN ZUMOS CÍTRICOS

### 2.1. Fuentes de amargor en los zumos cítricos

La calidad de los zumos de cítricos (Figura 2) depende de la variedad, la composición, la anatomía y el grado de madurez del fruto, junto con la forma de procesado y almacenamiento del zumo (Cook, 1983).



**Figura 2.** Factores que determinan la calidad de los zumos cítricos: estructura, composición y procesamiento del fruto. Adaptado de Cook (1983).

Algunas variedades de cítricos, como el pomelo o la naranja agria, así como los frutos poco maduros, contienen altas cantidades de compuestos amargos, fundamentalmente el flavonoide naringina y el limonoide limonina (Nobile *et al.*, 2003). Esto supone una limitación para la comercialización de los zumos de estas frutas, ya que, a pesar de sus características nutritivas y bioactivas, el amargor provoca el rechazo del consumidor.

En el zumo de pomelo el principal compuesto responsable del amargor es la **naringina** (Puri y Banerjee, 2000) que produce el denominado “immediate bitterness”. Este flavonoide se encuentra fundamentalmente en el albedo y el flavedo de los cítricos

y en menores cantidades en el endocarpio. Su concentración depende del grado de madurez del fruto, disminuyendo a medida que la fruta madura (Puri *et al.*, 1996a; Kore y Chakraborty, 2015).

La naringina no es un componente indeseable de los zumos ya que contribuye a sus características bioactivas. Sin embargo, a altas concentraciones el amargor es tan intenso que provoca el rechazo del consumidor. Cuando la naringina está presente en soluciones acuosas el sabor amargo puede detectarse a concentraciones superiores a 20 ppm, sin embargo, en zumos de pomelo, el amargor sólo es detectado a concentraciones por encima de 300-400 mg L<sup>-1</sup> (Soares y Hotchkiss, 1998a; Ribeiro *et al.*, 2008). Cantidades moderadas de este compuesto son deseables ya que contribuyen al aroma y sabor de estos zumos. Se han recomendado contenidos máximos de 600 mg L<sup>-1</sup> para zumos de pomelo de buena calidad (Lime, 1977).

El procedimiento más simple para obtener zumos con bajos niveles de flavonoides amargos consiste en emplear frutos maduros y bajas presiones de extracción del zumo, ya que una presión excesiva libera altas cantidades de compuestos amargos procedentes de la cáscara (Pino, 1997). Así, al extraer zumo de pomelo procedente de frutas maduras se encontraron valores medios de naringina de 546 mg L<sup>-1</sup> cuando se llevaba a cabo la extracción a presiones fuertes, mientras que al emplear frutas poco maduras la concentración de naringina se incrementaba hasta 577 mg L<sup>-1</sup> para extracciones suaves y 898 mg L<sup>-1</sup> para extracciones fuertes (Attaway, 1977). Por tanto, es evidente que las propiedades organolépticas del zumo mejoran al disminuir la presión de extracción, pero se reduce el rendimiento del zumo (Pino, 1997).

## 2.2. Técnicas de reducción del amargor

La presencia de amargor reduce la calidad y el valor comercial de los zumos de cítricos (Mongkolkul *et al.*, 2006). El empleo de frutos poco maduros o las técnicas que liberan alta cantidad de compuestos amargos de la cáscara hace que los zumos contengan elevadas cantidades de naringina. A pesar del cuidado que pone la industria en la selección del tiempo de recolección y el método de extracción del zumo, en ocasiones, la cantidad de naringina en los zumos se encuentra por encima del umbral de tolerancia del consumidor por lo que es necesario recurrir a técnicas de eliminación del amargor. Algunas alternativas se basan en la adición de agentes supresores del amargor, el aumento del pH o la incorporación de azúcar para tratar de enmascarar el sabor amargo. Sin embargo, estos procedimientos pueden generar problemas de contaminación o productos secundarios no deseados, así como el aumento de la concentración de azúcares libres en los zumos con los inconvenientes para la salud que ello conlleva (Puri y Banerjee, 2000; Kore y Chakraborty, 2015).

Los métodos tradicionales de eliminación del amargor se basan en el empleo de técnicas físico-químicas para retirar los compuestos amargos, pero tienen el inconveniente de que se eliminan también compuestos responsables de las características sensoriales y bioactivas.

Frente a estas limitaciones se están estudiando alternativas biotecnológicas basadas en el empleo de biocatalizadores, como la naringinasa, que actúan de manera específica sobre los componentes amargos, minimizando la alteración de las características nutricionales y saludables de los zumos. Además, el empleo de métodos enzimáticos permitiría tratar el zumo y la pulpa de forma simultánea (Puri y Banerjee, 2000).

### 2.2.1. Procesos físico-químicos

Los procesos físico-químicos son los métodos de reducción del amargor más utilizados a nivel industrial. Se basan en la capacidad de adsorción de los compuestos amargos a polímeros sintéticos de diferente naturaleza, como poliamidas (Griffith, 1969), acetato de celulosa (Johnson y Chandler, 1981), resinas de estireno-divinilbenceno (Puri, 1984), matrices basadas en nylon (Johnson y Chandler, 1982), tierra de diatomeas (Ribeiro *et al.*, 2002),  $\beta$ -ciclodextrinas (Shaw y Wilson, 1983), resinas de intercambio iónico (Johnson y Chandler, 1985) o polímeros porosos del tipo Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-16, Amberlite IR-400, Amberlite IR-120, NPA-1, Duolite S-861, EXA-45, LX-900 (Ribeiro *et al.*, 2002; Lee y Kim, 2003; Singh *et al.*, 2008; Kola *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2015).

Estas técnicas de adsorción en resinas para la reducción de compuestos amargos tienen gran aceptación en la industria alimentaria fundamentalmente por su bajo coste (Kranz *et al.*, 2011) aunque presentan algunas limitaciones intrínsecas (Puri y Banerjee, 2000; Stinco *et al.*, 2013; Akyildiz y Ağçam, 2014; Ni *et al.*, 2015) que se detallan a continuación:

- Se requiere un procesamiento previo para la clarificación del zumo ya que debe estar libre de aceites, ceras y pulpas. Posteriormente, se debe reconstituir el zumo para recuperar sus cualidades lo que puede encarecer el proceso.
- Las columnas de adsorción suelen regenerarse con álcalis diluidos que pueden afectar a las características organolépticas de los zumos.
- En algunos casos, los productos químicos usados no se pueden reciclar, por lo que el proceso de reducción del amargor y la posterior eliminación de los contaminantes tienen un coste muy elevado.
- Estos métodos pueden alterar la composición y la calidad final del zumo debido a la adsorción de compuestos a las resinas y a reacciones químicas que pueden producirse

entre el adsorbente y los componentes del zumo. Estos procesos pueden disminuir nutrientes como la vitamina C y compuestos bioactivos como los flavonoides, así como componentes responsables del aroma y el sabor.

- Se trata de métodos inespecíficos y por lo tanto ineficientes.

### 2.2.2. Técnicas biotecnológicas

El uso en la industria alimentaria de enzimas y microorganismos como biocatalizadores se ha ido incrementado con el objetivo de optimizar los procesos de producción, desarrollar nuevos productos, aumentar los rendimientos o mejorar la seguridad y las características nutricionales y organolépticas de los alimentos (Ribeiro *et al.*, 2010).

En el sector de los zumos de fruta, las enzimas (pectinasas, celulasas y hemicelulasas) se emplean ampliamente en los procesos de maceración y clarificación del zumo. También se emplean amilasas para degradar el exceso de almidón en los zumos que puede dar lugar a turbidez y gelatinización durante el almacenamiento (Ribeiro *et al.*, 2010). Además de estas aplicaciones industriales, otras enzimas han demostrado tener potencial para mejorar la calidad de los zumos como son la lacasa relacionada con la eliminación de los compuestos fenólicos que interfieren en el color y la turbidez de los zumos y las enzimas implicadas en la reducción del amargor de los zumos de cítricos (Ribeiro *et al.*, 2010).

La limonato deshidrogenasa y la limonoide glucosil transferasa son las enzimas en las que se ha centrado la atención para la reducción de la limonina, principal responsable del amargor retardado (“delayed bitterness”) de los zumos de cítricos. Estas enzimas actúan sobre el precursor de la limonina impidiendo que se forme con el tiempo el compuesto amargo.

La **naringinasa**, enzima en la que se centra esta investigación, es responsable de la hidrólisis de la naringina, principal responsable del amargor en los zumos de pomelo. La naringina se transforma en prunina y ramnosa por la  $\alpha$ -ramnosidasa y, posteriormente, la actividad  $\beta$ -glucosidasa hidroliza la prunina en naringenina. La prunina es un 33% menos amarga que la naringina y la naringenina es insípida (Puri *et al.*, 1996a). La naringina y la naringenina tienen una actividad antioxidante similar o incluso superior en el caso de la naringenina (Cavia-Saiz *et al.*, 2010). Por tanto, la hidrólisis de la naringina en su aglicona parece una buena alternativa para reducir el amargor sin afectar a las propiedades bioactivas de los zumos.

Un estudio comparativo entre el efecto del tratamiento con resinas de adsorción frente al tratamiento enzimático, ha determinado que la capacidad antioxidante total, medida mediante método ABTS y FRAP, era inferior en los zumos tratados con la resina

de adsorción Amberlite IRA-400 que en los zumos tratados con naringinasa libre o inmovilizada en criogeles de alcohol polivinílico (Busto *et al.*, 2014). Además, los zumos tratados enzimáticamente tenían mayor contenido en polifenoles totales. Se observó, también, que el tratamiento enzimático mejoraba la capacidad estabilizadora del radical superóxido frente al zumo no tratado, mientras que el procesado del zumo con la resina de intercambio, al reducir el contenido en polifenoles, disminuía a su vez la capacidad estabilizadora frente al zumo sin tratar. Finalmente, se encontró que los zumos tratados con las resinas de adsorción tenían menor efecto protector sobre el daño oxidativo al ADN que los zumos tratados enzimáticamente. En cuanto a las características organolépticas, Ni *et al.* (2015) encontraron que los zumos tratados con naringinasa presentaban un perfil aromático similar al zumo sin tratar mientras que los zumos tratados con resinas tenían una intensidad aromática mucho más débil.

A pesar de las evidentes ventajas frente a otros catalizadores, el uso industrial de las enzimas se ve limitado por su sensibilidad a las condiciones de procesado (Tran y Balkus, 2011). Su naturaleza proteica hace que sean poco estables, ya que son sensibles a la temperatura y el pH, pudiendo disminuir su actividad y llegando, en algunos casos, a desnaturalizarse. Además, son susceptibles de inhibición por los componentes de la reacción (Mohamad *et al.*, 2015). Por otra parte, la aplicación industrial de algunas enzimas no resulta económicamente rentable ya que su solubilidad en agua dificulta su separación del producto final por lo que no se pueden reutilizar. Además, una vez cumplida su función, es necesario inactivar las enzimas o eliminarlas del medio para evitar que queden como contaminantes del producto final e impedir que continúe la reacción lo que podría afectar a la calidad del producto. Para inactivar las enzimas se han empleado tratamientos térmicos o modificaciones del pH. Sin embargo, estos procedimientos son costosos y pueden reducir la calidad del producto al afectar al aroma, sabor y color, además de generarse contaminantes (Tucker, 1996).

Para solventar los inconvenientes de la aplicación directa de las enzimas y mejorar su aplicabilidad industrial se han desarrollado diferentes estrategias (Cen *et al.*, 2019), siendo la inmovilización enzimática una de las tecnologías más prometedoras (Mateo *et al.*, 2007).

### 3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

En 1971, en la Primera Conferencia sobre Tecnología Enzimática (New Hampshire, EEUU), se adoptó por primera vez el término “enzimas inmovilizadas”. Posteriormente, se definieron como “enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio con retención de su actividad catalítica y que pueden ser usadas repetidamente y de modo continuo” (Chibata *et al.*, 1978).

La invertasa fue la primera enzima inmovilizada en el año 1916 en matrices de carbón e hidróxido de aluminio (Nelson y Griffin, 1916). Entre 1916 y 1940 se hicieron pocos avances en el campo de la inmovilización. Se descubrieron algunos soportes inorgánicos como el vidrio, la alúmina, o vidrio recubierto de un compuesto hidrofóbico, para atrapar enzimas y otras biomoléculas (Dwevedi, 2016). Durante estos años las técnicas se basaban en métodos reversibles, fundamentalmente la adsorción. Es a partir de 1960 cuando se empieza a desarrollar la base de las tecnologías actuales con un incremento exponencial de las publicaciones. Se desarrollaron las técnicas de adsorción, atrapamiento y se comenzó a emplear las técnicas de encapsulación y entrecruzamiento de enzimas (Cao, 2006). A partir de 1985, comienzan a desarrollarse sistemas más complejos que incluían procesos con varias enzimas y la inmovilización de células.

La tecnología de inmovilización de enzimas tiene muchas ventajas a la hora de su aplicación a nivel industrial (Mateo *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2013; Eş *et al.*, 2015; Mohamad *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Bilal *et al.*, 2019):

- Posibilita la recuperación y reutilización del catalizador, mejorando la eficacia del proceso y permite operar en continuo.
- Incrementa la estabilidad frente a las condiciones de procesado (temperatura, solventes, pH, contaminantes e impurezas).
- Permite aplicar altas concentraciones de sustrato y previene la inhibición por producto.
- Incrementa la estabilidad al almacenamiento.
- Mejora los procesos de separación y purificación disminuyendo e incluso eliminando la contaminación del producto final.
- Permite llevar a cabo varias reacciones simultáneas en reactores multienzimáticos.
- Facilita la conclusión rápida de las reacciones mediante la retirada de la enzima de la solución de reacción.
- Reduce la exposición de las enzimas al ataque de proteasas.
- Incrementa la eficacia y la productividad de los procesos.
- Simplifica el diseño y el control de los biorreactores.

Sin embargo, los procesos de inmovilización presentan algunas desventajas como son los posibles cambios conformacionales de la enzima que pueden incluso llegar a provocar su inactivación y el incremento de las limitaciones difusionales y de transferencia de materia. Todo ello hace que, generalmente, las enzimas pierdan actividad y que se puedan modificar sus propiedades cinéticas (Chapman *et al.*, 2018). Otro inconveniente es que en algunos casos la matriz de inmovilización puede favorecer el crecimiento microbiano en los biorreactores (Eş *et al.*, 2015). No obstante, a pesar de estos inconvenientes, la inmovilización de enzimas es una de las herramientas de la biotecnología más eficaces para facilitar los procesos industriales, generar una tecnología limpia e incrementar la especificidad de estos biocatalizadores.

A pesar de los numerosos estudios sobre inmovilización de enzimas, no existe un método estandarizado que sirva para diferentes enzimas y aplicaciones, por lo que se hace necesario estudiar, en cada caso, el método de inmovilización y el soporte más adecuados. En concreto, para la selección de la matriz hay que valorar sus propiedades y características (Tabla 2) ya que el soporte debe tener una alta capacidad de captación de la enzima y ser estable química y mecánicamente con el fin de que no se altere durante el proceso. Además, su preparación debe ser sencilla y barata ya que afecta al coste global del proceso y a su efectividad (Eş *et al.*, 2015; Bilal *et al.*, 2019). Un soporte ideal también debe permitir separar fácilmente el inmovilizado del medio de reacción y retener

**Tabla 2.** Principales consideraciones para seleccionar el soporte de inmovilización (Bickerstaff, 1997).

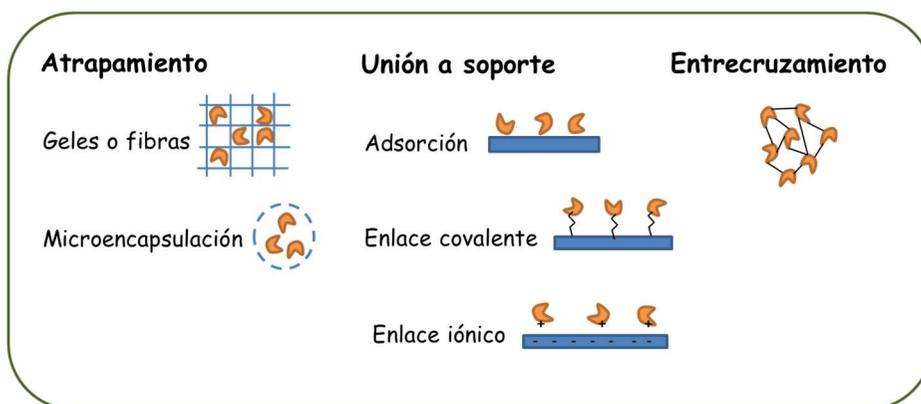
<b>Propiedades</b>	<b>Aspectos a tener en cuenta</b>
Físicas	Dureza, grado de porosidad, volumen de poro, permeabilidad, área superficial, densidad.
Químicas	Regeneración del soporte, hidrofobicidad, grupos funcionales disponibles para modificaciones.
Estabilidad	Actividad enzimática residual, estabilidad al almacenamiento, regeneración de la actividad enzimática, estabilidad mecánica del soporte.
Seguridad	Biocompatibilidad, toxicidad de los componentes, etc.
Económicas	Coste y disponibilidad del soporte y de los reactivos químicos necesarios, impacto medioambiental, preparación a escala industrial, procesado en continuo, vida útil, reutilización del soporte.
Reacción	Radio de flujo, productividad catalítica, cinéticas de reacción, limitaciones difusionales de transferencia de masa de cofactores, sustratos o productos, etc.
Resistencia	Temperatura, pH, mecanismos de defensa al ataque bacteriano y fúngico, etc.

la actividad enzimática. Finalmente, señalar que el soporte debe estar aprobado legalmente para su uso en el caso de la industria alimentaria o farmacéutica (Nedovic *et al.*, 2011).

Junto con el soporte, se ha de evaluar el método de inmovilización más adecuado para la enzima concreta en la que se va a aplicar. Las principales técnicas aplicadas en la inmovilización de enzimas se describen en el siguiente apartado (apartado 3.1).

### 3.1. Técnicas de inmovilización enzimática

Las principales técnicas de inmovilización de enzimas podrían incluirse en alguna las categorías detalladas en la Figura 3: atrapamiento, unión a soporte y entrecruzamiento (Singh *et al.*, 2013). Además, en función de la interacción entre la enzima y el soporte los métodos de inmovilización pueden ser reversibles o irreversibles. Los métodos reversibles son aquellos en los que el biocatalizador se puede separar del soporte en condiciones suaves, mientras que la inmovilización irreversible supone que una vez unida la enzima a la matriz, no se pueden separar sin destruir la actividad enzimática o la funcionalidad del soporte.



**Figura 3.** Principales técnicas de inmovilización de enzimas.

El **atrapamiento** consiste en la localización de la enzima dentro de una matriz polimérica o de una membrana semipermeable que permita la penetración del sustrato pero que impida la liberación del biocatalizador.

La enzima se puede atrapar en **geles** como el alginato de calcio (Mishra y Kar, 2003; Nguyen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017), quitosano (Bilal *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2017), o alcohol polivinílico (Busto *et al.*, 2007; Krasňan *et al.*, 2016; Míguez *et al.*, 2018), entre otros; o dentro de las microcavidades de **fibras** sintéticas, por ejemplo, de

acetato de celulosa (Nakane *et al.*, 2001). También, se pueden formar **microencapsulados** que contengan la enzima en su interior como pueden ser los liposomas (Jahadi y Khosravi-Darani, 2017) o las microcápsulas de quitosano (Kašpar *et al.*, 2013).

El atrapamiento es una técnica sencilla en la que no se producen cambios en las propiedades intrínsecas de la enzima ni modificaciones químicas (Dwevedi, 2016). Seleccionando cuidadosamente el soporte, se puede crear un microambiente óptimo para la enzima (Mohamad *et al.*, 2015), mejorando, además, su estabilidad al estar menos expuesta a las condiciones del medio de reacción (Cao, 2006). Sin embargo, una de las principales desventajas de este método son las limitaciones difusionales del sustrato hacia el centro activo de la enzima (Gorecka y Jastrzębska, 2011). Por otro lado, es importante tener en cuenta que es relativamente fácil que la enzima se libere del soporte en comparación con otros métodos, y que los sustratos y productos deben ser de pequeño tamaño para que puedan atravesar el soporte (Dwevedi, 2016). Además, la matriz generalmente se forma durante el proceso de inmovilización por lo que las condiciones para su obtención deben ser compatibles con la enzima que se quiere inmovilizar (Cao, 2006).

La **unión a soporte** se basa en unir la enzima a un soporte insoluble en agua. Se puede llevar a cabo mediante adsorción física, enlace covalente o enlace iónico.

En la unión mediante **adsorción física** la enzima se une al soporte a través de fuerzas débiles no específicas como interacciones hidrofóbicas y dipolo-dipolo, fuerzas de van der Waals, y enlaces de hidrógeno (Eş *et al.*, 2015). Es un método simple que se basa en la adsorción de moléculas de enzima a la superficie de un soporte poroso, al poner en contacto el biocatalizador con la matriz mediante inmovilización estática, electrodeposición, inmovilización en reactor o adsorción en baño con agitación. Los soportes utilizados son de naturaleza inorgánica como la bentonita, la hidroxiapatita, la tierra de diatomeas o el vidrio poroso, y orgánica como quitina, agar-agar, alginato, quitosano y almidón, entre otros (Jesionowski *et al.*, 2014).

La técnica de adsorción es sencilla y barata, y generalmente mantiene bien las propiedades catalíticas de la enzima, por lo que se usa frecuentemente en los procesos industriales de inmovilización (Bilal *et al.*, 2019). Al tratarse de un método reversible permite recuperar la enzima y el soporte. Por otro lado, las condiciones de inmovilización son suaves y no se produce modificación química por lo que la retención de la actividad catalítica es alta (Cao, 2006), aunque es relativamente sencillo que la enzima se desprenda del soporte ya que está unida mediante interacciones débiles que son susceptibles a cambios en el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. (Mohamad *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018).

La inmovilización mediante **enlace covalente** se basa en la formación de uniones entre grupos funcionales no esenciales de la enzima y el soporte. Las reacciones entre la matriz y el biocatalizador incluyen reacciones de amidación y diazotación, enlaces amida, formación de bases de Schiff's, intercambio tioldisulfuro y reacciones de alquilación. Las moléculas de enzima se unen directamente a los grupos reactivos de la matriz o mediante un brazo espaciador que se une artificialmente al soporte mediante reacción química (Dwevedi, 2016). Entre los soportes empleados se incluyen agarosa, dextranos, celulosa, poli vinil cloruro, vidrio poroso o bentonita (Adlercreutz, 1993; Mohamad *et al.*, 2015). En este tipo de inmovilización el enlace es un tipo de unión fuerte por lo que se evita el desacoplamiento de la enzima del soporte (Liu *et al.*, 2018). Dado que la interacción es muy fuerte, la estabilidad del inmovilizado es muy alta y se incrementa la resistencia de la enzima a las condiciones de procesamiento extremas (temperatura, disolventes orgánicos, desnaturalizantes, etc) (Eş *et al.*, 2015; Dwevedi, 2016). Además, la enzima queda inmovilizada en la superficie del soporte por lo que se favorece el contacto entre biocatalizador y sustrato reduciendo las limitaciones difusionales en comparación con otros métodos (Eş *et al.*, 2015). Sin embargo, esta técnica de inmovilización afecta negativamente a la capacidad catalítica de la enzima ya que en algunos casos se producen cambios conformacionales importantes, el centro activo de la enzima puede ser inactivado debido a las reacciones químicas y la enzima pierde movilidad (Eş *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018).

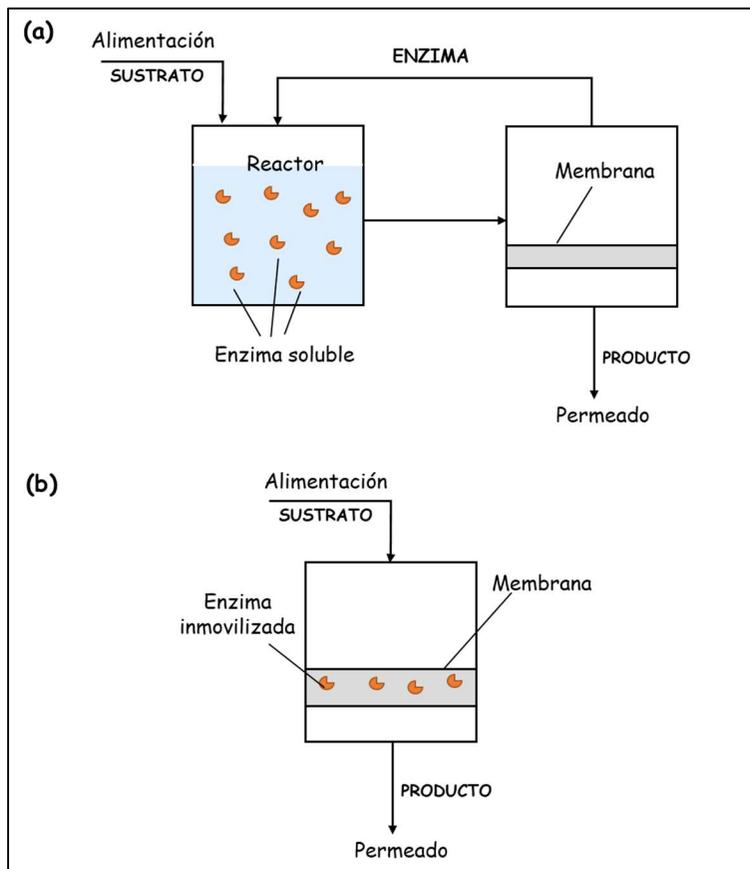
La inmovilización mediante **enlace iónico** se caracteriza por la formación de interacciones iónicas entre las moléculas de enzima y una matriz cargada. Algunos autores incluyen este tipo de inmovilización dentro de los métodos de adsorción. Los soportes pueden ser cambiadores aniónicos si tienen capacidad para cambiar aniones (cloruros o hidroxilos), o catiónicos si pueden cambiar cationes (iones hidrógeno o sodio) con los correspondientes residuos aniónicos o catiónicos de la enzima. Las matrices más comúnmente empleadas son derivados de polisacáridos como dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) o carboximetil-celulosa (CM-celulosa), polímeros sintéticos como derivados del poliestireno, o materiales inorgánicos como Amberlite, sílica y bentonita (Dwevedi, 2016). Este método de inmovilización tiene la ventaja de que las condiciones de inmovilización son suaves y apenas afectan a la conformación de la enzima, sin embargo, debido a la naturaleza iónica del enlace, la enzima se puede liberar por modificaciones en la fuerza iónica o en el pH del medio de reacción.

El **entrecruzamiento** consiste en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima mediante reactivos bi- o multi-funcionales dando lugar a agregados tridimensionales (Dwevedi, 2016). El agente entrecruzante más frecuentemente empleado es el glutaraldehído. Se trata de un método irreversible que no requiere del empleo de un soporte de inmovilización por lo que se eliminan las ventajas y desventajas del empleo de matrices. El uso de soportes inevitablemente diluye la actividad catalítica

al incorporar una porción al biocatalizador que no tiene actividad (Mohamad *et al.*, 2015; Bilal *et al.*, 2019), hecho que se evita al inmovilizar enzimas mediante entrecruzamiento. Esta metodología causa daños mínimos a la estructura tridimensional de la enzima, si bien, algunas enzimas pueden ser inactivadas si el entrecruzamiento afecta al centro activo (Dwevedi, 2016).

### 3.1.1. Inmovilización en membranas

Otra tecnología que está ganando relevancia en los últimos años es la inmovilización en **membranas**. En los reactores enzimáticos de membrana (REM), las enzimas pueden encontrarse de dos formas (Figura 4): (i) soluble en la mezcla de reacción, donde la membrana actúa exclusivamente como barrera selectiva o (ii) inmovilizada en la superficie o en el interior de los poros de la membrana que actúa como soporte de inmovilización. En ambos casos, se puede separar el producto de la mezcla



**Figura 4.** Reactores de membrana: (a) enzima soluble, (b) enzima inmovilizada en la superficie o los poros de la membrana.

de reacción mediante la acción de fuerzas motrices a través de la membrana (potencial químico, presión, campo eléctrico) (Prazeres y Cabral, 1994). Si la enzima se encuentra en forma soluble, la membrana debe conseguir su confinamiento mediante exclusión molecular o repulsión electrostática (Prazeres y Cabral, 1994). En el caso de que la membrana actúe como soporte, la enzima puede ser inmovilizada mediante atrapamiento, gelificación, adsorción física, enlace iónico, enlace covalente o entrecruzamiento (Giorno y Drioli, 2000). Las membranas más utilizadas como soporte son de celulosa, silica o polietersulfona (Chakraborty *et al.*, 2016).

Los REM tienen dos ventajas fundamentales frente a otras técnicas de inmovilización. Ofrecen una alta superficie de contacto por área de volumen y permiten combinar la separación del producto con la reacción enzimática (Oliveira *et al.*, 2008). La separación selectiva del producto permite removerlo del medio de reacción lo que incrementa la actividad enzimática en las reacciones en las que hay inhibición por producto o en aquellas que no son favorables termodinámicamente (Giorno *et al.*, 2001). Además, con este tipo de reactores se puede trabajar fácilmente en continuo, se puede controlar el peso molecular de los hidrolizados gracias a la membrana y llevar a cabo reacciones multifase (Chakraborty *et al.*, 2016). Sin embargo, presentan algunas desventajas como son el descenso de la actividad enzimática con el tiempo, debido a la desorción de la enzima o a su inactivación por las fuerzas de cizalla, y la reducción de la productividad a lo largo del proceso, debido al descenso del flujo de permeado por el ensuciamiento de membrana y la polarización por concentración (Rios *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2016).

### 3.2. Inmovilización de naringinasa

Los primeros intentos para inmovilizar naringinasa datan de 1977 cuando Ono *et al.* (1977) inmovilizaron una naringinasa de *A. niger* en DEAE-Sephadex A25 mediante enlace iónico. Estos autores consiguieron rendimientos de inmovilización de hasta el 80% y un alto porcentaje de hidrólisis de naringina cuando empleaban soluciones del sustrato puro, aunque la actividad de la enzima inmovilizada descendía rápidamente en presencia del zumo. En los años posteriores, la naringinasa de esta misma fuente fue inmovilizada en celulosa aminohexil tanino (Ono *et al.*, 1978), reactores de fibra hueca (Olson *et al.*, 1979; Gray y Olson, 1981), quitina (Tsen y Tsai, 1988), alginato de calcio (Mishra y Kar, 2003; Awad *et al.*, 2016), alcohol polivinílico (PVA) (Busto *et al.*, 2007) o materiales silíceos del tipo MCM-41 y SBA-15 (Luo *et al.*, 2019).

La naringinasa de *Penicillium* sp. ha sido inmovilizada entre otras matrices en vidrio poroso (Manjón *et al.*, 1985), fibras de triacetato de celulosa (Tsen *et al.*, 1989), alginato de calcio (Puri *et al.*, 1996b; Norouzian *et al.*, 1999), clara de huevo (Puri *et al.*,

2001),  $\kappa$ -carragenato (Ribeiro y Ribeiro, 2008), tamiz molecular mesoporoso MCM-41 (Lei *et al.*, 2011a) y PVA (Nobile *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2014).

Norouzian *et al.* (1999) inmovilizaron la naringinasa de *P. decumbens* mediante atrapamiento en alginato de calcio, en clara de huevo entrecruzada con glutaraldehído y en gelatina, y también mediante enlace covalente a semillas de *Ocimum basilicum* a través de enlaces de etilendiamina. Este último método fue el más efectivo al conseguir retener un 92% de proteína y un 57% de la actividad catalítica con respecto a la enzima libre. El empleo de soportes naturales también ha sido estudiado por Puri *et al.* (2005b) los cuales inmovilizaron la naringinasa de *Penicillium* sp. mediante enlace covalente a chips de madera funcionalizados con glutaraldehído consiguiendo mejorar la actividad catalítica con respecto a su contrapartida soluble.

También se han empleado soportes sintéticos para la inmovilización de naringinasa de *P. decumbens*. Por ejemplo, Amaro *et al.* (2009) optimizaron la inmovilización de naringinasa mediante enlace covalente y adsorción a microestructuras poliméricas no iónicas, Amberlite XAD-16N y XAD-1600, consiguiendo retener el 80% de la proteína enzimática. Lei *et al.* (2011a) emplearon tamiz molecular mesoporoso MCM-41 para inmovilizar naringinasa mediante entrecruzamiento con glutaraldehído. Por otra parte, Nunes *et al.* (2012) emplearon PVA entrecruzado con dimetilsulfóxido logrando una retención del 98% de proteína y 87% de enzima activa. Más recientemente, Carceller *et al.* (2019) desarrollaron un inmovilizado en óxidos de grafeno que mantenía un 91% de la actividad de la enzima libre.

Una tecnología emergente que se está utilizando para inmovilización de enzimas es el electrohilado de nanofibras. Esta tecnología ha sido empleada para la inmovilización de naringinasa de *P. decumbens* en fibras de PVA (Nunes *et al.*, 2016b) y de triacetato de celulosa (Huang *et al.*, 2017).

Para la aplicación de la naringinasa a nivel industrial es necesario encontrar un método de inmovilización adecuado que evite los problemas de baja estabilidad operacional y baja actividad frecuentemente observados cuando los inmovilizados de esta enzima se aplican en zumo (Vila-Real *et al.*, 2010). En este contexto, en el presente trabajo de investigación se proponen dos metodologías de inmovilización muy diferenciadas para la naringinasa de *P. decumbens*: (1) el atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol, y (2) la inmovilización en membranas de ultrafiltración mediante la técnica de ensuciamiento inducido, ensuciamiento combinado con entrecruzamiento con glutaraldehído, y mediante enlace iónico a membranas recubiertas con polietilenimina.

En la Tabla 3 se recoge una revisión bibliográfica de los soportes y técnicas empleados en la inmovilización de naringinasa.

**Tabla 3.** Revisión de soportes y técnicas empleados para la inmovilización de naringinasa.

<b>Soporte<sup>1</sup></b>	<b>Técnica de inmovilización</b>	<b>Referencias</b>
DEAE-Sephadex A25	Enlace iónico	Ono <i>et al.</i> (1977)
Celulosa aminohexil tanino	Adsorción	Ono <i>et al.</i> (1978)
Fibras huecas	Membranas	Olson <i>et al.</i> (1979) Gray y Olson (1981)
Quitina	Enlace covalente	Tsen (1984) Tsen y Tsai (1988)
Vidrio poroso	Enlace covalente	Manjón <i>et al.</i> (1985)
Fibras de triacetato de celulosa	Atrapamiento en fibras	Tsen y Yu (1991)
Alginato de calcio	Atrapamiento en gel	Puri <i>et al.</i> (1996b) Norouzian <i>et al.</i> (1999) Mishra y Kar (2003) Pedro <i>et al.</i> (2007)
Films de celulosa triacetato	Atrapamiento	Soares y Hotchkiss (1998b)
Gelatina	Atrapamiento en gel	Norouzian <i>et al.</i> (1999)
Semillas de <i>Ocimum basilicum</i>	Enlace covalente	Norouzian <i>et al.</i> (1999)
Clara de huevo	Enlace covalente	Puri <i>et al.</i> (2001)
PVA	Entrecruzamiento con la matriz	Nobile <i>et al.</i> (2003)
Chips de madera	Enlace covalente	Puri <i>et al.</i> (2005b)
Celita	Adsorción	Şekeroğlu <i>et al.</i> (2006)
PVA	Atrapamiento en gel	Busto <i>et al.</i> (2007)
κ-carragenato	Atrapamiento en gel	Ribeiro y Ribeiro (2008)
Amberlite XAD-16 N Amberlite XAD 1600	Adsorción y enlace covalente	Amaro <i>et al.</i> (2009)
Aquil alcoxisilanos	Encapsulación	Vila-Real <i>et al.</i> (2010)
Silica mesoporoso MCM-41	Adsorción y entrecruzamiento con glutaraldehído	Lei <i>et al.</i> (2011a)
PVA-alginato de calcio	Enlace covalente	Lei <i>et al.</i> (2011b)
CLEAs	Entrecruzamiento	Ribeiro y Rabaça (2011)

Tabla 3. Continuación.

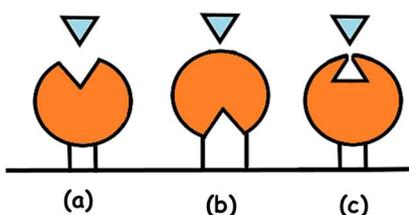
<b>Soporte</b>	<b>Técnica de inmovilización</b>	<b>Referencias</b>
Alginato de calcio	Enlace covalente	Lei y Pan (2012)
PVA-dimetil sulfoxido	Atrapamiento en gel	Nunes <i>et al.</i> (2012) Nunes <i>et al.</i> (2014)
Nanopartículas de fibroína de seda	Entrecruzamiento con el soporte	Wu <i>et al.</i> (2013)
Nanopartículas de óxido de hierro	Enlace covalente	Xiao <i>et al.</i> (2015)
PVA entrecruzado con ácidos borónicos	Atrapamiento en gel	Nunes <i>et al.</i> (2016a)
Alginato de calcio-polietilenimina entrecruzado con glutaraldehído	Enlace covalente	Awad <i>et al.</i> (2016)
Nanofibras electrohiladas de PVA	Atrapamiento en fibras	Nunes <i>et al.</i> (2016b)
Nanofibras electrohiladas de triacetato de celulosa	Atrapamiento en fibras	Huang <i>et al.</i> (2017)
Nanopartículas de grafeno	Adsorción	Gong <i>et al.</i> (2017)
Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con lisina y CLEAs	Enlace covalente con el soporte y entrecruzamiento de las moléculas de enzima	Torabizadeh y Mikani (2018)
Nanoencapsulados de quitosano y de alginato	Nano encapsulación	Housseiny y Aboelmagd (2019)
Sílica mesoporoso MCM-41 Sílica mesoporoso SBA-15	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Luo <i>et al.</i> (2019)
Óxidos de grafeno	Enlace covalente	Carceller <i>et al.</i> (2019)
PVA-PEG	Atrapamiento	González-Temiño <i>et al.</i> (2020)

<sup>1</sup>DEAE: Dietilaminoetil-celulosa, PVA: alcohol polivinílico, CLEAs: “cross-linked enzyme aggregates”, PEG: polietilenglicol.

### 3.3. Efecto de la inmovilización sobre las propiedades de las enzimas

La inmovilización puede causar cambios en las propiedades de las enzimas debido a dos razones fundamentales: (1) modificación directa de la enzima, cuando se producen cambios químicos y/o conformacionales de la estructura proteica, o (2) modificación del microentorno alrededor de la enzima que puede generar efectos de difusión y partición de las moléculas.

Los **efectos directos** de la inmovilización sobre las enzimas pueden deberse a la reacción de algún aminoácido del centro activo con el soporte (Figura 5b) o se pueden producir cambios conformacionales (Figura 5c) que afecten a las características cinéticas de la enzima o que limiten el acceso del sustrato al centro activo de la enzima (Trevan, 1990).



**Figura 5.** Efectos directos de la inmovilización sobre las enzimas: (a) enzima inmovilizada activa, (b) enzima inmovilizada inactiva por reacción del centro activo con el soporte, (c) enzima inmovilizada inactiva por cambios conformacionales.

Por otra parte, las enzimas inmovilizadas se ven afectadas por **efectos microambientales** ya que se forma un microentorno alrededor del soporte distinto al resto de la disolución. Como resultado de las propiedades físicas y químicas del soporte y las interacciones con sustratos, productos y otros componentes del medio de reacción, se puede producir un reparto de moléculas diferente en la fase global y en el microentorno del inmovilizado. Además, se puede restringir la difusión de moléculas hacia el interior de la matriz o dentro de ella (Trevan, 1990).

El *efecto de partición o reparto* se produce cuando la concentración de sustratos u otros compuestos que intervienen en la catálisis es diferente en el microentorno de la enzima inmovilizada y en el grueso de la solución (Adlercreutz, 1993). Este efecto se debe a interacciones electrostáticas o hidrofóbicas que hacen que las moléculas sean atraídas por el soporte, acumulándose en el microentorno, o repelidas de forma que se acumulan en el grueso de la disolución (Chaplin, 2017).

El *efecto de difusión limitada* se produce por la resistencia que se genera, como consecuencia de la inmovilización, a la transferencia de masa hasta o desde el centro activo de la enzima. Las moléculas de sustrato deben difundir desde el seno de la disolución hasta la superficie del soporte a través de una capa no agitada (capa de Nerst) que dificulta la transferencia de masa (difusión externa). Además, el sustrato debe atravesar el interior del gel, microcápsula o poro del soporte para alcanzar la enzima (difusión interna). El producto deberá difundir también desde el interior del soporte hasta el seno de la disolución. Dependiendo de la velocidad de reacción y de difusión, la diferencia de concentración entre el seno de la disolución y el microentorno de la enzima será mayor o menor; de forma que, a mayor velocidad de reacción mayor diferencia de concentración (Adlercreutz, 1993). La difusión de sustratos y productos depende de su peso molecular y tamaño, de la temperatura, y de la viscosidad y composición de la fase líquida (Chaplin, 2017). Los efectos difusionales se pueden minimizar reduciendo el tamaño del biocatalizador, aumentando la concentración de sustrato e incrementando la agitación o el flujo en el reactor (Arroyo, 1998).

Los efectos directos y microambientales de la inmovilización hacen que se perturben en mayor o menor medida las características cinéticas de la enzima: efectos sobre los parámetros cinéticos, efectos sobre las curvas pH/actividad y efectos sobre la acción de inhibidores y activadores (Apartado 3.3.1). También se pueden producir modificaciones en la estabilidad térmica, operacional y al almacenamiento de la enzima como consecuencia de su asociación a un soporte sólido (Apartado 3.3.2).

### 3.3.1. Características cinéticas

Los *parámetros cinéticos* de las enzimas pueden ser alterados por el proceso de inmovilización debido a cambios estructurales internos o porque se restringe el acceso al centro activo (Chaplin, 2017). El efecto de partición o reparto produce modificaciones de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). La  $K_m$  de una enzima se reduce aparentemente si la concentración de sustrato en las proximidades del centro activo es mayor que la del seno de la disolución. Esto ocurre porque se necesita menor concentración de sustrato en la fase global de la disolución para semi-saturar la enzima con el sustrato. Si, por el contrario, la concentración de sustrato en el microambiente de la enzima es menor que en la disolución, la  $K_m$  aparente ( $K_{m,app}$ ) se incrementará porque se necesita mayor concentración de sustrato en el seno de la solución para semi-saturar la enzima. Efectos similares en la concentración local de productos, inhibidores, activadores y cofactores pueden modificar las constantes cinéticas que afectan a estas moléculas (Trevan, 1990; Chaplin, 2017).

Las barreras difusionales, tanto internas como externas, son otra de las razones por las que se ven modificadas las constantes cinéticas. La difusión limitada del sustrato

produce también cambios en la  $K_{m,app}$ , aunque en este caso siempre será mayor que la  $K_m$  intrínseca de la enzima, ya que la concentración de sustrato en el microentorno de la enzima será menor que la concentración en la fase global (Trevan, 1990). Las limitaciones difusionales afectan también a la velocidad de reacción. La presencia de la capa no agitada alrededor del inmovilizado hace que la  $V_{max,app}$  observada de la enzima disminuya. El peso molecular del sustrato puede ser importante, ya que las moléculas grandes difunden peor y están más sujetas a interacciones estéricas con la matriz. Los efectos de la difusión externa se pueden reducir incrementando la velocidad de agitación o de flujo de forma que se reduzca la capa de Nerst (Dwevedi, 2016).

El microentorno creado por el soporte también influye en el *efecto del pH* de forma que la curva pH/actividad de la enzima puede verse ensanchada o estrechada, desplaza o distorsionada (Trevan, 1990). El reparto desigual de protones hace que el pH en el microentorno de la enzima sea más alto o más bajo que el existente en el resto de la fase lo que provoca un desplazamiento aparente del perfil de pH/actividad (Trevan, 1990; Adlercreutz, 1993; Chaplin, 2017). Si la enzima está inmovilizada sobre un soporte polianiónico los protones son atraídos hacia la matriz acumulándose en el microentorno lo que provoca un desplazamiento de la curva pH/actividad hacia valores más básicos. Si el soporte en el que está inmovilizada la enzima es policatiónico, los protones son repelidos lo que provoca que el óptimo se desplace hacia valores más ácidos porque se necesitan más iones hidrógeno en el seno de la disolución para que lleguen hasta el microentorno.

La inmovilización tiene también *efecto sobre inhibidores y activadores*. El reparto desigual de inhibidores o activadores puede tener efecto positivo o negativo en la actividad enzimática en función de si son concentrados o expulsados del microentorno de la enzima. La distribución de estas moléculas estará afectada por factores como la fuerza iónica. La difusión limitada de inhibidores o activadores que intervengan en la reacción también afecta a la actividad enzimática.

### 3.3.2. Estabilidad enzimática

La estabilidad de las enzimas inmovilizadas suele ser mayor que la de la enzima nativa, aunque va a depender de la matriz y las condiciones de inmovilización. Las condiciones de inmovilización tales como el tiempo de reacción, el pH, la temperatura y el tampón deben ser optimizados para asegurar una buena estabilidad de la enzima y eficacia de inmovilización (Dwevedi, 2016). Además, las características químicas y físicas del soporte y el tipo de interacción con la enzima, la libertad de la enzima para cambiar de conformación y el microambiente que rodea al biocatalizador, también condicionan la estabilidad de la enzima inmovilizada (Cao, 2006).

A la hora de hablar de estabilidad de las enzimas inmovilizadas hay que distinguir entre estabilidad operativa, térmica y al almacenamiento. No existe consenso en la bibliografía a la hora de hablar de *estabilidad operativa*. Algunos autores hacen referencia a la capacidad de la enzima para ser reutilizada en ciclos consecutivos de operación. Obviamente, las enzimas libres no pueden ser reutilizadas por lo que una de las principales ventajas de la inmovilización en soportes insolubles es la capacidad para recuperar y reutilizar el biocatalizador lo que disminuye los costes del proceso. Por otro lado, algunos autores al hablar de estabilidad operativa se refieren a la capacidad de la enzima para mantenerse activa frente a las condiciones del proceso. En este sentido, la inmovilización en soportes porosos puede proteger a las enzimas de la proteólisis, de la acción microbiana y evitar la agregación intermolecular (Adlercreutz, 1993; Arroyo, 1998; Mateo *et al.*, 2007). Además, la inmovilización puede prevenir a la enzima de los cambios conformacionales previos a la inactivación (Chaplin, 2017). En los métodos de inmovilización en los que se emplea el enlace covalente, la presencia de uniones multipuntuales hace que la estructura terciaria de la proteína sea más rígida lo que hace que sea más resistente a la inactivación química o térmica (Arroyo, 1998).

Por otro parte, la *estabilidad térmica* de las enzimas puede incrementarse, disminuir o verse inalterada por la inmovilización (Chibata, *et al.*, 1978). Como ocurre con todos los catalizadores, el incremento de la temperatura conduce a una mayor velocidad de la reacción, sin embargo, en el caso de las enzimas, debido a su naturaleza proteica, a partir de cierta temperatura se producen cambios en la estructura terciaria que llevan a su desnaturalización y por tanto a la pérdida de actividad. Si el soporte protege a la enzima de la inactivación térmica ampliando el rango de temperatura a la cual se puede trabajar, se mejora, por tanto, el uso potencial del biocatalizador.

Finalmente, la *estabilidad al almacenamiento* puede verse afectada positiva o negativamente por la inmovilización (Chibata, *et al.*, 1978) por lo que es un parámetro que debe estudiarse tras establecer un nuevo protocolo de inmovilización para una enzima determinada.

#### 4. REFERENCIAS

- Adlercreutz, P. (1993). Immobilized enzymes. En: Nagodawithana, T. y Reed, G. (Eds.), *Enzymes in Food Processing*. Londres: Academic Press, pp. 103-119.
- Akyildiz, A. y Ağçam, E. (2014). Citrus juices technology. En: Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S. y Erten, H. (Eds.), *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*. Nueva York: Springer New York, pp. 37-103.
- Amaro, M. I., Rocha, J., Vila-Real, H., Eduardo-Figueira, M., Mota-Filipe, H., Sepodes, B. y Ribeiro, M. H. (2009). Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Research International*, 42(8), pp. 1010-1017.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), pp. 111-127.
- Attaway, J. A. (1977). Factors influencing the flavor of grapefruit juice. En: *Proceeding of the International Society of Citriculture of the 2<sup>nd</sup> International Citrus Congress*, Orlando, Florida, pp. 816-820.
- Awad, G. E. A., Abd El Aty, A. A., Shehata, A. N., Hassan, M. E. y Elnashar, M. M. (2016). Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin. *3 Biotech*, 6(14), pp. 1-10.
- Bao, Y., Yuan, F., Zhao, X., Liu, Q. y Gao, Y. (2015). Equilibrium and kinetic studies on the adsorption debittering process of ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) juice using macroporous resins. *Food and Bioproducts Processing*, 94, pp. 199-207.
- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C., van Hylckama Vlieg, A. y Hall, R. D. (2009). Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), pp. 3447-3454.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. En: Bickerstaff, G. F. (Ed.), *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press, pp. 1-11.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W. y Zhang, X. (2017). Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system. *Science of the Total Environment*, 575, pp. 1352-1360.
- Bilal, M., Zhao, Y., Noreen, S., Shah, S. Z. H., Bharagava, R. N. y Iqbal, H. M. N. (2019). Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(3), pp. 159-182.
- Borzova, N., Gudzenko, O. y Varbanets, L. (2018). Purification and characterization of a naringinase from *Cryptococcus albidus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(3), pp. 953-969.

- Bouriche, H. y Arnhold, J. (2010). Effect of *Cleome arabica* leaf extract treated by naringinase on human neutrophil chemotaxis. *Natural Product Communications*, 5(3), pp. 415-418.
- Bram, B. y Solomons, G. L. (1965). Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, 13(6), pp. 842-845.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3), pp. 1177-1182.
- Busto, M. D., Cavia-Saiz, M., Ortega, N. y Muñoz, P. (2014). Enzymatic debittering on antioxidant capacity of grapefruit juice. En: Preedy, V. (Ed.), *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Waltham: Academic Press, pp. 195-202.
- Cao, L. (2006). *Carrier-Bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Carceller, J. M., Galán, J. P. M., Monti, R., Bassan, J. C., Filice, M., Iborra, S., Yu, J. y Corma, A. (2019). Selective synthesis of citrus flavonoids prunin and naringenin using heterogeneized biocatalyst on graphene oxide. *Green Chemistry*, 21(4), pp. 839-849.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M. y Muñoz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), pp. 1238-1244.
- Cen, Y. K., Liu, Y. X., Xue, Y. P. y Zheng, Y. G. (2019). Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, en prensa.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S. y Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), pp. 43-48.
- Chang, H. Y., Lee, Y. B., Bae, H. A., Huh, J. Y., Nam, S. H., Sohn, H. S., Lee H. J. y Lee, S. B. (2011). Purification and characterisation of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with in vitro inhibition of HMG-CoA reductase. *Food Chemistry*, 124(1), pp. 234-241.
- Chaplin, M. (2017). *Enzyme Technology*. Disponible en: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/> (Consultado: 20 de julio de 2019).
- Chapman, J., Ismail, A. E. y Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), pp. 20-29.
- Chen, D., Niu, T. y Cai, H. (2010). Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by *Aspergillus oryzae* JMU316. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), pp. 4970-4978.
- Chibata, I., Tosa, T. y Sato, T. (1978). Preparation of immobilized enzymes and microbial cells. En: Chibata, I. (Ed.), *Immobilized Enzymes Research and Development*. Nueva York: John Wiley & Sons, pp. 11-107.

- Cook, R. (1983). Quality of citrus juices as related to composition and processing practices. *Food Technology*, 37(9), pp. 68-71.
- Dwevedi, A. (2016). Basics of enzyme immobilization. En: Dwevedi, A. (Ed.), *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. Cham: Springer International, pp. 21-44.
- Elujoba, A. y Hardman, R. (1987). Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. *Fitoterapia*, 58, pp. 299-303.
- Eş, I., Vieira, J. D. G. y Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), pp. 2065-2082.
- Fukumoto, J. y Okada, S. (1973). Naringinase production by fermentation. Japon. Patente 7.306.554.
- Gallego, M. V., Piñaga, F., Ramón, D. y Vallés, S. (2001). Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *Journal of Food Science*, 66(2), pp. 204-209.
- Giorno, L. y Drioli, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: Applications and perspectives. *Trends in Biotechnology*, 18(8), pp. 339-349.
- Giorno, L., Drioli, E., Carvoli, G., Cassano, A. y Donato, L. (2001). Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of L-malic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), pp. 77-84.
- Gong, A., Zhu, C. T., Xu, Y., Wang, F. Q., Wu, F. A. y Wang, J. (2017). Moving and unsinkable graphene sheets immobilized enzyme for microfluidic biocatalysis. *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1-15.
- González-Temiño, Y., Ortega, N. y Busto, M. (2020). Optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol. *Información Tecnológica*, 31(1), en prensa.
- Gorecka, E. y Jastrzębska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers – A review. *Biotechnology and Food Sciences*, 75(1-2), pp. 65-86.
- Gray, G. M. y Olson, A. C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin in grapefruit juice using a hollow fiber naringinase reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6), pp. 1298-1301.
- Griffith, F. P. (1969). Process for reactivating polyamides resin used in debittering citrus juice. EE.UU. Patente 3.463.763.
- Hall, D. H. (1938). A new enzyme of the glycosidase type. *Nature*, 142, p. 150.
- Housseiny, M. M. y Aboelmagd, H. I. (2019). Nano-encapsulation of naringinase produced by *Trichoderma longibrachiatum* ATCC18648 on thermally stable biopolymers for citrus juice debittering. *Journal of Microbiology*, 57(6), pp. 521-531.

- Huang, W., Zhan, Y., Shi, X., Chen, J., Deng, H. y Du, Y. (2017). Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp. 630-636.
- Jahadi, M. y Khosravi-Darani, K. (2017). Liposomal encapsulation enzymes: From medical applications to kinetic characteristics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(4), pp. 366-370.
- Jesionowski, T., Zdarta, J. y Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5-6), pp. 801-821.
- Johnson, R. L. y Chandler, B. V. (1981). A pilot-plant cellulose acetate gel bead column for the removal of limonin from citrus juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(12), pp. 1183-1190.
- Johnson, R. L. y Chandler, B. V. (1982). Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(3), pp. 287-293.
- Johnson, R. L. y Chandler, B. V. (1985). Ion exchange and adsorbent resins for removal of acids and bitter principles from citrus juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(6), pp. 480-484.
- Jung, H. A., Ali, M. Y., Bhakta, H. K., Min, B. S. y Choi, J. S. (2017). Prunin is a highly potent flavonoid from *Prunus davidiana* stems that inhibits protein tyrosine phosphatase 1B and stimulates glucose uptake in insulin-resistant HepG2 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 40(1), pp. 37-48.
- Kašpar, O., Tokárová, V., Nyanhongo, G. S., Gübitz, G. y Štěpánek, F. (2013). Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with immobilized laccase. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), pp. 525-533.
- Kola, O., Kaya, C., Duran, H. y Altan, A. (2010). Removal of limonin bitterness by treatment of ion exchange and adsorbent resins. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), pp. 411-416.
- Kore, V. T. y Chakraborty, I. (2015). Efficacy of various techniques on biochemical characteristics and bitterness of pummelo juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), pp. 6073-6077.
- Kranz, P., Adler, P. y Kunz, B. (2011). Sorption of citrus flavour compounds on XAD-7HP resin during the debittering of grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(1), pp. 30-36.
- Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M. y Rebroš, M. (2016). Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), pp. 2535-2553.
- Lee, H. S. y Kim, J. G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*, 82(2), pp. 177-180.
- Lei, S., Xu, Y., Fan, G., Xiao, M. y Pan, S. (2011a). Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, 257(9), pp. 4096-4099.

- Lei, S. J., Wang, K. X., Lu, X. Y. y Pan, S. Y. (2011b). Immobilization of naringinase on PVA-calcium alginate gel. *Food Science*, 32, pp. 138-143.
- Lei, S. y Pan, S. (2012). Improvement of the activity of naringinase by covalent immobilization on sodium alginate in biomaterial engineering and its applications. *Advanced Materials Research*, 578, pp. 187-190.
- Lime, B. (1977). Grapefruit products. En: *Proceeding of the International Society of Citriculture of the 2<sup>nd</sup> International Citrus Congress*, Orlando, Florida, pp. 781-783.
- Liu, D., Chen, J. y Shi, Y. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends in Analytical Chemistry*, 102, pp. 332-342.
- Luo, J., Li, Q., Sun, X., Tian, J., Fei, X., Shi, F., Zhang, N. y Liu, X. (2019). The study of the characteristics and hydrolysis properties of naringinase immobilized by porous silica material. *RSC Advances*, 9(8), pp. 4514-4520.
- Magario, I., Vielhauer, O., Neumann, A., Hausmann, R. y Syldatk, C. (2009). Kinetic analysis and modeling of the liquid-liquid conversion of emulsified di-rhamnolipids by naringinase from *Penicillium decumbens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), pp. 9-19.
- Manjón, A., Bastida, J., Romero, C., Jimeno, A. y Iborra, J. L. (1985). Immobilization of naringinase on glycophase-coated porous glass. *Biotechnology Letters*, 7(7), pp. 477-482.
- Martearena, M. R., Daz, M. y Ellenrieder, G. (2008). Synthesis of rutosides and rutinose by reverse hydrolysis catalyzed by fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3), pp. 177-185.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), pp. 1451-1463.
- Míguez, N., Gimeno-Pérez, M., Fernández-Polo, D., Cervantes, F. V., Ballesteros, A. O., Fernández-Lobato, M., Ribeiro M. H. y Plou, F. J. (2018). Immobilization of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by entrapment in polyvinyl alcohol and its application to neo-fructooligosaccharides production. *Catalysts*, 8(5), 201.
- Mishra, P. y Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Journal of Food Science*, 68(4), pp. 1229-1233.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. y Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), pp. 205-220.
- Mongkolkul, P., Rodart, P., Pipatthitikorn, T., Meksut, L. y Sa-Nguandeeikul, R. (2006). Debittering of tangerine *Citrus reticulata* Blanco juice by  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56(1-2), pp. 167-170.

- Mukund, P., Belur, P. D. y Saidutta, M. B. (2014). Production of naringinase from a new soil isolate, *Bacillus methylotrophicus*: isolation, optimization and scale-up studies. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(2), pp. 146-163.
- Nakane, K., Ogihara, T., Ogata, N. y Kurokawa, Y. (2001). Entrap- immobilization of invertase on composite gel fiber of cellulose acetate and zirconium alkoxide by sol-gel process. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(9), pp. 2084-2088.
- Nedović V. A., Manojlović, V., Bugarski, B. y Willaert, R. (2011). State of the art in immobilized/encapsulated cell technology in fermentation processes. En: Aguilera J., Simpson R., Welti-Chanes J., Bermudez-Aguirre D. y Barbosa-Canovas G. (Eds), *Food Engineering Interfaces*. Nueva York: Springer, pp. 119-146.
- Nelson, J. M. y Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38(5), pp. 1109-1115.
- Nguyen, L. T., Lau, Y. S. y Yang, K. -L. (2016). Entrapment of cross-linked cellulase colloids in alginate beads for hydrolysis of cellulose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, pp. 862-869.
- Ni, H., Li, L., Xiao, A., Cao, Y., Chen, Y. y Cai, H. (2011). Identification and characterization of a new naringinase-producing strain, *Williopsis californica* Jmudeb007. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), pp. 2857-2862.
- Ni, H., Chen, F., Cai, H., Xiao, A., You, Q. y Lu, Y. (2012). Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juice. *Journal of Food Science*, 77(1), pp. C1-C7.
- Ni, H., Hong, P., Ji, H. F., Sun, H., Chen, Y. H., Xiao, A. F. y Chen, F. (2015). Comparative analyses of aromas of fresh, naringinase-treated and resin-absorbed juices of pummelo by GC-MS and sensory evaluation. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(3), pp. 245-253.
- Nobile, M. D., Piergiovanni, L., Buonocore, G. G., Fava, P., Puglisi, M. L. y Nicolais, L. (2003). Naringinase immobilization in polymeric films intended for food packaging applications. *Journal of Food Science*, 68(6), pp. 2046-2049.
- Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N. y Moazami, N. (1999). Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15(4), pp. 501-502.
- Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N. y Moazami, N. (2000). Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), pp. 471-473.
- Nunes, M. A. P., Vila-Real, H., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2010). Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), pp. 2129-2147.
- Nunes, M. A. P., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2012). High-affinity water-soluble system for efficient naringinase immobilization in polyvinyl alcohol-dimethyl sulfoxide lens-shaped particles. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), pp. 580-594.

- Nunes, M. A. P., Rosa, M. E., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2014). Operational stability of naringinase PVA lens-shaped microparticles in batch stirred reactors and mini packed bed reactors-one step closer to industry. *Bioresource Technology*, 164, pp. 362-370.
- Nunes, M. A. P., Gois, P. M. P., Rosa, M. E., Martins, S., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2016a). Boronic acids as efficient cross linkers for PVA: synthesis and application of tunable hollow microspheres in biocatalysis. *Tetrahedron*, 72(46), pp. 7293-7305.
- Nunes, M. A. P., Martins, S., Rosa, M. E., Gois, P. M. P., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2016b). Improved thermostable polyvinyl alcohol electrospun nanofibers with entangled naringinase used in a novel mini-packed bed reactor. *Bioresource Technology*, 213, pp. 208-215.
- Oliveira, G. B., Filho, J. L. L., Chaves, M. E. C., Azevedo, W. M. y Carvalho, L. B. (2008). Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive and Functional Polymers*, 68(1), pp. 27-32.
- Olson, A. C., Gray, G. M. y Guadagni, D. G. (1979). Naringin bitterness of grapefruit juice debittered with naringinase immobilized in a hollow fiber. *Journal of Food Science*, 44(5), pp. 1358-1361.
- Ono, M., Tosa, T. y Chibata, I. (1977). Preparation and properties of naringinase immobilized by ionic binding to DEAE-Sephadex. *Journal of Fermentation Technology*, 55(5), pp. 493-500.
- Ono, M., Tosa, T. y Chibata, I. (1978). Preparation and properties of immobilized naringinase using tannin-aminohexyl cellulose. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), pp. 1847-1853.
- Orhan, I. E., Nabavi, S. F., Daglia, M., Tenore, G. C., Mansouri, K. y Nabavi, S. M. (2015). Naringenin and atherosclerosis: A review of literature. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16, pp. 245-251.
- Pandey, V. P., Rani, J., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., Shasany, A. K., Tiwari, S. y Dwivedi, U. N. (2017). Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, pp. 1713-1720.
- Pandove, G., Sahota, P., Gupta, N. y Singh, P. (2016). Production of low-alcoholic naturally carbonated fermented debittered beverage from W. Murcott mandarin (*Citrus reticulata*) by naringinase producing yeast. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 14(1), pp. 30-34.
- Pedro, H. A. L., Alfaia, A. J., Marques, J., Vila-Real, H. J., Calado, A. y Ribeiro, M. H. L. (2007). Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), pp. 442-446.
- Pino, J. A. (1997). Los flavonoides presentes en los cítricos. *Alimentaria*, 286, pp. 63-79.
- Prazeres, D. M. F. y Cabral, J. M. S. (1994). Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(9), pp. 738-750.

- Puri, A. (1984). Preparation and properties of citrus juices, concentrates and dried powders which are reduced in bitterness. EEUU. Patente 4.439.458.
- Puri, M., Marwaha, S. S., Kothari, R. M. y Kennedy, J. F. (1996a). Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16(2), pp. 145-155.
- Puri, M., Marwaha, S. S. y Kothari, R. M. (1996b). Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), pp. 281-285.
- Puri, M. y Banerjee, U. C. (2000). Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 18(3), pp. 207-217.
- Puri, M., Seth, M., Marwaha, S. S. y Kothari, R. M. (2001). Debittering of Kinnow mandarin juice by covalently bound naringinase on hen egg white. *Food Biotechnology*, 15(1), pp. 13-23.
- Puri, M. y Kalra, S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), pp. 753-758.
- Puri, M., Banerjee, A. y Banerjee, U. C. (2005a). Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, 40(1), pp. 195-201.
- Puri, M., Kaur, H. y Kennedy, J. F. (2005b). Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(10), pp. 1160-1165.
- Puri, M., Kaur, A., Singh, R. S. y Singh, A. (2010). Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(1), pp. 181-191.
- Puri, M., Kaur, A., Barrow, C. J. y Singh, R. S. (2011). Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), pp. 715-722.
- Puri, M. (2012). Updates on naringinase: Structural and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), pp. 49-60.
- Radhakrishnan, I., Sampath, S. y Kumar, S. (2013). Isolation and characterization of enzyme naringinase from *Aspergillus flavus*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4(2), pp. 208-212.
- Raval, K., Gehlot, K. y Prasanna, B. D. (2017). Scale-up of naringinase production process based on the constant oxygen transfer rate for a novel strain of *Bacillus methylotrophicus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2), pp. 192-198.
- Ribeiro, M. H. L., Silveira, D. y Ferreira-Dias, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *European Food Research and Technology*, 215(6), pp. 462-471.

- Ribeiro, I. A. y Ribeiro, M. H. L. (2008). Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1–2), pp. 10-18.
- Ribeiro, I. A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H. y Ribeiro, M. H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52-53(1-4), pp. 13-18.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M., Oliveira, L. S., Macedo, G. A. y Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), pp. 635-641.
- Ribeiro, M. H. L. (2011). Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), pp. 1883-1895.
- Ribeiro, M. H. L. y Rabaça, M. (2011). Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: novel biocatalysts for naringin hydrolysis. *Enzyme Research*, 2011, ID 851272.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D. y Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors - A review. *Journal of Membrane Science*, 242, pp. 189-196.
- Saerens, K., Van Bogaert, I., Soetaert, W. y Vandamme, E. (2009). Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: Optimization and kinetics. *Biotechnology Journal*, 4(4), pp. 517-524.
- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N. y Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, 12(1), pp. 1-18.
- Şekeroğlu, G., Fadiloğlu, S. y Göğüş, F. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 224(1), pp. 55-60.
- Shan, S., Zhang, Y., Wu, M., Yi, B., Wang, J. y Li, Q. (2017). Naringenin attenuates fibroblast activation and inflammatory response in a mechanical stretch-induced hypertrophic scar mouse model. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), pp. 4643-4649.
- Shanmugaparakash, M., Vinoth Kumar, V., Hemalatha, M., Melbia, V. y Karthik, P. (2011). Solid-state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Engineering in Life Sciences*, 11(3), pp. 322-325.
- Shanmugaparakash, M., Vinothkumar, V., Ragupathy, J. y Reddy, D. A. (2015). Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, pp. 418-423.
- Shaw, P. E. y Wilson, C. W. (1983). Debittering citrus juices with  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *Journal of Food Science*, 48(2), pp. 646-647.
- Singh, R. K., Tiwari, M., Singh, R. y Lee, J. K. (2013). From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp. 1232-1277.

- Singh, S. V., Gupta, A. K. y Jain, R. K. (2008). Adsorption of naringin on nonionic (neutral) macroporus adsorbent resin from its aqueous solutions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), pp. 259-271.
- Soares, N. F. F. y Hotchkiss, J. H. (1998a). Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Packaging Technology and Science*, 11(1), pp. 9-18.
- Soares, N. F. F. y Hotchkiss, J. H. (1998b). Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 63(1), pp. 61-65.
- Soria, F., Ellenrieder, G., Grasselli, M., Del Cañizo, A. N. y Cascone, O. (2004). Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography. *Biotechnology Letters*, 26(16), pp. 1265-1268.
- Stinco, C. M., Fernández-Vázquez, R., Hernanz, D., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J. y Vicario, I. M. (2013). Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. *Journal of Food Engineering*, 116(1), pp. 155-161.
- Thomas, D. W., Smythe, C. V. y Labbe, M. D. (1958). Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. *Journal of Food Science*, 23(6), pp. 591-598.
- Ting, S. V. (1958). Fruit glycoside hydrolysis, enzymic hydrolysis of naringin in grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(7), pp. 546-549.
- Torabizadeh, H. y Mikani, M. (2018). Kinetic and thermodynamic features of nanomagnetic cross-linked enzyme aggregates of naringinase nanobiocatalyst in naringin hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, pp. 717-725.
- Tran, D. N. y Balkus, K. J. (2011). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catalysis*, 1(8), pp. 956-968.
- Trevan, M. D. (1990). Tecnología enzimática. En: Trevan, M. D., Boffey, S., Goulding, K. H. y Stanbury, P. (Eds.), *Biotecnología: Principios Biológicos*. Zaragoza: Acribia, pp. 169-264.
- Tsen, H. Y. (1984). Factors affecting the inactivation of naringinase immobilized on chitin during debittering of fruit juice. *Journal of Fermentation Technology*, 62, pp. 263-267.
- Tsen, H. Y. y Tsai, S. Y. (1988). Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources. *Journal of Fermentation Technology*, 66(2), pp. 193-198.
- Tsen, H. Y., Tsai, S. Y. y Yu, G. K. (1989). Fiber entrapment of naringinase from *Penicillium* sp. and application to fruit juice debittering. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67(3), pp. 186-189.
- Tsen, H. Y. y Yu, G. K. (1991). Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibers. *Journal of Food Science*, 56(1), pp. 31-34.
- Tucker, G. (1996). Biotechnology and enzymes in the food industry. *British Food Journal*, 98(4/5), pp. 14-19.

- Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Calado, A. R. y Ribeiro, M. H. (2007). Development of co-solvent systems in the bioconversion of naringin to naringenin by naringinase. *Journal of Biotechnology*, 131(S), pp. S93-S94.
- Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Rosa, M. E., Calado, A. R. y Ribeiro, M. H. (2010). An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(6), pp. 841-850.
- VinothKumar, V., Kayambu, P. y RevathiBabu, S. (2010). Optimization of fermentation parameters for enhanced production of naringinase by soil isolate *Aspergillus niger* VB07. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), pp. 827-829.
- Wu, M. H., Zhu, L., Zhou, Z. Z. y Zhang, Y. Q. (2013). Coimmobilization of naringinases on silk fibroin nanoparticles and its application in food packaging. *Journal of Nanoparticles*, 2013, pp. 1-5.
- Xiao, A., You, H., Wu, C., Ni, H., Yang, Q. y Cai, H. (2015). Immobilization and characterization of naringinase from *Aspergillus aculeatus* onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 7(9), pp. 770-778.
- Yadav, M., Sehrawat, N., Sharma, A. K., Kumar, V. y Kumar, A. (2018). Naringinase: microbial sources, production and applications in food processing industry. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(1), pp. 717-720.
- Yang, J., Wang, Z., Lin, Y., Ng, T. B., Ye, X. y Lin, J. (2017). Immobilized *Cerrena* sp. laccase: preparation, thermal inactivation, and operational stability in malachite green decolorization. *Scientific Reports*, 7(1), p. 16429.
- Zhang, Y., Ge, J. y Liu, Z. (2015). Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. *ACS Catalysis*, 5(8), pp. 4503-4513.
- Zheng, Y., Zheng, Z., Ming, Y., Bai, Y., Chen, L., Huang, W., Lin, M., Liu, S., Xiao, J. y Lin, H. (2019). Compound K producing from the enzymatic conversion of gypenoside by naringinase. *Food and Chemical Toxicology*, 130, pp. 253-261.
- Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Xu, L., Wu, S. y Li, X. (2017a). Purification and characterization of a naringinase from a newly isolated strain of *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 suitable for the transformation of flavonoids. *Food Chemistry*, 214, pp. 39-46.
- Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Li, J., Yang, L. y Li, X. (2017b). Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its application in the debitterization of orange juice. *Process Biochemistry*, 62, pp. 114-121.

## **ABREVIATURAS**

ABTS	Ácido 2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CLEAs	“Cross linked enzyme aggregates”
DEAE	Dietilaminoetil-celulosa
FRAP	“Ferric reducing ability of plasma”
PEG	Polietilenglicol
PVA	Alcohol polivinílico
REM	Reactor enzimático de membrana



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hidrólisis enzimática de naringina .....	11
<b>Figura 2</b>	Factores que determinan la calidad de los zumos de cítricos: estructura, composición y procesamiento del fruto. Adaptado de Cook (1983).....	15
<b>Figura 3</b>	Principales técnicas de inmovilización de enzimas .....	22
<b>Figura 4</b>	Reactores de membrana: (a) enzima soluble, (b) enzima inmovilizada en la superficie o los poros de la membrana.....	25
<b>Figura 5</b>	Efectos directos de la inmovilización sobre las enzimas: (a) enzima inmovilizada activa, (b) enzima inmovilizada inactiva por reacción del centro activo con el soporte, (c) enzima inmovilizada inactiva por cambios conformacionales.....	30



## **LISTADO DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	Fuentes microbianas de producción de naringinasa.....	12
<b>Tabla 2</b>	Principales consideraciones para seleccionar el soporte de inmovilización (Bickerstaff, 1997).....	21
<b>Tabla 3</b>	Revisión de soportes y técnicas empleados para la inmovilización de naringinasa. ....	28



# **Inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol**



## **Capítulo II: Inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol**

<b>1. INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE PVA ....</b>	<b>55</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
3.1. Ensayo de actividad naringinasa .....	62
3.2. Determinación cuantitativa de flavonoides totales .....	63
3.3. Atrapamiento en geles de PVA.....	64
3.4. Atrapamiento en geles de PVA-PEG.....	65
3.5. Optimización mediante diseño de experimentos.....	66
3.6. Caracterización morfológica de los inmovilizados .....	68
3.7. Caracterización bioquímica de la naringinasa libre e inmovilizada.....	69
3.7.1. Cinética enzimática.....	69
3.7.2. Perfiles pH/actividad.....	69
3.7.3. Curvas temperatura/actividad .....	70
3.7.4. Estabilidad al almacenamiento .....	70
3.8. Tratamiento estadístico de los datos .....	70
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
4.1. Selección de la composición de la matriz de inmovilización de naringinasa ....	72
4.1.1. Efecto de las características del PVA sobre la inmovilización de naringinasa .....	72
4.1.2. Efecto del PEG sobre la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA .....	73
4.1.3. Caracterización morfológica de los inmovilizados.....	75
4.2. Optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG .....	79
4.2.1. Diseño de experimentos para la eficacia de inmovilización.....	79

4.2.2. Diseño de experimentos para la estabilidad enzimática.....	85
4.2.3. Optimización simultánea de la eficacia de inmovilización y la estabilidad enzimática.....	88
4.3. Caracterización bioquímica de la naringinasa libre e inmovilizada.....	89
4.3.1. Cinética enzimática. Determinación de los parámetros cinéticos $K_m$ y $V_{max}$ .....	90
4.3.2. Efecto de la inmovilización sobre la curva pH-actividad naringinasa.....	92
4.3.3. Influencia de la inmovilización sobre el perfil temperatura-actividad naringinasa.....	94
4.3.4. Estabilidad al almacenamiento.....	97
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>107</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>109</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>111</b>

La naringinasa ha sido inmovilizada en soportes de diferente naturaleza, tal y como se ha descrito en el Capítulo I. Sin embargo, a pesar de los diferentes estudios sobre la inmovilización de este complejo enzimático, su aplicación comercial todavía es limitada. Por ello, es necesario seguir investigando en la mejora de los procesos y soportes de inmovilización para la aplicación de naringinasa en el procesado industrial de zumos cítricos.

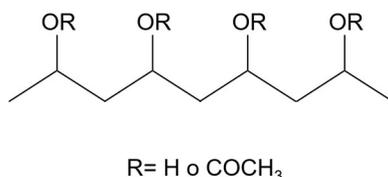
En esta Tesis se propone como una alternativa de inmovilización el atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico (PVA) y polietilenglicol (PEG). Se seleccionaron estos polímeros como soporte debido a su biodisponibilidad, biocompatibilidad y a la relativa simplicidad y bajo coste del método de inmovilización. Las matrices basadas en PVA se consideran muy prometedoras debido a sus adecuadas características físico-químicas (elasticidad y estabilidad mecánica), su capacidad de reutilización y su estabilidad térmica (Nunes *et al.*, 2014; Poraj-Kobielska *et al.*, 2015). La incorporación de PEG a la matriz de PVA puede contribuir a mejorar la resistencia mecánica y porosidad de los geles de PVA (Lozinsky *et al.*, 1995).

## **1. INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO EN CRIOGELES DE PVA**

La inmovilización por atrapamiento en geles se basa en retener o atrapar las enzimas dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua. Los hidrogeles se consideran matrices adecuadas para la inmovilización por atrapamiento debido a su biocompatibilidad, bajos coeficientes de fricción y alto contenido en agua, proporcionando entornos adecuados para la actividad enzimática.

Los hidrogeles basados en alcohol polivinílico (PVA) han sido aplicados con éxito en el campo de la biotecnología y la biomedicina, principalmente en la inmovilización de enzimas y células, en la conversión de biomasa y la ingeniería de tejidos (Alves *et al.*, 2011).

El PVA (Figura 1) es un polímero sintético, no tóxico y biocompatible. Se obtiene industrialmente por polimerización radicalaria del acetato de vinilo seguido de la hidrólisis parcial de los grupos éster en grupos hidroxilo en presencia de hidróxido de sodio acuoso. Posteriormente, el PVA es precipitado, lavado y secado. La extensión de la hidrólisis, generalmente entre el 85 y el 100%, condiciona la solubilidad, las propiedades químicas y la cristalinidad del polímero (Monopoli *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura del alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado.

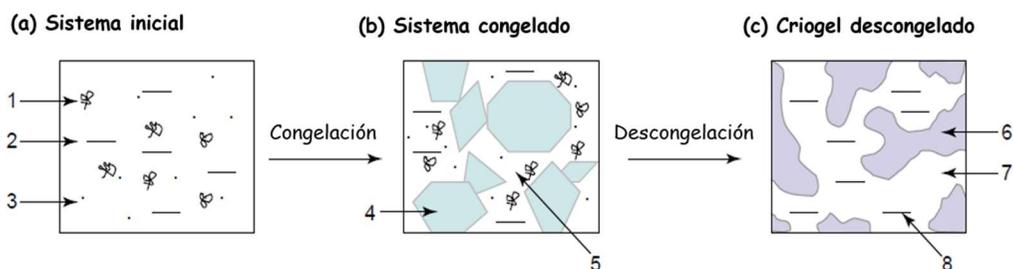
Para poder usar el PVA como soporte de inmovilización por atrapamiento es necesario hacerlo insoluble mediante la formación de hidrogeles. Se han estudiado diferentes métodos para gelificar el PVA: entrecruzamiento con reactivos bi- o multi-funcionales, entrecruzamiento por aplicación de radiación ultravioleta o gamma y entrecruzamiento físico mediante el método de congelación y descongelación del polímero.

El método de **entrecruzamiento químico** se basa en la reacción entre los grupos hidroxilo de las cadenas de PVA **con reactivos bi- o multi-funcionales**. Como agentes entrecruzantes se han empleado compuestos como glutaraldehído, hexametileno diisocianato y principalmente ácido bórico (Nunes *et al.*, 2016a). Los geles obtenidos mediante este método son térmica y mecánicamente muy estables (Nunes *et al.*, 2016a). Sin embargo, la presencia residual de los agentes entrecruzantes, que suelen ser tóxicos, limita sus aplicaciones (Buwalda *et al.*, 2014).

Los hidrogeles se pueden obtener también mediante entrecruzamiento de las cadenas de PVA al irradiar una solución acuosa del polímero con **radiación** ultravioleta o gamma. Este método se considera más limpio y seguro que el entrecruzamiento con agentes químicos ya que no se emplean compuestos tóxicos (Rosiak y Ulański, 1999). Sin embargo, los geles obtenidos mediante esta técnica tienen muy poca estabilidad mecánica (Buwalda *et al.*, 2014).

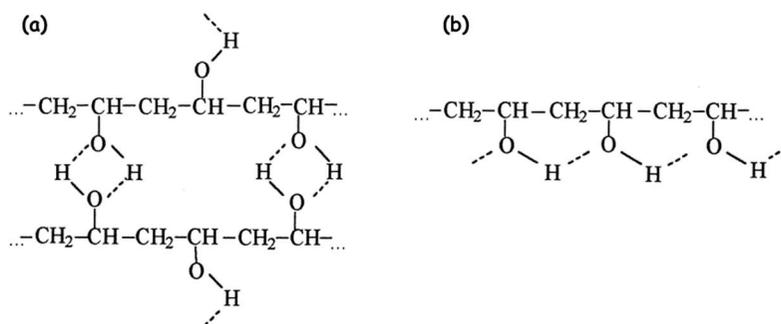
Finalmente, se puede conseguir la gelificación física del alcohol polivinílico mediante el **método de congelación-descongelación** (Figura 2), procedimiento seguido en este trabajo para atrapar naringinasa. El criogel se forma al poner en contacto una solución acuosa del polímero sobre un medio congelado como puede ser el nitrógeno líquido. En la fase inicial de congelación, a temperaturas por debajo de 0 °C, se forman microcristales de hielo que después actúan como agentes formadores de poros. En las zonas no congeladas la concentración de macromoléculas disueltas es alta lo que permite que se formen enlaces de hidrógeno entre las cadenas de PVA. Posteriormente, durante la fase gradual de descongelación, la estructura del criogel se refuerza ya que continúa la formación de enlaces de hidrógeno (Lozinsky *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2011). El método de congelación-descongelación es el que mayor ventajas ofrece ya que se obtienen geles

de PVA con excelentes propiedades mecánicas sin emplear reactivos tóxicos (Hassan y Peppas, 2000).



**Figura 2.** Esquema del proceso de congelación-descongelación para la obtención de criogeles de PVA. 1: macromoléculas en solución; 2: solvente; 3: solutos de bajo peso molecular; 4: cristales de solvente congelado; 5: microfase líquida no congelada; 6: red de polímero; 7: macroporos; 8: solvente. Adaptado de Lozinsky *et al.* (2003).

El criogel de PVA se forma debido a numerosos enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de cadenas vecinas y, en menor medida, por interacciones de Van der Waals entre los hidrocarburos de las cadenas poliméricas (Alves *et al.*, 2011). Las cadenas de PVA poseen dominios sindiotácticos (secuencias de 6 a 8 unidades en las cuales los grupos hidroxilo se encuentran enlazados de forma alternante al carbono quiral de la cadena principal) responsables de la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, y dominios isotácticos (secuencias en las que los grupos hidroxilo se distribuyen de manera aleatoria a lo largo de la cadena) que participan fundamentalmente en las interacciones intramoleculares (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura (a) sindiotáctica e (b) isotáctica en geles de PVA (Lozinsky y Plieva, 1998).

La formación de criogeles se puede llevar a cabo mediante enfriamiento lento con metanol de -15 a -55 °C o enfriamiento rápido con nitrógeno líquido (Ariga *et al.*, 1993; Lozinsky y Plieva, 1998). Otros agente congelantes que se han empleado son parafina a -30 °C (Ariga *et al.*, 1993), aceite de naranja a -40 °C (Prübe *et al.*, 1998), aceite de silicona a -10, -20 ó -25 °C (Leidig *et al.*, 1999; Temiño *et al.*, 2005; Hischer *et al.*, 2006) y aceite de oliva a -25 °C (Szcześna-Antczak *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha usado nitrógeno líquido (-146 °C) como medio de congelación. La solución con la enzima y el alcohol polivinílico se goteaba sobre el nitrógeno formándose inmediatamente una perla que contenía la enzima atrapada. Posteriormente, se dejaba descongelar lentamente para favorecer el entrecruzamiento de las cadenas de PVA. El hidrogel obtenido mediante esta técnica presenta una elevada rigidez mecánica, tiene una naturaleza elástica y gomosa y posee la capacidad de hincharse cuando se sumerge en agua (Hassan y Peppas, 2000).

Las propiedades del criogel de PVA dependen de las características del polímero, la concentración del PVA en solución, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos de congelación y descongelación (Hassan y Peppas, 2000). Las características del PVA que influyen en la formación del gel son el grado de hidrólisis (GH), el grado de polimerización (GP) y el peso molecular (PM). El GH afecta a las propiedades químicas, de solubilidad y cristalización del polímero (Monopoli *et al.*, 2008). La formación de enlaces intermoleculares puede verse comprometida por la presencia de grupos ésteres residuales (Watase y Nishinari, 1988; Lozinsky y Plieva, 1998), por lo que para la obtención de geles rígidos es necesario usar PVA con alto grado de hidrólisis. El GP afecta a la viscosidad de la solución de PVA de forma que bajos GP no son apropiados ya que la viscosidad no es suficiente para formar el hidrogel, incluso a concentraciones elevadas de PVA. Por el contrario, cuando el GP es muy alto, se producen soluciones muy viscosas de PVA que son difíciles de manipular. Finalmente, el incremento del PM del polímero favorece la gelificación. Por tanto, a la hora de utilizar el PVA como soporte de inmovilización es necesario tener en cuenta las características del producto comercial que puede tener diferentes GH, GP y PM.

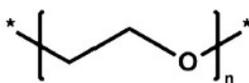
El empleo de criogeles de PVA como matriz de inmovilización presenta numerosas ventajas (Ariga *et al.*, 1993; Lozinsky y Plieva, 1998; Bieler *et al.*, 2010; Poraj-Kobielska *et al.*, 2015):

- El PVA es un polímero no tóxico y biocompatible.
- Su estructura química puede estabilizar la proteína enzimática.
- El método de inmovilización es sencillo y el PVA es un polímero sintético fácilmente disponible a bajo coste.

- Presenta una elevada macro y microporosidad lo que facilita la difusión de sustratos y productos. Además, la porosidad del gel se puede modificar variando las condiciones del proceso y las características del PVA.
- Tiene una termoestabilidad superior a la de otros geles con temperaturas operativas que pueden alcanzar los 70-80 °C.
- Su resistencia al ataque microbiológico es alta.
- Posee unas propiedades fisicoquímicas muy adecuadas para un soporte de inmovilización. Tiene una buena elasticidad, bajo coeficiente de fricción, resistencia al cizallamiento y buena estabilidad mecánica lo que permite aplicar el inmovilizado incluso en condiciones de agitación intensa. Esto contrasta con otros hidrogel empelados para el atrapamiento de enzimas como el alginato, el agar o el carragenato.
- El PVA puede ser reutilizado para la preparación de un nuevo soporte.

En la inmovilización con hidrogel de alcohol polivinílico se pueden emplear diferentes reactivos solubles o insolubles para modificar las propiedades y la morfología porosa de los respectivos criogeles de PVA (Lozinsky *et al.*, 2014). En concreto, los polioles afectan a las propiedades reológicas y térmicas de los geles de PVA (Lozinsky *et al.*, 1995). En la presente investigación se estudió el efecto del polietilenglicol (PEG), ya que se ha demostrado que mejora la resistencia mecánica de los criogeles de PVA (Lozinsky *et al.*, 1995). Además, el PEG puede actuar como agente estabilizante de la enzima inmovilizada (Cao, 2006).

El polietilenglicol es un polímero lineal e hidrosoluble cuya estructura química se muestra en la Figura 4. Es biocompatible, biodegradable y no tóxico lo que le hace un polímero muy adecuado como soporte para la inmovilización de enzimas.



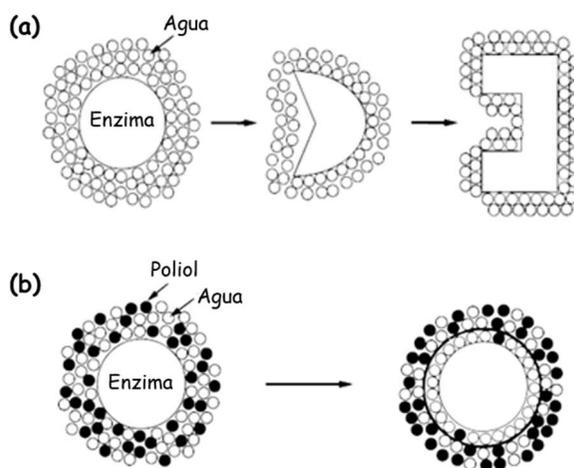
PEG

**Figura 4.** Estructura química del polietilenglicol (Buwalda *et al.*, 2014).

El PEG se puede emplear como copolímero formador de poros. Por ejemplo, Zhang y Ye (2011) encontraron que al incorporar PEG se mejoraba la permeabilidad y la transferencia de masa en hidrogel de PVA obtenidos mediante entrecruzamiento por ácido bórico. La concentración de PEG y su peso molecular influían en la cantidad de poros de las perlas de PVA. Por otro lado, Cheng *et al.* (2014) también observaron que

la incorporación de PEG a perlas de alginato de calcio incrementaba el número de poros y mejoraba la permeabilidad de las perlas.

Además del papel como formador de poros del PEG, la incorporación de este polímero como aditivo al soporte de PVA puede mejorar la estabilidad de la enzima inmovilizada. El papel de los polioles, como el PEG, en la estabilización de enzimas se debe a su capacidad para formar una estructura rígida rica en agua alrededor de la enzima (Figura 5). Las moléculas del poliol son excluidas preferentemente de la capa superficial de la enzima y se forma una capa de agua alrededor de la proteína que hace que la conformación nativa de la enzima se vuelva más rígida, lo que disminuye la probabilidad de desnaturalización (Matsumoto *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2002).



**Figura 5.** Efecto de los polioles en la estabilización de proteínas enzimáticas: (a) Desnaturalización de la enzima en solución acuosa, (b) formación de una capa alrededor de la enzima en presencia de polioles que evita la desnaturalización proteica. Adaptado de Matsumoto *et al.* (1997).

## **2. OBJETIVOS**

La investigación desarrollada en este capítulo tiene como objetivo la obtención de inmovilizados de naringinasa de *P. decumbens* en criogeles de PVA-PEG activos y estables, para su posterior aplicación en la reducción del amargor en zumos. Para su consecución se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar las características (peso molecular, grado de hidrólisis y grado de polimerización) de los componentes de la matriz de inmovilización (PVA y PEG) que den lugar a biocatalizadores con capacidad catalítica y estabilidad mecánica.
2. Establecer, utilizando la metodología de superficie de respuesta, las condiciones de inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG (pH y concentración de polímeros) que optimicen de forma simultánea la eficacia de inmovilización y la estabilidad enzimática en zumo sintético.
3. Comparar las características bioquímicas (cinética enzimática, perfiles pH-actividad, curvas T-actividad y estabilidad al almacenamiento) de la naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG con las de su contrapartida soluble.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ensayo de actividad naringinasa

La actividad de la enzima naringinasa, tanto libre como inmovilizada por atrapamiento, se determinó siguiendo el protocolo descrito por Busto *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones.

##### Reactivos

R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5*: Este tampón se obtenía mezclando 678 mL de solución A y 322 mL de solución B.

- Solución A: Se disolvían 16,408 g de acetato sódico en 1 L de agua destilada.
- Solución B: Se disolvían 12,01 g de ácido acético glacial en 1 L de agua destilada.

R.2. *Naringina 0,8 g L<sup>-1</sup>* en tampón acetato 0,2 M a pH 5 (R.1). Para disolver la naringina se calentaba la disolución a 50 °C durante al menos 5 min en baño María.

R.3. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) 5 g L<sup>-1</sup>* en tampón acetato 0,2 M a pH 5 (R.1).

##### Protocolo experimental

La determinación de la actividad naringinasa se llevaba a cabo incubando a 50 °C, en agitador orbital a 150 rpm durante 1 h, muestras con la enzima libre o inmovilizada junto con sus controles. Pasado el tiempo de incubación se introducían los recipientes en hielo para paralizar la reacción enzimática, y se determinaba la concentración de naringina mediante el método colorimétrico descrito por Davis (1947) (apartado 3.2). Todas las muestras se realizaron al menos por triplicado, y los controles al menos por duplicado.

Para determinar la actividad de la enzima libre (L), las muestras junto a los controles de sustrato se prepararon como se indica a continuación:

- Muestra (L-M): 5 mL de sustrato (R.2) + 0,1 mL de enzima (R.3)
- Control de sustrato (L-Cs): 5 mL de sustrato (R.2) + 0,1 mL de tampón (R.1)

En el caso de la actividad de la enzima inmovilizada (I) las muestras y los controles se prepararon teniendo en cuenta que la cantidad de enzima inmovilizada añadida era equivalente a 0,1 mL de enzima libre:

- Muestra (I-M): soporte con enzima + 5 mL de sustrato (R.2) + 0,1 mL de tampón (R.1)

- Control de sustrato (I-Cs): soporte sin enzima + 5 mL de sustrato (R.2) + 0,1 mL de tampón (R.1)

La actividad naringinasa se expresaba en unidades por mg de enzima añadida ( $U\text{ mg}^{-1}$ ), teniendo en cuenta que una unidad de actividad naringinasa (U) era la cantidad de enzima necesaria para degradar  $1\mu\text{g}$  de naringina por minuto bajo las condiciones de ensayo indicadas.

### **3.2. Determinación cuantitativa de flavonoides totales**

Para la determinación de naringina se utilizó el procedimiento descrito por Davis (1947). Este método colorimétrico no específico se fundamenta en que cuando se mezclan flavanonas y dietilenglicol en medio básico se produce una reacción que genera un cambio de color cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de flavanonas.

#### **Reactivos**

- R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5.*
- R.2. *Solución de hidróxido de sodio 4 M.*
- R.3. *Dietilenglicol al 90% en agua destilada.*
- R.4. *Naringina 1 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M a pH 5 (R.1).* Para disolver la naringina se calentaba la disolución a 50 °C durante al menos 5 min en baño María.

#### **Protocolo experimental**

El protocolo consistía en mezclar en un tubo de ensayo 0,1 mL de muestra con 0,1 mL de hidróxido de sodio (R.2), añadir 0,8 mL de dietilenglicol (R.3), agitar intensamente con el vortex durante 30 s y dejar reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluaba la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 420 nm.

#### **Recta de calibrado**

La recta patrón se preparaba a partir de una solución estándar de naringina (R.4), en un rango de concentración de 0 a  $0,5\text{ g L}^{-1}$ . Una vez preparadas las disoluciones se seguía el procedimiento descrito anteriormente para obtener una recta como la que se representa en la Figura 6.

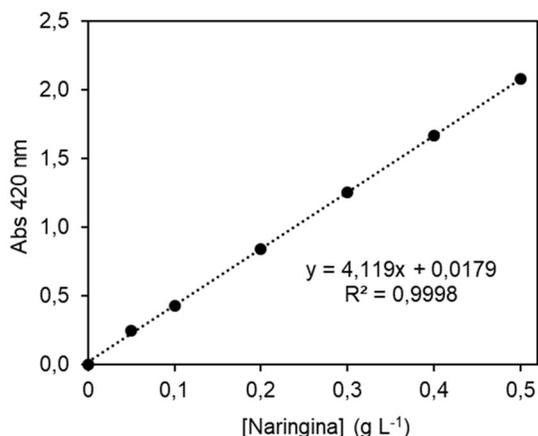


Figura 6. Ejemplo de recta de calibrado de naringina.

### 3.3. Atrapamiento en geles de PVA

La inmovilización de naringinasa por atrapamiento en criogeles de PVA se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Busto *et al.* (2007) basado en el método de congelación-descongelación.

#### Reactivos

R.1. *Alcohol polivinílico (PVA) (Sigma)*: se estudiaron diferentes PVA comerciales cuyas características se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de los PVA utilizados en este trabajo para la inmovilización de naringinasa.<sup>1</sup>

PM (Da)	GP (%)	GH (%)
61.000	1400	98-98,8
125.000	2800	98-98,8
145.000	3300	99-99,8
205.000	4200	86,7-88,7

<sup>1</sup>PM: Peso Molecular; GP: Grado de Polimerización; GH: Grado de Hidrólisis.

R.2. *NaOH QP (Panreac)*.

R.3. *HCl al 37% (p/p)*.

R.4. *Nitrógeno líquido*.

R.5. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5.*

R.6. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) 5 g L<sup>-1</sup> preparada en tampón acetato 0,2 M pH 5 (R.5).*

### **Protocolo experimental**

Se preparaban soluciones alcalinas de PVA en agua destilada con 25 mg de NaOH (R.2) por cada g de PVA (R.1), excepto para el PVA de 205 kDa en el que la proporción era de 87,5 mg de NaOH g<sup>-1</sup> de PVA. Esta solución se autoclavaba a 121 °C durante 15 min en un recipiente de cristal herméticamente cerrado para disolver completamente el polímero. Posteriormente, se enfriaba la solución en agitación a temperatura ambiente y finalmente se fijaba el pH a 7 con unas gotas de HCl (R.3). A continuación, se añadía el volumen necesario de la solución del complejo naringinasa (R.6) para obtener una concentración final de 0,5 g L<sup>-1</sup> de enzima. La concentración final de PVA era del 8% (p/v).

La inmovilización por el método de congelación-descongelación suponía extraer la mezcla con la enzima sobre nitrógeno líquido (contenido en un vaso Dewar) gota a gota con ayuda de una bomba peristáltica situada a unos 60 cm de altura. Una vez formadas las perlas se mantenían en nitrógeno líquido durante 1 h. Posteriormente, se decantaba el nitrógeno líquido con el PVA que no había polimerizado y se dejaban las perlas en refrigeración durante toda la noche. Una vez descongeladas, se lavaban con 1 L de agua destilada bajo agitación magnética durante 2 h. Una vez eliminada la mayor cantidad posible de humedad del inmovilizado (con papel de filtro), las perlas se pesaban y se almacenaban a 4 °C hasta su utilización. Paralelamente se preparaba soporte sin enzima, sustituyendo la solución enzimática por tampón.

### **3.4. Atrapamiento en geles de PVA-PEG**

El efecto de la incorporación de polietilenglicol (PEG) a la matriz de PVA se estudió en las condiciones descritas en el apartado 3.3 (8% de PVA, 0,5 g L<sup>-1</sup> de enzima y pH 7), añadiendo PEG al 8%.

#### **Reactivos**

R.1. *Alcohol polivinílico (PVA) (Sigma): se seleccionaron los PVA de 61, 125 y 145 kDa cuyas características se detallan en la Tabla 1.*

R.2. *Polietilenglicol (PEG) de 400, 600 y 1000 Da (Sigma).*

R.3. *NaOH QP (Panreac).*

R.4. *HCl al 37% (p/p).*

R.5. *Nitrógeno líquido*.

R.6. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5*.

R.7. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) 5 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M pH 5 (R.5)*.

### Protocolo experimental

La solución de PVA y PEG se preparaba disolviendo 0,04 g de NaOH (R.3) en 18 mL de agua destilada a los que se adicionaba 1,6 g de PVA (R.1) y 1,6 g de PEG (R.2). Esta solución alcalina (25 mg NaOH g<sup>-1</sup> PVA) se autoclavaba durante 15 min a 121 °C para disolver el PVA. Posteriormente, se adicionaban 2 mL de enzima (R.7) y se procedía a la formación de la perla tal y como se describe en el apartado 3.3.

### 3.5. Optimización mediante diseño de experimentos

La optimización de las condiciones de inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG se llevó a cabo empleando la metodología de diseño de experimentos y superficie de respuesta. Se utilizó PVA de 125 kDa y PEG de 400 Da seleccionados previamente en base a la eficacia de inmovilización (EI) y a la estabilidad mecánica del soporte.

Se aplicó un diseño central compuesto del tipo 2<sup>3</sup> + estrella con 3 puntos centrales. Se escogió un diseño rotatable, en el que todos los puntos son equidistantes del centro del diseño. Los factores estudiados fueron la concentración de PVA (A), la concentración de PEG (B) y el pH de inmovilización (C), cuyos niveles centrales (0), máximo (+1), mínimo (-1) y puntos axiales ( $\pm\alpha$ ) se detallan en la Tabla 2. Las variables respuestas analizadas fueron la EI (Ec. 1) y la estabilidad enzimática (Ee) (Ec. 2).

**Tabla 2.** Niveles de los factores en la optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG, de acuerdo con un diseño central compuesto (2<sup>3</sup>+estrella).

Factores	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A: [PVA] (%)	5,3	6,0	7,0	8,0	8,7
B: [PEG] (%)	7,0	8,0	9,5	11,0	12,0
C: pH	3,0	4,0	5,5	7,0	8,0

La variable respuesta EI (Ec. 1) relaciona la actividad de la enzima inmovilizada (I) frente a la enzima libre (L), ensayada tal y como se describe en el apartado 3.1.

$$EI (\%) = \frac{I}{L} \times 100 \quad (1)$$

Por otra parte, la variable respuesta Ee (Ec. 2) da una idea de la capacidad de reutilización del inmovilizado en zumo sintético (ZS) preparado según Gray y Olson (1981) con naringina 0,8 g L<sup>-1</sup>, sacarosa 47,5 g L<sup>-1</sup> y ácido cítrico 0,25 g L<sup>-1</sup>. Para ello, el inmovilizado se incubaba en ZS durante 1 h a 50 °C y 150 rpm y se medía la actividad enzimática tal y como se describe en el apartado 3.1. Tras la reacción, las perlas se separaban mediante filtración y se lavaban dos veces con tampón acetato durante 15 min, para su utilización en un segundo ciclo de reacción. La Ee se definió como la actividad residual de la enzima inmovilizada en el segundo ciclo de reacción (I<sub>ZS-2</sub>) frente a la actividad de la enzima libre (L<sub>ZS</sub>).

$$Ee (\%) = \frac{I_{ZS-2}}{L_{ZS}} \times 100 \quad (2)$$

La relación entre las variables respuesta y las variables independientes se explicó mediante una ecuación polinómica de segundo grado (Ec. 3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3)$$

donde  $Y$  es la variable respuesta predicha,  $\beta_0$  el término independiente,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  los coeficientes lineales,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  los coeficientes cuadráticos,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  y  $\beta_{23}$  los coeficientes de interacción y  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  las variables independientes.

Una vez optimizada cada variable respuesta por separado se procedió a la optimización multiobjetivo empleando la función de deseabilidad que permitió encontrar la combinación de variables independientes más adecuada que optimizaba ambas respuestas de forma simultánea.

La función de deseabilidad es un procedimiento matemático propuesto por Derringer y Suich (1980) mediante el cual cada respuesta es escalada entre 0 y 1, de forma que, 0 indica un valor inaceptable y 1 indica la situación ideal. Las funciones de deseabilidad individuales se combinan mediante medias geométricas para obtener la función de deseabilidad global (D) de acuerdo con la siguiente expresión (Ec. 4):

$$D = (d_1^{r_1} d_2^{r_2} \dots d_k^{r_k})^{1/\sum r_k} \quad (4)$$

donde  $d_k$  es una función de deseabilidad individual para cada respuesta  $k$ , y  $r_k$  es la importancia relativa dentro de la función de deseabilidad global (Candiotti *et al.*, 2014). La importancia relativa de cada respuesta se establece asignando diferentes pesos que pueden variar entre 1 para la variable menos importante y 5 para la más importante. En este caso, se consideró que ambas respuestas tenían la misma relevancia por lo que se les asignó idénticos pesos.

El paquete informático STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.2.02) se utilizó para construir el diseño de experimentos, realizar el análisis estadístico y el modelado matemático para cada variable respuesta. Además, con la ayuda de este programa se calculó la función de deseabilidad de Derringer para establecer las condiciones experimentales que maximizaban ambas respuestas (EI y Ee) de forma simultánea.

### 3.6. Caracterización morfológica de los inmovilizados

La morfología de las perlas de PVA y PVA-PEG se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para la observación en el microscopio electrónico de barrido fue necesario fijar las muestras con glutaraldehído, con el objetivo de reducir la alteración de la estructura de las perlas. Posteriormente, hubo que deshidratarlas, dado que la presencia de humedad dificultaría la generación de vacío dentro de la cámara del microscopio y el haz de electrones se perturbaría. Finalmente, las perlas se recubrieron con oro, ya que para su observación en el microscopio es necesario que las muestras sean conductoras. Para preparar las muestras se siguió el protocolo descrito por Li *et al.* (2015).

#### Reactivos

R.1. *Solución de glutaraldehído (grado II, Sigma) al 2% (p/v).*

R.2. *Acetona anhidra (Acros Organics).*

#### Protocolo experimental

Las perlas con naringinasa inmovilizada se fijaron con la solución de glutaraldehído (R.1) durante 20 min. A continuación, se deshidrataron mediante inmersión secuencial en concentraciones crecientes de acetona (50, 60, 70, 80 y 90% (p/v)) y finalmente se sumergieron dos veces en acetona anhidra para eliminar las trazas finales de agua. Las muestras deshidratadas se sometieron a liofilización, se cortaron en mitades con un bisturí estéril y se recubrieron con oro. La morfología de la superficie de las perlas y de su sección transversal se examinó mediante un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6400LV). Se tomaron imágenes a un voltaje de aceleración de 10

kV y aumentos de 45 y 3000x para la observación de la superficie e interior de las perlas, respectivamente.

### 3.7. Caracterización bioquímica de la naringinasa libre e inmovilizada

Se estudió la cinética enzimática, el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad, y la estabilidad al almacenamiento, de la naringinasa libre e inmovilizada en las condiciones óptimas propuestas por el diseño de experimentos (8,5% PVA; 7,2% PEG y pH 3).

#### 3.7.1. Cinética enzimática

Los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten,  $K_m$  (constante de Michaelis) y  $V_{max}$  (velocidad máxima de reacción) de la naringinasa libre y los parámetros aparentes  $K_{m,app}$  y  $V_{max,app}$  de la enzima inmovilizada, se calcularon mediante la determinación de la velocidad de reacción enzimática a diferentes concentraciones de sustrato: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 y 0,9 g L<sup>-1</sup>. Las soluciones de sustrato se preparaban en tampón acetato 0,2 M (pH 5), y la actividad enzimática se midió tal y como se describe en el apartado 3.1.

La ecuación empleada para el cálculo de las constantes cinéticas fue la representación de Lineweaver-Burk o representación doble recíproca de Michaelis-Menten (Ec. 5):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

donde  $V_0$  es la velocidad inicial de reacción,  $K_m$  la constante de Michaelis,  $V_{max}$  la velocidad máxima y  $[S]$  la concentración de sustrato.

#### 3.7.2. Perfiles pH/actividad

El comportamiento de la naringinasa libre e inmovilizada frente al pH se evaluó mediante el ensayo de su actividad (apartado 3.1) a diferentes valores de pH (2; 3; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8 y 9). Las soluciones de sustrato y enzima se preparaban en un tampón universal que abarcaba el rango de valores estudiados, con el fin de evitar diferentes tampones cuyas sales puedan afectar a la actividad enzimática.

El tampón universal se preparó mezclando 100 mL de ácido cítrico monohidrato 0,33 M, 100 mL de fosfato disódico 0,33 M, y 100 mL de ácido bórico 0,17 M preparado en una solución de NaOH 1 M. Una vez mezcladas las soluciones se completaba hasta

900 mL con agua destilada, se justaba el pH con HCl 1 M hasta el valor deseado y finalmente se enrasaba a 1 L con agua destilada.

### 3.7.3. Curvas temperatura/actividad

La influencia de la temperatura sobre la actividad naringinasa se determinó midiendo la actividad de la enzima libre e inmovilizada a 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C.

A partir de la ecuación de Arrhenius se determinó la energía de activación ( $E_a$ ) de la enzima libre e inmovilizada. Esta ecuación relaciona la variación de la constante de velocidad,  $k$ , con la temperatura a través de la siguiente expresión (Ec. 6):

$$k = A \cdot e^{(-E_a/RT)} \quad (6)$$

donde  $A$  es el factor pre-exponencial,  $R$  la constante de los gases ( $8,3143 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura absoluta (K) y  $E_a$  la energía de activación ( $\text{J mol}^{-1}$ ).

### 3.7.4. Estabilidad al almacenamiento

Se estudió la estabilidad al almacenamiento en refrigeración a 4 °C de la enzima libre e inmovilizada. La enzima libre se disolvía en tampón acetato 0,2 M (pH 5) y tras medir su actividad inicial se almacenaba en refrigeración. La enzima inmovilizada en soporte de PVA-PEG se almacenaba en seco.

La actividad enzimática se ensayaba tal y como se describe en el apartado 3.1, a tiempo 0 y después de 1, 2, 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días de almacenamiento.

## 3.8. Tratamiento estadístico de los datos

Con el fin de controlar la exactitud y precisión de los resultados experimentales se calculó la media aritmética y la desviación estándar muestral de los valores obtenidos para cada muestra, de acuerdo a las siguientes expresiones:

*Media aritmética* ( $\bar{x}$ ) es el valor medio de de los resultados obtenidos al analizar la muestra  $n$  veces (Ec. 7).

$$\bar{x} = \sum x_i / n \quad (7)$$

*Desviación estándar muestral* ( $S$ ) es la medida de la dispersión de los valores respecto a la media (Ec. 8).

$$S = \sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)} \quad (8)$$

Se utilizó el paquete informático STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.2.02) para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo. El análisis de la varianza (ANOVA) permitió comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ ; y se empleó el test de Tukey para establecer entre qué niveles existía dicha diferencia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Selección de la composición de la matriz de inmovilización de naringinasa

Las características de ambos polímeros (peso molecular, grado de hidrólisis y grado de polimerización del PVA; y peso molecular del PEG) pueden afectar a la formación del criogel. Por tanto, en primer lugar, se estudiaron varios PVA comerciales con características diferenciadas, y PEG de diferentes pesos moleculares para la inmovilización de naringinasa.

#### 4.1.1. Efecto de las características del PVA sobre la inmovilización de naringinasa

El estudio del efecto de las características del PVA sobre la actividad catalítica de los inmovilizados se realizó a partir de las condiciones óptimas seleccionadas previamente por Busto *et al.* (2007) para inmovilizar naringinasa en geles de PVA: concentración de PVA del 8% (p/v), concentración de naringinasa de 0,5 g L<sup>-1</sup> y pH del medio de inmovilización de 7.

En la Tabla 3 se detallan los valores de eficacia de inmovilización (EI) obtenidos para los distintos PVA empleados (51-56%), no encontrándose diferencias significativas entre los distintos soportes. Sin embargo, la estabilidad mecánica sí se veía afectada por la modificación de las características del polímero, de manera que, a medida que aumentaba el PM y el GP, las perlas obtenidas eran más rígidas y se fragmentaban menos durante su manipulación. Sin embargo, se descartó el PVA de 205 kDa para las siguientes experiencias, ya que daba lugar a soluciones muy viscosas que dificultaban su manipulación.

**Tabla 3.** Influencia de las características de PVA en la inmovilización de naringinasa.

PM (Da)	Características del PVA <sup>1</sup>		EI (%) <sup>2</sup>
	GP	GH (%)	
61.000	1400	98-98,8	54,5 ± 3,9 <sup>a</sup>
125.000	2800	98-98,8	51,6 ± 1,5 <sup>a</sup>
145.000	3300	99-99,8	56,3 ± 2,5 <sup>a</sup>
205.000	4200	86,7-88,7	52,0 ± 1,6 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>PM: peso molecular; GP: grado de polimerización; GH: grado de hidrólisis; EI: eficacia de inmovilización. <sup>2</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Los porcentajes de inmovilización obtenidos en este trabajo eran inferiores a los conseguidos anteriormente en nuestro laboratorio para el atrapamiento de naringinasa de *A. niger* CECT 2088 en criogeles de PVA (95-108%) (Busto *et al.*, 2007). Esta menor eficacia de inmovilización puede deberse por un lado a que la naringinasa proviene de diferentes fuentes microbianas y, además, el PVA empleado tenía diferentes características (72,000 Da, GP de 1600 y GH>97,5%). Otros autores también han empleado PVA como matriz para la inmovilización de naringinasa. Por ejemplo, Nunes *et al.* (2012) inmovilizaron la naringinasa de *P. decumbens* en partículas de alcohol polivinílico combinado con dimetilsulfóxido y entrecruzadas con glutaraldehído, consiguiendo una eficacia de inmovilización del 87%. Más recientemente, estos mismos autores han inmovilizado naringinasa mediante atrapamiento en nanofibras electrohiladas de PVA, aunque no indicaban la eficacia de inmovilización que obtuvieron mediante esta técnica (Nunes *et al.*, 2016b).

#### **4.1.2. Efecto del PEG sobre la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA**

Con el objetivo de mejorar la estabilidad mecánica de los biocatalizadores con naringinasa inmovilizada se decidió incorporar a la matriz de PVA, PEG al 8% (p/v). El peso molecular del PEG afecta a la formación de poros y a la estabilidad mecánica (Moriyama *et al.*, 2015), por lo que a las tres muestras de PVA seleccionadas en la prueba precedente (61, 125 y 145 kDa) se incorporó PEG de distinto peso molecular (400, 600 y 1000 Da).

La incorporación de PEG a la matriz de PVA daba lugar, en todos los casos, a una menor capacidad de retención de actividad en el criogel formado, obteniéndose eficacias de inmovilización del 26-46% (Tabla 4). Para PVA de 61.000 Da la EI disminuía al incrementar el PM de PEG. En el caso de PVA de 125.000 Da no se detectaron diferencias significativas al incrementar el PM de PEG de 400 a 600 Da, sin embargo, la EI disminuía con PEG de 1000 Da. Para PVA de 145.000 Da la menor EI se obtuvo con PEG 600, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre PEG 400 y PEG 1000.

Por otro lado, si se analiza de forma individualizada los distintos PEG se observa que cuando se utilizaba PEG 400 no se encontraban diferencias significativas entre los distintos PVA. Para PEG 600, el PVA de 125.000 Da daba lugar a una mayor eficacia de inmovilización, mientras que no se detectaban diferencias significativas entre los otros PVA analizados. Finalmente, para el PEG 1000 el incremento del PM del PVA conllevaba un aumento en la EI.

No se han encontrado referencias previas sobre inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG. Este soporte sí que se ha aplicado para la inmovilización de

peroxigenasas en geles de PVA (61.000 Da) y PEG (1000 Da), consiguiéndose una retención del 60% de enzima activa (Poraj-Kobielska *et al.*, 2015).

**Tabla 4.** Efecto de la incorporación de PEG a la matriz de PVA en la eficacia de inmovilización (EI) de naringinasa.

PVA (Da)	EI (%) <sup>1</sup>		
	PEG 400	PEG 600	PEG 1000
61.000	46,2 ± 1,2 <sup>a,γ</sup>	36,2 ± 3,1 <sup>a,β</sup>	25,8 ± 1,3 <sup>a,α</sup>
125.000	44,9 ± 4,0 <sup>a,β</sup>	41,7 ± 3,1 <sup>b,αβ</sup>	36,8 ± 1,3 <sup>b,α</sup>
145.000	44,9 ± 3,7 <sup>a,β</sup>	34,8 ± 1,7 <sup>a,α</sup>	43,6 ± 1,5 <sup>c,β</sup>

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de la misma columna (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras griegas diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma fila (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la actividad de los inmovilizados disminuía con la incorporación de PEG a la matriz de PVA. Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 7 las perlas obtenidas sin PEG era más traslúcidas y su consistencia menos compacta lo que daba lugar a una mayor rotura durante la manipulación. Es por esta razón que, a pesar de la menor eficacia de inmovilización, se decidió incorporar PEG a la matriz de PVA.



**Figura 7.** Fotografía de perlas de PVA-PEG (izq.) y de perlas de PVA (dcha.).

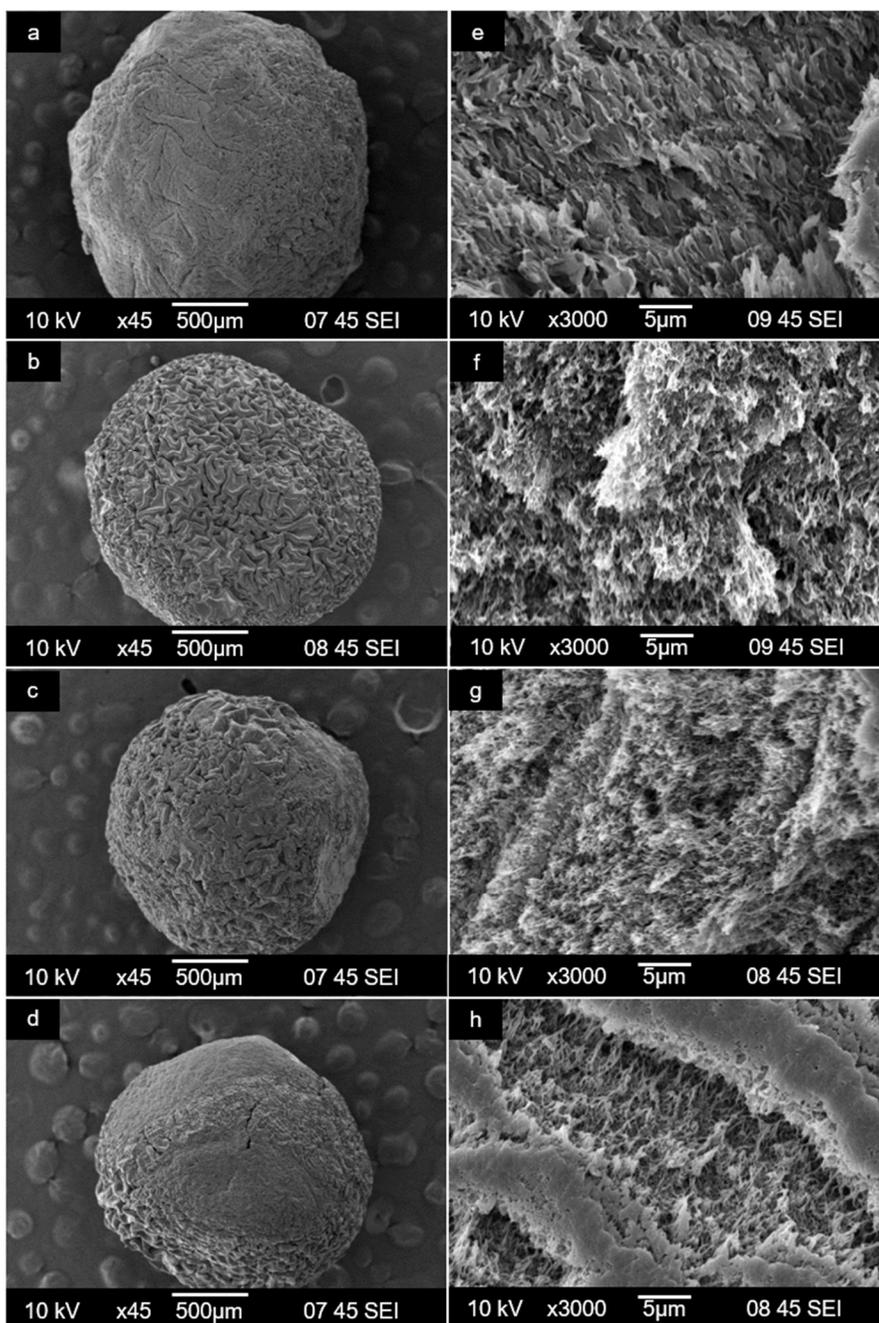
Para las siguientes experiencias y en base a los resultados previos ya detallados, se seleccionaron los PVA y PEG que mejoraban la estabilidad mecánica y la manipulación de los inmovilizados. En concreto, se escogió el PVA de 125.000 Da ya que daba lugar a inmovilizados con mayor estabilidad mecánica que los obtenidos con PVA de 61.000

Da, y a su vez, las soluciones obtenidas eran menos viscosas y más fáciles de manipular que las de PVA 145.000 Da. Por otra parte, se seleccionó el PEG de 400 Da ya que el incremento en el peso molecular dificultaba la manipulación de la solución debido al incremento de la viscosidad, pero no mejoraba de forma apreciable ni la EI ni la estabilidad mecánica de las perlas.

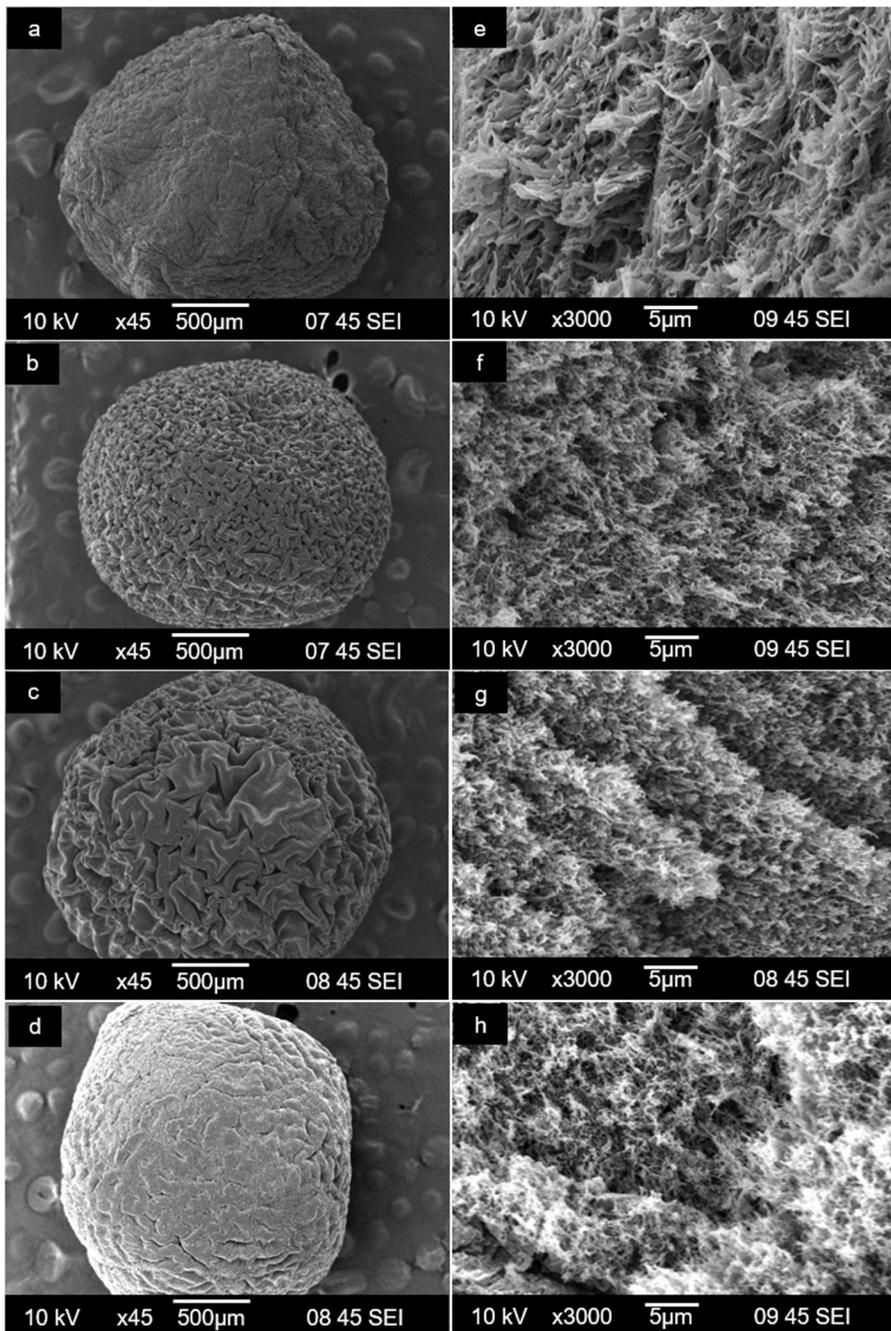
#### **4.1.3. Caracterización morfológica de los inmovilizados**

La morfología de las perlas con naringinasa inmovilizada se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En las Figuras 8, 9 y 10 se incluyen las imágenes correspondientes a los inmovilizados obtenidos con PVA de 61.000, 125.000 y 145.000 Da, respectivamente. Como puede observarse en estas Figuras no se apreciaban diferencias al modificar el peso molecular del PVA. Las imágenes de la superficie exterior de las perlas (Figuras 8, 9 y 10, a-d) muestran que la incorporación de PEG daba lugar a la formación de surcos más definidos y profundos. En las fotografías del interior de las perlas (Figuras 8, 9 y 10, e-h) se puede apreciar que la incorporación de PEG conducía a una estructura más compacta, con mayor número de poros, pero de menor tamaño. Esta compactación estructural explicaría la mejora en la estabilidad mecánica de los inmovilizados y, también, el descenso en la actividad enzimática debido al incremento de las limitaciones difusionales.

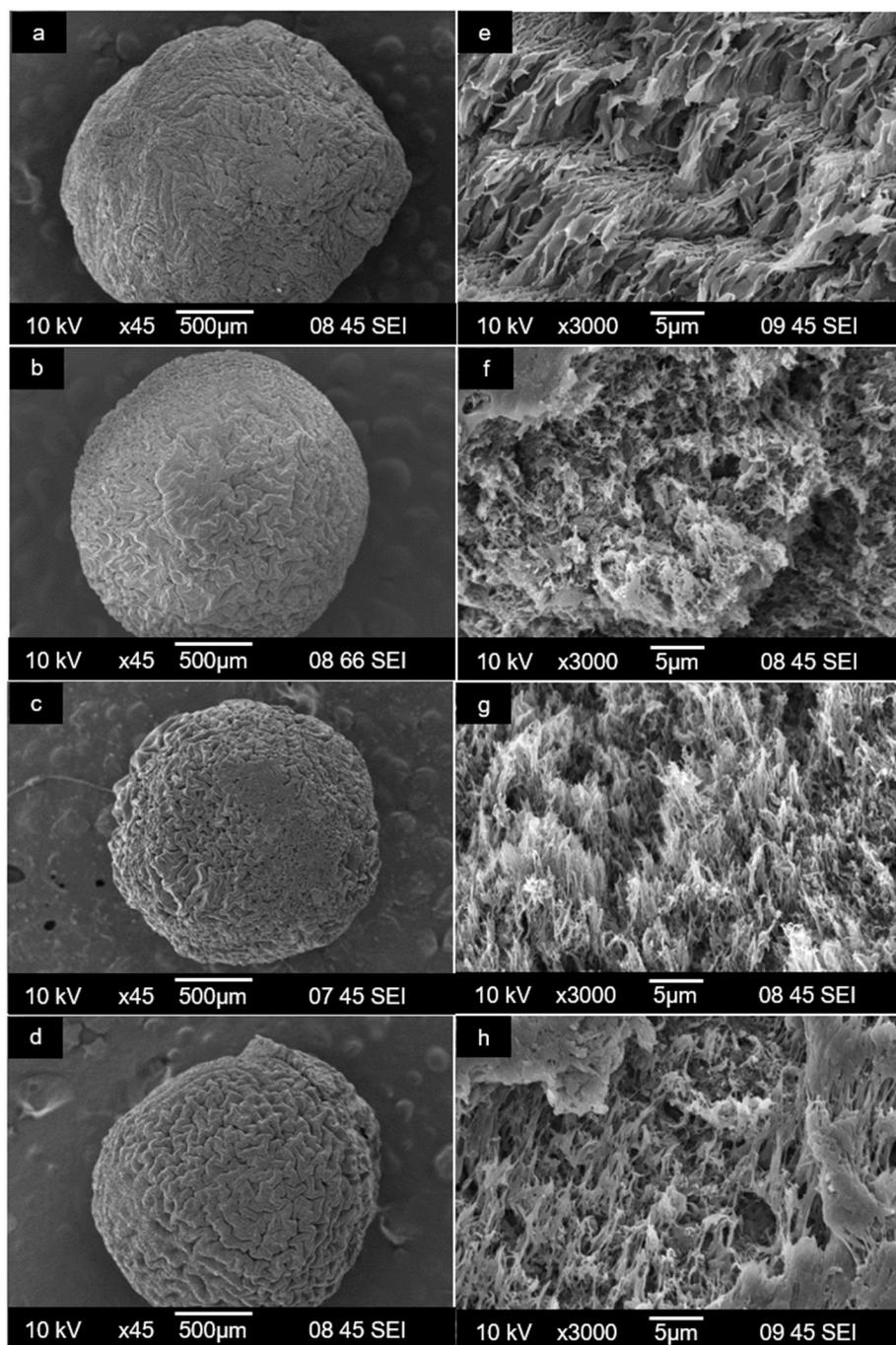
No se han encontrado referencias previas sobre estudios morfológicos de geles de PVA-PEG como matriz de inmovilización enzimática, a excepción del trabajo de Bieler *et al.* (2010) en el que se describía que los inmovilizados de benzaldehído liasa en geles de PVA-PEG tenían una estructura tipo esponja. Otros autores sí han estudiado el efecto de la presencia de PEG sobre la morfología de hidrogeles. Así, Cheng *et al.* (2014) investigaron el efecto de la incorporación de PEG a perlas de alginato de calcio en las que inmovilizaron la bacteria *Pseudomonas putida* XY4. Estos autores concluyeron que el PEG daba lugar a un aumento del tamaño y número de poros del gel a medida que aumentaba su PM. Por su parte, Zhang y Ye (2011) encontraron que el incremento de la concentración y PM de PEG se traducía en un aumento de la porosidad y mejora de la transferencia de masa en geles de PVA-alginato de calcio entrecruzados con ácido bórico. Esto último, contrasta con lo observado en el presente trabajo para los inmovilizados de naringinasa en criogeles de PVA-PEG.



**Figura 8.** Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA 61 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.



**Figura 9.** Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA 125 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.



**Figura 10.** Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA de 145 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.

## **4.2. Optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG**

La metodología de diseño de experimentos permite la optimización simultánea de múltiples variables con el mínimo número de experimentos. Aplicando un modelo matemático, denominado superficie de respuesta, se pueden relacionar los factores estudiados con las respuestas obtenidas. Son numerosos los procesos de inmovilización de enzimas que han sido optimizados mediante esta estrategia. Algunos ejemplos son la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en Sephadex y perlas de quitosano (Dwevedi y Kayastha, 2009), lipasa en un copolímero de estireno-divinilbenceno (Aybastier y Demir, 2010),  $\alpha$ -amilasa en DEAE celulosa (Singh y Kayastha, 2014) o alginato de calcio (Kumar *et al.*, 2016), peroxidasa en nanopartículas de quitosano-óxido de cobalto (Shukla *et al.*, 2017) y tripsina en sílica mesoporoso (Liu *et al.*, 2019).

En este trabajo, para la optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles se empleó PVA de 125.000 Da y PEG de 400 Da, seleccionados en las experiencias anteriores, y se aplicó la herramienta de diseño de experimentos y superficie de respuesta. Los factores estudiados fueron el pH de inmovilización y las concentraciones de ambos polímeros. Con el fin de obtener biocatalizadores activos y estables, se analizaron como variables respuesta la EI y la Ee, definidas en el apartado 3.5 de este capítulo. En la Tabla 5 se presentan los 17 experimentos propuestos por el diseño junto con los valores experimentales obtenidos para las dos respuestas analizadas. El experimento 16 fue eliminado del diseño por considerarse un punto atípico.

La optimización simultánea de las variables respuesta requiere establecer, en primer lugar, el modelo matemático que relaciona cada respuesta con las variables independientes. Una vez establecido cada modelo, se puede aplicar la función de deseabilidad para encontrar la combinación de factores que optimiza las respuestas de forma simultánea. Así, se procedió a evaluar el diseño de experimentos para la EI (apartado 4.2.1) (González-Temiño *et al.*, 2020), después el diseño de experimentos para la Ee (apartado 4.2.2) y finalmente se optimizó de forma simultánea ambas variables respuesta (apartado 4.2.3).

### **4.2.1. Diseño de experimentos para la eficacia de inmovilización**

Los mejores resultados para la EI (Tabla 5) se obtuvieron en el experimento 5 (Exp 5) (PVA 7%, PEG 9,5% y pH 8) con un porcentaje de inmovilización de 47,5%, mientras que el menor porcentaje, 14,8%, se obtuvo en el Exp 8 (PVA 6%, PEG 11% y pH 4). El incremento de la concentración de PEG desde el 8% (Exp 9) hasta el 11% (Exp 8) se traducían en un descenso de la EI desde un 45,4% hasta un 14,8%. Por tanto, el aumento de la concentración de PEG tenía un efecto negativo en la EI. Por otro lado, el aumento

del pH ejercía un efecto positivo en la EI dado que al comparar el Exp 3 cuyo pH es 3, frente al Exp 5 cuyo pH es 8 se observaba un incremento del porcentaje de inmovilización desde 19,7% hasta 47,5%. No obstante, para obtener una mejor comprensión del efecto de cada uno de los factores y sus interacciones sobre la respuesta es necesario recurrir al análisis estadístico del diseño de experimentos.

**Tabla 5.** Diseño experimental y variables respuestas, eficacia de inmovilización (EI) y estabilidad enzimática (Ee), en la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG.

Experimento <sup>1</sup>	Variables independientes			EI (%)	Ee (%)
	A: [PVA] (%)	B: [PEG] (%)	C: pH		
1	8,7	9,5	5,5	24,8	24,7
2	7,0	9,5	5,5	25,8	21,1
3	7,0	9,5	3,0	19,7	39,2
4	8,0	8,0	7,0	39,1	15,1
5	7,0	9,5	8,0	47,5	32,6
6	8,0	11,0	7,0	32,1	18,2
7	6,0	8,0	7,0	23,7	42,0
8	6,0	11,0	4,0	14,8	8,7
9	6,0	8,0	4,0	45,4	16,0
10	7,0	9,5	5,5	26,1	21,7
11	7,0	7,0	5,5	29,3	21,7
12	7,0	12,0	5,5	15,1	21,3
13	7,0	9,5	5,5	22,9	19,8
14	8,0	8,0	4,0	36,1	27,3
15	5,3	9,5	5,5	30,9	21,4
17	8,7	9,5	5,5	35,0	24,3

<sup>1</sup>El experimento 16 se consideró un punto atípico y fue eliminado del diseño.

El análisis de la varianza o ANOVA (Tabla 6) permite conocer los factores que tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta, a un nivel de confianza del 95%, que son aquellos cuyo valor de *p* es menor de 0,05. Se deduce, por tanto, que la concentración de PEG (B), el pH de inmovilización (C), y las interacciones [PVA]-pH (AC), [PEG]-pH (BC) tenían un efecto significativo sobre la EI. Por el contrario, la concentración de PVA (A) y las interacciones [PVA]-[PEG] (AB) no afectaban de forma significativa a la respuesta en el intervalo estudiado.

**Tabla 6.** ANOVA para el modelo de superficie de respuesta que representa el efecto de las variables independientes sobre la respuesta eficacia de inmovilización (EI).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	Valor-p
A: [PVA]	47,60	1	47,60	15,74	0,0580
B: [PEG]	515,40	1	515,40	170,48	0,0058
C: pH	448,54	1	448,54	148,36	0,0067
AA	8,87	1	8,87	2,94	0,2288
AB	82,72	1	82,72	27,36	0,0347
AC	167,49	1	167,49	55,40	0,0176
BB	13,42	1	13,42	4,44	0,1697
BC	542,46	1	542,46	179,43	0,0055
CC	95,53	1	95,53	31,60	0,0302
Fallo de ajuste	104,32	4	26,08	8,63	0,1066
Error puro	6,05	2	3,02		
Total (corr.)	1396,81	15			

$$R^2 = 92,1\%; R^2_{\text{adj}} = 80,3\%$$

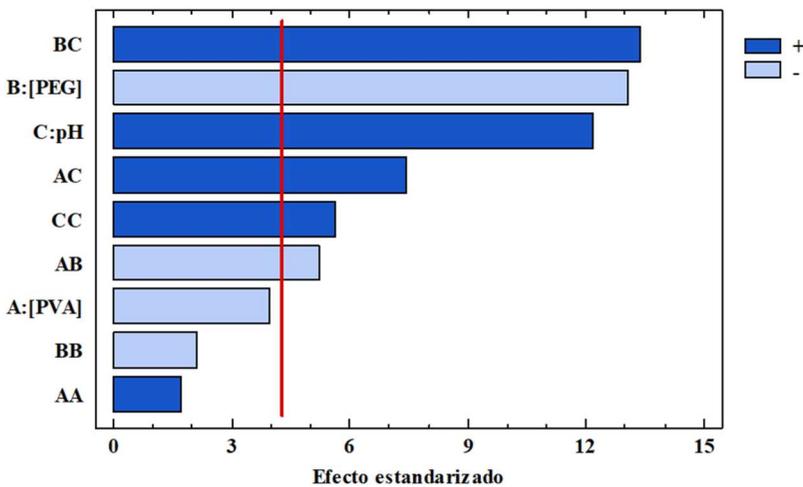
El ANOVA es una herramienta estadística importante para confirmar la adecuación del modelo matemático. La prueba de fallo de ajuste permite determinar si el modelo matemático es adecuado para describir los datos experimentales. Dado que el valor de  $p$  era mayor de 0,05 (0,1066) se puede concluir que el modelo se ajustaba a los datos obtenidos. El modelo explicaba un porcentaje elevado de la varianza de los datos ya que el coeficiente de regresión  $R^2$  era 92,1%. La ecuación (Ec. 9) que explica la relación entre la respuesta y las variables independientes sería la siguiente:

$$EI (\%) = 292,76 - 10,18A - 1,09B - 76,31C + 0,88A^2 - 0,50B^2 + 1,33C^2 - 2,52AB + 3,58AC + 4,30BC \quad (9)$$

donde  $A$ ,  $B$ , y  $C$  son los valores de concentración de PVA, concentración de PEG y pH de inmovilización, respectivamente.

El diagrama de Pareto (Figura 11) es una representación gráfica del efecto estandarizado de las variables estudiadas y sus interacciones sobre la respuesta. En esta representación, la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado sobre la

respuesta. Aquellos factores cuyas barras cruzan la línea vertical se considera que tienen un efecto significativo a un nivel de confianza del 95%. Del análisis de este diagrama se deduce que la interacción [PEG]-pH era el parámetro que mayor efecto ejercía sobre la EI, seguido de la [PEG] y el pH. De los factores que tenían un efecto significativo, el pH de inmovilización, y las interacciones [PEG]-pH y [PVA]-pH eran directamente proporcionales a la EI, mientras que la concentración de PEG y la interacción [PVA]-[PEG] tenían un efecto negativo sobre la respuesta.



**Figura 11.** Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables del diseño para la respuesta eficacia de inmovilización (EI).

El efecto negativo sobre la EI que ejercía el incremento de la concentración de los polímeros empleados como soporte, podría explicarse por el impacto que tiene sobre la porosidad del gel. Lozinsky y Plieva (1998) indicaron que el incremento de la concentración de PVA conducía a un descenso del número y tamaño de los macroporos del criogel y a un aumento del grosor de las paredes. Esto puede contribuir a la resistencia mecánica del gel, pero puede generar, a su vez, limitaciones difusionales que explicarían el descenso de la actividad de los inmovilizados al incrementar la [PVA]. Además, el PEG puede competir por el agua con el PVA durante el proceso de gelificación, lo que genera microfases ricas en alcohol polivinílico (Lozinsky *et al.*, 1995) y, por tanto, el incremento en la [PEG] tendría un efecto similar al aumento de PVA.

Mediante la Ec. 9 se pueden construir los diagramas de superficie de respuesta (Figura 12) que muestran la respuesta (eje Z) representada frente a dos de las variables independientes (ejes X e Y), manteniendo constante el factor no representado. Estos

diagramas permiten deducir la dirección hacia la que hay que moverse sobre dicha superficie para alcanzar un determinado valor en la respuesta. En el caso de la inmovilización de enzimas, generalmente se busca el máximo rendimiento de inmovilización, que, en este caso, tal y como se aprecia en la Figura 12, se encontraba en los extremos del diseño.

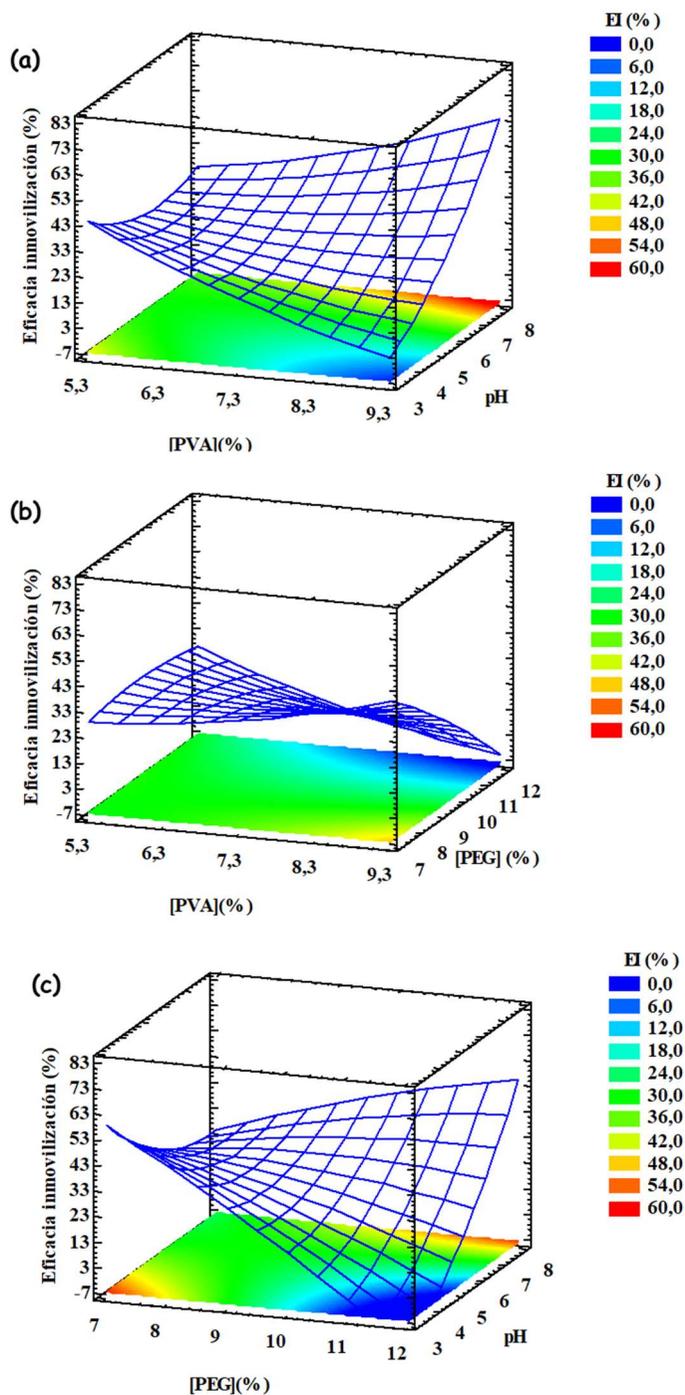
La Figura 12a se obtuvo fijando la concentración de PEG en el punto central del diseño (9,5%) y representando las otras dos variables frente a la respuesta. En este gráfico se observa que a bajas concentraciones de PVA (5,3-6,3%) la variación del pH no tenía efecto sobre la EI. Sin embargo, al aumentar la concentración de PVA hasta el máximo del rango estudiado (8,7%), el incremento del pH daba lugar en un aumento de la respuesta, llegando a alcanzar valores teóricos en torno al 60%.

En la Figura 12b se muestra el efecto de las variables concentración de PVA y concentración de PEG cuando el pH se fijaba en el centro del diseño (5,5). A valores bajos de concentración de PVA (5,3-6,3%), la EI apenas se modificaba, independientemente de la concentración de PEG, manteniéndose en torno al 30% según el modelo. Sin embargo, para concentraciones altas de PVA (8,7%), la respuesta se incrementaba cuando se reducía la concentración de PEG, llegando a valores del 45% para el 7% de PEG.

En la Figura 12c se representa la EI frente a la concentración de PEG y el pH, cuando se mantenía la concentración de PVA en el centro del diseño (7%). Destaca que la EI era prácticamente nula, según el modelo, cuando se trabajaba en el extremo máximo para el PEG (12%) junto con un pH ácido de 3. Sin embargo, concentraciones altas de PEG (12%) junto con un pH básico de 8, o concentraciones bajas de PEG (7%) y pH ácido de 3, daban lugar a un incremento notable de la EI, llegando a valores máximos teóricos cercanos al 60%.

Por tanto, del estudio del ANOVA, del diagrama de Pareto y de las superficies de respuesta puede concluirse que el pH de inmovilización y sus interacciones con los otros factores (concentración de PVA y de PEG) tenían un efecto muy importante sobre la respuesta EI.

A partir del modelo (Ec. 9) se obtuvieron las condiciones óptimas que maximizaban la eficacia de inmovilización: 8,7% de PVA, 11,5% de PEG, y pH 8. En estas condiciones se obtuvo experimentalmente una EI del  $37,9 \pm 1,8\%$ , valor muy alejado del predicho por el modelo matemático que era 59,8%. Es frecuente encontrar desviaciones entre la respuesta estimada y el valor experimental cuando, como en este caso, los niveles de las variables independientes se sitúan en los extremos de un diseño central compuesto (Demarche *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Diagrama de superficie de respuesta estimada para la eficacia de inmovilización (EI). (a) [PEG]= 9,5%; (b) pH= 5,5; (c) [PVA]= 7,0%.

#### 4.2.2. Diseño de experimentos para la estabilidad enzimática

Los resultados del diseño de experimentos para la Ee (Tabla 5) variaban desde un 8,7% en el experimento 8 (6% de PVA, 11% de PEG y pH 4) hasta un 42,0% en el experimento 7 (6% de PVA, 8% de PEG y pH 7).

El efecto de las variables independientes sobre la estabilidad enzimática se estudió mediante el ANOVA recogido en la Tabla 7. Los factores que tenían una influencia significativa sobre la respuesta ( $p < 0,05$ ) eran la concentración de PVA (A), el pH de inmovilización en su forma cuadrática (CC) y las interacciones [PVA]-[PEG] (AB), [PVA]-pH (AC) y [PEG]-pH (BC). Sin embargo, la concentración de PEG (B) no ejercía un efecto significativo sobre la respuesta. La prueba de fallo de ajuste permitió determinar que el modelo era adecuado para describir los datos experimentales dado que el valor de  $p$  era mayor a 0,05 (0,0902). Además, el modelo explicaba con bastante precisión la variabilidad de los datos ya que el coeficiente de regresión  $R^2$  era 96,2%. La ecuación (Ec. 10) que relaciona la respuesta Ee con las variables independientes es la siguiente:

$$\text{Ee (\%)} = 1,48 - 2,87A - 17,83B + 40,04C + 0,29A^2 - 0,13B^2 + 2,17C^2 + 4,15AB - 7,05AC - 1,60BC \quad (10)$$

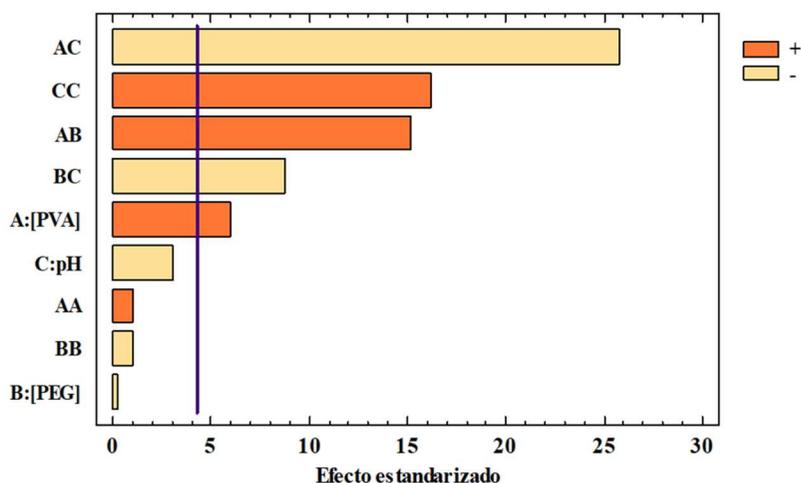
donde  $A$ ,  $B$ , y  $C$  son los valores de concentración de PVA, concentración de PEG y pH de inmovilización, respectivamente.

**Tabla 7.** ANOVA para el modelo de superficie de respuesta que representa el efecto de las variables independientes sobre la respuesta estabilidad enzimática (Ee).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	Valor- $p$
A: [PVA]	34,51	1	34,51	35,46	0,0271
B: [PEG]	0,07	1	0,07	0,07	0,8157
C: pH	9,09	1	9,09	9,34	0,0925
AA	0,93	1	0,93	0,96	0,4313
AB	224,37	1	224,37	230,54	0,0043
AC	648,22	1	648,22	666,05	0,0015
BB	0,89	1	0,89	0,92	0,4394
BC	75,27	1	75,27	77,34	0,0127
CC	254,93	1	254,93	261,94	0,0038
Fallo de ajuste	40,21	4	10,05	10,33	0,0902
Error puro	1,95	2	0,97		
Total (corr.)	1097,29	15	34,51		

$$R^2 = 96,2\%; R^2_{\text{adj}} = 90,4\%$$

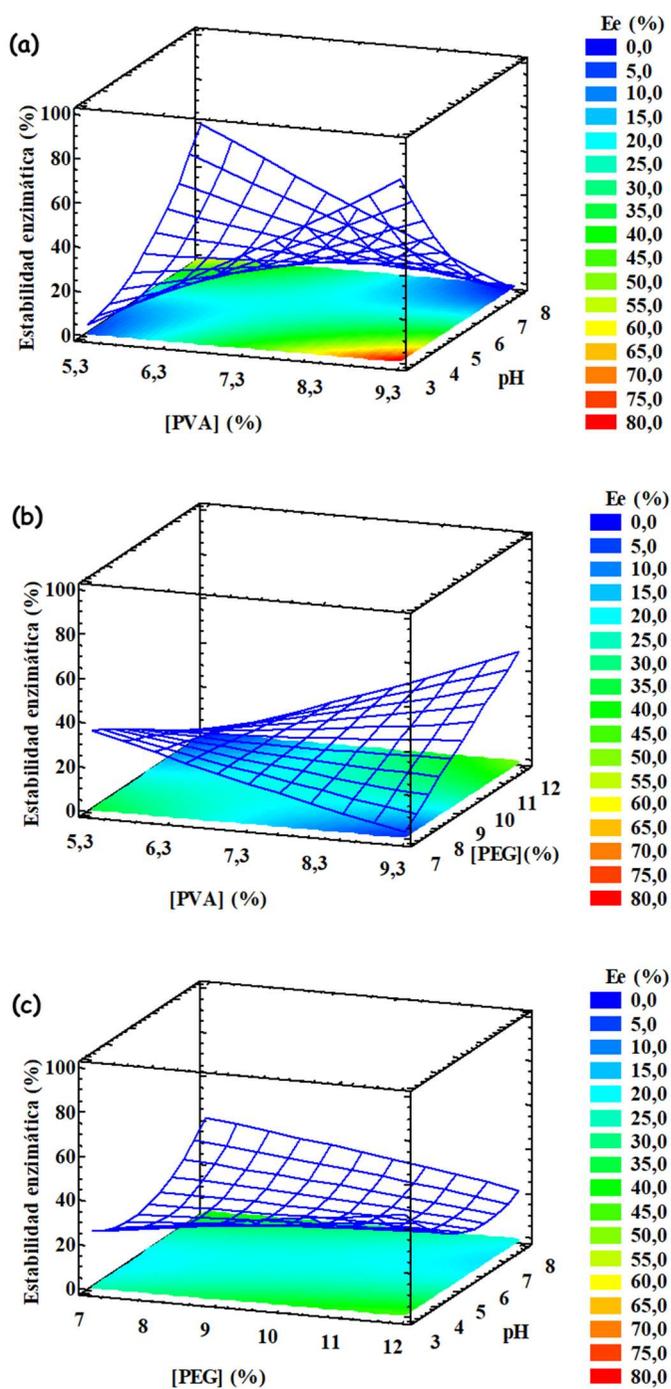
El diagrama de Pareto para la Ee (Figura 13) muestra que las interacciones entre las variables tenían un importante efecto sobre la Ee, siendo la interacción [PVA]-pH el parámetro que mayor efecto tenía sobre la estabilidad, seguido del pH<sup>2</sup>, y las interacciones [PVA]-[PEG] y [PEG]-pH. De entre los parámetros que afectaban de forma significativa a la respuesta, la [PVA], el pH<sup>2</sup>, y la interacción [PVA]-[PEG] ejercían un efecto positivo sobre la estabilidad mientras que las interacciones [PVA]-pH y [PEG]-pH tenían un efecto negativo.



**Figura 13.** Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de los factores sobre la estabilidad enzimática (Ee).

A partir de la ecuación que describe la Ee (Ec. 10) se construyeron los diagramas de superficie de respuesta (Figura 14). Cabe destacar que los mejores resultados para la Ee aparecen en los extremos de los rangos estudiados.

La Figura 14a muestra el efecto sobre la estabilidad enzimática de la concentración de PVA y el pH de inmovilización, cuando se fijaba la concentración de PEG en el centro del diseño (9,5%). Cuando la concentración de PVA se situaba en el extremo más bajo del diseño (5,3%), el desplazamiento del pH hacia valores más básicos se traducía en una mejora de la Ee desde valores nulos (pH 3) hasta un 60% (pH 8) según el modelo. Sin embargo, cuando la concentración de PVA se mantenía en el extremo superior del rango estudiado (8,7%) la Ee se veía incrementada hacia valores más ácidos hasta alcanzar un 75% a pH 3.



**Figura 14.** Diagrama de superficie de respuesta estimada para la estabilidad enzimática (Ee). (a) [PEG]= 9,5%; (b) pH= 5,5; (c) [PVA]= 7,0%.

En la Figura 14b se representa el efecto de la concentración de PVA y la concentración de PEG sobre la estabilidad cuando se mantenía el pH en el centro del diseño (5,5). Según el modelo matemático, a bajas concentraciones de PVA la Ee se veía reducida con el incremento de la concentración de PEG, desde un 40% hasta el 5%. Sin embargo, cuando la concentración de PVA se mantenía en los valores más altos del rango estudiado (8,7%), el aumento de la concentración de PEG se traducía en un incremento muy importante de la estabilidad desde valores nulos para 7% de PEG hasta un 50% para un 12% de PEG.

En la Figura 14c se observa el efecto sobre la estabilidad en función de la concentración de PEG y el pH de inmovilización, cuando se fijaba la concentración de PVA en el centro del diseño (7%). La estabilidad apenas se modificaba, manteniéndose en torno al 20%, cuando el pH (5,5) se situaba en el centro del rango estudiado, independientemente de la concentración de PEG. Es hacia los extremos de ambas variables donde se veía incrementada la respuesta llegando a alcanzarse en torno al 45% para una concentración de PEG de 7% y pH 8.

Por tanto, el estudio del ANOVA, del diagrama de Pareto y de las superficies de respuesta permite concluir que las interacciones entre las diferentes variables ejercían un efecto determinante sobre la estabilidad enzimática.

A partir del modelo obtenido (Ec. 10) se obtuvieron las condiciones óptimas que maximizaban la Ee: 8,7% PVA, 10,2% PEG, y pH 3. En estas condiciones, la respuesta predicha por el modelo era de 78%, sin embargo, experimentalmente se obtuvo un  $47,0 \pm 1,5\%$ . De nuevo, aparecen discrepancias entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, al operar en los extremos del diseño.

#### **4.2.3. Optimización simultánea de la eficacia de inmovilización y la estabilidad enzimática**

Existen multitud de procesos en los cuales es necesario optimizar más de una variable respuesta de forma simultánea. Obviamente, no es útil optimizar cada respuesta por separado ya que los niveles de los factores que optimizan una respuesta pueden estar muy alejados del óptimo de otra de las variables. Dado que la optimización multiobjetivo es muy compleja, sobre todo cuando se requieren niveles antagónicos de las variables, se hacen necesarias herramientas matemáticas que faciliten encontrar un óptimo común como es el caso de la función de deseabilidad, procedimiento propuesto por Derringer y Suich (1980).

El objetivo de la presente Tesis era obtener inmovilizados activos y estables, por lo que se hace imprescindible conseguir un biocatalizador con un porcentaje de EI elevado pero que a su vez presente una alta Ee. Así pues, una vez construidos los modelos

matemáticos para cada variable respuesta y encontrados los óptimos para cada una de ellas (Tabla 8), se aplicó la función de deseabilidad, que permite optimizar varias variables respuesta de forma simultánea, encontrando un óptimo en las siguientes condiciones: [PVA]= 5,4%; [PEG]= 10,9% y pH= 8. Al ensayar experimentalmente estas condiciones se obtuvo una EI de  $31,1 \pm 1,9\%$  y una Ee de  $10,9 \pm 4,4\%$ . Estos resultados se encontraban lejos de los valores predichos por el diseño: EI= 48,4%; Ee= 43% (Tabla 8). Como ya se ha indicado, es habitual encontrar discrepancias entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo matemático cuando los niveles de los factores se encuentran próximos a los extremos de un diseño central compuesto. Cabe destacar que, bajo las condiciones de ensayo empleadas, gran cantidad de perlas se rompían durante la manipulación y muchas se encontraban aglomeradas, probablemente debido a la baja concentración de PVA. Por ello, se decidió buscar un nuevo óptimo limitando la región de búsqueda entre el nivel mínimo (6%) y el nivel axial (8,7%) de la concentración de PVA. En esta ocasión, la función de deseabilidad proponía las siguientes condiciones óptimas: [PVA]= 8,5%; [PEG]= 7,2% y pH= 3. A pesar de que los valores de los factores eran muy diferentes al primer óptimo la respuesta estimada era muy similar: EI= 48,9% y Ee= 42,2%. En este caso, los resultados experimentales sí se ajustaban a lo predicho por el diseño:  $41,7 \pm 1,4\%$  y  $38,2 \pm 2,8\%$  para la EI y la Ee, respectivamente.

**Tabla 8.** Niveles de los factores y variables respuesta calculadas para la optimización individual de la eficacia de inmovilización (EI), la estabilidad enzimática (Ee) y optimización multiobjetivo.

	[PVA] (%)	[PEG] (%)	pH	EI calculada	Ee calculada
Maximizar EI	8,7	11,5	8,0	59,8	12,7
Maximizar Ee	8,7	10,2	3,0	-8,2	78,0
Maximizar EI + Ee <sup>1</sup>	5,4	10,9	8,0	48,4	43,0
Maximizar EI + Ee <sup>2</sup>	8,5	7,2	3,0	48,9	42,2

<sup>1</sup>Óptimo multiobjetivo cuando se buscaba en todo el rango de [PVA]. <sup>2</sup>Óptimo multiobjetivo cuando se limitaba el rango de [PVA] de 6% a 8,7%.

### 4.3. Caracterización bioquímica de la naringinasa libre e inmovilizada

La inmovilización puede afectar a las propiedades catalíticas de las enzimas. La técnica de inmovilización, así como el soporte utilizado, pueden producir cambios estructurales en la enzima o modificar su microambiente. Por ello, en este apartado se incluye un estudio bioquímico de la naringinasa soluble e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG en las condiciones óptimas seleccionadas: 8,5% PVA; 7,2% PEG y pH 3

(apartado 4.2.3). En concreto, se estudió el comportamiento cinético (apartado 4.3.1), se analizó el efecto del pH (apartado 4.3.2) y la temperatura de incubación (apartado 4.3.3) sobre la actividad naringinasa, y la estabilidad al almacenamiento (apartado 4.3.4), de la enzima inmovilizada en comparación con su contrapartida soluble.

#### 4.3.1. Cinética enzimática. Determinación de los parámetros cinéticos $K_m$ y $V_{max}$

La modificación de los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada con respecto a la libre puede deberse a interacciones con el soporte, a limitaciones difusionales o a la inactivación de la enzima (Özdural *et al.*, 2008). Se estudió el comportamiento cinético de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG mediante la determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato (Tabla 9) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.1. La representación gráfica de los resultados obtenidos (Figura 15) permite afirmar que tanto la naringinasa libre como inmovilizada seguían un comportamiento cinético de Michaelis-Menten.

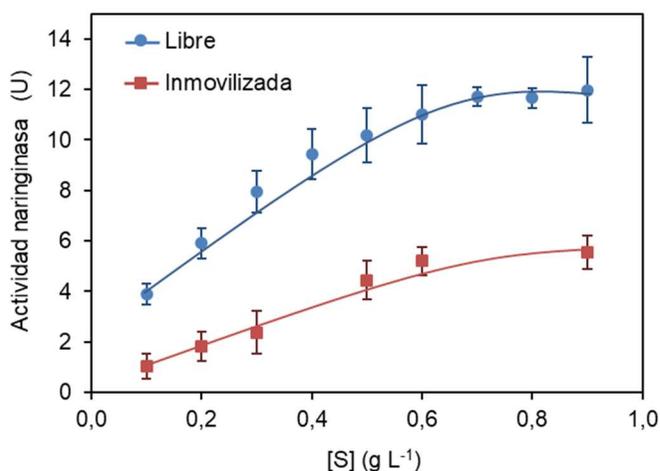
**Tabla 9.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

[S] (g L <sup>-1</sup> )	Actividad enzimática (U)	
	Libre	Inmovilizada
0,1	3,90 ± 0,41	1,05 ± 0,51
0,2	5,90 ± 0,62	1,81 ± 0,58
0,3	7,93 ± 0,83	2,37 ± 0,84
0,4	9,44 ± 0,99	3,76 ± 0,36
0,5	10,19 ± 1,07	4,44 ± 0,76
0,6	11,01 ± 1,16	5,20 ± 0,57
0,7	11,70 ± 0,38	6,27 ± 1,61
0,8	11,65 ± 0,38	5,85 ± 0,03
0,9	11,97 ± 1,30	5,55 ± 0,65

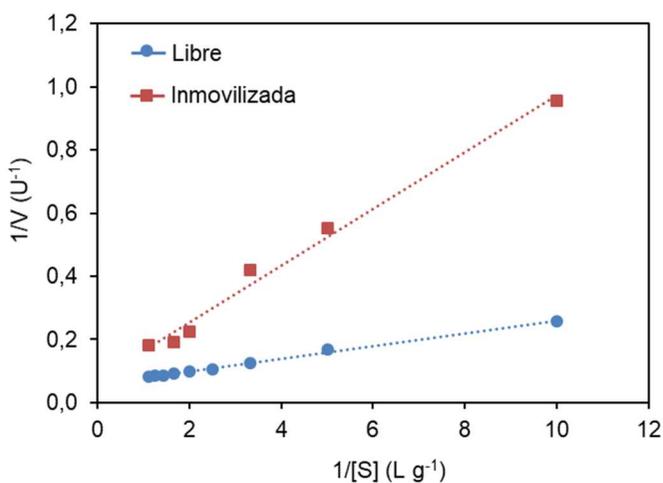
La representación de Lineweaver-Burk (Figura 16) se aplicó para el cálculo de los parámetros cinéticos. La Tabla 10 recoge los valores calculados de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la naringinasa libre y,  $K_{m,app}$  y  $V_{max,app}$  para la enzima inmovilizada en PVA-PEG. La  $V_{max}$  era 16,82 U para la naringinasa libre y 13,47 U para la inmovilizada. Cuando el soporte produce limitaciones difusionales, como en el caso del atrapamiento en geles de PVA-

PEG, se genera una capa no agitada alrededor de la enzima que hace que la  $V_{\max}$  observada disminuya.

La constante  $K_m$  se veía fuertemente afectada por la inmovilización, con valores de  $0,337 \text{ g L}^{-1}$  para la enzima libre, mientras que el valor aparente para el inmovilizado se veía incrementado 3,6 veces ( $1,214 \text{ g L}^{-1}$ ). Este aumento de la  $K_{m,app}$  sugiere que la inmovilización de la naringinasa en el criogel de PVA-PEG conducía a una menor afinidad de la enzima por el sustrato como consecuencia de limitaciones difusionales que imponía la matriz soporte al acceso del sustrato y liberación del producto de reacción.



**Figura 15.** Cinética de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.



**Figura 16.** Representación de Lineweaver-Burk para naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG calculados a partir de la representación de Lineweaver-Burk.<sup>1</sup>

Naringinasa	$K_m$ (g L <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (U)	$R^2$
Libre	0,337	16,82	0,9947
Inmovilizada	1,214	13,47	0,9884

Diversos autores han descrito el aumento de la  $K_{m,app}$  de las enzimas inmovilizadas respecto a su contrapartida soluble, especialmente cuando se utiliza el atrapamiento como técnica de inmovilización. Puri *et al.* (1996) al inmovilizar naringinasa mediante atrapamiento en geles de alginato de calcio encontraron que la  $K_{m,app}$  de la enzima inmovilizada era 1,2 veces superior a la de su contrapartida soluble. Resultados similares encontraron Şekeroğlu *et al.* (2006) y Nunes *et al.* (2010) al inmovilizar naringinasa en celita y en geles de alginato-PVA, respectivamente. Más recientemente, Awad *et al.* (2016) observaron que la constante michaeliana aumentaba un 69% al inmovilizar naringinasa mediante enlace covalente a perlas de alginato de calcio modificadas.

En bibliografía también se ha descrito el descenso de la  $K_{m,app}$  como por ejemplo al inmovilizar naringinasa mediante enlace covalente a chips de madera (Puri *et al.*, 2005) o a un tamiz molecular mesoporoso MCM-41 (Lei *et al.*, 2011).

#### 4.3.2. Efecto de la inmovilización sobre la curva pH-actividad naringinasa

La inmovilización de enzimas puede llevar a la distorsión, ensanchamiento, estrechamiento o desplazamiento de los perfiles pH-actividad de las enzimas debido a los siguientes fenómenos (Trevan, 1990): (1) el reparto desigual de los iones hidrógeno, (2) las cargas electroestáticas del soporte, (3) la difusión limitada de los iones hidrógeno producidos o consumidos durante la reacción y (4) la difusión limitada de sustrato que hace que la sensibilidad se vea disminuida frente a cambios del pH.

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada se determinó mediante el estudio de la degradación de naringina en muestras incubadas a valores de pH comprendidos entre 2 y 9 en un tampón universal, tal y como se describe en el apartado 3.7.2 de este capítulo (Tabla 11). La actividad máxima para la enzima libre y la inmovilizada en PVA-PEG se obtuvo a pH 4. En el caso de soportes neutros, como los polímeros empleados en este trabajo, no suele haber desplazamiento del pH, ya que la ausencia de cargas evita el reparto desigual de protones entre el seno de la disolución y el microambiente de la enzima. Otros autores también observaron un valor óptimo de actividad a pH 4 para la naringinasa de *P. decumbens* (Puri *et al.*, 1996; Norouzian *et al.*, 1999; Şekeroğlu *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2010). Aunque también se han descrito

**Tabla 11.** Efecto del pH sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

pH	Actividad naringinasa (U mg <sup>-1</sup> )		Actividad relativa (%)	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
2,0	15,90 ± 1,54	8,61 ± 0,77	27,4 ± 2,7	44,0 ± 3,9
3,0	39,00 ± 1,27	14,22 ± 1,60	67,1 ± 2,2	72,7 ± 8,2
4,0	58,12 ± 2,31	19,56 ± 1,10	100,0 ± 4,0	100,0 ± 5,6
4,5	51,34 ± 2,06	15,61 ± 0,97	88,3 ± 3,5	79,8 ± 4,9
5,0	27,94 ± 1,09	13,27 ± 1,81	48,1 ± 1,9	67,9 ± 9,2
6,0	19,37 ± 1,43	7,99 ± 0,66	33,9 ± 2,5	40,8 ± 3,4
7,0	12,58 ± 0,06	6,51 ± 0,00	21,6 ± 0,1	33,3 ± 0,0
8,0	3,04 ± 0,44	3,23 ± 0,88	5,2 ± 0,8	16,5 ± 4,5
9,0	1,56 ± 0,50	3,00 ± 0,61	2,7 ± 0,9	15,3 ± 3,1

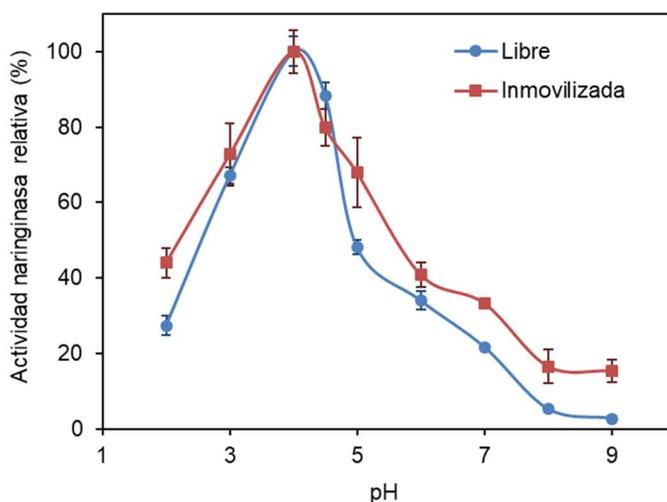
óptimos a pH 4,5 para esta misma enzima (Puri *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2012). Por otra parte, para la naringinasa de *Aspergillus* sp. se han indicado óptimos entre 4,0 y 6,0 (Busto *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2013; Shanmugaprakash *et al.*, 2014; Awad *et al.*, 2016).

En la bibliografía aparecen descritos diferentes efectos de la inmovilización sobre el pH óptimo de la naringinasa. Al igual a lo observado en este trabajo, la inmovilización puede no modificar el valor óptimo de pH como ocurría al inmovilizar naringinasa en criogeles de PVA (Busto *et al.*, 2007), en encapsulados sol-gel (Vila-Real *et al.*, 2010), en geles de PVA entrecruzados con ácido bórico (Nunes *et al.*, 2010), en partículas de PVA-dimetilsulfóxido (Nunes *et al.*, 2012) o mediante CLEAs nanomagnéticos (Torabizadeh y Mikani, 2018). En otros trabajos, los inmovilizados de naringinasa presentaban un pH óptimo inferior a su contrapartida soluble. Por ejemplo, el pH óptimo descendía de 4,5 a 4 al inmovilizar naringinasa de *P. decumbens* en chips de madera (Puri *et al.*, 2005) o naringinasa de *A. niger* en perlas de alginato de calcio modificadas con polietilenimina y glutaraldehído (Awad *et al.*, 2016). La inmovilización de naringinasa en semillas activadas de *Ocimum basilicum* (Norouzian *et al.*, 1999) o en celita (Şekeroğlu *et al.*, 2006), daba lugar a un descenso del valor óptimo de 4 a 3,5.

El perfil pH/actividad naringinasa se muestra en la Figura 17. Se observa un ensanchamiento del perfil de la enzima inmovilizada con respecto al de la libre, lo que sugiere que la matriz tenía un efecto protector frente a los cambios de pH, especialmente hacia pHs por encima del óptimo. El ensanchamiento del perfil pH/actividad ha sido

descrito también por otros autores al inmovilizar naringinasa en alginato de calcio (Puri *et al.*, 1996), en geles de PVA entrecruzados con ácido bórico (Nunes *et al.*, 2010) y en silica poroso (Luo *et al.*, 2019).

Finalmente, destacar que al pH ácido de los zumos de cítricos, entre 3 y 4,5 (Ni *et al.*, 2012), el biocatalizador inmovilizado mostraba una alta actividad con respecto al óptimo (por encima del 70%), lo que sugiere que este biocatalizador podría ser de interés para su aplicación en el procesado de zumos.



**Figura 17.** Curva pH-actividad de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

#### 4.3.3. Influencia de la inmovilización sobre el perfil temperatura-actividad naringinasa

Los biocatalizadores, al igual que los catalizadores químicos, muestran un aumento de su actividad con el incremento de la temperatura de reacción. Sin embargo, a partir de cierta temperatura se observa pérdida de actividad debido a procesos de desnaturalización proteica (Chibata *et al.*, 1978). En esta investigación se determinó la actividad naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG en un rango de temperatura comprendido entre 20 y 80 °C (apartado 3.7.3) (Tabla 12), observándose un desplazamiento de la temperatura óptima desde 70 °C para la enzima libre hacia 60 °C para el inmovilizado.

En la bibliografía se han encontrado resultados dispares sobre la temperatura óptima de la naringinasa y sobre el efecto que la inmovilización tiene sobre este parámetro. Los primeros trabajos que caracterizaron naringinasas de *Penicillium* sp.

**Tabla 12.** Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

T (°C)	Actividad enzimática (U mg <sup>-1</sup> )		Actividad relativa (%)	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
20	2,11 ± 0,08	2,39 ± 0,04	3,2 ± 1,1	11,5 ± 0,2
30	4,14 ± 0,28	3,85 ± 0,45	6,3 ± 0,4	17,1 ± 2,0
40	8,43 ± 1,69	4,44 ± 0,11	12,7 ± 2,6	21,6 ± 0,5
50	27,12 ± 0,18	12,61 ± 0,87	41,0 ± 0,3	67,4 ± 4,7
60	36,14 ± 2,80	16,01 ± 1,48	54,6 ± 4,2	100,0 ± 9,3
70	66,19 ± 0,77	13,98 ± 0,97	100,0 ± 1,2	94,4 ± 6,6
80	57,87 ± 0,37	13,52 ± 1,42	87,4 ± 0,6	87,7 ± 9,2

encontraron óptimos entre 50-57 °C (Jimeno *et al.*, 1987; Puri *et al.*, 1996; Norouzian *et al.*, 1999). Estudios posteriores con naringinasa de *P. decumbens* comercializada por Sigma, muestran óptimos de 70 °C (Şekeroğlu *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2010; Lei y Pan, 2012), coincidiendo con lo encontrado en esta investigación. Para *A. niger* se han descrito óptimos de temperatura que varían entre 45 y 60 °C (Puri y Kalra, 2005; Busto *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2012; Awad *et al.*, 2016).

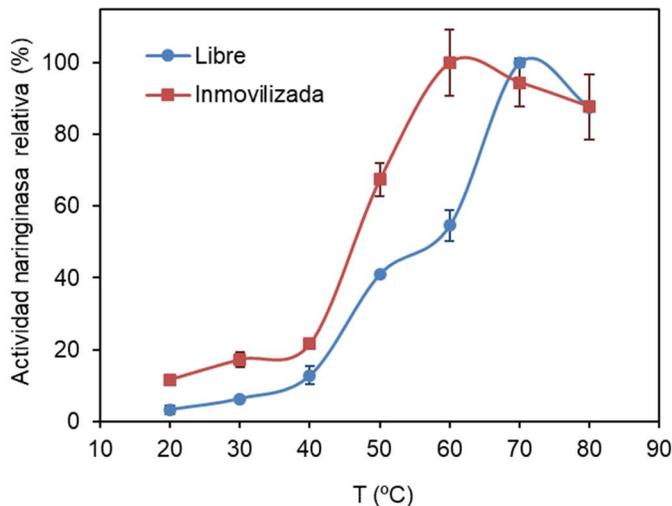
Es frecuente que la temperatura óptima se vea incrementada por el proceso de inmovilización debido al efecto protector que puede ejercer sobre la enzima. Así, por ejemplo, la naringinasa de *Penicillium* sp. inmovilizada en alginato mostraba un óptimo superior a su contrapartida soluble, que pasaba de 50 a 55-60 °C (Puri *et al.*, 1996). Resultados similares fueron descritos por Mishra y Kar (2003) al inmovilizar naringinasa de *A. niger* también en alginato de forma que el óptimo se incrementaba de 45 a 55 °C. Busto *et al.* (2007) observaron este comportamiento al inmovilizar naringinasa de *A. niger* CECT 2088 en criogeles de alcohol polivinílico, siendo de 60 °C para la enzima nativa y de 70 °C para el inmovilizado. Más recientemente, una naringinasa de *A. niger* de origen marino inmovilizada mediante enlace covalente a perlas de alginato modificado mostraba un óptimo de temperatura de 70 °C, 20 °C por encima de su contrapartida soluble (Awad *et al.*, 2016). Torabizadeh y Mikani (2018) encontraron también que la inmovilización de naringinasa de *A. aculeatus* daba lugar a un incremento del óptimo hasta 60 °C frente a los 50 °C de la enzima libre.

En otros casos, la inmovilización no afecta a la temperatura óptima. Por ejemplo, la naringinasa de *Penicillium* sp. caracterizada por Jimeno *et al.* (1987) presentaba una temperatura óptima de 55 °C tanto en solución como inmovilizada en vidrio poroso. Puri

*et al.* (2005) indicaron una temperatura óptima de 50 °C para naringinasa libre e inmovilizada mediante enlace covalente a chips de madera. Nunes *et al.* (2010) observaron que la temperatura óptima de naringinasa de *P. decumbens* era 70 °C tanto para la enzima soluble como para la inmovilizada mediante atrapamiento en perlas de PVA-alginato. Idénticos resultados fueron descritos al inmovilizar la misma enzima mediante encapsulación en matrices sol gel (Vila-Real *et al.*, 2010) o mediante enlace covalente a perlas de alginato de calcio (Lei y Pan, 2012).

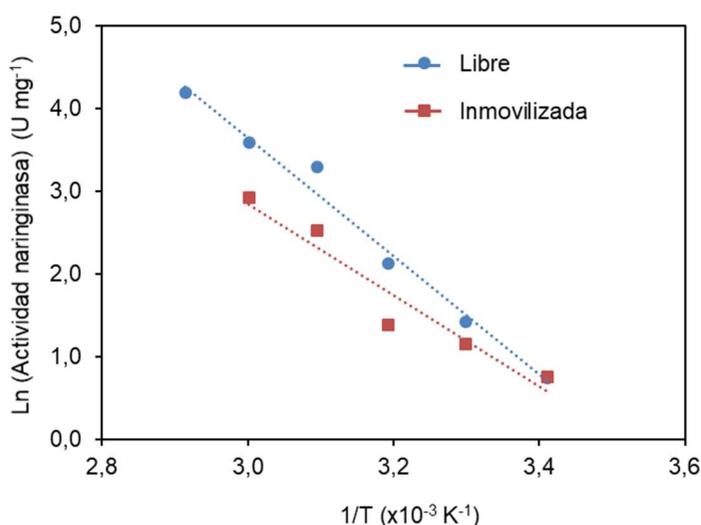
También se han encontrado referencias del descenso de la temperatura óptima de reacción mediante el proceso de inmovilización. Şekeroğlu *et al.* (2006) indicaron que la inmovilización de naringinasa de *P. decumbens* en celita daba lugar a la disminución de la temperatura óptima de 70 a 60 °C. Por su parte, Luo *et al.* (2019) observaron que la inmovilización de naringinasa de *A. niger* en silica poroso disminuía el óptimo de temperatura de 50 °C para la enzima nativa, a 45 °C para la inmovilizada.

La Figura 18 muestra un ensanchamiento en el perfil de temperatura-actividad para la enzima inmovilizada, especialmente en valores cercanos al óptimo lo que indica que el inmovilizado era más tolerante a cambios en la temperatura, probablemente por el efecto protector del soporte de PVA-PEG. Se ha sugerido que la inmovilización de enzimas en soportes con una alta hidrofiliadad (como son los geles de alcohol polivinílico) mejora la termoestabilidad de las enzimas (Buchholz y Klein, 1987). El ensanchamiento del perfil temperatura/actividad se ha observado también al inmovilizar naringinasa en otros soportes como chips de madera (Puri *et al.*, 2005), geles de PVA-alginato (Nunes *et al.*, 2010), perlas de alginato (Lei y Pan, 2012) o silica poroso (Luo *et al.*, 2019).



**Figura 18.** Curvas temperatura-actividad de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

La Figura 19 muestra la representación de Arrhenius de la naringinasa libre e inmovilizada. La energía de activación, calculada a partir de esta representación, era menor para la enzima inmovilizada (45,9 kJ mol<sup>-1</sup>) que para la libre (59,6 kJ mol<sup>-1</sup>). El descenso en la energía de activación al inmovilizar una enzima puede indicar de que el sistema de reacción está controlado por la difusión del sustrato hasta el centro activo de la enzima (Narinesingh *et al.*, 1988; Catana *et al.*, 2007). Es decir, el proceso catalítico estaría controlado por la velocidad de transferencia del sustrato desde la fase global hasta el microambiente de la enzima. Manjón *et al.* (1985), Soraes y Hotchkiss (1998) y Busto *et al.* (2007) encontraron un comportamiento similar al inmovilizar naringinasa en vidrio poroso, films de acetato de celulosa y alcohol polivinílico, respectivamente.



**Figura 19.** Representación de Arrhenius para la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

#### 4.3.4. Estabilidad al almacenamiento

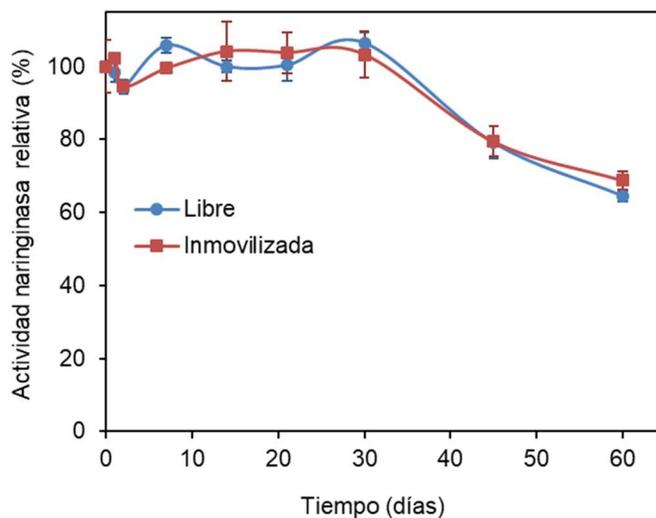
En general, las enzimas en disolución pierden actividad de forma gradual durante el almacenamiento (De Queiroz *et al.*, 2006). Por tanto, es importante conocer la estabilidad al almacenamiento de las enzimas de cara a su aplicación industrial.

Los resultados de estabilidad al almacenamiento a 4 °C se muestran en la Tabla 13 y Figura 20. Se observa que el comportamiento de la enzima libre e inmovilizada era muy similar, conservando su actividad durante los primeros 30 días de almacenamiento. Posteriormente, la actividad naringinasa descendía gradualmente y al cabo de dos meses la enzima libre retenía un 64,6% de la actividad inicial y la inmovilizada un 68,8%. Cabe destacar que no se producían modificaciones apreciables en la estructura física del

soporte (color, rigidez y diámetro) durante el almacenamiento, tal y como se observa en la Figura 21. Estos resultados permiten confirmar que la naringinasa de *P. decumbens* inmovilizada en PVA-PEG era estable al almacenamiento.

**Tabla 13.** Estabilidad al almacenamiento de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

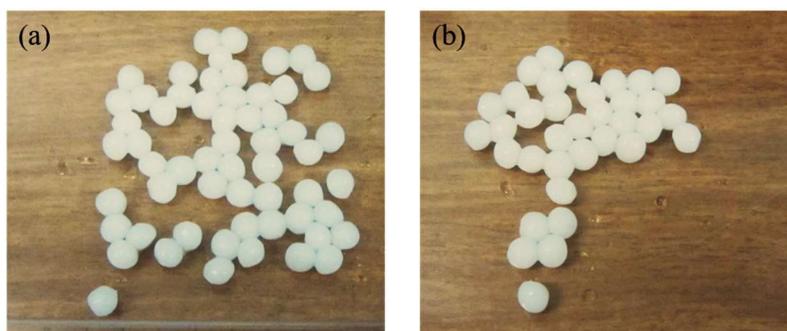
Tiempo (días)	Actividad enzimática (U mg <sup>-1</sup> )		Actividad relativa (%)	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
0	22,49 ± 0,35	10,79 ± 0,79	100,0 ± 1,6	100,0 ± 7,3
1	22,10 ± 0,54	11,04 ± 0,16	98,3 ± 2,4	102,3 ± 1,4
2	21,23 ± 0,41	10,19 ± 0,11	94,4 ± 1,8	94,4 ± 1,0
7	23,80 ± 0,47	10,73 ± 0,10	105,8 ± 2,1	99,4 ± 0,9
14	25,41 ± 0,41	11,23 ± 0,88	100,0 ± 1,6	104,1 ± 8,1
21	22,59 ± 0,96	11,20 ± 0,61	100,4 ± 4,2	103,7 ± 5,6
30	23,98 ± 0,64	11,14 ± 0,68	106,5 ± 2,9	103,2 ± 6,3
45	17,80 ± 0,99	8,57 ± 0,45	79,1 ± 4,4	79,4 ± 4,1
60	14,52 ± 0,34	7,42 ± 0,28	64,6 ± 1,5	68,8 ± 2,6



**Figura 20.** Estabilidad al almacenamiento de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

Lei *et al.* (2011) observaron que la naringinasa libre de *P. decumbens* quedaba inactivada tras 15 días de almacenamiento a 4 °C en tampón acetato a pH 4. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo ya que la enzima no perdía actividad durante los primeros 30 días, y conservaba entorno al 65% de actividad tras dos meses de almacenamiento. Esta diferencia podría deberse al pH más ácido (pH 4) utilizado por Lei *et al.* (2011) que podría tener un efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima.

Con respecto a la naringinasa de *P. decumbens* inmovilizada en diferentes soportes como alginato (Puri *et al.*, 1996), clara de huevo (Puri *et al.*, 2001), chips de madera (Puri *et al.*, 2005) o PVA (Nunes *et al.*, 2010), se ha comprobado que mantiene su actividad durante al menos los primeros 30 días de almacenamiento a 4 °C, al igual que el inmovilizado desarrollado en este trabajo. Con respecto a las enzimas de *A. niger*, el inmovilizado en criogeles de PVA, desarrollado previamente en nuestro laboratorio, conservaba un 75% de su actividad durante al menos 2 meses refrigerado a 4 °C (Busto *et al.*, 2007), mientras que cuando se inmovilizó naringinasa en sílica mesoporoso, ésta conservaba entorno al 85% de su actividad inicial tras 30 días de almacenamiento (Lei *et al.*, 2011). Por otra parte, Awad *et al.* (2016) indicaron que el inmovilizado de *A. niger* mediante enlace covalente a perlas de alginato conservaba su actividad durante las primeras 5 semanas de almacenamiento a 4 °C, aunque perdía gradualmente capacidad catalítica hasta que a las 10 semanas retenía sólo un 20% de la actividad inicial.



**Figura 21.** Fotografías de la naringinasa inmovilizada en PVA-PEG: (a) al inicio del experimento y (b) tras 60 días de almacenamiento a 4 °C.

## 5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que derivan de los resultados obtenidos en este capítulo son:

1. La incorporación de PEG a criogeles de PVA mejora la estabilidad mecánica del soporte de inmovilización, sin provocar reducciones importantes de la actividad enzimática del biocatalizador.
2. La aplicación del diseño de experimentos y la función de deseabilidad permitieron establecer las condiciones de inmovilización (8,5% PVA, 7,2% PEG y pH 3,0) que optimizan de forma simultánea la eficacia de inmovilización (42%) y la estabilidad enzimática (38%).
3. La naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG siguen una cinética típica de Michaelis-Menten, si bien, como consecuencia de una difusión limitada del sustrato, el valor de  $K_{m,app}$  del inmovilizado es mayor que el de la enzima soluble.
4. El proceso de inmovilización no modifica el valor de pH óptimo (4,0) de la enzima, pero sí que provoca un ensanchamiento del perfil pH/actividad.
5. La naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG presenta, en las condiciones de ensayo, una temperatura óptima de 60 °C frente a los 70 °C de la enzima libre. Además, la curva temperatura-actividad para el biocatalizador inmovilizado se ensancha, posiblemente por el efecto protector de la matriz de inmovilización.
6. La enzima inmovilizada presenta una estabilidad al almacenamiento a 4 °C similar a la de la enzima libre. Ambas enzimas mantienen su actividad después de 1 mes en refrigeración.

## 6. REFERENCIAS

- Alves, M. H., Jensen B. E., Smith A. A. y Zelikin A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), pp. 1293-1313.
- Ariga, O., Kato, M., Sano, T., Nakazawa, Y. y Sano, Y. (1993). Mechanical and kinetic properties of PVA hydrogel immobilizing  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(3), pp. 203-206.
- Awad, G. E. A., Abd El Aty, A. A., Shehata, A. N., Hassan, M. E. y Elnashar, M. M. (2016). Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin. *3 Biotech*, 6(14), pp. 1-10.
- Aybastier, Ö. y Demir, C. (2010). Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3-4), pp. 170-178.
- Bieler, N. C., Ansorge-Schumacher, M. B. y Greiner, L. (2010). Automated lab-scale production of PVA/PEG-enzyme immobilisates. *Biotechnology Journal*, 5(8), pp. 881-885.
- Buchholz, K. y Klein, J. (1987). [1] Characterization of immobilized biocatalysts. En: Mosbach, K. (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 135). Oxford: Academic Press, pp. 3-30.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3), pp. 1177-1182.
- Buwalda, S. J., Boere, K. W., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T. y Hennink, W. E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, 190, pp. 254-273.
- Candiotti, L. V., De Zan, M. M., Camara, M. S. y Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, pp. 123-138.
- Cao, L. (2006). *Carrier-Bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Catana, R., Eloy, M., Rocha, J. R., Ferreira, B. S., Cabral, J. M. S. y Fernandes, P. (2007). Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 101(1), pp. 260-266.
- Chang, H. Y., Lee, Y. B., Bae, H. A., Huh, J. Y., Nam, S. H., Sohn, H. S., Lee, H. J. y Lee, S. B. (2011). Purification and characterisation of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with in vitro inhibition of HMG-CoA reductase. *Food Chemistry*, 124(1), pp. 234-241.

- Chen, D., Niu, T. y Cai, H. (2010). Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by *Aspergillus oryzae* JMU316. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), pp. 4970-4978.
- Cheng, Y., Ma, L., Deng, C., Xu, Z. y Chen, J. (2014). Effect of PEG-mediated pore forming on Ca-alginate immobilization of nitrilase-producing bacteria *Pseudomonas putida* XY4. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(8), pp. 1653-1658.
- Chibata, I., Tosa, T. y Sato, T. (1978). Preparation of immobilized enzymes and microbial cells. En: Chibata, I. (Ed.), *Immobilized Enzymes Research and Development*. Nueva York: John Wiley & Sons, pp. 11-107.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Carneiro, A. F., Paar, A., Gübitz, G. M. y Cavaco-Paulo, A. (2002). Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), pp. 387-391.
- Davis, W. B. (1947). Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry*, 19(7), pp. 476-478.
- Demarche, P., Junghanns, C., Mazy, N. y Agathos, S. N. (2012). Design-of-experiment strategy for the formulation of laccase biocatalysts and their application to degrade bisphenol A. *New Biotechnology*, 30(1), pp. 96-103.
- Derringer, G. y Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), pp. 214-219.
- De Queiroz, A. A., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z. y Vítolo, M. (2006). Alginate-poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), pp. 1553-1560.
- Dwevedi, A. y Kayastha, A. M. (2009). Optimal immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, 100(10), pp. 2667-2675.
- González-Temiño, Y., Ortega, N. y Busto, M. (2020). Optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol. *Información Tecnológica*, 31(1), en prensa.
- Gray, G. M. y Olson, A. C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin in grapefruit juice using a hollow fiber naringinase reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6), pp. 1298-1301.
- Hassan, C. M. y Peppas, N. A. (2000). Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. En: *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. Advances in Polymer Science* (Vol. 153), Heidelberg: Springer, pp. 37-65.
- Hischer, T., Steinsiek, S. y Ansorge-Schumacher, M. B. (2006). Use of polyvinyl alcohol cryogels for the compartmentation of biocatalyzed reactions in non-aqueous media. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(6), pp. 437-442.

- Jimeno, A., Manjon, A., Canovas, M. y Iborra, J. L. (1987). Use of naringinase immobilized on glycophase-coated porous glass for fruit juice debittering. *Process biochemistry*, 22(1), pp. 13-16.
- Kumar, G. S., Rather, G. M., Gurramkonda, C. y Reddy, B. R. (2016). Thermostable  $\alpha$ -amylase immobilization: Enhanced stability and performance for starch biocatalysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(1), pp. 57-66.
- Lei, S., Xu, Y., Fan, G., Xiao, M. y Pan, S. (2011). Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, 257(9), pp. 4096-4099.
- Lei, S. y Pan, S. (2012). Improvement of the activity of naringinase by covalent immobilization on sodium alginate in biomaterial engineering and its applications. *Advanced Materials Research*, 578, pp. 187-190.
- Leidig, E., Prüsse, U., Vorlop, K. D. y Winter, J. (1999). Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated. *Bioprocess Engineering*, 21, pp. 5-12.
- Li, F., Mao, W. J., Li, X., Wang, X. Y., Xiao, Z. H., Zhou, Y. Y. y Zeng, G. M. (2015). Characterization of *Microcystis Aeruginosa* immobilized in complex of PVA and sodium alginate and its application on phosphorous removal in wastewater. *Journal of Central South University*, 22(1), pp. 95-102.
- Liu, J., Liu, Y., Jin, D., Meng, M., Jiang, Y., Ni, L. y Liu, Z. (2019). Immobilization of trypsin onto large-pore mesoporous silica and optimization enzyme activity via response surface methodology. *Solid State Sciences*, 89, pp. 15-24.
- Lozinsky, V. I., Solodova, E. V., Zubov, A. L. y Simenel, I. A. (1995). Study of cryostructuration of polymer systems. XI. The formation of PVA cryogels by freezing–thawing the polymer aqueous solutions containing additives of some polyols. *Journal of Applied Polymer Science*, 58(1), pp. 171-177.
- Lozinsky, V. I. y Plieva, F. M. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(3–4), pp. 227-242.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H. y Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10), pp. 445-451.
- Lozinsky, V. I., Damshkaln, L. G., Kurochkin, I. N. y Kurochkin, I. I. (2014). Cryostructuring of polymeric systems. 36. Poly(vinyl alcohol) cryogels prepared from solutions of the polymer in water/low-molecular alcohol mixtures. *European Polymer Journal*, 53, pp. 189-205.
- Luo, J., Li, Q., Sun, X., Tian, J., Fei, X., Shi, F., Zhang, N. y Liu, X. (2019). The study of the characteristics and hydrolysis properties of naringinase immobilized by porous silica material. *RSC Advances*, 9(8), pp. 4514-4520.

- Manjón, A., Bastida, J., Romero, C., Jimeno, A. y Iborra, J. L. (1985). Immobilization of naringinase on glycophase-coated porous glass. *Biotechnology Letters*, 7(7), pp. 477-482.
- Matsumoto, M., Kida, K. y Kondo, K. (1997). Effects of polyols and organic solvents on thermostability of lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 70(2), pp. 188-192.
- Mishra, P. y Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Journal of Food Science*, 68(4), pp. 1229-1233.
- Monopoli, V. D., Pizzio, L. R. y Blanco, M. N. (2008). Polyvinyl alcohol–polyethyleneglycol blends with tungstophosphoric acid addition: Synthesis and characterization. *Materials Chemistry and Physics*, 108, pp. 331-336.
- Moriyama, K., Wakabayashi, R., Goto, M. y Kamiya, N. (2015). Characterization of enzymatically gellable, phenolated linear poly(ethylene glycol) with different molecular weights for encapsulating living cells. *Biochemical Engineering Journal*, 93, pp. 25-30.
- Narinesingh, D., Stoute, V. A., Davis, G. y Ngo, T. T. (1988).  $\beta$ -Galactosidase covalently immobilized on fractogel derivative: preparation, bioreactor flow kinetics, solvent effects and stability. *Journal of Molecular Catalysis*, 45(3), pp. 285-304.
- Ni, H., Chen, F., Cai, H., Xiao, A., You, Q. y Lu, Y. (2012). Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juice. *Journal of Food Science*, 77(1), pp. C1-C7.
- Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N. y Moazami, N. (1999). Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decombens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15(4), pp. 501-502.
- Nunes, M. A. P., Vila-Real, H., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2010). Immobilization of naringinase in PVA–alginate matrix using an innovative technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), pp. 2129-2147.
- Nunes, M. A. P., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2012). High-affinity water-soluble system for efficient naringinase immobilization in polyvinyl alcohol–dimethyl sulfoxide lens-shaped particles. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), pp. 580-594.
- Nunes, M. A. P., Rosa, M. E., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2014). Operational stability of naringinase PVA lens-shaped microparticles in batch stirred reactors and mini packed bed reactors-one step closer to industry. *Bioresource Technology*, 164, pp. 362-370.
- Nunes, M. A. P., Gois, P. M. P., Rosa, M. E., Martins, S., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2016a). Boronic acids as efficient cross linkers for PVA: synthesis and application of tunable hollow microspheres in biocatalysis. *Tetrahedron*, 72(46), pp. 7293-7305.
- Nunes, M. A. P., Martins, S., Rosa, M. E., Gois, P. M. P., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2016b). Improved thermostable polyvinyl alcohol electrospun nanofibers with entangled naringinase used in a novel mini-packed bed reactor. *Bioresource Technology*, 213, pp. 208-215.

- Özdural, A. R., Alkan-Sungur, A., Boyaci, I. H. y Webb, C. (2008). Determination of immobilized enzyme apparent kinetic parameters in packed-bed reactors: Presentation of a new methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 86(2), pp. 104-108.
- Poraj-Kobielska, M., Peter, S., Leonhardt, S., Ullrich, R., Scheibner, K. y Hofrichter, M. (2015). Immobilization of unspecific peroxigenases (EC 1.11.2.1) in PVA/PEG gel and hollow fiber modules. *Biochemical Engineering Journal*, 98, pp. 144-150.
- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J. y Vorlop, K. D. (1998). New process (jet cutting method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chemical Engineering and Technology*, 21(1), pp. 29-33.
- Puri, M., Marwaha, S. S. y Kothari, R. M. (1996). Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), pp. 281-285.
- Puri, M., Seth, M., Marwaha, S. S. y Kothari, R. M. (2001). Debittering of Kinnow mandarin juice by covalently bound naringinase on hen egg white. *Food Biotechnology*, 15(1), pp. 13-23.
- Puri, M. y Kalra, S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), pp. 753-758.
- Puri, M., Kaur, H. y Kennedy, J. F. (2005). Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(10), pp. 1160-1165.
- Radhakrishnan, I., Sampath, S. y Kumar, S. (2013). Isolation and characterization of enzyme naringinase from *Aspergillus flavus*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4(2), pp. 208-212.
- Rosiak, J. M. y Ulański, P. (1999). Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(2), pp. 139-151.
- Şekeroğlu, G., Fadiloğlu, S. y Göğüş, F. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 224(1), pp. 55-60.
- Shanmugaprakash, M., Kirthika, J., Ragupathy, J., Nilanee, K. y Manickam, A. (2014). Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, pp. 443-452.
- Shukla, A., Gundampati, R. K. y Jagannadham, M. V (2017). Immobilization of *Euphorbia tirucalli* peroxidase onto chitosan-cobalt oxide magnetic nanoparticles and optimization using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, pp. 384-395.
- Singh, K. y Kayastha, A. M. (2014). Optimal immobilization of  $\alpha$ -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 104, pp. 75-81.

- Soares, N. F. F. y Hotchkiss, J. H. (1998). Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 63(1), pp. 61-65.
- Szczęsna-Antczak, M., Antczak, T. y Bielecki, S. (2004). Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA-cryogel. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), pp. 168-176.
- Temiño, D. M. R. D., Hartmeier, W. y Ansorge-Schumacher, M. B. (2005). Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), pp. 3-9.
- Torabizadeh, H. y Mikani, M. (2018). Kinetic and thermodynamic features of nanomagnetic cross-linked enzyme aggregates of naringinase nanobiocatalyst in naringin hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, pp. 717-725.
- Trevan, M. D. (1990). Tecnología enzimática. En: Trevan, M. D., Boffey, S., Goulding, K. H. y Stanbury, P. (Eds.), *Bioteología: Principios Biológicos*. Zaragoza: Acribia, pp. 169-264.
- Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Rosa, M. E., Calado, A. R. y Ribeiro, M. H. (2010). An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(6), pp. 841-850.
- Watase, M. y Nishinari, K. (1988). Thermal and rheological properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by repeated cycles of freezing and thawing. *Die Makromolekulare Chemie*, 189, pp. 871-880.
- Zhang, Y. y Ye, L. (2011). Improvement of permeability of poly(vinyl alcohol) hydrogel by using poly(ethylene glycol) as porogen. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 50(8), pp. 776-782.

## **ABREVIATURAS**

ANOVA	Análisis de la varianza
Ea	Energía de activación
Ee	Estabilidad enzimática
EI	Eficacia de inmovilización
GH	Grado de hidrólisis
GP	Grado de polimerización
I	Enzima inmovilizada
L	Enzima libre
MEB	Microscopía electrónica de barrido
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
PVA	Alcohol polivinílico
ZS	Zumo sintético



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura del alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado. ....	56
<b>Figura 2</b>	Esquema del proceso de congelación-descongelación para la obtención de criogeles de PVA. 1: macromoléculas en solución; 2: solvente; 3: solutos de bajo peso molecular; 4: cristales de solvente congelado; 5: microfase líquida no congelada; 6: red de polímero; 7: macroporos; 8: solvente. Adaptado de Lozinsky <i>et al.</i> (2003) .....	57
<b>Figura 3</b>	Estructura (a) sindiotáctica e (b) isotáctica en geles de PVA (Lozinsky y Plieva, 1998).....	57
<b>Figura 4</b>	Estructura química del polietilenglicol (Buwalda <i>et al.</i> , 2014) .....	59
<b>Figura 5</b>	Efecto de los polioles en la estabilización de proteínas enzimáticas: (a) Desnaturalización de la enzima en solución acuosa, (b) formación de una capa alrededor de la enzima en presencia de polioles que evita la desnaturalización proteica. Adaptado de Matsumoto <i>et al.</i> (1997).....	60
<b>Figura 6</b>	Ejemplo de recta de calibrado de naringina.....	64
<b>Figura 7</b>	Fotografía de perlas de PVA-PEG (izq.) y de perlas de PVA (dcha.) .....	74
<b>Figura 8</b>	Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA 61 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.....	76
<b>Figura 9</b>	Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA 125 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.....	77
<b>Figura 10</b>	Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en PVA de 145 kDa. Superficie de la perla: (a) sin PEG, (b) con PEG 400, (c) con PEG 600 y (d) con PEG 1000. Interior de la perla: (e) sin PEG, (f) con PEG 400, (g) con PEG 600 y (h) con PEG 1000.....	78
<b>Figura 11</b>	Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables del diseño para la respuesta eficacia de inmovilización (EI) .....	82
<b>Figura 12</b>	Diagrama de superficie de respuesta estimada para la eficacia de inmovilización (EI). (a) [PEG]= 9,5%; (b) pH= 5,5; (c) [PVA]= 7,0% .....	84

<b>Figura 13</b>	Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de los factores sobre la estabilidad enzimática (Ee).....	86
<b>Figura 14</b>	Diagrama de superficie de respuesta estimada para la estabilidad enzimática (Ee). (a) [PEG]= 9,5%; (b) pH= 5,5; (c) [PVA]= 7,0% .....	87
<b>Figura 15</b>	Cinética de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG .....	91
<b>Figura 16</b>	Representación de Lineweaver-Burk para naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG .....	91
<b>Figura 17</b>	Curva pH-actividad de la naringinasa libre e inmovilizada en criogel de PVA-PEG.....	94
<b>Figura 18</b>	Curvas temperatura-actividad de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	96
<b>Figura 19</b>	Representación de Arrhenius para la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	97
<b>Figura 20</b>	Estabilidad al almacenamiento de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	98
<b>Figura 21</b>	Fotografías de la naringinasa inmovilizada en PVA-PEG: (a) al inicio del experimento y (b) tras 60 días de almacenamiento a 4 °C.....	99

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Características de los PVA utilizados en este trabajo para la inmovilización de naringinasa.....	64
<b>Tabla 2</b>	Niveles de los factores en la optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG, de acuerdo con un diseño central compuesto ( $2^3$ +estrella).....	66
<b>Tabla 3</b>	Influencia de las características de PVA en la inmovilización de naringinasa.....	72
<b>Tabla 4</b>	Efecto de la incorporación de PEG a la matriz de PVA en la eficacia de inmovilización (EI) de naringinasa.....	74
<b>Tabla 5</b>	Diseño experimental y variables respuestas, eficacia de inmovilización (EI) y estabilidad enzimática (Ee), en la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG.....	80
<b>Tabla 6</b>	ANOVA para el modelo de superficie de respuesta que representa el efecto de las variables independientes sobre la respuesta eficacia de inmovilización (EI).....	81
<b>Tabla 7</b>	ANOVA para el modelo de superficie de respuesta que representa el efecto de las variables independientes sobre la respuesta estabilidad enzimática (Ee).....	85
<b>Tabla 8</b>	Niveles de los factores y variables respuesta calculadas para la optimización individual de la eficacia de inmovilización (EI), la estabilidad enzimática (Ee) y optimización multiobjetivo.....	89
<b>Tabla 9</b>	Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	90
<b>Tabla 10</b>	Parámetros cinéticos de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG calculados a partir de la representación de Lineweaver-Burk.....	92
<b>Tabla 11</b>	Efecto del pH sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	93
<b>Tabla 12</b>	Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	95

<b>Tabla 13</b>	Estabilidad al almacenamiento de la naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.....	98
-----------------	---	----

# **Inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración**



## **Capítulo III: Inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración**

<b>1. INMOVILIZACIÓN EN MEMBRANAS POR ENSUCIAMIENTO INDUCIDO .....</b>	<b>117</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>121</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>122</b>
3.1. Estudio de permeabilidad de la membrana .....	123
3.2. Inmovilización mediante ensuciamiento inducido.....	124
3.3. Inmovilización por ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído .....	125
3.4. Inmovilización en membranas funcionalizadas con polietilenimina .....	126
3.5. Parámetros calculados.....	127
3.6. Cuantificación de proteína enzimática.....	129
3.7. Conversión de naringina en el REM.....	130
3.8. Modelos teóricos de ensuciamiento inducido .....	131
3.9. Tratamiento estadístico de los datos .....	132
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
4.1. Inmovilización de naringinasa por ensuciamiento inducido en membranas de ultrafiltración.....	133
4.1.1. Selección del tamaño de poro y configuración de la membrana de ultrafiltración en la inmovilización de naringinasa.....	133
4.1.1.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización.....	134
4.1.1.2. Efecto sobre la conversión de naringina .....	137
4.1.2. Selección de los parámetros de inmovilización: presión transmembrana, concentración de enzima y pH.....	138
4.1.2.1. Efecto de la presión transmembrana sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina .....	138
4.1.2.1.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización.....	138
4.1.2.1.2. Efecto sobre la conversión de naringina.....	141

4.1.2.2. Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina.....	142
4.1.2.2.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización .....	142
4.1.2.2.2. Efecto sobre la conversión de naringina.....	145
4.1.2.3. Efecto del pH de inmovilización sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina.....	146
4.1.2.3.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización .....	146
4.1.2.3.2. Efecto sobre la conversión de naringina.....	149
4.1.3. Estudio del mecanismo de ensuciamiento inducido en la inmovilización de naringinasa .....	150
4.2. Inmovilización de naringinasa por ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído .....	152
4.2.1. Efecto de la adición de glutaraldehído sobre la conversión de naringina .....	152
4.3. Inmovilización en membranas funcionalizadas con polietilenimina .....	154
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>156</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>157</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>161</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>163</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>167</b>

Los reactores enzimáticos de membrana (REM) están siendo objeto de amplio estudio y desarrollo, en la última década, por sus posibilidades de aplicación en procesos de bioconversión para la industria alimentaria y farmacéutica, la biorrefinería y el tratamiento de residuos (Cen *et al.*, 2019). Este tipo de reactores al permitir la separación de la enzima y el producto de reacción mediante una membrana semipermeable que actúa como barrera selectiva (Prazeres y Cabral, 1994), resultan muy útiles en reacciones en las que se puede producir inhibición por producto (Cen *et al.*, 2019).

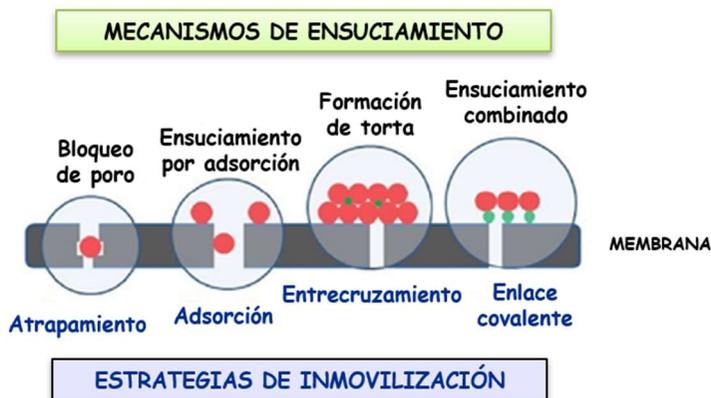
Una de las técnicas para el desarrollo de un REM consiste en filtrar la solución con el biocatalizador a través del sistema de membrana de forma que la enzima quede adsorbida en la superficie y/o atrapada en el interior de los poros (Jochems *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2016). Este procedimiento, denominado ensuciamiento inducido, es el que se ha estudiado en el presente trabajo, ya que resulta ser una técnica sencilla y con un gran potencial de aplicación (Luo *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

## **1. INMOVILIZACIÓN EN MEMBRANAS POR ENSUCIAMIENTO INDUCIDO**

Se puede definir el ensuciamiento como la pérdida de permeabilidad que experimenta la membrana, durante el proceso de filtración por presión, debido a la adsorción o precipitación de solutos. Este fenómeno es una de las principales limitaciones de los reactores de membrana ya que se produce una bajada del flujo de permeado y de la eficacia de separación (Ho y Zydney, 1999; Guo *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014b). Sin embargo, la promoción deliberada del ensuciamiento puede ser utilizada como una estrategia para la inmovilización de enzimas en membranas, siempre y cuando se mantengan niveles aceptables de actividad y estabilidad del biocatalizador, tratando de maximizar la tasa de ensuciamiento irreversible (Luo *et al.*, 2014a).

Existen claros paralelismos entre los mecanismos de ensuciamiento y las estrategias de inmovilización para obtener membranas biocatalíticas (Figura 1). El ensuciamiento inducido se puede emplear directamente como una estrategia de inmovilización por atrapamiento (bloqueo de poro) o por adsorción de las enzimas en las membranas (ensuciamiento por adsorción y formación de torta). La inmovilización de enzimas en membranas mediante estos mecanismos implica interacciones físicas, fundamentalmente fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Como se trata de interacciones débiles es posible que se produzca la desorción de la enzima a medida que se alimenta el reactor (Cen *et al.*, 2019). Sin embargo, si se produce el mecanismo de bloqueo de poro, a pesar de que las interacciones son débiles,

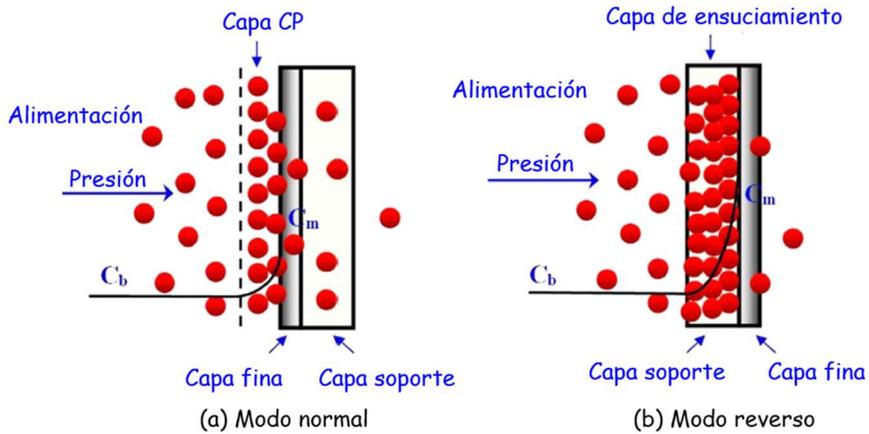
el hecho de que la enzima se encuentre en el interior del poro de la membrana dificulta su desorción en mayor medida que si se obtura la membrana por formación de torta (Luo *et al.*, 2014b). La adición de un reactivo funcional (Yujun *et al.*, 2008) promueve el entrecruzamiento de las moléculas de enzima previamente inmovilizadas en la membrana (formación de torta) lo que dificulta su desorción, evitando así una de las principales desventajas de esta técnica de inmovilización.



**Figura 1.** Representación esquemática de las conexiones entre los mecanismos de ensuciamiento de membrana y las estrategias de inmovilización (Luo *et al.*, 2014b).

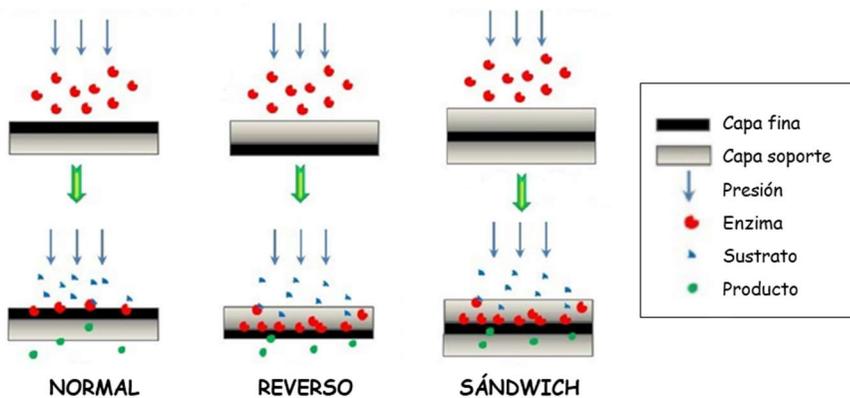
El tamaño de poro de la membrana afecta al mecanismo de ensuciamiento. Si las partículas tienen un tamaño similar al del poro de la membrana se favorece el bloqueo de poro, mientras que si tienen un tamaño mayor tienen tendencia a la formación de torta, por lo que es más fácil que las moléculas se desprendan de la membrana durante el lavado (Huang *et al.*, 2008). Dado que la mayoría de las enzimas tienen un peso molecular entre 10 y 80 kDa se suelen usar membranas de ultrafiltración con un peso molecular de corte de 1 hasta 100 kDa (Rios *et al.*, 2004).

En el proceso de ensuciamiento inducido, las moléculas de enzima se aproximan hasta la superficie de la membrana por transporte convectivo, donde el disolvente pasa a través de la membrana y las enzimas retenidas provocan un incremento en la concentración local (Figura 2). Por otro lado, las moléculas que no atraviesan la membrana no pueden difundir fácilmente hacia el grueso de la disolución, provocando una acumulación de partículas y la formación de la capa de polarización por concentración (CP) que puede producir un ensuciamiento irreversible sobre o dentro de la membrana (Guo *et al.*, 2012) (Figura 2b). Este fenómeno, se produce con mayor o menor intensidad en función, entre otros factores, de la configuración de la membrana en el reactor, lo que determina también la mayor o menor eficacia de inmovilización.



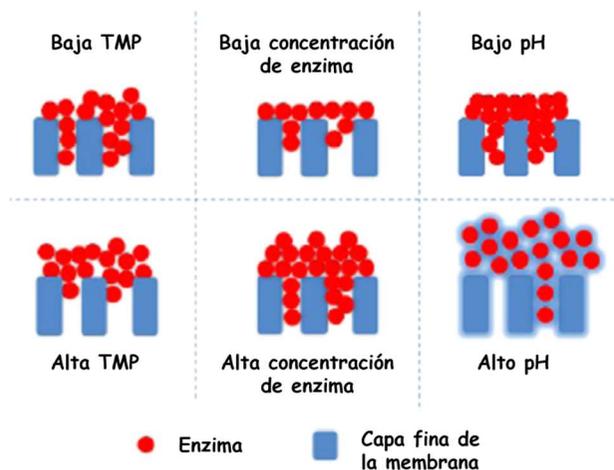
**Figura 2.** Representación esquemática del proceso de ensuciamiento inducido en la inmovilización de enzimas para la configuración de membrana en (a) modo normal y (b) reverso.  $C_b$ : concentración de enzima en el seno de la disolución,  $C_m$ : concentración de enzima en la capa fina de la membrana, CP: polarización por concentración (Luo *et al.*, 2013).

Se considera como configuración normal cuando la capa fina de la membrana se coloca frente a la alimentación, mientras que si es la capa soporte la que está en contacto con la alimentación se denomina configuración reversa (Figura 3). Otro tipo de configuración es el modo sándwich en el que la capa fina de la membrana queda colocada entre dos capas soportes. En los modos reverso y sándwich, la capa soporte protege a las moléculas de enzima puesto que la fuerza de cizalla se ve reducida al mínimo y aporta una mayor superficie para el depósito de la enzima que la capa fina lo que aumenta la eficacia de inmovilización con respecto al modo normal (Luo *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Esquema de las configuraciones de membrana para la inmovilización enzimática y reacción catalítica. Adaptado de Luo *et al.* (2014b).

En la inmovilización por ensuciamiento inducido se ha comprobado que los parámetros presión transmembrana, concentración de enzima y pH afectan a la eficacia del proceso (She *et al.*, 2009; Lim y Mohammad, 2010; Wang y Tang, 2011; Luo *et al.*, 2014a; Corbatón-Báguena *et al.*, 2015). Un esquema de los efectos de estos parámetros se incluye en la Figura 4. La *presión transmembrana* (TMP) afecta a la inmovilización de la enzima ya que el aumento de la presión durante la filtración favorece la acumulación de solutos en la superficie de la membrana (Luo *et al.*, 2013) y se produce un aumento de las fuerzas de cizalla que conducen a la compresión de la torta (Guo *et al.*, 2012). No obstante, a baja presión, las enzimas tienen mayor posibilidad de penetrar en el interior de los poros incrementando el ensuciamiento irreversible (Luo *et al.*, 2014a). Por otra parte, la *concentración de enzima* afecta al ensuciamiento ya que el incremento de la concentración en la alimentación aumenta las probabilidades de deposición y agregación del soluto en la membrana (Luo *et al.*, 2014a). Por último, el *pH de la disolución enzimática* también influye en la eficacia de inmovilización. El ensuciamiento de la membrana se ve favorecido cuando el pH está próximo al punto isoelectrico de la proteína ya que la repulsión electrostática es mínima por lo que se favorece la adsorción hidrofóbica (She *et al.*, 2009; Lim y Mohammad, 2010; Wang y Tang, 2011; Luo *et al.*, 2014a). Por otra parte, cuando las moléculas de enzima y la membrana tienen cargas opuestas (a bajo pH), la enzima puede agregarse sobre la superficie o el interior de la membrana mediante adsorción electrostática (Luo *et al.*, 2014a). Sin embargo, si la enzima y la membrana tienen la misma carga (a alto pH), las enzimas tienden a ser rechazadas por la aparición de repulsiones electrostáticas.



**Figura 4.** Efectos de los parámetros del proceso, presión transmembrana (TMP), concentración de enzima y pH, sobre el comportamiento de las enzimas durante la inmovilización por ensuciamiento inducido. Adaptado de Luo *et al.* (2014a).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo planteado en este capítulo es el desarrollo de un reactor enzimático de membrana (REM) con actividad naringinasa que implicaba, a su vez, alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Inmovilizar la enzima naringinasa en membranas de ultrafiltración por: (i) ensuciamiento inducido, (ii) ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído, y (iii) funcionalización de la membrana con polietilenimina.
2. Seleccionar el tamaño de poro y la configuración de la membrana.
3. Establecer los parámetros de operación (presión transmembrana, concentración de enzima y pH de inmovilización) de los REM en base a la eficacia de inmovilización y su capacidad biocatalítica en la degradación de naringina.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos descritos en los siguientes apartados se llevaban a cabo en una célula de ultrafiltración (UF) con agitación de la casa Millipore, en concreto el modelo Amicon® 8050 con 50 mL de capacidad (Figura 5). Esta célula tiene una superficie efectiva de filtración de 13,4 cm<sup>2</sup> y está dotada de una entrada de gas para mantener la presión constante.



**Figura 5.** Celda de ultrafiltración modelo Amicon® 8050.

Las características de las membranas de UF, Biomax 10 y Biomax 30, utilizadas en este trabajo para la inmovilización de naringinasa se recogen en la Tabla 1. Su peso molecular de corte (MWCO, “Molecular Weight Cut-Off”) era de 10 y 30 kDa. Por indicación del fabricante se lavaron las membranas antes de su utilización con 150 mL de agua miliQ a 3,5 bar de presión para eliminar el glicerol que se usa como agente conservante.

**Tabla 1.** Características de las membranas de ultrafiltración utilizadas (Millipore, 2019).

<b>Membrana</b>	<b>Biomax 10</b>	<b>Biomax 30</b>
Fabricante	Millipore	Millipore
MWCO (kDa)	10	30
Material de cubierta	Polietersulfona (PES)	Polietersulfona (PES)
Material de soporte	Poliiolefina	Poliiolefina
Diámetro (mm)	44,5	44,5
Área de filtración (cm <sup>2</sup> )	13,4	13,4

### 3.1. Estudio de permeabilidad de la membrana

La permeabilidad inicial de las membranas de UF se determinaba como paso previo a la inmovilización de la enzima.

#### Reactivos

R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5*: Este tampón se obtenía mezclando 678 mL de solución A y 322 mL de solución B.

- Solución A: Se disolvían 16,408 g de acetato sódico en 1 L de agua miliQ.
- Solución B: Se disolvían 12,01 g de ácido acético glacial en 1 L de agua miliQ.

R.2. *Tampón citrato-fosfato a pH 3, 5 y 6*: El tampón a pH 3, 5 y 6 se obtenía a partir de 803, 490 y 374 mL de solución A, respectivamente, y completando hasta 1 L con solución B.

- Solución A: Se disolvían 19,213 g de ácido cítrico en 1 L de agua miliQ.
- Solución B: Se disolvían 28,392 g de fosfato disódico en 1 L de agua miliQ.

#### Protocolo experimental

La permeabilidad inicial de las membranas Biomax 10 y Biomax 30 se calculaba a partir de la variación que presentaba el flujo de permeado en función de la presión. Se medía el flujo de permeado, por triplicado, a 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 bar de presión filtrando diferentes disolventes (agua miliQ, tampón acetato (R.1) y tampón citrato-fosfato (R.2)). El cálculo de la permeabilidad,  $L_p$  ( $\text{m s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ), se llevaba a cabo mediante la representación de la ley de Darcy, que relaciona el flujo de permeado,  $J_p$  ( $\text{m s}^{-1}$ ), frente a la presión transmembrana, TMP (Pa), a través de la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$J_p = L_p \cdot \text{TMP} \quad (1)$$

Los valores de permeabilidad obtenidos para las membranas Biomax 10 y 30 se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Permeabilidad (Lp) de las membranas Biomax 10 y 30 a diferentes disolventes, agua miliQ, tampón acetato 0,2 M pH 5 y tampón citrato-fosfato pH 3, 5 y 6.

Membrana	Configuración	Disolvente	Lp ( $\times 10^{-10} \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ )
Biomax 10	Normal	Agua miliQ	9,90 $\pm$ 0,62
		Tampón acetato pH 5	8,36 $\pm$ 0,93
	Reversa	Agua miliQ	7,58 $\pm$ 0,18
		Tampón acetato pH 5	6,98 $\pm$ 0,14
		Tampón citrato-fosfato pH 3	3,95 $\pm$ 0,58
		Tampón citrato-fosfato pH 5	4,18 $\pm$ 0,83
		Tampón citrato-fosfato pH 6	2,91 $\pm$ 0,57
Biomax 30	Reversa	Agua miliQ	10,2 $\pm$ 0,03
		Tampón acetato pH 5	9,14 $\pm$ 0,37

### 3.2. Inmovilización mediante ensuciamiento inducido

El protocolo de inmovilización mediante ensuciamiento inducido en membranas de ultrafiltración se basaba en el descrito por Luo *et al.* (2014b), con pequeñas modificaciones.

#### Reactivos

- R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5.*
- R.2. *Tampón citrato-fosfato a pH 3, 5 y 6.*
- R.3. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) a una concentración de 0,2; 0,3 ó 0,4 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M pH 5 ó en tampón citrato fosfato a pH 3, 5 ó 6.*

#### Protocolo experimental

Para la inmovilización de la naringinasa se cargaba la celda de ultrafiltración con 30 mL de solución de enzima y se recogía el permeado aplicando presión con gas nitrógeno a temperatura ambiente y agitación constante a 100 rpm. Se probaron diferentes presiones (1, 2 y 3 bar), concentraciones de enzima (0,2; 0,3 y 0,4 g L<sup>-1</sup>) y valores de pH (3, 5 y 6). Hay que tener en cuenta que el tampón acetato en el que se preparaba generalmente la enzima no abarca el rango de pH que se quería analizar en esta investigación, por lo que se empleó tampón citrato-fosfato a la hora de analizar el efecto

del pH. El permeado resultante de filtrar la solución de enzima se recogía cada 4 mL hasta alcanzar un volumen final de 28 mL. Al final de la filtración, la membrana ensuciada se lavaba 3 veces con el tampón de inmovilización sin aplicar presión (5 mL cada vez) y se recogían los lavados, los cuales se mezclaban con el retenido. Después, la membrana se lavaba con tampón a presión de 2 bar y el permeado se recogía cada 10 mL hasta alcanzar un volumen total de 100 mL, volumen suficiente para que la cantidad de enzima en el permeado fuera próxima a cero.

La inmovilización de naringinasa se llevó a cabo con las membranas Biomax 10 y Biomax 30 y se ensayaron dos tipos de configuración de membrana, normal (capa fina enfrentada a la alimentación) y reversa (capa soporte en contacto con la alimentación).

La membrana biocatalítica se utilizaba en el REM para la determinación de la conversión de naringina, inmediatamente después de la inmovilización de naringinasa.

### **3.3. Inmovilización por ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído**

La naringinasa se inmovilizaba en las condiciones previamente seleccionadas para el ensuciamiento inducido (apartado 3.2) y se entrecruzaba con glutaraldehído de acuerdo al protocolo experimental desarrollado por Yujun *et al.* (2008) con algunas modificaciones.

#### **Reactivos**

- R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5* preparado en agua miliQ.
- R.2. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) 0,3 g L<sup>-1</sup>* en tampón acetato 0,2 M a pH 5.
- R.3. *Solución de glutaraldehído (grado II, Sigma)* a una concentración de 0,1; 0,25; 0,5 ó 1% (p/v) preparada en agua miliQ.

#### **Protocolo experimental**

La celda de ultrafiltración se cargaba con 30 mL de solución de enzima (0,3 g L<sup>-1</sup>) (R.2) y se filtraba a través de la membrana Biomax de 10 kDa colocada en modo reverso, aplicando una presión de 2 bar, a temperatura ambiente y con agitación constante a 100 rpm. Se recogían permeados cada 4 mL, y la filtración se llevaba a volumen final por lo que el último permeado obtenido era de 2 mL.

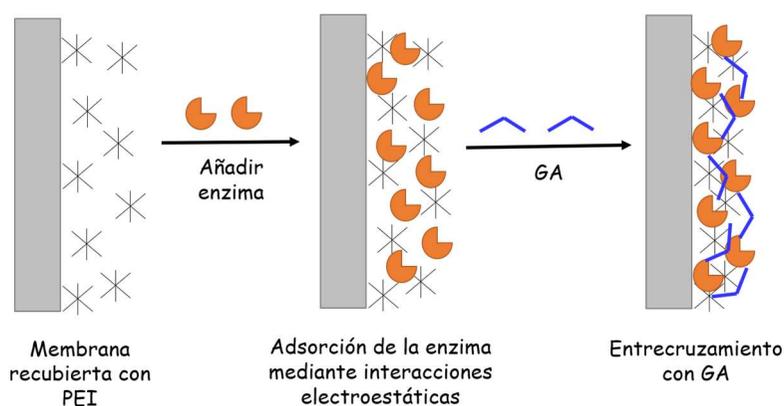
Una vez inmovilizada la naringinasa, aplicando presión de 1,5 bar y 100 rpm de agitación, se pasaban 20 mL de una solución de glutaraldehído a diferentes

concentraciones (R.3) para entrecruzar las moléculas de enzima. Finalmente, se realizaban dos lavados de 30 mL de tampón acetato (R.1) a 2 bar y 100 rpm.

Tras la inmovilización, la membrana biocatalítica se conservaba a 4 °C hasta al día siguiente y antes de la determinación de la conversión de naringina se humectaba en 10 mL de tampón acetato (R.1) durante 15 min.

### 3.4. Inmovilización en membranas funcionalizadas con polietilenimina

La inmovilización de naringinasa mediante enlace iónico a membranas recubiertas con polietilenimina (PEI) se llevaba a cabo mediante el protocolo descrito por Sen *et al.* (2011) con pequeñas modificaciones. Este protocolo incluye los siguientes pasos: (1) adsorción de la PEI sobre la superficie de la membrana, (2) incorporación de la enzima que forma interacciones electroestáticas con la PEI, (3) entrecruzamiento con glutaraldehído de los agregados PEI-enzima que recubren la membrana (Figura 6).



**Figura 6.** Inmovilización de enzimas mediante enlace iónico en membranas recubiertas con polietilenimina (PEI) y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído (GA). Adaptado de Albayrak y Yang (2002).

#### Reactivos

- R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5* preparado en agua miliQ.
- R.2. *PEI (Sigma) 0,22% (p/v) a pH 8.*
- R.4. *Naringinasa de P. decumbens (Sigma) 0,3 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M a pH 5.*
- R.3. *Glutaraldehído (grado II, Sigma) 0,2% (p/v) a pH 7.*

## Protocolo experimental

La membrana Biomax de 10 kDa se sumergía durante 2 h en 20 mL de PEI (R.2), a temperatura ambiente y en reposo. Posteriormente, 10 mL de la solución de enzima (R.3) se mantenían en contacto con la membrana recubierta con PEI durante 5 min a 28 °C en agitación orbital a 100 rpm. A continuación, la membrana, cargada con la enzima, se sumergía durante 5 min, sin agitación, en 10 mL de la solución de glutaraldehído (R.4). Finalmente, se lavaba la membrana cuidadosamente, tres veces con 10 mL de tampón acetato (R.1).

La membrana biocatalítica obtenida se conservaba hasta el día siguiente a 4 °C. Inmediatamente antes de determinar la conversión de naringina, se humectaba la membrana en 10 mL de tampón acetato (R.1) durante 15 min.

### 3.5. Parámetros calculados

A partir de los resultados experimentales se calculaban los siguientes parámetros:

**Permeabilidad ( $L_p$ ):** hace referencia a la tendencia de una membrana a dejar pasar sustancias a través de ella. Se calculaba mediante la Ec. 2:

$$L_p = \frac{1}{\mu \cdot R_t} \quad (2)$$

donde  $L_p$  es la permeabilidad ( $\text{m s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ),  $\mu$  la viscosidad del fluido que atraviesa la membrana ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ), y  $R_t$  la resistencia de la membrana al fluido ( $\text{m}^{-1}$ ).

**Densidad de flujo de permeado ( $J_p$ ):** se define como el caudal de permeado entre el área de la membrana. Se calculaba a partir de la siguiente expresión (Ec. 3):

$$J_p = \frac{V_p}{A_m \cdot t} \quad (3)$$

siendo  $J_p$  la densidad del flujo de permeado ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $V_p$  el volumen de permeado ( $\text{m}^3$ ),  $A_m$  el área efectiva de la membrana ( $\text{m}^2$ ) y  $t$  el tiempo (s).

**Resistencias:** en este trabajo el mecanismo de ensuciamiento de la membrana se evaluaba mediante el modelo de resistencias en serie o ley de Darcy que relaciona la densidad de flujo de permeado con la presión transmembrana por medio de la Ec. (4):

$$J_p = L_p \cdot \text{TMP} = \frac{\text{TMP}}{\mu \cdot R_t} \quad (4)$$

donde  $J_p$  es la densidad de flujo de permeado ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $L_p$  la permeabilidad a la membrana ( $\text{m s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ),  $\mu$  la viscosidad del fluido ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ),  $TMP$  la presión transmembrana ( $\text{Pa}$ ) y  $R_t$  la resistencia total que ofrece la membrana al paso de permeado durante el proceso de ultrafiltración ( $\text{m}^{-1}$ ).

La  $R_t$  puede definirse como la suma de varias resistencias en serie (Ec. 5):

$$R_t = R_m + R_d + R_{cp} + R_{rf} + R_{if} \quad (5)$$

donde  $R_m$  es la resistencia hidráulica,  $R_d$  la resistencia debido a los iones del tampón,  $R_{cp}$  la resistencia debida a la polarización por concentración,  $R_{rf}$  la resistencia debida al ensuciamiento reversible y  $R_{if}$  la resistencia debido al ensuciamiento irreversible. Las distintas resistencias se calculaban como se indica a continuación:

- $R_m$ : calculada a partir de la medida de la permeabilidad inicial al agua.
- $R_m + R_d$ : se obtenía a partir de la medida de la permeabilidad inicial al tampón.
- $R_t$ : determinada a partir del flujo de permeado de la última muestra tomada durante la inmovilización.
- $R_m + R_d + R_{rf} + R_{if}$ : se obtenía a partir del flujo del tampón al principio de la etapa de lavado con presión ya que la capa de polarización por concentración (CP) se eliminaba con el lavado sin presión.
- $R_{cp}$ : se calculaba despejando de la Ec. 5.
- $R_m + R_d + R_{if}$ : se determinaba a partir del flujo al final de la etapa de lavado a presión porque el ensuciamiento reversible se ha eliminado durante el lavado con presión y agitación.

**Carga enzimática ( $m_i$ ):** cantidad de enzima inmovilizada ( $\text{mg}$ ) calculada a partir del siguiente balance de materia (Ec. 6):

$$m_i = C_a V_a - C_p V_p - C_r V_r - C_w V_w \quad (6)$$

donde  $m_i$  es la cantidad de enzima inmovilizada,  $C_a$  la concentración de enzima en la alimentación,  $C_p$  la concentración de enzima en el permeado,  $C_r$  la concentración de enzima en la mezcla del retenido con los lavados sin presión y  $C_w$  la concentración de enzima en la suma de los lavados a presión.  $V_a$ ,  $V_p$ ,  $V_r$  y  $V_w$  son los volúmenes de alimentación, de permeado, de mezcla del retenido y los lavados sin presión y de los lavados a presión, respectivamente.

La concentración de enzima se cuantificaba mediante el método de Bradford (apartado 3.9).

**Rendimiento de inmovilización (RI):** cantidad de enzima que ha quedado retenida en la membrana frente a la cantidad de enzima presente en la alimentación. Se calculaba mediante la siguiente expresión (Ec. 7):

$$RI (\%) = \frac{m_i}{m_t} \times 100 \quad (7)$$

siendo  $m_i$  la carga enzimática y  $m_t$  la cantidad de enzima en la alimentación.

### 3.6. Cuantificación de proteína enzimática

La cantidad de enzima presente en la alimentación, permeados, lavados y retenido obtenidos durante el proceso de inmovilización, se determinaba a partir del método de Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en la unión de un colorante hidrofóbico (Azul de Coomassie G-250) cuya disolución acuosa en presencia de ácido fosfórico es de color pardo y que, al encontrarse en un entorno hidrofóbico, como el interior de una proteína, origina un color azul intenso. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes como los detergentes y las sustancias básicas.

#### Reactivos

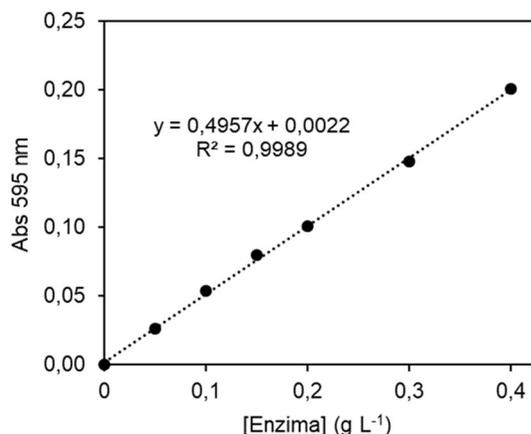
- R.1. *Reactivo de Bradford:* disolver 100 mg de azul de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol. Adicionar a la mezcla 100 mL de ácido fosfórico al 85% (p/v). Diluir la solución resultante a 1 L en agua destilada.
- R.2. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5*
- R.3. *Naringinasa de P. decumbens 0,5g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M a pH 5.*

#### Protocolo experimental

El protocolo experimental suponía mezclar 0,5 mL de muestra con 5 mL de reactivo de Bradford (R.1). Transcurridos 5 min se medía la absorbancia a 595 nm.

#### Recta de calibrado

Se preparaba una recta de calibrado en un rango de 0-0,4 g L<sup>-1</sup> a partir de la solución de naringinasa de 0,5 g L<sup>-1</sup> (R.3). La Figura 7 recoge un ejemplo de la recta de calibrado.



**Figura 7.** Ejemplo de recta de calibrado para la cuantificación de la concentración de naringinasa.

### 3.7. Conversión de naringina en el REM

La membrana catalítica, con naringinasa inmovilizada mediante los protocolos descritos en los apartados 3.2, 3.3 y 3.4, se aplicaba en el REM para la conversión del compuesto amargo naringina.

#### Reactivos

R.1. *Tampón acetato 0,2 M a pH 5*

R.2. *Naringina 0,8 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M a pH 5.*

#### Protocolo experimental

La reacción se llevaba a cabo con 50 mL de solución de sustrato (R.2) que se hacía pasar a través de la membrana catalítica colocada en modo reverso para los protocolos de ensuciamiento y entrecruzamiento con glutaraldehído, y en modo normal y sandwich para el protocolo de funcionalización con PEI. Durante la reacción se mantenía la temperatura entre 45-50 °C y una agitación constante de 100 rpm. Se aplicaba una presión de 0,25 bar hasta que se recogieron 48 mL de permeado en alícuotas de 4 mL que rápidamente se enfriaban en hielo, para asegurar la inactivación de la enzima que pudiera liberarse de la membrana.

La **conversión** de naringina, indicador de la progresión de la reacción, hace referencia a la cantidad de naringina que se ha conseguido reducir en cada alícuota de permeado y se calcula mediante la Ec. 8:

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{C_i - C_p}{C_i} \times 100 \quad (8)$$

donde  $C_i$  y  $C_p$  son las concentraciones de naringina en la alimentación y en cada alícuota de permeado, respectivamente.

El **grado total de conversión**, indicador de la actividad naringinasa en el REM, hace referencia a la conversión de naringina en el volumen total de la solución alimentada al reactor y se calcula mediante la Ec. 9:

$$\text{Grado total de conversión (\%)} = \frac{C_i - C_{\Sigma p}}{C_i} \times 100 \quad (9)$$

donde  $C_i$  y  $C_{\Sigma p}$  son las concentraciones de naringina en la alimentación y en el volumen total de permeado, respectivamente.

La concentración de naringina se determinaba mediante el método de Davis (1947), protocolo que se encuentra descrito en el apartado 3.2 del Capítulo II de esta Tesis Doctoral.

Con el objetivo de establecer si se producían pérdidas de enzima a lo largo del proceso de reacción, se llevaba a cabo una simulación del procedimiento completo descrito empleando como solución de alimentación exclusivamente tampón acetato (R.1), y se analizaba el contenido de proteína mediante el método de Bradford en las muestras de tampón recogido.

### **3.8. Modelos teóricos de ensuciamiento inducido**

Hermia (1982) desarrolló cuatro modelos empíricos para describir los cuatro modelos básicos de ensuciamiento de membrana (Tabla 3): (1) bloqueo completo, cuando las partículas son más grandes que el poro de la membrana y lo taponan; (2) bloqueo estándar, que se produce cuando las partículas son más pequeñas que los poros de la membrana y quedan depositadas a lo largo del poros; (3) bloqueo intermedio, que ocurre cuando las partículas tienen un tamaño similar al poro de forma que lo obturan parcialmente; y (4) formación de torta, que se forma a medida que continúan depositándose partículas en la membrana dando lugar a una capa superficial.

Para un proceso de filtración a presión constante, el progreso del volumen de permeado respecto al tiempo puede expresarse mediante la siguiente ecuación (Ec. 10):

$$\frac{d^2t}{dV^2} = K \left( \frac{dt}{dV} \right)^n \quad (10)$$

donde  $t$  es el tiempo de filtración (s),  $V$  el volumen de permeado ( $m^3$ ) y  $K$  una constante. El valor de  $n$  depende del tipo de ensuciamiento que se esté produciendo en la membrana:  $n = 2$  se refiere a un modelo de bloqueo completo,  $n = 1,5$  para el bloqueo estándar,  $n = 1$  indica un bloqueo intermedio y  $n = 0$  representa el modelo de formación de torta.

Cuando se fija  $n$ , la Ec. 10 puede integrarse dando lugar a las ecuaciones lineales que se muestran en la Tabla 3. Mediante el ajuste de los datos experimentales usando cada uno de los modelos lineales y comparando sus coeficientes de regresión, se puede obtener el mecanismo de ensuciamiento más probable. Con estas estimaciones se pueden seleccionar la membrana y las condiciones de inmovilización que den lugar a una interacción más estable entre la enzima y el soporte.

**Tabla 3.** Descripción matemática y esquemática de los cuatro modelos empíricos de ensuciamiento de membrana. Adaptado de Luo *et al.* (2013).

Modelo de ensuciamiento	Ecuación matemática <sup>1</sup>	Descripción esquemática
Bloqueo completo ( $n = 2$ )	$\ln J_p = \ln J_o + K_c t$ (Ec. 11)	
Bloqueo estándar ( $n = 1,5$ )	$\frac{1}{J_p^{0,5}} = \frac{1}{J_o^{0,5}} + K_s t$ (Ec. 12)	
Bloqueo intermedio ( $n = 1$ )	$\frac{1}{J_p} = \frac{1}{J_o} + K_i t$ (Ec. 13)	
Formación de torta ( $n = 0$ )	$\frac{1}{J_p^2} = \frac{1}{J_o^2} + K_{cl} t$ (Ec. 14)	

<sup>1</sup> $J_p$  es el flujo de permeado;  $t$  es el tiempo de filtración;  $J_o$  es el flujo de permeado a  $t=0$ ; y  $K_c$ ,  $K_s$ ,  $K_i$ ,  $K_{cl}$  son las constantes para los diferentes modelos.

### 3.9. Tratamiento estadístico de los datos

Para cada muestra analizada se calculó la media aritmética y la desviación estándar muestral (Capítulo II, apartado 3.8).

Con el fin de determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre muestras, se empleó el paquete informático STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.2.02) para realizar los análisis t-student, si se comparaba dos grupos de muestras, o ANOVA (Capítulo II, apartado 3.8), cuando se tenían tres o más grupos de muestras.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para el desarrollo del REM con actividad naringinasa, se seleccionaron para su estudio y optimización tres protocolos de inmovilización de la enzima en membranas de ultrafiltración de polietersulfona: ensuciamiento inducido, ensuciamiento inducido y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído y, por último, inmovilización en membranas funcionalizadas con polietilenimina.

### **4.1. Inmovilización de naringinasa por ensuciamiento inducido en membranas de ultrafiltración**

La optimización del diseño del REM con actividad naringinasa se llevó a cabo mediante el estudio pormenorizado de los principales parámetros que pueden afectar a la inmovilización de enzimas por ensuciamiento inducido en membranas de ultrafiltración y que se relacionan por orden cronológico de desarrollo experimental:

- Tamaño de poro y configuración de la membrana en el reactor (apartado 4.1.1).
- Parámetros de inmovilización: presión transmembrana, concentración de enzima y pH del medio (apartado 4.1.2).

Dentro de cada uno de estos bloques de experiencias se procedió a seleccionar la condición más adecuada en base al rendimiento de inmovilización y grado de conversión del biorreactor. Adicionalmente, se estudió el efecto de estos parámetros sobre los mecanismos teóricos de bloqueo de poro (apartado 4.1.3).

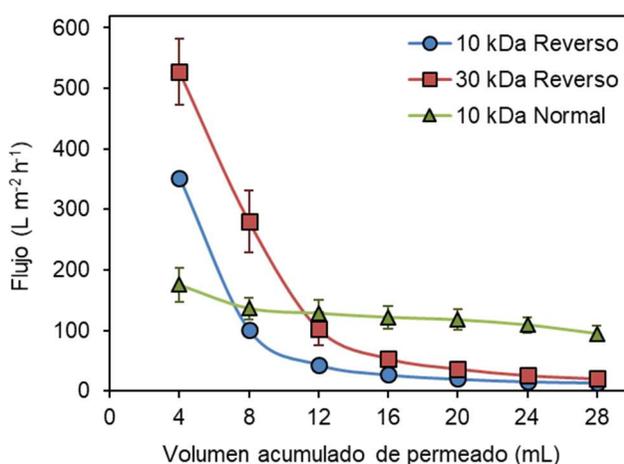
#### **4.1.1. Selección del tamaño de poro y configuración de la membrana de ultrafiltración en la inmovilización de naringinasa**

Teniendo en cuenta que el peso molecular de la proteína enzimática objeto de inmovilización se encuentra entre 60-240 kDa (Puri y Kalra, 2005; Zhu, *et al.*, 2017) se seleccionaron, a priori, las membranas Biomax de 10 y 30 kDa. Se analizó también el efecto sobre la inmovilización de la naringinasa del modo de configuración, normal (capa fina de material de polietersulfona enfrentada a la alimentación) y reverso (capa soporte en contacto con la alimentación). Se fijaron en todas las pruebas las condiciones de inmovilización a una presión intermedia de 2 bar, una concentración de enzima de 0,3 g L<sup>-1</sup> y el medio de medida de actividad naringinasa, es decir, tampón acetato a pH 5.

#### 4.1.1.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización

Los flujos de permeado durante la inmovilización para las membranas de 10 y 30 kDa en configuración reversa, y para la membrana de 10 kDa en modo normal, se recogen en la Figura 8. Si se analiza el efecto del tamaño de poro, se observa que el flujo de permeado inicial era mayor para la membrana de 30 kDa debido a su mayor permeabilidad. Sin embargo, a medida que avanza la filtración, los flujos para los dos MWCO tienden a igualarse por el proceso de ensuciamiento.

Por otra parte, el efecto de la configuración de la membrana es también evidente. En el modo reverso la caída del flujo de permeado era muy severa, entorno a un 96% mientras que en el modo normal el descenso era mucho más moderado, entorno al 46% (Figura 8). Estas diferencias en la evolución del flujo se deben a un mayor ensuciamiento en el modo reverso porque la superficie para la deposición de la enzima era mayor cuando la capa soporte se colocaba frente a la alimentación (Luo *et al.*, 2013).



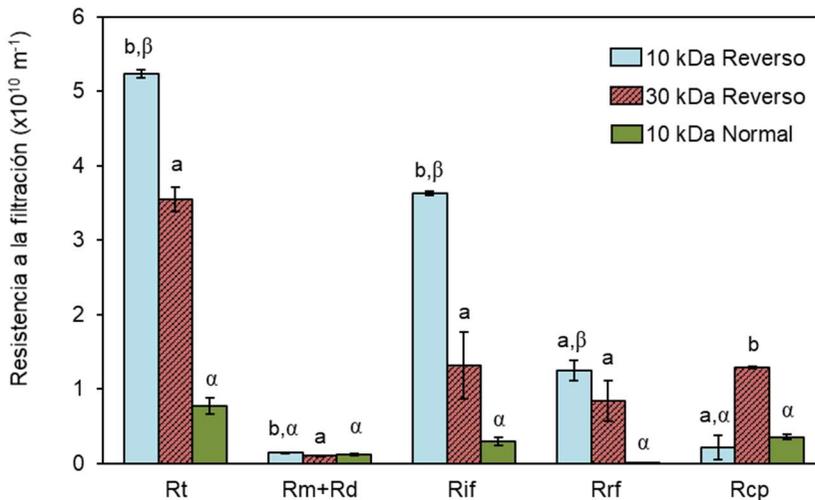
**Figura 8.** Efecto del tamaño de poro y la configuración de la membrana sobre el flujo de permeado durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

Luo *et al.* (2014b) señalaron efectos similares del tamaño de poro y de la configuración de la membrana al inmovilizar alcohol deshidrogenasa en membranas de ultrafiltración. Estos mismos autores indicaron que el comportamiento inicial del flujo de permeado dependía en gran medida de las características de la membrana (tamaño de poro y material), mientras que el flujo final estaba más controlado por la capa de ensuciamiento formada sobre la superficie de la membrana.

El efecto del tamaño de poro y la configuración de la membrana sobre las resistencias a la filtración se recoge en la Tabla 4 y Figura 9. El incremento del MWCO

de 10 a 30 kDa daba lugar a un descenso en la resistencia total a la filtración ( $5,23$  y  $3,54 \cdot 10^{10} \text{ m}^{-1}$ , respectivamente), debido a la mayor facilidad de la enzima para atravesar los poros de la membrana. Para la membrana de 10 kDa se observó un aumento de la resistencia irreversible, lo que indicaba que la inmovilización era más estable para este tamaño de poro. Además, destacar el incremento de la polarización por concentración en la membrana de 30 kDa. Esto es indeseable de cara a una inmovilización efectiva de la enzima ya que la polarización por concentración se produce porque los solutos se concentran en las proximidades de la membrana, pero sin llegar a depositarse.

Las resistencias a la filtración se veían, también, claramente afectadas por la configuración de membrana. En modo normal la  $R_t$ , la  $R_{if}$  y la  $R_{rf}$  eran muy inferiores a las resistencias en modo reverso (Figura 9). Por otra parte, destaca la gran diferencia en el porcentaje  $R_{cp}/R_t$  de 4,1% para el modo reverso, frente a 46,0% para el modo normal (Tabla 4). Este incremento en valores relativos de la polarización por concentración en modo normal se puede explicar en base al menor tamaño de poro de la capa fina frente a la capa soporte, de forma que, las moléculas de enzima tendrían mayor tendencia a acumularse en la vecindad de la membrana.



**Figura 9.** Efecto del tamaño de poro y la configuración de membrana sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. Letras minúsculas diferentes (a-b) indican diferencias significativas (t-student:  $p < 0,05$ ) entre los diferentes tamaños de poro para cada tipo de resistencia. Letras griegas diferentes ( $\alpha$ - $\beta$ ) indican diferencias significativas (t-student:  $p < 0,05$ ) entre las diferentes configuraciones para cada tipo de resistencia.

**Tabla 4.** Efecto del tamaño de poro y la configuración de membrana sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.<sup>1</sup>

	<b>Biomax 10 Reverso</b>	<b>Biomax 30 Reverso</b>	<b>Biomax 10 Normal</b>
$R_t$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ )	$5,23 \pm 0,05$	$3,54 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,10$
$R_m + R_d$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ )	$0,14 \pm 0,003$	$0,11 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,01$
$R_{if}$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ )	$3,62 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,45$	$0,29 \pm 0,05$
$R_{rf}$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ )	$1,25 \pm 0,13$	$0,84 \pm 0,27$	$0,004 \pm 0,002$
$R_{cp}$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ )	$0,22 \pm 0,16$	$1,29 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,03$
$(R_m + R_d) / R_t$ (%)	$2,7 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,4$
$R_{if} / R_t$ (%)	$69,3 \pm 0,2$	$36,8 \pm 11,0$	$37,8 \pm 2,0$
$R_{rf} / R_t$ (%)	$23,8 \pm 2,8$	$23,8 \pm 8,6$	$0,5 \pm 0,2$
$R_{cp} / R_t$ (%)	$4,1 \pm 3,1$	$36,3 \pm 2,1$	$46,0 \pm 1,8$

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

La cantidad de enzima inmovilizada en función del MWCO y de la configuración de la membrana se recoge en la Tabla 5. Al incrementar el tamaño de poro de la membrana el RI disminuía de 87, 3% para la de 10 kDa hasta 71,8% para la de 30 kDa. Esto se debía a la presencia de enzima en el permeado cuando se utilizaba la membrana de 30 kDa, probablemente porque el mayor tamaño de poro facilitaba que las moléculas de proteína atravesaran la membrana durante la filtración.

**Tabla 5.** Efecto del peso molecular de corte y configuración de la membrana sobre el rendimiento de inmovilización (RI).<sup>1</sup>

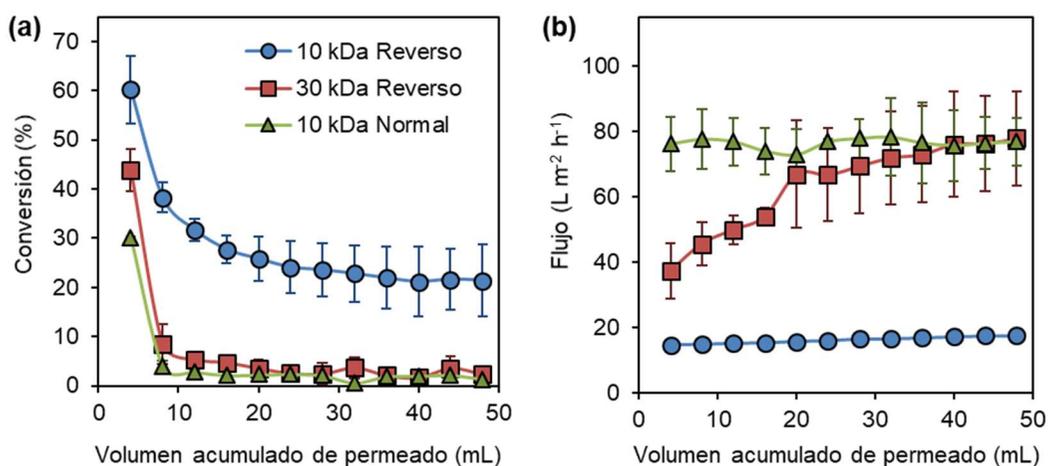
<b>Membrana<sup>2</sup></b>	<b>Cantidad de enzima (mg)</b>					<b>RI (%)<sup>3</sup></b>
	<b>Alimentación</b>	<b>Permeado</b>	<b>Lavado</b>	<b>Retenido</b>	<b>Carga</b>	
10-R	$8,97 \pm 0,22$	ND <sup>4</sup>	ND	$1,14 \pm 0,21$	$7,83 \pm 0,16$	$87,3 \pm 1,6^{b\beta}$
30-R	$8,82 \pm 0,36$	$1,30 \pm 0,19$	ND	$1,18 \pm 0,26$	$6,33 \pm 0,32$	$71,8 \pm 0,7^a$
10-N	$9,07 \pm 0,14$	ND	ND	$7,55 \pm 0,64$	$1,52 \pm 0,60$	$16,7 \pm 6,4^a$

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. <sup>2</sup>10-R:10 kDa-Reverso, 30-R: 30 kDa-Reverso, 10-N: 10 kDa-Normal. <sup>3</sup>Letras minúsculas diferentes (a-b) indican diferencias significativas entre distintos tamaños de poro (t-student,  $p < 0,05$ ), letras griegas diferentes ( $\alpha$ - $\beta$ ) indican diferencias significativas entre distintas configuraciones de membrana (t-student,  $p < 0,05$ ). <sup>4</sup> ND= no detectada.

En cuanto a la configuración de la membrana, es evidente que el modo reverso favorecía el ensuciamiento, de forma que, el RI caía drásticamente desde el 87,3% hasta el 16,7% para la configuración normal (Tabla 5). Con esta configuración, la mayor parte de la enzima alimentada a la celda de UF quedaba en el retenido (el 83,3% del total), en concordancia con el alto porcentaje de  $R_{cp}/R_t$ , lo que indicaba que las moléculas de enzima no podían penetrar a través de la membrana debido al pequeño tamaño de poro de la capa fina (10 kDa) frente al tamaño de la naringinasa (60-240 kDa). Cuando se utilizaba el modo reverso, la capa soporte, cuyo grosor y tamaño de poro eran superiores a los de la capa fina, facilitaría la deposición de la enzima sobre y en el interior de la membrana.

#### 4.1.1.2. Efecto sobre la conversión de naringina

El tamaño de poro de la membrana ejercía un claro efecto sobre la conversión de naringina (Figura 10a) de forma que, al pasar de 10 a 30 kDa, se reducía la capacidad catalítica del REM. El grado total de conversión era mayor para la membrana de 10 kDa ( $28,8 \pm 3,5\%$  frente a  $7,0 \pm 1,5\%$  para la de 30 kDa) debido a la mayor cantidad de enzima inmovilizada y al mayor tiempo de operación (134 y 36 min para 10 y 30 kDa, respectivamente) que permitía un mejor contacto entre la enzima y su sustrato. Estos resultados están en consonancia con los flujos de permeados obtenidos, que se veían incrementados al pasar de 10 a 30 kDa (Figura 10b).



**Figura 10.** Efecto del tamaño de poro y la configuración de la membrana sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

Por otra parte, la configuración normal daba lugar a una pérdida muy importante de la capacidad catalítica (Figura 10a), alcanzándose tan sólo un  $4,5 \pm 1,0\%$  de grado total de conversión. Esto se debía a la baja cantidad de enzima inmovilizada y al reducido tiempo de operación (28 min) con respecto al modo reverso, como consecuencia del importante incremento del flujo de permeado (Figura 10b).

Independientemente del tamaño de poro y de la configuración de la membrana, se observó una tendencia descendente para el grado de conversión de naringina, lo que indicaba una posible inactivación y/o una desorción de la enzima durante el proceso. Se comprobó que el 39,5% de la enzima cargada en la membrana se desprendía durante la aplicación del REM.

Finalmente, se puede concluir que, de las opciones estudiadas en este bloque de experiencias, la membrana de 10 kDa colocada en modo reverso, era la más adecuada para la inmovilización de naringinasa ya que se conseguía el mejor rendimiento de inmovilización y la mayor capacidad de conversión de naringina. Por tanto, fue seleccionada para su aplicación en las siguientes pruebas de inmovilización de naringinasa.

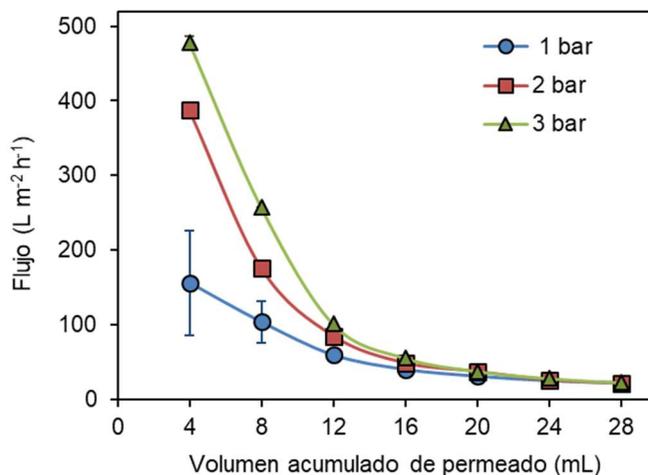
#### **4.1.2. Selección de los parámetros de inmovilización: presión transmembrana, concentración de enzima y pH**

Dentro de este bloque de experiencias se procedió a evaluar el efecto de la presión transmembrana, la concentración de enzima y el pH del medio sobre el rendimiento de inmovilización y la capacidad de conversión de naringina. La metodología de ensayo implicaba estudiar un parámetro manteniendo constantes el resto de condiciones. Una vez optimizado cada parámetro éste se fijaba para la siguiente tanda de pruebas.

##### ***4.1.2.1. Efecto de la presión transmembrana sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina***

###### *4.1.2.1.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización*

El flujo de permeado durante la inmovilización, para cada una de las presiones estudiadas (1, 2 y 3 bar), se recoge en la Figura 11. Se puede observar que, tal y como se esperaba, el flujo inicial de permeado era mayor al incrementar la TMP obteniéndose valores de 156, 387 y 478 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> para 1, 2 y 3 bar, respectivamente. Sin embargo, a medida que el experimento avanzaba, los flujos decrecían debido al proceso de ensuciamiento, de manera que a partir de los 16 mL de permeado ya no se apreciaban diferencias entre las distintas presiones. Por otra parte, se reducía el tiempo de operación



**Figura 11.** Efecto de la presión transmembrana sobre el flujo de permeado durante la inmovilización de naringinasa mediante ensuciamiento inducido. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

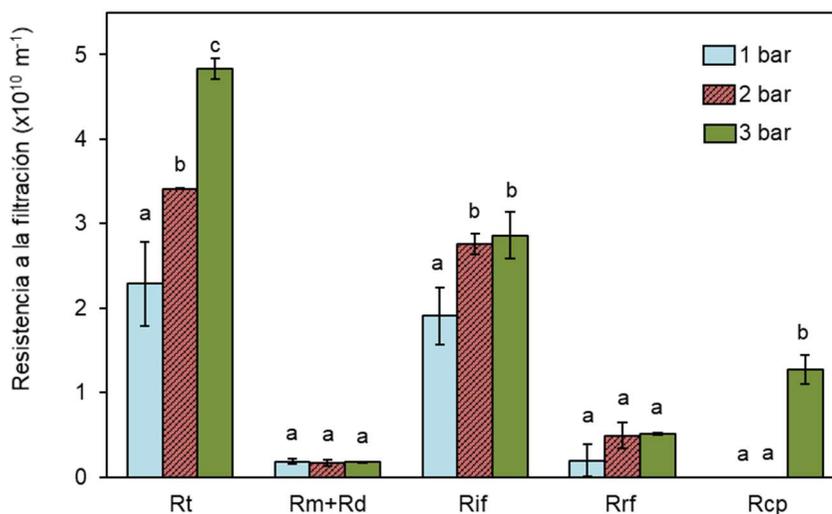
al incrementar la presión, 32, 28 y 25 min para 1, 2 y 3 bar, respectivamente. Así, para obtener el mismo volumen de permeado (28 mL) el flujo decrecía un 86, 94 y 95% al aplicar 1, 2 y 3 bar de presión, respectivamente

Wang y Tang (2011) en su estudio sobre el ensuciamiento de la proteína serolabúmina bovina (BSA) en diferentes tipos de membrana, observaron que, la reducción del flujo de permeado era más moderada al disminuir la presión. Resultados similares describieron Luo *et al.* (2014a) al inmovilizar alcohol deshidrogenasa en membranas de ultrafiltración mediante ensuciamiento inducido.

Se analizó, además, el efecto de la presión transmembrana sobre la resistencia a la filtración durante la inmovilización (Figura 12). En general, el aumento de la TMP favorecía el ensuciamiento por el incremento de la fuerza de arrastre y de la polarización por concentración (Wang y Tang, 2011), lo que conllevaba un aumento de la  $R_t$ , tal y como se observa en la Figura 12.

A la hora de inmovilizar una enzima mediante ensuciamiento inducido se busca que este sea irreversible, ya que se pretende evitar la desorción del biocatalizador durante los ciclos de operación. Los resultados recogidos en la Figura 12 muestran que este tipo de ensuciamiento ( $R_{if}$ ) se veía favorecido al incrementar la presión de 1 a 2 bar, mientras que no se detectaron diferencias entre 2 y 3 bar. Al observar el porcentaje de  $R_{if}/R_t$  (Tabla 6) se puede comprobar que éste era mayor para la presión de 1 y 2 bar (83,7 y 80,9%, respectivamente) mientras que se reducía mucho a 3 bar (59,2%). Esto se debía a que a 3 bar aparecía la polarización por concentración, CP, (26,5% de la resistencia total)

que era nula para las otras dos presiones. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas en la resistencia reversible para las diferentes presiones.



**Figura 12.** Efecto de la presión transmembrana sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas (ANOVA;  $p < 0,05$ ) entre las diferentes presiones para cada tipo de resistencia.

**Tabla 6.** Efecto de la presión transmembrana sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.<sup>1</sup>

	1 bar	2 bar	3 bar
R <sub>t</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	2,29 ± 0,50	3,41 ± 0,01	4,83 ± 0,12
R <sub>m</sub> + R <sub>d</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,001
R <sub>if</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	1,91 ± 0,38	2,76 ± 0,13	2,86 ± 0,28
R <sub>rf</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	1,98 ± 1,90	4,88 ± 1,53	5,11 ± 0,13
R <sub>cp</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0	0	1,28 ± 0,18
R <sub>d</sub> / R <sub>t</sub> (%)	8,4 ± 3,1	4,8 ± 1,0	3,7 ± 0,1
R <sub>if</sub> / R <sub>t</sub> (%)	83,7 ± 3,4	80,9 ± 3,6	59,2 ± 4,3
R <sub>rf</sub> / R <sub>t</sub> (%)	8,0 ± 6,6	14,3 ± 4,5	10,57 ± 0,01
R <sub>cp</sub> / R <sub>t</sub> (%)	0	0	26,5 ± 4,3

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

Luo *et al.* (2014a) también analizaron el efecto de la presión sobre las resistencias a la filtración en la inmovilización de alcohol deshidrogenasa mediante ensuciamiento inducido en membranas de polisulfona de 50 kDa. Estos autores describieron un comportamiento similar para la  $R_t$  y la  $R_{cp}$ , pero, a diferencia de lo observado en el presente trabajo, la  $R_{if}$  se reducía al incrementar la TMP. Esto lo asociaban a que a baja TMP las enzimas tenían más tiempo para difundir en el interior de los poros y su interacción con la membrana era mayor. A pesar de las discrepancias con los resultados obtenidos en este trabajo, las experiencias de Luo *et al.* (2014b) no son extrapolables ya que ni la enzima a inmovilizar, ni las membranas utilizadas eran las estudiadas en esta investigación.

El efecto de la TMP sobre el RI se muestra en la Tabla 7. El menor rendimiento se obtuvo para la presión de 2 bar (87,3% frente a 94,7 y 92,3% para 1 y 3 bar, respectivamente), aunque las diferencias entre las diferentes presiones eran mínimas. No se detectó enzima ni en los permeados ni en los lavados para ninguna de las tres presiones.

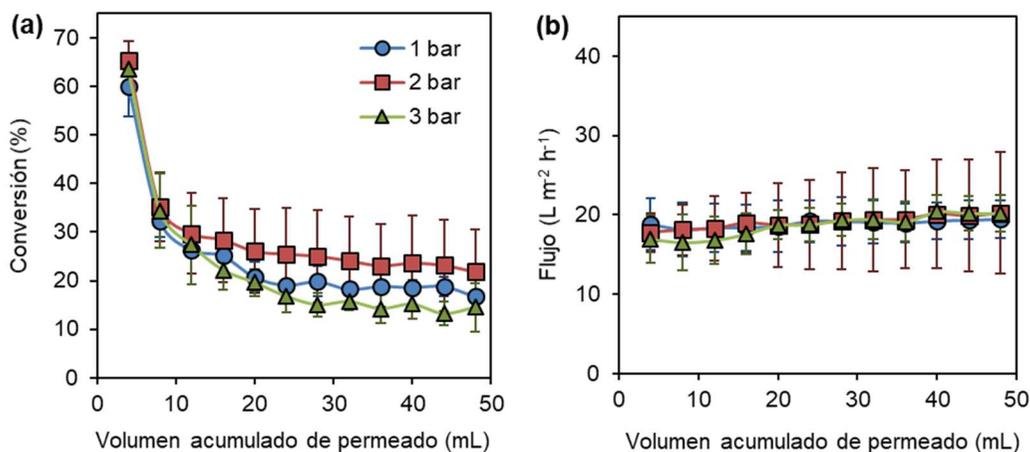
**Tabla 7.** Efecto de la presión transmembrana (TMP) sobre el rendimiento de inmovilización (RI).<sup>1</sup>

TMP (bar)	Cantidad de enzima (mg)					RI (%) <sup>2</sup>
	Alimentación	Permeado	Lavado	Retenido	Carga	
1	6,02 ± 0,25	ND <sup>3</sup>	ND	0,32 ± 0,00	5,71 ± 0,25	94,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
2	6,06 ± 0,42	ND	ND	0,77 ± 0,26	5,11 ± 0,34	87,3 ± 3,5 <sup>a</sup>
3	5,79 ± 0,21	ND	ND	0,39 ± 0,01	5,39 ± 0,21	93,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. <sup>2</sup>Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>ND= no detectada.

#### 4.1.2.1.2. Efecto sobre la conversión de naringina

La conversión de naringina a lo largo de la reacción era similar para las tres presiones (Figura 13a), de forma que no se detectaron diferencias significativas en el grado total de conversión que era  $24,6 \pm 1,7$ ;  $24,5 \pm 7,2$  y  $22,7 \pm 3,0\%$  para 1, 2 y 3 bar de presión, respectivamente. Esto está en consonancia con los resultados de carga enzimática (Tabla 7) y los flujos de permeado obtenidos (Figura 13b) que eran similares para las tres presiones.



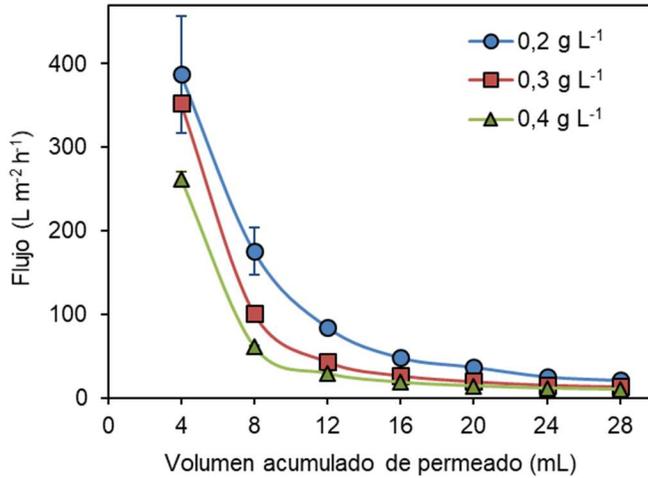
**Figura 13.** Efecto de la presión transmembrana de inmovilización sobre (a) la conversión de naringina y el (b) flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.

De lo expuesto, se puede concluir que la presión de 2 bar era la más adecuada para la inmovilización de naringinasa en la membrana Biomax 10 en modo reverso ya que, aunque no existían diferencias significativas en la conversión de naringina con el resto de las presiones, se incrementaba el ensuciamiento irreversible y se evitaba la polarización por concentración.

#### 4.1.2.2. Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina

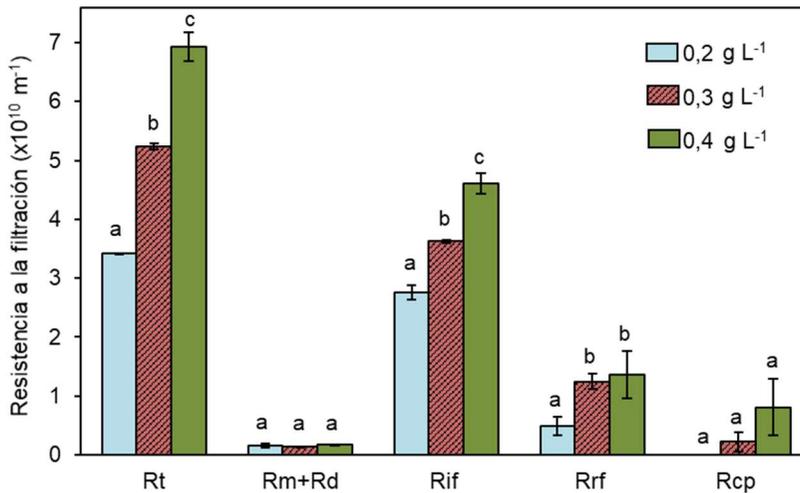
##### 4.1.2.2.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización

El flujo de permeado durante la inmovilización, para cada una de las concentraciones de enzima estudiadas, se muestra en la Figura 14. El descenso en el flujo era más acusado al incrementar la concentración de enzima, dando lugar a un incremento en el tiempo de inmovilización de 28, 46 y 64 min para 0,2; 0,3 y 0,4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. El aumento de solutos en la alimentación aceleraba el ensuciamiento porque al haber más partículas, éstas tienen mayor posibilidad de depositarse sobre la membrana o bloquear sus poros, produciendo una caída más rápida del flujo de permeado.



**Figura 14.** Efecto de la concentración de enzima sobre el flujo de permeado en la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5.

Por otra parte, las resistencias a la filtración se veían afectadas por la concentración de enzima, tal y como se desprende de los resultados recogidos en la Figura 15 y la Tabla 8. La resistencia total se incrementaba notablemente al aumentar la concentración de enzima ya que, como se ha mencionado anteriormente, el incremento de la concentración



**Figura 15.** Efecto de la concentración de enzima sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas (ANOVA;  $p < 0,05$ ) entre las diferentes concentraciones para cada tipo de resistencia.

**Tabla 8.** Efecto de la concentración de enzima sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.<sup>1</sup>

	0,2 g L <sup>-1</sup>	0,3 g L <sup>-1</sup>	0,4 g L <sup>-1</sup>
R <sub>t</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	3,41 ± 0,01	5,23 ± 0,05	6,93 ± 0,25
R <sub>m</sub> +R <sub>d</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,003	0,17 ± 0,003
R <sub>if</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	2,76 ± 0,13	3,62 ± 0,03	4,60 ± 0,17
R <sub>rf</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0,49 ± 0,15	1,25 ± 0,13	1,36 ± 0,41
R <sub>cp</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0	0,22 ± 0,16	0,81 ± 0,48
R <sub>d</sub> / R <sub>t</sub> (%)	4,8 ± 1,0	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,04
R <sub>if</sub> / R <sub>t</sub> (%)	80,9 ± 3,6	69,3 ± 0,2	66,4 ± 0,1
R <sub>rf</sub> / R <sub>t</sub> (%)	14,3 ± 4,5	23,8 ± 2,8	19,7 ± 6,5
R <sub>cp</sub> / R <sub>t</sub> (%)	0	4,1 ± 3,1	11,5 ± 6,5

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5.

de solutos en la alimentación aceleraba el ensuciamiento. Además, los valores absolutos de R<sub>if</sub>, R<sub>rf</sub> y R<sub>cp</sub> también se veían incrementados al aumentar la concentración de enzima, si bien es cierto que, del análisis estadístico se desprendería que las diferencias en la R<sub>cp</sub> no eran significativas (Figura 15). Por otra parte, cabe destacar que, a menor concentración de enzima (0,2 g L<sup>-1</sup>), la inmovilización parecía ser más estable ya que aumentaba la resistencia por ensuciamiento irreversible con respecto a la total (R<sub>if</sub>/R<sub>t</sub> = 80,9% frente a 69,3 y 64,4% para 0,3 y 0,4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente).

En la inmovilización de alcohol deshidrogenasa en membranas de polisulfona por ensuciamiento inducido, Luo *et al.* (2014a) indicaron que el incremento de la concentración de enzima, desde 0,05 hasta 0,2 g L<sup>-1</sup>, daba lugar a una caída más rápida del flujo de permeado durante la inmovilización, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Observaron también un incremento en las resistencias a la filtración con el aumento de la concentración de enzima aunque, en su caso, la resistencia reversible era la más afectada.

Corbatón-Báguena *et al.* (2015) estudiaron el ensuciamiento en membranas de ultrafiltración de polietersulfona al filtrar soluciones de pectinasas a diferentes concentraciones de proteína (2; 7,5 y 15 g L<sup>-1</sup>), observando que la caída del flujo de permeado era más drástica al aumentar la concentración, lo que indicaba un ensuciamiento más severo, en consonancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de inmovilización se muestra en la Tabla 9. No se detectaron diferencias significativas en el RI para las diferentes concentraciones, observándose que la cantidad de enzima inmovilizada en la membrana (carga) aumentaba con el incremento de la concentración en la alimentación.

**Tabla 9.** Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de inmovilización (RI).<sup>1</sup>

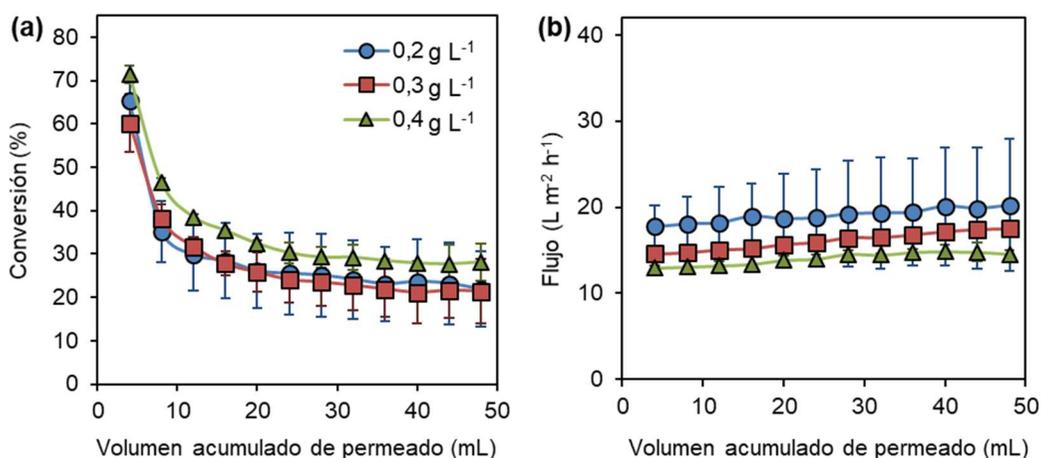
[E] (g L <sup>-1</sup> )	Cantidad de enzima (mg)					RI (%) <sup>2</sup>
	Alimentación	Permeado	Lavado	Retenido	Carga	
0,2	6,06 ± 0,42	ND <sup>3</sup>	ND	0,77 ± 0,26	5,11 ± 0,34	87,3 ± 3,5 <sup>a</sup>
0,3	8,97 ± 0,22	ND	ND	1,14 ± 0,21	7,83 ± 0,16	87,3 ± 1,6 <sup>a</sup>
0,4	11,76 ± 0,30	ND	ND	1,74 ± 0,48	10,02 ± 0,59	85,2 ± 3,4 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5.

<sup>2</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>ND= no detectada.

#### 4.1.2.2.2. Efecto sobre la conversión de naringina

La capacidad de conversión de naringina de la membrana biocatalítica en función de las diferentes concentraciones de enzima empleadas en la inmovilización se detalla en la Figura 16a. Se puede observar que la mayor capacidad de reducción de naringina del REM a lo largo de todo el proceso de reacción se obtenía a 0,4 g L<sup>-1</sup>. De esta forma,



**Figura 16.** Efecto de la concentración de enzima sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5.

el grado total de conversión era mayor a  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  alcanzando el  $35,4 \pm 1,0\%$ , mientras que se reducía para las concentraciones de  $0,2$  y  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de enzima ( $24,5 \pm 7,2\%$  y  $28,8 \pm 3,5\%$ , respectivamente) entre las que no se apreciaban diferencias significativas. El incremento en la conversión al aumentar la concentración de enzima a  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  probablemente era resultado de la mayor cantidad de proteína cargada en la membrana (Tabla 9), que a su vez provocaba un menor flujo de permeado (Figura 16b).

Se decidió descartar la concentración de  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  ya que el incremento de la conversión de naringina, de apenas un  $6\%$ , no compensaba el incremento del tiempo total necesario para la inmovilización (incluyendo los lavados) de  $3,6$ ;  $5,3$  y  $6,7 \text{ h}$  para  $0,2$ ;  $0,3$  y  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Por otra parte, se descartó también la concentración de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  debido a la alta variabilidad de los resultados durante la reacción (flujo de permeado y conversión), junto con que la cantidad de enzima cargada era menor que a  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ , lo que implicaba, a priori, una menor efectividad de cara a la aplicación en zumo natural.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de enzima de  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  para las experiencias siguientes.

#### ***4.1.2.3. Efecto del pH de inmovilización sobre el rendimiento de inmovilización y la conversión de naringina***

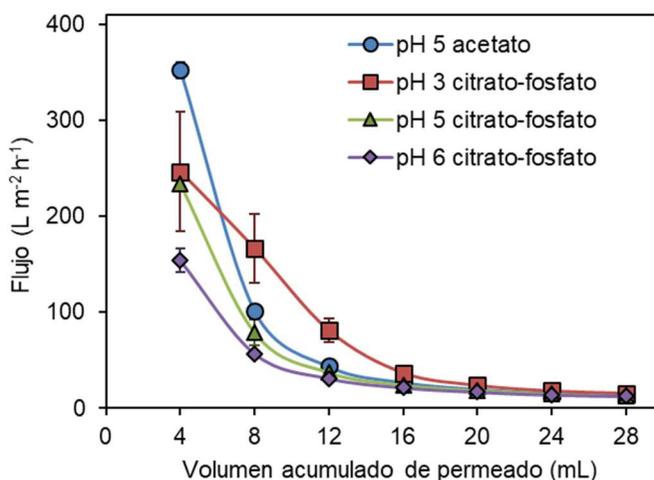
##### *4.1.2.3.1. Efecto sobre el rendimiento de inmovilización*

El ensuciamiento de membrana, generalmente, se ve muy afectado por el pH de la solución ya que condiciona la carga y la hidrofiliidad de los solutos de la disolución y de la membrana (Luo y Wan, 2013). Es por esta razón, por la que se decidió estudiar el efecto de diferentes valores de pH,  $3$ ,  $5$  y  $6$ , sobre la inmovilización de naringinasa mediante ensuciamiento inducido. Para este estudio, se empleó tampón citrato-fosfato, ya que el tampón acetato, hasta ahora utilizado, tiene un rango de tamponamiento muy limitado ( $3,8-5,6$ ) que no incluye el rango de pH objeto de estudio.

El efecto del pH sobre los flujos de permeado durante la inmovilización se recoge en la Figura 17. Las curvas para el tampón citrato-fosfato muestran que el flujo inicial era inferior para pH  $6$  ( $154 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y se incrementaba a pH  $3$  y  $5$ , entre los que no había diferencia significativa ( $247$  y  $234 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). La caída del flujo de permeado era mucho más suave a pH  $3$ , indicando un menor ensuciamiento, y daba lugar a una disminución del tiempo de operación,  $38 \text{ min}$  frente a  $51$  y  $56 \text{ min}$  para pH  $5$  y  $6$ , respectivamente.

En la Figura 17 también se puede observar la comparativa para el flujo de permeado entre el tampón acetato y el citrato-fosfato a pH  $5$ . El flujo inicial de permeado aumentaba para el tampón acetato con respecto al citrato-fosfato ( $352$  y  $234 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,

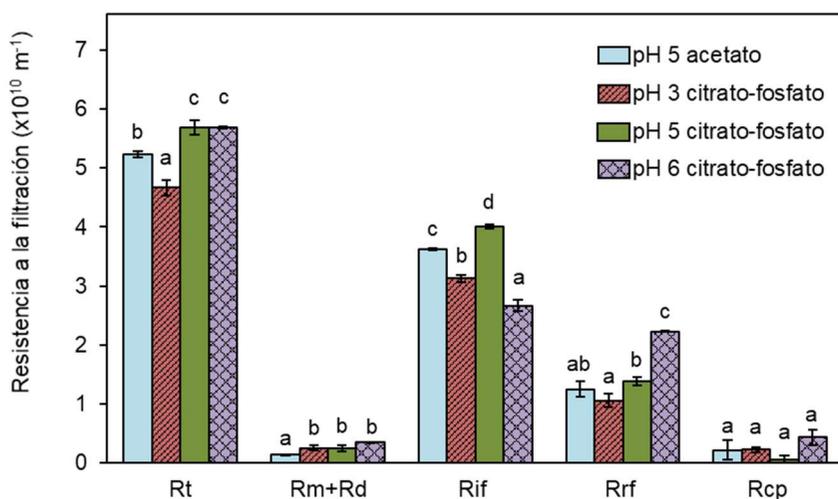
respectivamente) debido a la mayor permeabilidad inicial de la membrana (en ausencia de enzima) (apartado 3.1).



**Figura 17.** Efecto del pH sobre el flujo de permeado durante la inmovilización. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima.

El efecto del pH sobre las resistencias a la filtración se detalla en la Figura 18 y Tabla 10. Analizando los resultados para el tampón citrato-fosfato, se observa que no había diferencias significativas en la  $R_t$  entre pH 5 y 6, mientras que decrecía a pH 3. Esto concuerda con los resultados encontrados para el flujo de permeado, cuya caída era más suave a pH 3. Por otra parte, la resistencia irreversible era mayor a pH 5 (Figura 18) indicando que el tipo de ensuciamiento era más estable a este pH. Destaca, también, el incremento en la  $R_{rf}$  a pH 6, sugiriendo un ensuciamiento más inestable. Finalmente, se observa que al cambiar el tampón acetato a citrato a pH 5, se veían incrementadas la resistencia total, al disolvente y la resistencia irreversible.

Los resultados obtenidos sugieren que a pH 5 se producía mayor ensuciamiento de la enzima en la membrana de ultrafiltración (descenso del flujo más acusado) y que, además, era más estable ya que se observaba un incremento significativo de la resistencia irreversible con respecto a los otros pHs. Esto podría deberse a que a pH 5 la naringinasa se encuentra próxima a su punto isoeléctrico (pI) (Ono *et al.*, 1978), por lo que su carga era mayoritariamente neutra, de forma que la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína era mínima, facilitando la adsorción (She *et al.*, 2009; Lim y Mohammad, 2010). Huisman *et al.* (2000) y Wang y Tang (2011) estudiaron el efecto del pH del medio al filtrar soluciones de BSA a través de membranas de ultrafiltración y nanofiltración, respectivamente, observando que el flujo de permeado decrecía más rápido cuando el pH se encontraba próximo al pI de la proteína.



**Figura 18.** Efecto del pH sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima. Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas (ANOVA; p<0,05) entre los diferentes tampones para cada tipo de resistencia.

**Tabla 10.** Efecto del pH sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.<sup>1</sup>

	pH 5-acetato	pH 3-citrato	pH 5-citrato	pH 6-citrato
R <sub>t</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	5,23 ± 0,05	4,66 ± 0,13	5,68 ± 0,13	5,68 ± 0,02
R <sub>m</sub> + R <sub>d</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,003	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,05	0,35 ± 0,006
R <sub>if</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	3,62 ± 0,03	3,13 ± 0,06	4,00 ± 0,04	2,67 ± 0,10
R <sub>rf</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	1,25 ± 0,13	1,05 ± 0,11	1,38 ± 0,13	2,23 ± 0,002
R <sub>cp</sub> (x10 <sup>10</sup> m <sup>-1</sup> )	0,22 ± 0,16	0,22 ± 0,04	0,05 ± 0,08	0,43 ± 0,13
(R <sub>m</sub> + R <sub>d</sub> ) / R <sub>t</sub> (%)	2,7 ± 0,1	5,5 ± 0,7	4,3 ± 0,9	6,2 ± 0,1
R <sub>if</sub> / R <sub>t</sub> (%)	69,3 ± 0,2	67,1 ± 3,2	70,4 ± 1,0	46,9 ± 1,9
R <sub>rf</sub> / R <sub>t</sub> (%)	23,8 ± 2,8	22,6 ± 1,8	24,3 ± 0,6	39,3 ± 0,2
R <sub>cp</sub> / R <sub>t</sub> (%)	4,1 ± 3,1	4,8 ± 0,8	1,0 ± 1,3	7,6 ± 2,2

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima.

Por otra parte, Luo *et al.* (2014a) en su estudio sobre el efecto de las condiciones de la alimentación en la inmovilización de alcohol deshidrogenasa mediante ensuciamiento inducido encontraron un comportamiento frente al pH muy similar a la inmovilización de naringinasa, observando también un aumento de las resistencias total e irreversible a pH 5 (frente a pH 7 y 9) y un descenso del flujo más acusado a este pH.

Los rendimientos de inmovilización obtenidos para los diferentes pHs se recogen en la Tabla 11. Se puede observar que el incremento del pH de 3 a 5 no afectaba al RI (93 y 92%, respectivamente). Sin embargo, disminuía al incrementar el pH hasta 6 (80%) debido fundamentalmente a la aparición de enzima en los lavados, en consonancia con el incremento de la resistencia reversible. La modificación del tampón acetato a citrato no afectaba tampoco al RI (no se detectaron diferencias significativas).

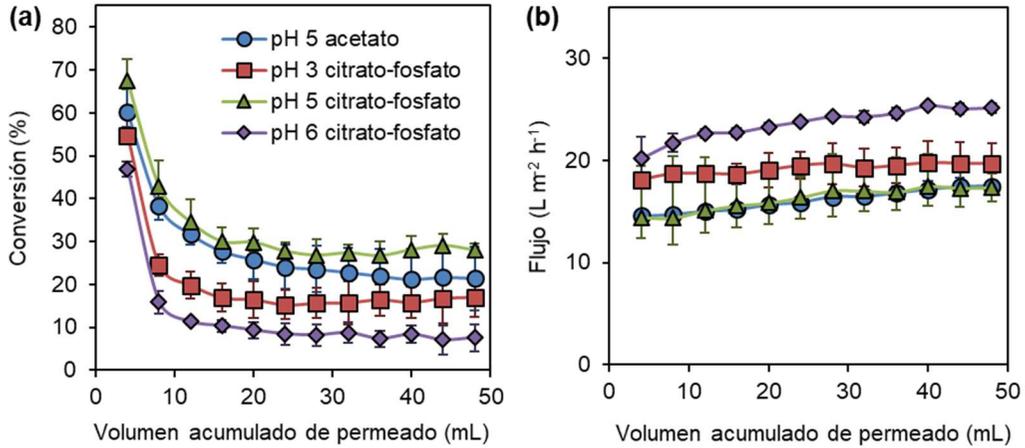
**Tabla 11.** Efecto del pH de inmovilización sobre el rendimiento de inmovilización (RI).<sup>1</sup>

Tampón	Cantidad de enzima (mg)					RI (%) <sup>2</sup>
	Alimentación	Permeado	Lavado	Retenido	Carga	
Acetato						
pH 5	6,06 ± 0,42	ND <sup>5</sup>	ND	0,77 ± 0,26	5,11 ± 0,34	87,3 ± 3,5 <sup>ab</sup>
Citrato						
pH 3	8,81 ± 0,27	ND	ND	0,60 ± 0,12	8,22 ± 0,19	93,3 ± 0,9 <sup>b</sup>
pH 5	8,80 ± 0,15	ND	ND	0,67 ± 0,01	8,13 ± 0,15	92,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
pH 6	8,86 ± 0,47	0,15 ± 0,04	0,95 ± 0,35	0,65 ± 0,22	7,12 ± 0,24	80,4 ± 4,5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima. <sup>2</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>ND= no detectada.

#### 4.1.2.3.2. Efecto sobre la conversión de naringina

La capacidad de conversión de naringina se veía también afectada por el pH de inmovilización (Figura 19a). La reducción de naringina a lo largo de todo el proceso de reacción era mayor a pH 5, alcanzándose un grado total de conversión de  $33,7 \pm 2,7\%$ . Esto se explica por la mayor cantidad de enzima inmovilizada (Tabla 11), y por el menor flujo de permeado (Figura 19b) que favorece el contacto entre enzima y sustrato, incrementándose la hidrólisis enzimática. A pH 3 la reducción de naringina por el REM era menor consiguiéndose un grado total de conversión de  $20,4 \pm 2,9\%$ . La peor eficacia de conversión se obtenía a pH 6, probablemente debido a la menor cantidad de enzima inmovilizada, obteniéndose un grado total de conversión de sólo el  $12,4 \pm 1,7\%$ . Además, el grado total de conversión de naringina era ligeramente inferior cuando se empleaba tampón acetato ( $28,8 \pm 3,5\%$ ), mientras que el flujo de permeado no se veía afectado.



**Figura 19.** Efecto del pH de inmovilización sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima.

A pesar de que se obtenían mejores resultados de conversión de naringina con el tampón citrato-fosfato, se descartó este medio porque originaba precipitaciones que podían afectar negativamente a la operatividad del REM. Por tanto, se seleccionó el tampón acetato 0,2 M a pH 5 para la inmovilización de naringinasa por ensuciamiento inducido.

#### 4.1.3. Estudio del mecanismo de ensuciamiento inducido en la inmovilización de naringinasa

El modelo de Hermia establece cuatro ecuaciones (apartado 3.8, Tabla 3) para describir los cuatro modelos básicos de ensuciamiento de membrana: bloqueo completo, bloqueo estándar, bloqueo intermedio, y formación de torta. Ajustando los datos empíricos a los modelos teóricos y comparando los coeficientes de correlación R<sup>2</sup>, se puede establecer qué modelo se ajusta mejor al proceso de filtración.

Los coeficientes de regresión (R<sup>2</sup>) obtenidos para cada mecanismo teórico de ensuciamiento en función del tamaño de poro (10 y 30 kDa) y la configuración de la membrana (reversa y normal) y para los diferentes parámetros de inmovilización se recogen en las Tablas 12 y 13. Los resultados muestran que en todas las experiencias realizadas el mecanismo de ensuciamiento más probable era el bloqueo de poro intermedio, ya que se obtuvo para este modelo el mejor ajuste de los datos experimentales (R<sup>2</sup>=1,000).

**Tabla 12.** Coeficiente de correlación ( $R^2$ ) para el ajuste de los datos experimentales a los modelos teóricos de ensuciamiento propuestos por Hermia en función del tamaño de poro y la configuración de la membrana.<sup>1</sup>

Membrana	Bloqueo completo n = 2	Bloqueo estándar n = 1,5	Bloqueo intermedio n = 1	Formación de torta n = 0
Biomax 10 Reverso	0,8507	0,9675	1,000	0,9406
Biomax 30 Reverso	0,8537	0,9660	1,000	0,9343
Biomax 10 Normal	0,9873	0,9969	1,000	0,9880

<sup>1</sup>Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima, tampón acetato a pH 5.

**Tabla 13.** Coeficiente de correlación ( $R^2$ ) para el ajuste de los datos experimentales a los modelos teóricos de ensuciamiento propuestos por Hermia en función de los parámetros de inmovilización: presión transmembrana (TMP), concentración de enzima ([E]) y pH.<sup>1</sup>

TMP (bar)	[E] (g L <sup>-1</sup> )	pH	Bloqueo completo n = 2	Bloqueo estándar n = 1,5	Bloqueo intermedio n = 1	Formación de torta n = 0
1	0,2	5	0,9380	0,9851	1,000	0,9590
2	0,2	5	0,8792	0,9722	1,000	0,9423
3	0,2	5	0,8710	0,9700	1,000	0,9374
2	0,3	5	0,8507	0,9675	1,000	0,9406
2	0,4	5	0,8454	0,9664	1,000	0,9407
2	0,3	3*	0,9080	0,9786	1,000	0,9510
2	0,3	5*	0,8688	0,9703	1,000	0,9400
2	0,3	6*	0,8971	0,9766	1,000	0,9494

<sup>1</sup>Condiciones: membrana de polietersulfona de 10 kDa en configuración reversa. \*Tampón citrato-fosfato. Para el resto de las experiencias se utilizó tampón acetato.

Que el mecanismo de ensuciamiento más probable fuera el bloqueo de poro intermedio, indicaba que la naringinasa podía producir un bloqueo de poro y también depositarse sobre la superficie de la membrana. Este mecanismo de ensuciamiento es menos estable que el bloqueo completo o el estándar. Sin embargo, puede ser el más efectivo a la hora de inmovilizar enzimas porque al no quedar completamente obturados

los poros de la membrana, se podría facilitar el paso del sustrato y del producto favoreciendo la actividad catalítica del REM.

No se han encontrado referencias previas sobre el efecto de las condiciones de inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración. Sin embargo, existen estudios del efecto sobre los mecanismos de bloqueo de poro que tiene la modificación de las condiciones de operación en la inmovilización de alcohol deshidrogenasa. En este sentido, Luo *et al.* (2014a) indicaron que el mecanismo de ensuciamiento dominante se veía modificado al cambiar la concentración de enzima y el pH, pero no se modificaba con la TMP. Por otra parte, Luo *et al.* (2014b) encontraron que el tipo de bloqueo de poro más probable dependía tanto de las características de la membrana (tamaño de poro y material), como de la configuración.

## **4.2. Inmovilización de naringinasa por ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído**

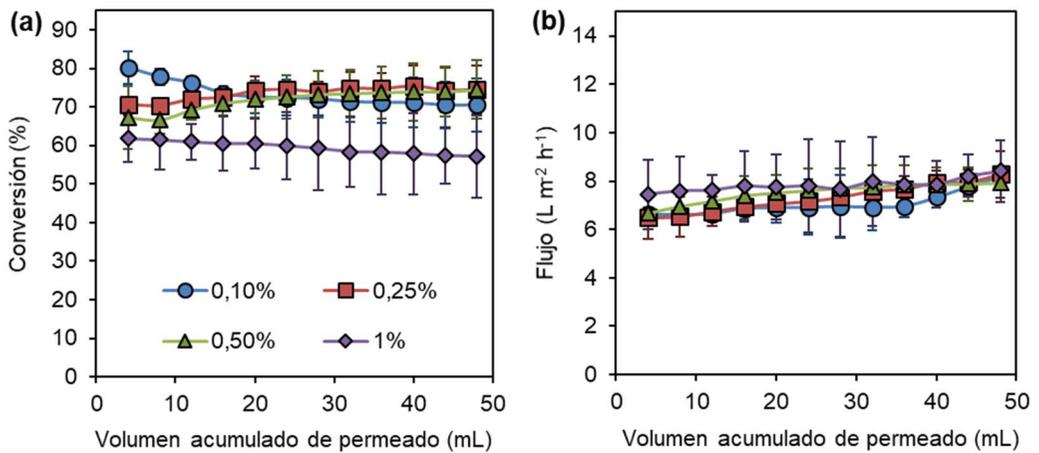
El ensuciamiento inducido como estrategia para la inmovilización de enzimas en membranas de ultrafiltración presenta como principal inconveniente la posibilidad de desorción de la enzima, como se ha constatado en las pruebas precedentes (apartado 4.1.1). Para minimizar estos efectos y en un intento de mejorar los rendimientos de efectividad catalítica del REM, se ha utilizado como estrategia el entrecruzamiento, con el reactivo bifuncional glutaraldehído, de las moléculas de enzimas ubicadas en el interior de los poros o en la superficie de la membrana con el fin de dificultar su liberación (Yujun *et al.*, 2008).

### **4.2.1. Efecto de la adición de glutaraldehído sobre la conversión de naringina**

La inmovilización se llevó a cabo en las condiciones previamente seleccionadas para el ensuciamiento inducido: membrana Biomax de 10 kDa en modo reverso, 2 bar de presión, solución de naringinasa 0,3 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato a pH 5. Una vez retenida la naringinasa en la membrana se entrecruzó con diferentes soluciones de glutaraldehído (0,10; 0,25; 0,50 y 1%). Debido al propio proceso de inmovilización (apartado 3.3) que implicaba la filtración completa de la alimentación, junto con la no detección de proteína ni en los permeados ni en los lavados, podría considerarse que quedaba retenida en la membrana la totalidad de la proteína enzimática.

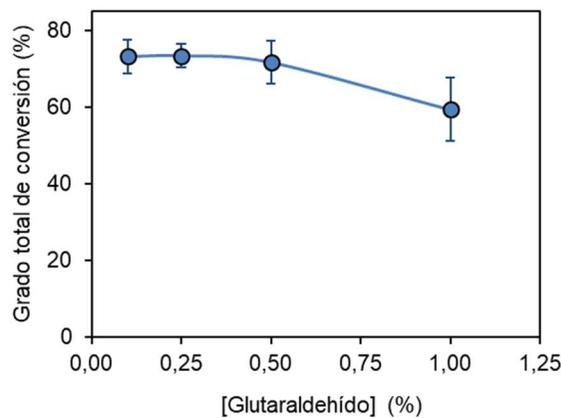
En los REM obtenidos a las diferentes concentraciones de glutaraldehído se llevó a cabo el estudio de la evolución en la conversión de naringina y del flujo de permeado al aplicar 50 mL de este sustrato (0,8 g L<sup>-1</sup>) en tampón acetato a pH 5 y presión de 0,25 bar. En la Figura 20 se puede observar que, a lo largo del proceso y para todas las

concentraciones de glutaraldehído, la conversión de naringina se mantenía relativamente estable, al igual que los flujos de permeado, a diferencia del comportamiento observado del REM con la enzima inmovilizada solo por ensuciamiento inducido (apartado 4.1, Figura 19). Además, se comprobó que durante el proceso se liberaba de la membrana tan sólo un 7,3% de naringinasa, en comparación con el 39,5% obtenido sin la reticulación con glutaraldehído.



**Figura 20.** Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM.

El grado total de conversión de naringina obtenida en cada uno de los REM, diferenciados en la concentración de glutaraldehído utilizada a la hora de inmovilizar la enzima, se representa en la Figura 21. Aunque del ANOVA se desprende que no había



**Figura 21.** Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre el grado total de conversión de naringina en el REM.

diferencias significativas al modificar la concentración de glutaraldehído ( $p>0,05$ ), los valores de conversión obtenidos para las concentraciones de 0,1; 0,25 y 0,50% oscilaban entre 71-73%, mientras que al incrementar la concentración hasta el 1% el valor medio de conversión descendía hasta el 59%. En base a estos resultados y teniendo en cuenta que con la concentración de glutaraldehído al 0,1% la conversión de naringina presentaba una tendencia descendente (Figura 20) y por encima del 0,25% no se mejoraba la hidrólisis de naringina, se seleccionó la concentración de glutaraldehído del 0,25% como óptima para la inmovilización de la enzima.

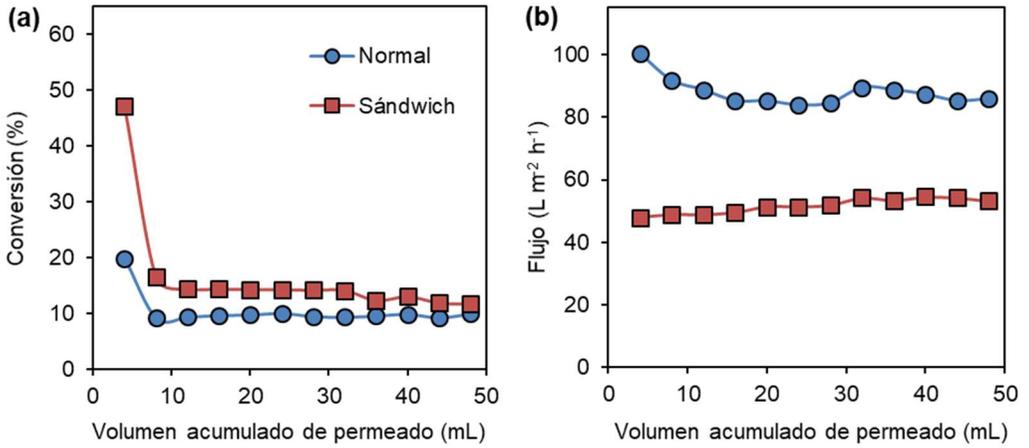
### 4.3. Inmovilización en membranas funcionalizadas con polietilenimina

Durante este bloque de experiencias se procedió al diseño y estudio de un nuevo REM con actividad naringinasa, utilizando la membrana Biomax de 10 kDa funcionalizada previamente con PEI, como se detalla en el apartado 3.4 de este Capítulo. Con este procedimiento, la enzima interaccionaba con la PEI mediante enlaces iónicos formando agregados PEI-naringinasa en la superficie de la membrana. Una vez fijada la enzima, se sometía el sistema a tratamiento con glutaraldehído al 0,2 % para provocar el entrecruzamiento entre las moléculas de enzima y, por tanto, una mayor fijación.

Como consecuencia de las interferencias del reactivo PEI con la metodología de cuantificación de proteína enzimática no se pudieron obtener datos concretos del rendimiento de inmovilización.

En el proceso de hidrólisis enzimática de naringina se dispusieron las membranas con la enzima inmovilizada en configuración normal y sándwich. La conversión de naringina frente al volumen acumulado de permeado se muestra en la Figura 22a. Se observa que, para las dos configuraciones utilizadas, la capacidad de conversión caía drásticamente en los primeros mililitros de permeado. Esto podría indicar que se producía una rápida desorción y/o inactivación de la enzima en este sistema de membrana. El mejor rendimiento para el REM se obtuvo para la configuración de tipo sándwich, como consecuencia directa del mayor tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato. En esta configuración la solución de sustrato tenía que atravesar dos membranas, incrementando la resistencia a la filtración y, por tanto, el tiempo de interacción enzima-sustrato. En concreto, la configuración sándwich presentaba una velocidad de permeación menor (Figura 22b), con un tiempo de duración total del proceso de catálisis de 42 min, frente a los 25 min con el modo normal.

El grado total de conversión alcanzado por este REM fue de  $10,5 \pm 0,2\%$  y  $16,6 \pm 0,7\%$  para la configuración normal y tipo sándwich, respectivamente, inferior al alcanzado en la inmovilización mediante ensuciamiento inducido, y ensuciamiento con entrecruzamiento con glutaraldehído.



**Figura 22.** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado para el reactor de membrana funcionalizada con PEI.

## 5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que derivan de los resultados obtenidos en este capítulo de la Tesis Doctoral son:

1. La técnica de ensuciamiento inducido resulta adecuada para la inmovilización de naringinasa en membranas de ultrafiltración de polietersulfona. Los mayores rendimientos de inmovilización (87%) se obtienen con las membranas de 10 kDa (Biomax 10) en modo reverso a 2 bar, 0,3 g L<sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. El REM alcanza un grado total de conversión de naringina del 29%.
2. La inmovilización de naringinasa mediante ensuciamiento inducido se ajusta al modelo de bloqueo de poro descrito por Hermia.
3. La reticulación de la enzima inmovilizada por ensuciamiento inducido con glutaraldehído reduce la desorción de la enzima y mejora la hidrólisis de naringinasa en el REM, alcanzándose un grado total de conversión del 71-73% para una concentración del 0,25% del reactivo bifuncional.
4. La inmovilización de naringinasa en membranas funcionalizadas con polietilenimina (PEI) reduce su capacidad catalítica, obteniéndose en el REM sólo un 17% de conversión de la naringina.

## 6. REFERENCIAS

- Albayrak, N. y Yang, S. T. (2002). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnology Progress*, 18(2), pp. 240-251.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
- Cen, Y. K., Liu, Y. X., Xue, Y. P. y Zheng, Y. G. (2019). Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, en prensa.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S. y Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), pp. 43-48.
- Corbatón-Báguena, M. J., Gugliuzza, A., Cassano, A., Mazzei, R. y Giorno, L. (2015). Destabilization and removal of immobilized enzymes adsorbed onto polyethersulfone ultrafiltration membranes by salt solutions. *Journal of Membrane Science*, 486, pp. 207-214.
- Davis, W. B. (1947). Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry*, 19(7), pp. 476-478.
- Guo, W., Ngo, H. H. y Li, J. (2012). A mini-review on membrane fouling. *Bioresource Technology*, 122, pp. 27-34.
- Hermia, J. (1982). Constant pressure blocking filtration laws-application to power-law non-Newtonian fluids. *Transactions Institution of Chemical Engineers*, 60(3), pp. 183-187.
- Ho, C. C. y Zydney, A. L. (1999). Effect of membrane morphology on the initial rate of protein fouling during microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 155(2), pp. 261-275.
- Huang, H., Spinette, R. y O'Melia, C. R. (2008). Direct-flow microfiltration of aquasols. I. Impacts of particle stabilities and size. *Journal of Membrane Science*, 314(1-2), pp. 90-100.
- Huisman, I. H., Prádanos, P. y Hernández, A. (2000). The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 179(1-2), pp. 79-90.
- Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L. y Dejonghe, W. (2011). Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: Status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs). *Green Chemistry*, 13(7), pp. 1609-1623.
- Lim, Y. P. y Mohammad, A. W. (2010). Effect of solution chemistry on flux decline during high concentration protein ultrafiltration through a hydrophilic membrane. *Chemical Engineering Journal*, 159(1-3), pp. 91-97.

- Luo, J. y Wan, Y. (2013). Effects of pH and salt on nanofiltration-a critical review. *Journal of Membrane Science*, 438, pp. 18-28.
- Luo, J., Meyer, A. S., Jonsson, G. y Pinelo, M. (2013). Fouling-induced enzyme immobilization for membrane reactors. *Bioresource Technology*, 147, pp. 260-268.
- Luo, J., Marpani, F., Brites, R., Frederiksen, L., Meyer, A. S., Jonsson, G. y Pinelo, M. (2014a). Directing filtration to optimize enzyme immobilization in reactive membranes. *Journal of Membrane Science*, 459, pp. 1-11.
- Luo, J., Meyer, A. S., Jonsson, G. y Pinelo, M. (2014b). Enzyme immobilization by fouling in ultrafiltration membranes: Impact of membrane configuration and type on flux behavior and biocatalytic conversion efficacy. *Biochemical Engineering Journal*, 83, pp. 79-89.
- Millipore (2019). *Ultrafiltration membranes for macromolecule processing*. Disponible en: [http://www.merckmillipore.com/ES/es/products/ivd-oem-materials-reagents/oem-membranes/ultrafiltration-oem-membranes/qLCb.qB.Ek4AAAE\\_jAd3.Lxj,nav](http://www.merckmillipore.com/ES/es/products/ivd-oem-materials-reagents/oem-membranes/ultrafiltration-oem-membranes/qLCb.qB.Ek4AAAE_jAd3.Lxj,nav) (Consultado: 30 de agosto de 2019).
- Ono, M., Tosa, T. y Chibata, I. (1978). Preparation and properties of immobilized naringinase using tannin-aminohexyl cellulose. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), pp. 1847-1853.
- Prazeres, D. M. F. y Cabral, J. M. S. (1994). Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(9), pp. 738-750.
- Puri, M. y Kalra, S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), pp. 753-758.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D. y Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors - A review. *Journal of Membrane Science*, 242, pp. 189-196.
- Sen, D., Sarkar, A., Gosling, A., Gras, S. L., Stevens, G. W., Kentish, S. E., Bhattacharya, P. K., Barber, A. R. y Bhattacharjee, C. (2011). Feasibility study of enzyme immobilization on polymeric membrane: A case study with enzymatically galacto-oligosaccharides production from lactose. *Journal of Membrane Science*, 378(1-2), pp. 471-478.
- She, Q., Tang, C. Y., Wang, Y. N. y Zhang, Z. (2009). The role of hydrodynamic conditions and solution chemistry on protein fouling during ultrafiltration. *Desalination*, 249(3), pp. 1079-1087.
- Wang, Y. N. y Tang, C. Y. (2011). Protein fouling of nanofiltration, reverse osmosis, and ultrafiltration membranes-The role of hydrodynamic conditions, solution chemistry, and membrane properties. *Journal of Membrane Science*, 376(1-2), pp. 275-282.
- Yujun, W., Jian, X., Guangsheng, L. y Youyuan, D. (2008). Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. *Bioresource Technology*, 99(7), pp. 2299-2303.

Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Xu, L., Wu, S. y Li, X. (2017). Purification and characterization of a naringinase from a newly isolated strain of *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 suitable for the transformation of flavonoids. *Food Chemistry*, 214, pp. 39-46.



## **ABREVIATURAS**

ANOVA	Análisis de la varianza
BSA	“Bovine serum albumin”
CP	Polarización por concentración
GA	Glutaraldehído
MWCO	Peso molecular de corte
PEI	Polietilenimina
PES	Polietersulfona
pI	Punto isoelectrico
REM	Reactor enzimático de membrana
RI	Rendimiento de inmovilización
TMP	“Transmembrane pressure”
UF	Ultrafiltración



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representación esquemática de las conexiones entre los mecanismos de ensuciamiento de membrana y las estrategias de inmovilización (Luo <i>et al.</i> , 2014b).....	118
<b>Figura 2</b>	Representación esquemática del proceso de ensuciamiento inducido en la inmovilización de enzimas para la configuración de membrana en (a) modo normal y (b) reverso. Cb: concentración de enzima en el seno de la disolución; Cm: concentración de enzima en la capa fina de la membrana, CP: polarización por concentración (Luo <i>et al.</i> , 2013).....	119
<b>Figura 3</b>	Esquema de las configuraciones de membrana para la inmovilización enzimática y reacción catalítica. Adaptado de Luo <i>et al.</i> (2014b).....	119
<b>Figura 4</b>	Efectos de los parámetros del proceso, presión transmembrana (TMP), concentración de enzima y pH, sobre el comportamiento de las enzimas durante la inmovilización por ensuciamiento inducido. Adaptado de Luo <i>et al.</i> (2014a).....	120
<b>Figura 5</b>	Celda de ultrafiltración modelo Amicon® 8050 .....	122
<b>Figura 6</b>	Inmovilización de enzimas mediante enlace iónico en membranas recubiertas con polietilenimina (PEI) y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído (GA). Adaptado de Albayrak y Yang (2002).....	126
<b>Figura 7</b>	Ejemplo de recta de calibrado para la cuantificación de la concentración de naringinasa.....	130
<b>Figura 8</b>	Efecto del tamaño de poro y la configuración de la membrana sobre el flujo de permeado durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5.....	134
<b>Figura 9</b>	Efecto del tamaño de poro y la configuración de membrana sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. Letras minúsculas diferentes (a-b) indican diferencias significativas (t-student: $p < 0,05$ ) entre los diferentes tamaños de poro para cada tipo de resistencia. Letras griegas diferentes ( $\alpha$ - $\beta$ ) indican diferencias significativas (t-student: $p < 0,05$ ) entre las diferentes configuraciones para cada tipo de resistencia.....	135

<b>Figura 10</b>	Efecto del tamaño de poro y la configuración de la membrana sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5 ..... 137
<b>Figura 11</b>	Efecto de la presión transmembrana sobre el flujo de permeado durante la inmovilización de naringinasa mediante ensuciamiento inducido. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5 ..... 139
<b>Figura 12</b>	Efecto de la presión transmembrana sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas (ANOVA; <i>p</i> <0,05) entre las diferentes presiones para cada tipo de resistencia ..... 140
<b>Figura 13</b>	Efecto de la presión transmembrana de inmovilización sobre (a) la conversión de naringina y el (b) flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 0,2 g L <sup>-1</sup> de enzima y tampón acetato a pH 5 ..... 142
<b>Figura 14</b>	Efecto de la concentración de enzima sobre el flujo de permeado en la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5 ..... 143
<b>Figura 15</b>	Efecto de la concentración de enzima sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas (ANOVA; <i>p</i> <0,05) entre las diferentes concentraciones para cada tipo de resistencia ..... 143
<b>Figura 16</b>	Efecto de la concentración de enzima sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar y tampón acetato a pH 5 ..... 145
<b>Figura 17</b>	Efecto del pH sobre el flujo de permeado durante la inmovilización. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima ..... 147
<b>Figura 18</b>	Efecto del pH sobre las resistencias a la filtración durante la inmovilización de naringinasa. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima. Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas (ANOVA; <i>p</i> <0,05) entre los diferentes tampones para cada tipo de resistencia ..... 148

<b>Figura 19</b>	Efecto del pH de inmovilización sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM. Parámetros de inmovilización: membrana de 10 kDa en modo reverso, 2 bar, 0,3 g L <sup>-1</sup> de enzima.....	150
<b>Figura 20</b>	Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre (a) la conversión de naringina y (b) el flujo de permeado en el REM .....	153
<b>Figura 21</b>	Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre el grado total de conversión de naringina en el REM.....	153
<b>Figura 22</b>	(a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado para el reactor de membrana funcionalizada con PEI .....	155



## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Características de las membranas de ultrafiltración utilizadas (Millipore, 2019).....	122
<b>Tabla 2</b>	Permeabilidad (Lp) de las membranas Biomax 10 y 30 a diferentes disolventes, agua miliQ, tampón acetato 0,2 M pH 5 y tampón citrato-fosfato pH 3, 5 y 6.....	124
<b>Tabla 3</b>	Descripción matemática y esquemática de los cuatro modelos empíricos de ensuciamiento de membrana. Adaptado de Luo <i>et al.</i> (2013).....	132
<b>Tabla 4</b>	Efecto del tamaño de poro y la configuración de membrana sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.....	136
<b>Tabla 5</b>	Efecto del peso molecular de corte y configuración de la membrana sobre el rendimiento de inmovilización (RI).....	136
<b>Tabla 6</b>	Efecto de la presión transmembrana sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.....	140
<b>Tabla 7</b>	Efecto de la presión transmembrana (TMP) sobre el rendimiento de inmovilización (RI).....	141
<b>Tabla 8</b>	Efecto de la concentración de enzima sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.....	144
<b>Tabla 9</b>	Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de inmovilización (RI).....	145
<b>Tabla 10</b>	Efecto del pH sobre las resistencias calculadas mediante el modelo de resistencias en serie para la inmovilización de naringinasa.....	148
<b>Tabla 11</b>	Efecto del pH de inmovilización sobre el rendimiento de inmovilización (RI).....	149
<b>Tabla 12</b>	Coefficiente de correlación ( $R^2$ ) para el ajuste de los datos experimentales a los modelos teóricos de ensuciamiento propuestos por Hermia en función del tamaño de poro y la configuración de la membrana.....	151

<b>Tabla 13</b>	Coefficiente de correlación ( $R^2$ ) para el ajuste de los datos experimentales a los modelos teóricos de ensuciamiento propuestos por Hermia en función de los parámetros de inmovilización: presión transmembrana (TMP), concentración de enzima ([E]) y pH.....	151
-----------------	---	-----

**Aplicación de naringinasa  
inmovilizada para la reducción  
del amargor en zumo de pomelo**



## **Capítulo IV: Aplicación de naringinasa inmovilizada para la reducción del amargor en zumo de pomelo**

<b>1. ZUMO DE POMELO. ELIMINACIÓN DEL AMARGOR Y PROCESADO INDUSTRIAL.....</b>	<b>174</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>177</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>178</b>
3.1. Aplicación de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG .....	178
3.2. Aplicación del REM con naringinasa inmovilizada.....	178
3.3. Extracción y caracterización del zumo de pomelo.....	179
3.3.1.Extracción de zumo de pomelo.....	179
3.3.2.Determinación cuantitativa de flavonoides totales .....	179
3.3.3.Determinación de °Brix y pH.....	179
3.3.4.Determinación de la acidez titulable.....	180
3.3.5.Medida del color y la turbidez .....	180
3.3.6.Determinación de la capacidad antioxidante total. Método ABTS.....	180
3.4. Tratamiento estadístico de los datos .....	182
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>183</b>
4.1. Aplicación de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG para la reducción del amargor.....	183
4.1.1.Reducción del contenido de naringina en medio tamponado .....	183
4.1.2.Reducción del contenido de naringina en zumo sintético.....	184
4.1.3.Reducción del contenido de naringina en zumo natural de pomelo .....	185
4.2. REM con actividad naringinasa para la reducción del amargor.....	188
4.2.1.Reducción del contenido de naringina en medio tamponado .....	188
4.2.2.Reducción del contenido de naringina en zumo sintético.....	190
4.2.3.Reducción del contenido de naringina en zumo natural de pomelo .....	191
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>194</b>

<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>195</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>201</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>203</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>205</b>

El interés creciente por los cítricos y sus zumos se debe a que son una fuente importante de compuestos nutritivos y bioactivos. Destaca su contenido en vitamina C, carotenoides, y compuestos fenólicos, además de poseer diferentes minerales y fibra (Xu *et al.*, 2008). La vitamina C y los carotenoides son reconocidos antioxidantes (Ribeiro *et al.*, 2008) al igual que los flavonoides (Akyildiz y Ağçam, 2014). El alto contenido en antioxidantes hace que los cítricos y sus zumos puedan tener un papel importante en la protección frente a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, la arterioesclerosis y el cáncer (Xu *et al.*, 2008; Aadil *et al.*, 2013; Castro-Vazquez *et al.*, 2016; Barreca *et al.*, 2017; Cirmi *et al.*, 2017; Cristóbal-Luna *et al.*, 2018). Además, diferentes estudios señalan que los flavonoides tienen actividad anti-úlceras, anti-alérgica, antiinflamatoria, analgésica, inmunomoduladora, anti-diarrea, y antitrombótica ya que inhiben la agregación plaquetaria (Borrelli y Izzo, 2000; Yu *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008).

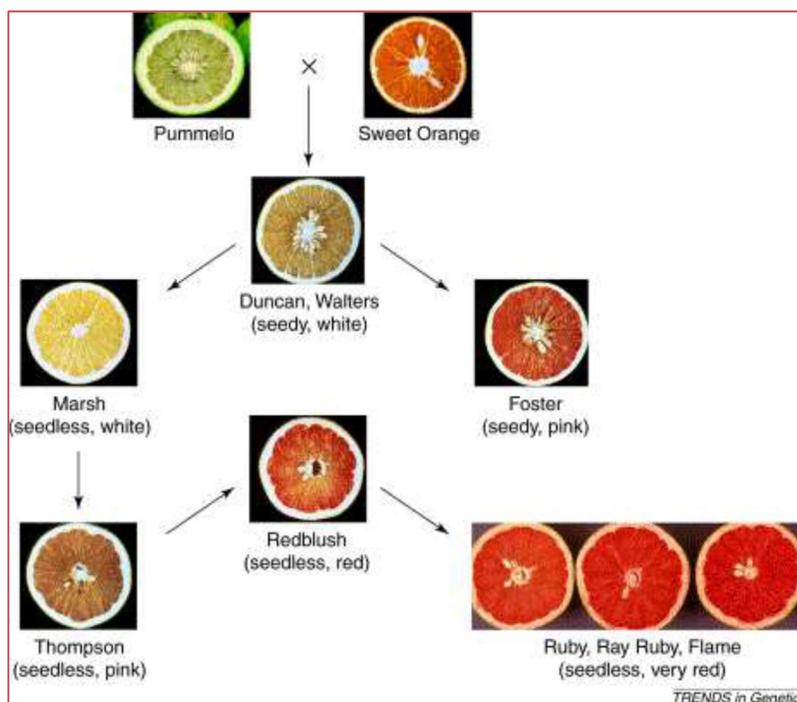
A pesar de las características nutritivas y bioactivas de los zumos de pomelo, su comercialización se encuentra limitada ya que presenta un alto grado de amargor lo que provoca el rechazo del consumidor. A nivel industrial, se emplean resinas de adsorción que son muy eficaces en la eliminación de compuestos amargos pero que tienen el inconveniente de que retiran, también, otros componentes responsables de las características bioactivas y organolépticas de los zumos (Busto *et al.*, 2014). Las técnicas enzimáticas son una alternativa interesante que pueden ayudar a controlar la calidad y mejorar el valor comercial de los zumos (Ribeiro, 2011). En concreto, la naringinasa se puede emplear para la hidrólisis de naringina, principal compuesto responsable del amargor en los zumos de pomelo y naranjas amargas (Ribeiro *et al.*, 2010).

El uso de enzimas solubles implica un gasto continuo y constante, ya que una vez utilizadas, no pueden recuperarse para sucesivas aplicaciones. Por ello, la inmovilización de naringinasa puede resultar muy ventajosa de cara a su aplicación industrial, ya que puede permitir su reutilización y facilitar el procesado en continuo, ahorrando costes.

En este sentido, en el presente capítulo se ha estudiado la aplicabilidad de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG (Capítulo II) y en membranas de ultrafiltración (Capítulo III) para la reducción del amargor en zumos de pomelo.

## 1. ZUMO DE POMELO. ELIMINACIÓN DEL AMARGOR Y PROCESADO INDUSTRIAL

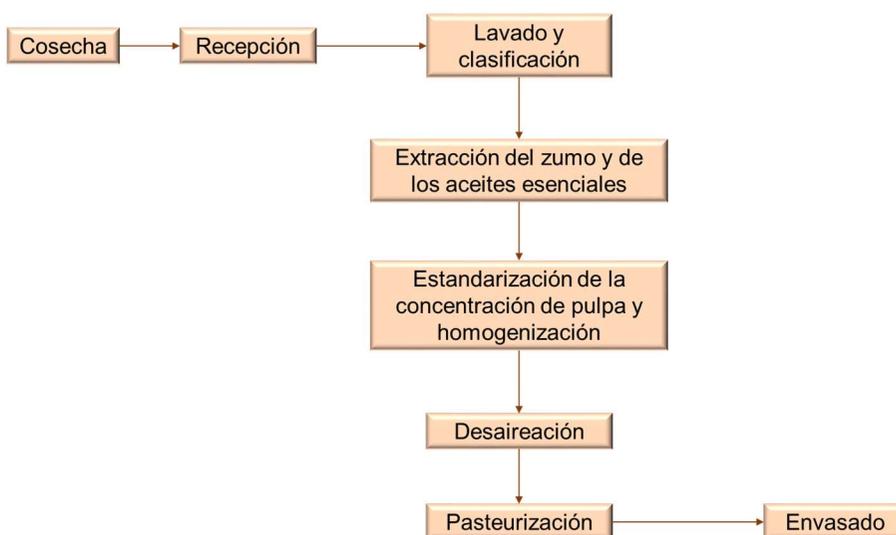
El origen del pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) está en el Caribe, probablemente como resultado de una hibridación natural entre el naranjo dulce y el *pummelo* (una variedad diferente al pomelo). Las diferentes variedades de pomelo han surgido a partir de diversas mutaciones y se pueden clasificar atendiendo a la tonalidad de su pulpa, tal y como se recoge en la Figura 1. Por un lado, están las variedades blancas o comunes que tienen la pulpa de color blanco o amarillo, entre las que se encuentran las variedades Duncan y Marsh Seedless, siendo esta última la más comercializada. Por otro lado, hay variedades pigmentadas, con una pulpa de un tono rojizo, y caracterizadas por un alto contenido en  $\beta$ -caroteno y licopeno que le imprime color rojizo característico. Entre las variedades pigmentadas tenemos la Burgundy, Ruby, Star Ruby, Thomson o Pink Marsh, siendo la Star Ruby la más abundante en el mercado (Akyildiz y Ağçam, 2014).



**Figura 1.** Variedades de pomelos (Moore, 2001).

El procesamiento general de los zumos cítricos como el pomelo (Figura 2) comienza con la cosecha. La selección de frutos que han alcanzado un buen grado de madurez es esencial para conseguir zumos de alta calidad. Tras la cosecha las frutas se transportan

hasta la industria donde son lavadas y clasificadas. Mediante estas operaciones se reduce el nivel de microorganismos que pueden alterar los frutos, se eliminan insectos, se retiran hojas y otros contaminantes que pueden llegar junto a los cítricos, y se separan las frutas dañadas. Posteriormente, se obtiene el zumo con extractores que, en algunos casos, permiten la extracción simultánea de los aceites esenciales y en otros sistemas los aceites se extraen después de la obtención del jugo. A continuación, se retira el exceso de pulpa, los restos de piel y de semillas y se homogeniza el zumo. Además, se desairea el zumo para reducir el contenido en oxígeno evitando la oxidación de compuestos que puede alterar las características organolépticas y antioxidantes del zumo. Finalmente, el zumo se pasteuriza, con el objetivo de inactivar la pectina esterasa que puede alterar la turbidez y provocar la gelación de los zumos de cítricos concentrados, y se almacena a baja temperatura (Akyildiz y Ağçam, 2014).



**Figura 2.** Esquema general del procesado de zumos de cítricos.

La comercialización del zumo de pomelo se encuentra limitada debido a la presencia de componentes naturales que imprimen al producto un fuerte sabor amargo, generando el rechazo del consumidor. El principal responsable del amargor de estos zumos es el flavonoide naringina (Puri y Banerjee, 2000), que puede ser detectado a concentraciones por encima de 300-400 ppm (Soares y Hotchkiss, 1998; Ribeiro *et al.*, 2008). No obstante, cantidades moderadas de este compuesto son deseables ya que contribuye a las propiedades organolépticas y bioactivas del zumo.

En la producción de zumo de pomelo, el esquema general de procesado previamente descrito debe incorporar un paso adicional de eliminación de amargor ya que, a pesar de que se seleccionen los tiempos de recolección y se controlen los

procedimientos de extracción del jugo para minimizar la presencia de naringina, los contenidos finales obtenidos del compuesto amargo pueden superar el nivel umbral de tolerancia del consumidor.

Los métodos tradicionales de eliminación del amargor en la producción industrial de zumos cítricos implican la utilización de técnicas físico-químicas basadas en el empleo de materiales adsorbentes como resinas de poliestireno del tipo Lewait VPOC 1064 MD PH (Stinco *et al.*, 2013) y de materiales acrílicos del tipo Amberlite XAD-7HP (Kranz *et al.*, 2011). Con estos procedimientos se precisa la separación previa del zumo de pulpa, con posterior reconstitución del zumo, y se producen junto con la reducción del amargor pérdidas de compuestos bioactivos y una reducción en la calidad del producto final (Busto *et al.*, 2014). Frente a estas limitaciones, la alternativa biotecnológica basada en la aplicación de naringinasa inmovilizada, a priori, minimizaría la alteración de las características nutricionales y saludables de los zumos, al actuar de manera específica sobre el compuesto amargo y permitiría la reutilización del biocatalizador.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo de este capítulo es la aplicación de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG y en membranas de ultrafiltración para la reducción del amargor en zumos de pomelo. Para alcanzar este objetivo fue necesario:

1. Analizar la capacidad de los biocatalizadores inmovilizados para reducir el contenido de naringina en un medio tamponado, zumo sintético y zumo de pomelo natural.
2. Estudiar la estabilidad operacional de los inmovilizados en criogeles de PVA-PEG y de los REM en medio tamponado, zumo sintético y zumo de pomelo natural.
3. Evaluar la modificación de las características físico-químicas (flavonoides totales, pH, acidez, contenido en sólidos solubles, color y turbidez) y de la capacidad antioxidante (método ABTS) de zumos de pomelo tratados con enzima inmovilizada en criogeles de PVA-PEG y en el REM.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Aplicación de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG

La capacidad para reducir naringina y la estabilidad operacional del inmovilizado de naringinasa de *P. decumbens* en geles de PVA-PEG, desarrollado en el Capítulo II, se estudió en (i) una solución tamponada de naringina (0,8 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M pH 5), (ii) zumo sintético (Capítulo II, apartado 3.5) y (iii) zumo de pomelo natural.

Se emplearon reactores discontinuos en los que se adicionaba 5 mL de sustrato y 0,1 mL de solución de naringinasa (5 g L<sup>-1</sup> para la solución tamponada de naringina y 34 g L<sup>-1</sup> para zumo de pomelo sintético y natural) o la cantidad equivalente de enzima inmovilizada (0,5 ó 3,4 mg enzima g<sup>-1</sup> soporte). La mezcla se incubaba durante 1 h a 50 °C con agitación orbital a 150 rpm, parando la reacción en hielo. Tras detener la reacción en hielo y separar en el caso de la enzima inmovilizada el biocatalizador por filtración, se determinaba la concentración de naringina mediante el método de Davis (1947) (Capítulo II, apartado 3.2).

La determinación de la estabilidad operacional de la naringinasa inmovilizada implicaba su reutilización en ciclos consecutivos de 1 h a 50 °C. Entre cada ciclo, el biocatalizador se lavaba dos veces con 100 mL de tampón acetato 0,2 M (pH 5) durante 15 min en agitación.

#### 3.2. Aplicación del REM con naringinasa inmovilizada

El REM con naringinasa inmovilizada mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído desarrollado en el Capítulo III, se aplicó en una solución tamponada de naringina (0,8 g L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0,2 M pH 5), zumo sintético (Capítulo II, apartado 3.5) y zumo de pomelo natural, para evaluar su capacidad para degradar naringina y su estabilidad operacional.

Se empleaba un proceso de carga por lotes con objeto de mantener estable la temperatura del medio de reacción. En la celda de ultrafiltración, con la membrana catalítica colocada en modo reverso, se cargaban 25 mL de solución tamponada de naringina (0,8 g L<sup>-1</sup>) o de zumo sintético, seguido de dos cargas más de 20 mL. La reacción se llevaba a cabo a 50 °C, 0,25 bar y 100 rpm de agitación. Una vez recogidos 60 mL de permeado (los 5 mL restantes quedaban como retenido) se procedía a lavar la membrana con 30 mL de tampón acetato aplicando una presión de 2 bar a temperatura ambiente. Para zumo de pomelo los volúmenes se reducían a una primera carga de 15 mL seguida de dos cargas de 10 mL, recogiendo al final del proceso un total de 30 mL de permeado.

Concluido el primer ciclo de reacción, la membrana se almacenaba en seco a 4 °C hasta su reutilización en el ciclo siguiente. Antes de cada ciclo, la membrana se humectaba con 10 ml de tampón acetato 0,2 M (pH 5) durante 15 min.

### **3.3. Extracción y caracterización del zumo de pomelo**

El efecto del tratamiento enzimático, sobre las características del zumo de pomelo, se evaluó mediante las siguientes determinaciones analíticas: contenido en flavonoides totales, concentración de sólidos solubles (°Brix), pH, acidez titulable, color, turbidez y capacidad antioxidante total (método ABTS).

#### **3.3.1. Extracción de zumo de pomelo**

Los pomelos de la variedad Star Ruby, adquiridos en un supermercado local, se mantenían a 4 °C hasta que eran procesados. El zumo se extraía con un exprimidor manual y se eliminaban las semillas y los restos más grandes de pulpa con un colador. El zumo obtenido se llevaba a ebullición durante 5 min para inactivar la pectina esterasa que puede alterar la nube del zumo (Tatum y Berry, 1973). Si la concentración de flavonoides totales se encontraba por debajo de 0,5 g L<sup>-1</sup>, se rectificaba con naringina comercial (Sigma) hasta 0,8 g L<sup>-1</sup>.

Para el tratamiento de zumo pomelo en el REM y con el fin de evitar el colapso de la membrana, el zumo pasteurizado se clarificaba mediante centrifugación a 9000 rpm durante 10 min seguido de filtración a vacío a través de un filtro de fibra de vidrio (tipo APFC; 1,2 µm de tamaño de poro, Millipore) para retirar la materia coloidal de mayor tamaño.

#### **3.3.2. Determinación cuantitativa de flavonoides totales**

La determinación de naringina se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Davis (1947). Este método se encuentra detallado en el apartado 3.2 del Capítulo II de esta Tesis Doctoral.

#### **3.3.3. Determinación de °Brix y pH**

La concentración de sólidos solubles en solución se medía por refractometría utilizando un refractómetro Atago 3T. Los resultados se expresaban en °Brix (Brasil *et al.*, 1995). El pH de las muestras se determinaba mediante un pHmetro digital a 20 °C.

### 3.3.4. Determinación de la acidez titulable

La acidez titulable se determinaba mediante valoración de 5 mL de muestra con una solución de NaOH 0,05 M, previamente estandarizada con ftalato ácido de potasio, utilizando fenolftaleína al 1% (p/v) como indicador. La acidez valorable  $C_{H^+}$ , expresada en mmoles de  $H^+$  por L de producto se calculaba mediante la siguiente fórmula (Ec.1):

$$C_{H^+}(\text{mM}) = \frac{1000 \times V_1 \times c}{V_0} \quad (1)$$

donde  $V_0$  es el volumen (mL) de la muestra de análisis,  $V_1$  el volumen (mL) de la solución de hidróxido sódico utilizada para la valoración, y  $c$  la concentración exacta (M) de la solución de NaOH.

Finalmente, los resultados se expresaban como contenido de ácido cítrico ( $\text{g L}^{-1}$ ), multiplicando la Ec. 1 por un factor de conversión de 0,064 (AENOR, 1997).

### 3.3.5. Medida del color y la turbidez

El color y la turbidez se determinaban a una longitud de onda de 420 y 660 nm, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

### 3.3.6. Determinación de la capacidad antioxidante total. Método ABTS

La capacidad antioxidante total se evaluaba mediante el método del ABTS de Miller y Rice-Evans (1997), modificado por Re *et al.* (1999) y por Rivero-Pérez *et al.* (2007). Este método se basa en la oxidación del ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) por el persulfato potásico para formar el radical  $ABTS^{*+}$ , que tiene un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm. En presencia de un antioxidante se reduce el radical disminuyendo la absorbancia.

#### Reactivos

- R.1. *ABTS 7 mM*: disolver 38,4 mg de ABTS en 10 mL de agua destilada.
- R.2. *Persulfato de potasio 2,45 mM*: disolver 6,6 mg de persulfato de potasio en 10 mL de agua destilada.
- R.3. *Reactivo  $ABTS^{*+}$* : el radical se obtiene tras la reacción del ABTS 7 mM (R.1) con el persulfato potásico 2,45 mM (R.2) en proporción (1:1), incubados durante al menos 16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Este reactivo es estable un máximo de 2 días. Una vez formado el radical  $ABTS^{*+}$  se diluye con etanol hasta conseguir una absorbancia de  $0,7 \pm 0,2$  a 734 nm.

R.4. Trolox 2 mM: disolver 2,5 mg de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en 10 mL de etanol. Esta solución se puede conservar hasta 2 días a -20 °C o más de 6 meses a -80 °C.

### Protocolo experimental

El procedimiento consistía en mezclar 20 µl de zumo, diluido 1/4, con 960 µl del reactivo ABTS<sup>+</sup> (R.3) y agua destilada hasta un volumen de 1 mL. Paralelamente se incluía un control sin zumo, y un blanco sin reactivo ABTS<sup>+</sup>. Se medía la absorbancia de las muestras a 734 nm transcurrido un tiempo suficiente para que se estabilizara la absorbancia (15 min). Se calculaba el porcentaje de inhibición de la oxidación mediante la Ec. 2. El ensayo se realizaba por triplicado y los resultados se expresaban como TEAC (“Trolox equivalent antioxidant capacity”).

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}}\right) \times 100 \quad (2)$$

### Recta de calibrado

La recta de calibrado se preparaba a partir de una solución estándar de Trolox (R.4) en un rango de concentración de 0-1,4 mM obteniendo una recta de calibrado como la que se muestra en la Figura 3.

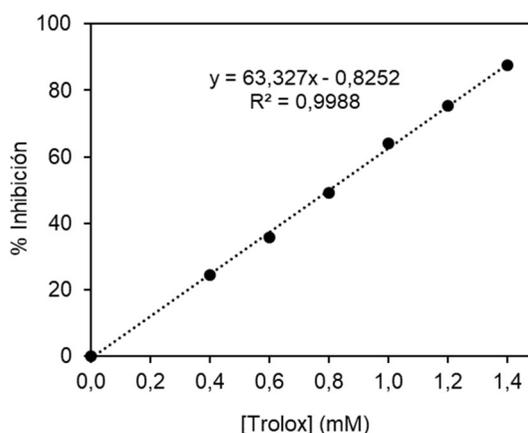


Figura 3. Ejemplo de recta de calibrado de Trolox.

### **3.4. Tratamiento estadístico de los datos**

Se calculó la media aritmética y la desviación estándar muestral para cada una de las muestras analizadas (Capítulo II, apartado 3.8).

Se utilizó el programa informático STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.2.02) con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras realizadas, empleando el análisis t-student, si se comparaba dos grupos de muestras, o el ANOVA (Capítulo II, apartado 3.8), cuando se tenían tres o más grupos de muestras.

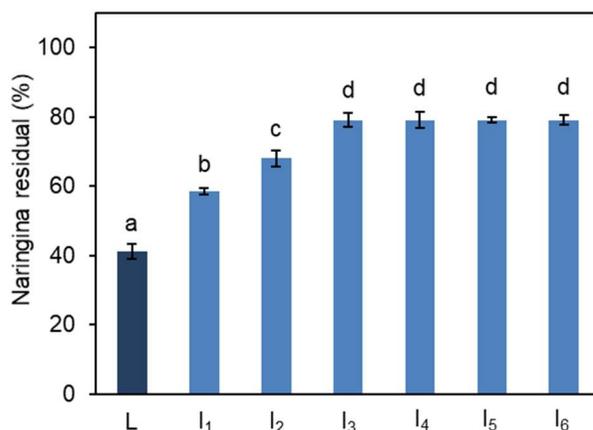
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aplicación de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG para la reducción del amargor

El inmovilizado de naringinasa en criogeles de PVA-PEG, desarrollado en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, se aplicó en la degradación de naringina en medio tamponado, zumo sintético y zumo natural. Se emplearon diferentes medios de reacción con el fin de valorar, en su caso, la influencia de los componentes del zumo sobre la acción catalítica y sobre su estabilidad operacional.

#### 4.1.1. Reducción del contenido de naringina en medio tamponado

La naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG se aplicó en una solución tamponada de naringina  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ , logrando una reducción del 43,5% del compuesto amargo. Se comprobó que entre el 5-15% de la naringina del medio quedaba adsorbida en el soporte de inmovilización, de forma que el biocatalizador hidrolizaba el 26,5% del compuesto amargo, frente al 59,8% obtenido para su contrapartida soluble. La Figura 4 muestra la estabilidad operativa del inmovilizado, observándose un incremento paulatino en la naringina residual desde el primer al tercer ciclo de operación debido a la pérdida de actividad enzimática. La capacidad para eliminar la naringina se mantenía prácticamente constante a partir del tercer ciclo, y se debía fundamentalmente a la adsorción del compuesto al soporte de inmovilización.



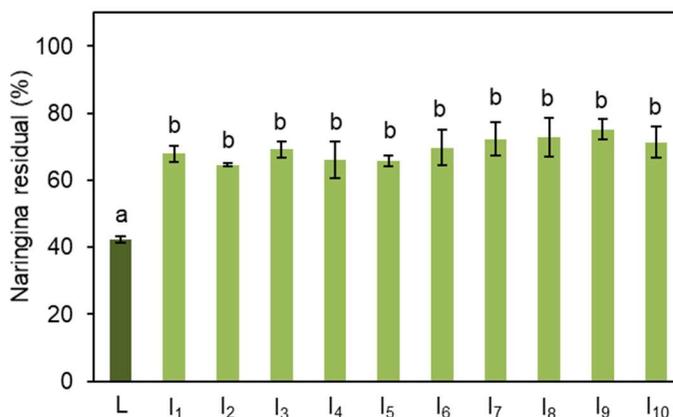
**Figura 4.** Estabilidad operativa en medio tamponado ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de naringina) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG ( $0,5 \text{ mg enzima g}^{-1}$  soporte). L: enzima libre; I<sub>n</sub>: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

El biocatalizador de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG mostró una baja estabilidad operativa en comparación con los inmovilizados desarrollados por otros autores. Mishra y Kar (2003) indicaron que la naringinasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio se podía reutilizar durante 4 ciclos de 30 min a 55 °C sin pérdida de actividad. Puri *et al.* (2005) desarrollaron un inmovilizado de esta enzima en chips de madera mediante enlace covalente con alta estabilidad operativa ya que el biocatalizador mantenía su actividad durante 7 ciclos consecutivos de reacción (30 °C, 2 h). Şekeroğlu, *et al.* (2006) usando celita como soporte para inmovilizar naringinasa mediante adsorción, observaron que tras cuatro ciclos de operación el biocatalizador había perdido el 40% de su actividad, probablemente por la desorción de la enzima debido a la naturaleza débil de los enlaces entre enzima y soporte. Por otra parte, la naringinasa inmovilizada en  $\kappa$ -carragenato (Ribeiro y Ribeiro, 2008) perdía más del 50% de su actividad tras 5 ciclos de reacción. Sin embargo, Vila-Real *et al.* (2010) desarrollaron un inmovilizado en matrices sol-gel con una alta estabilidad operativa, pudiendo ser reutilizado durante 50 ciclos de 1 h a 45 °C sin pérdida de eficacia catalítica. Nunes *et al.* (2010, 2012, 2016) obtuvieron inmovilizados de naringinasa en geles de PVA, combinados con alginato, dimetilsulfóxido o entrecruzados con ácidos borónicos, que conservaban su actividad por encima del 70% tras varios ciclos de reutilización. Más recientemente, Torabizadeh y Mikani (2018) desarrollaron CLEAs nanomagnéticos de naringinasa que fueron reutilizados durante 8 ciclos de reacción a 55 °C durante 2 h, conservando el 67% de su actividad inicial.

#### 4.1.2. Reducción del contenido de naringina en zumo sintético

En ensayos previos se comprobó que la actividad naringinasa se reducía en zumo sintético debido a la inhibición provocada por el ácido cítrico. Para incrementar la capacidad de eliminación del compuesto amargo en zumos, se estudiaron diferentes concentraciones de enzima, seleccionándose finalmente la de 3,4 g L<sup>-1</sup> para llevar a cabo este estudio.

El zumo sintético tratado con el biocatalizador inmovilizado en PVA-PEG mantenía el 67,9% de la naringina, quedando retenido en el soporte entre un 10-15% del flavonoide. Por tanto, el inmovilizado hidrolizaba el 16,3% de la naringina, frente al 42,3% de la enzima libre. En la Figura 5 se muestra que no existían diferencias significativas (ANOVA,  $p > 0,05$ ) entre los ciclos de reacción para la naringina residual y tampoco para la naringina hidrolizada por el inmovilizado en geles de PVA-PEG. Por tanto, este biocatalizador pudo ser reutilizado con éxito a lo largo de 10 ciclos de operación sin pérdida de actividad.

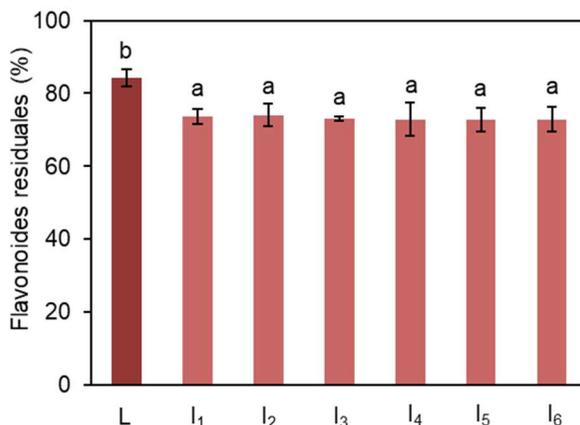


**Figura 5.** Estabilidad operativa en zumo sintético ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de naringina) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG ( $3,4 \text{ mg enzima g}^{-1}$  soporte). L: enzima libre; I<sub>n</sub>: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

No existen referencias previas sobre la aplicación en zumo sintético de naringinasa inmovilizada en geles de PVA-PEG. Se ha estudiado previamente la capacidad de reutilización de naringinasa de *A. niger* inmovilizada en criogeles de PVA (sin PEG), observándose una pérdida progresiva de la capacidad catalítica del inmovilizado de forma que, tras 6 ciclos de reacción (ciclos de 24 h a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), el inmovilizado conservaba el 36% de su actividad inicial (Busto *et al.*, 2007). Por tanto, la incorporación de PEG podría mejorar la estabilidad operativa de los inmovilizados en criogeles de PVA.

#### 4.1.3. Reducción del contenido de naringina en zumo natural de pomelo

El contenido de flavonoides totales del zumo de pomelo se reducía un 25% tras el tratamiento con el inmovilizado de naringinasa en geles de PVA-PEG frente al 16% obtenido para la enzima libre. No obstante, en torno al 15% de los flavonoides presentes en el jugo quedaban retenidos en la matriz, por lo que el inmovilizado apenas hidrolizaba un 8,4% del compuesto amargo (Figura 6). La baja capacidad catalítica mostrada por el inmovilizado en PVA-PEG se debía, por un lado, a las limitaciones difusionales generadas por el soporte que dificultaban la acción de la enzima sobre su sustrato, y por otro, a la inhibición provocada por los componentes del zumo natural como los azúcares glucosa, fructosa y ramnosa, y los iones metálicos como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Tsen, 1984; Norouzzian *et al.*, 2000; Martearena *et al.*, 2008). La estabilidad operativa del inmovilizado se recoge en la Figura 6, observándose que la capacidad para reducir los flavonoides totales se mantenía constante durante seis ciclos de operación.



**Figura 6.** Estabilidad operativa en zumo natural de pomelo (flavonoides totales  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG ( $3,4 \text{ mg enzima g}^{-1}$  soporte). L: enzima libre; I<sub>n</sub>: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

En bibliografía se ha descrito la aplicación en zumo de pomelo de naringinasa inmovilizada en distintos soportes con resultados de reducción de naringina muy dispares. El inmovilizado en geles de alginato desarrollado por Mishra y Kar (2003) eliminaba el 84% de la naringina en zumo tras 3 h de tratamiento a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ribeiro y Ribeiro (2008) utilizaron naringinasa atrapada en geles de  $\kappa$ -carragenato para reducir la naringina en zumo de pomelo con una eficacia del 95%. No obstante, en este caso la actividad del inmovilizado caía un 40% en los dos primeros ciclos de reutilización en zumo natural. Resultados similares se obtuvieron con un inmovilizado de naringinasa en tamiz molecular mesoporoso MCM-41 tras 30 min a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (Lei *et al.*, 2011), aunque no se disponen de datos sobre su estabilidad operativa. Huang *et al.* (2017) indicaron que la enzima inmovilizada en nanofibras de acetato de celulosa eliminaba el 22,7% de la naringina en zumo de pomelo. Más recientemente, Housseiny y Aboelmagd (2019) han aplicado naringinasa inmovilizada en dos tipos de nanoencapsulados de quitosano y de alginato, alcanzando un grado de reducción de naringina del 50,5 y 44%, respectivamente.

Finalmente, con el objetivo de conocer el efecto del tratamiento con naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG sobre la calidad del zumo de pomelo se llevó a cabo su caracterización físico-química (Tabla 1). El zumo comercial puede contener entre  $300$  y  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de flavonoides totales (Johnson y Chandler, 1982; Wagner *et al.*, 1988), encontrándose el zumo obtenido en el laboratorio dentro de este rango. Tras el tratamiento enzimático la concentración de flavonoides totales se reducía hasta  $450 \text{ mg L}^{-1}$ , por encima del límite de detección del amargor en zumos que se sitúa entre  $300$ - $400 \text{ mg L}^{-1}$  (Soares y Hotchkiss, 1998; Ribeiro *et al.*, 2008).

Diferentes autores han evaluado las características físico-químicas del zumo de pomelo, encontrando valores de pH, grado de acidez y sólidos solubles que oscilan entre 2,9-3,5; 0,4-20 g L<sup>-1</sup> y 9-11,5 °Brix, respectivamente (Johnson y Chandler, 1982; Cohen *et al.*, 1984; Del Caro *et al.*, 2004; Igual *et al.*, 2010; Kola *et al.*, 2010; La Cava y Sgroppo, 2015; Wang *et al.*, 2018). El zumo utilizado en este trabajo se encontraba dentro de estos parámetros antes y después del tratamiento con la enzima inmovilizada (Tabla 1). No obstante, el tratamiento con el inmovilizado daba lugar a una reducción significativa del grado de acidez y del contenido de sólidos solubles, probablemente debido a la adsorción en el soporte de PVA-PEG de diferentes componentes del zumo responsables de estos parámetros. El color y la turbidez del zumo de pomelo disminuían también debido al tratamiento.

**Tabla 1.** Caracterización físico-química del zumo de pomelo tratado con naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG.

Parámetros	Zumo de pomelo <sup>1</sup>	
	Natural	Tratado enzimáticamente
Flavonoides totales (mg naringina L <sup>-1</sup> )	613 ± 20 <sup>b</sup>	451 ± 12 <sup>a</sup>
pH	3,01 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,04 <sup>a</sup>
Acidez (g L <sup>-1</sup> ácido cítrico)	1,42 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,32 ± 0,01 <sup>a</sup>
Sólidos solubles (°Brix)	11,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
Color (Abs a 420 nm)	2,520 ± 0,014 <sup>b</sup>	2,340 ± 0,012 <sup>a</sup>
Turbidez (Abs a 660 nm)	1,810 ± 0,011 <sup>b</sup>	1,410 ± 0,009 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas (t-student,  $p < 0,05$ ) dentro de una misma fila.

El efecto del tratamiento enzimático sobre las propiedades antioxidantes del zumo de pomelo se evaluó a través de la medida de la capacidad antioxidante total mediante el método ABTS. El tratamiento con naringinasa de *P. decumbens* inmovilizada en PVA-PEG daba lugar a un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la capacidad antioxidante, desde  $3,26 \pm 0,07$  hasta  $3,85 \pm 0,08$  mM equivalente de Trolox, en consonancia con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio para el tratamiento con naringinasa de *A. niger* inmovilizada en geles de PVA (sin PEG) (Cavia-Saiz *et al.*,

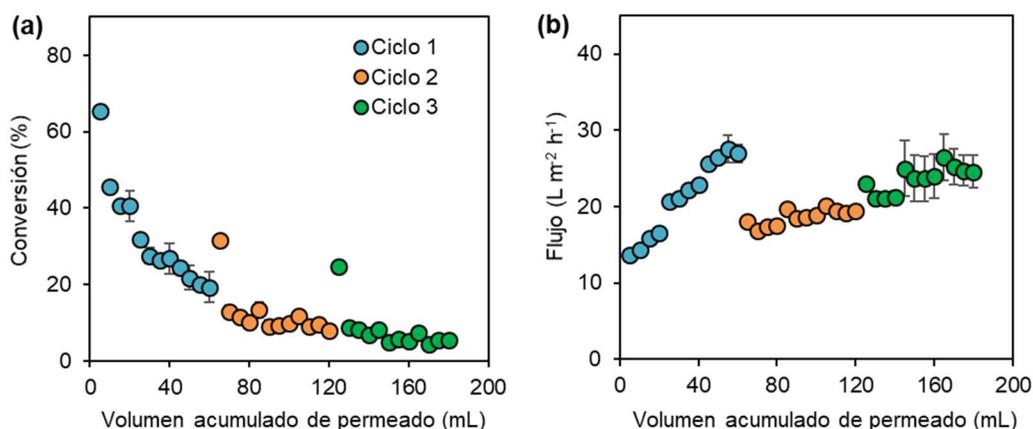
2011). Este incremento de la capacidad antioxidante puede deberse a que el producto final de la reacción enzimática, la naringenina, presenta una mayor capacidad para reducir el radical ABTS<sup>•+</sup> que la naringina (Heim *et al.*, 2002; Cavia-Saiz *et al.*, 2010).

## 4.2. REM con actividad naringinasa para la reducción del amargor

En este apartado se describen los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad de reutilización de los REM con naringinasa inmovilizada por ensuciamiento inducido y por ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído en las condiciones optimizadas en el Capítulo III. En primer lugar, y con objeto de seleccionar la membrana biocatalítica más adecuada, se evaluó el funcionamiento de los REM en un medio tamponado de naringina. Seleccionado el método de inmovilización de naringinasa en la membrana de UF se estudió la capacidad del REM para reducir el compuesto amargo en zumo sintético y zumo de pomelo.

### 4.2.1. Reducción del contenido de naringina en medio tamponado

La conversión de naringina y el flujo de permeado del REM obtenido mediante ensuciamiento inducido se recogen en la Figura 7. Destaca el importante descenso de la capacidad catalítica a lo largo de los ciclos de operación (Figura 7a), rindiendo un grado total de conversión de un  $32,5 \pm 1,7\%$ ,  $12,2 \pm 0,4\%$  y  $8,0 \pm 0,8\%$  para el primer, el segundo y el tercer ciclo de operación, respectivamente. Estos resultados concuerdan con el flujo de permeado observado (Figura 7b) que se veía fuertemente incrementado durante el primer ciclo de operación debido a la liberación del 40% de la enzima inmovilizada

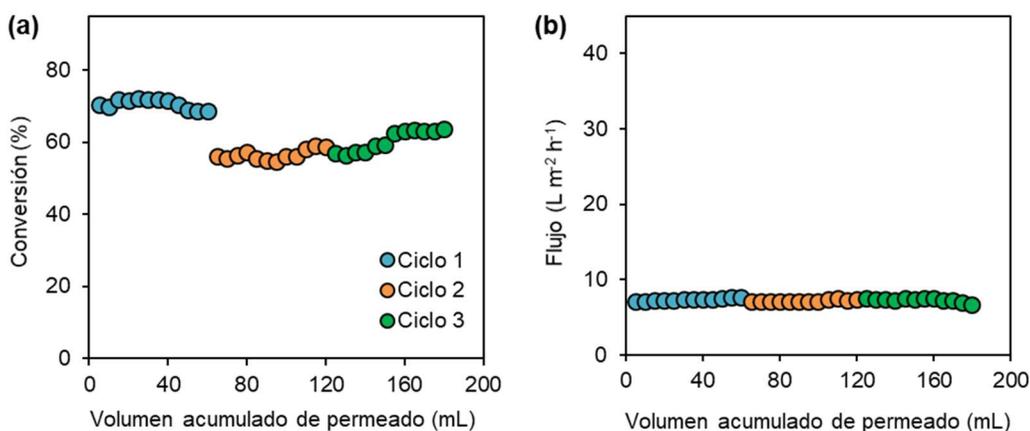


**Figura 7.** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido durante ciclos sucesivos de tratamiento de solución tamponada de naringina ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Condiciones de operación del REM:  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,25 \text{ bar}$ .

en la membrana. En los siguientes ciclos no se detectaba enzima en los permeados lo que explica la estabilización del flujo.

La estabilidad operativa del REM obtenido mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído se muestra en la Figura 8. La conversión de naringina (Figura 8a) y el flujo de permeado (Figura 8b) a lo largo de los ciclos de operación se mantenían más estables que cuando la enzima no era reticulada con glutaraldehído (Figura 7). El agente entrecruzante mejoraba la estabilidad de la enzima inmovilizada en la membrana, de forma que, a lo largo de todo el proceso de reutilización se perdía solo un 13% del catalizador, mientras que en el REM sin reticulación se liberaba el 40% de la enzima. Esta mayor estabilidad de la enzima reticulada con glutaraldehído conducía a un incremento del grado total de conversión de naringina en el REM de  $70,6 \pm 0,3\%$  en el primer ciclo,  $56,7 \pm 0,5\%$  en el segundo y  $60,6 \pm 0,2\%$  en el tercero.

Adikane y Thakar (2010) también describieron que el entrecruzamiento de penicilina G acilasa, tras su inmovilización en membranas basadas en celulosa, mejoraba notablemente la estabilidad operativa del REM.

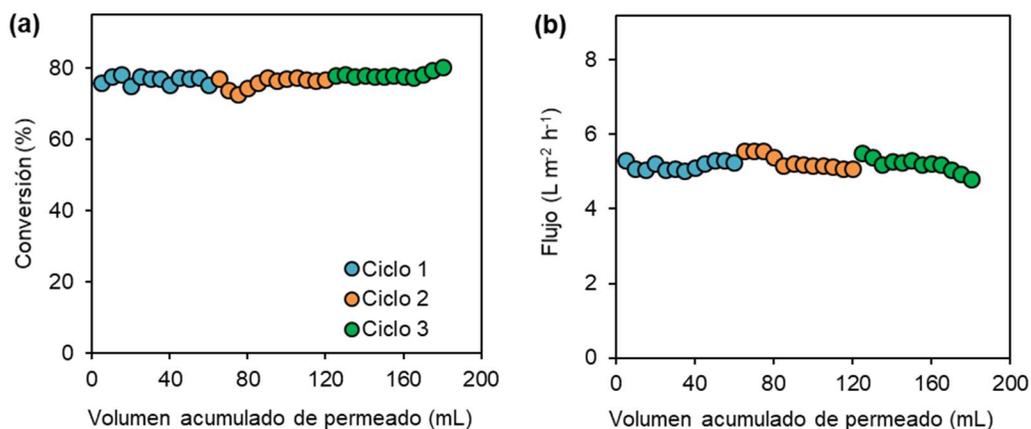


**Figura 8.** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante los ciclos sucesivos de tratamiento de solución tamponada de naringina ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Condiciones de operación en el REM:  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,25 \text{ bar}$ .

En base a la mejora de la capacidad catalítica y la estabilidad operacional del REM, se seleccionó el protocolo que incluía el entrecruzamiento con glutaraldehído para las siguientes experiencias.

#### 4.2.2. Reducción del contenido de naringina en zumo sintético

La evolución de la conversión y del flujo de permeado en el REM obtenido mediante ensuciamiento inducido y reticulación con glutaraldehído a lo largo de los ciclos consecutivos de tratamiento de zumo sintético se muestra en la Figura 9. La capacidad catalítica del reactor se mantenía durante la reutilización (Figura 9a), por lo que se puede concluir que este inmovilizado tenía una buena estabilidad operativa. Los valores de grado total de conversión alcanzados fueron  $76,8 \pm 0,2\%$ ;  $75,1 \pm 0,2$  y  $78,9 \pm 0,2\%$  para los ciclos uno, dos y tres, respectivamente. El grado de conversión alcanzado era muy similar al obtenido en medio tamponado (apartado 4.2.1), lo que sugería que el REM protegía a la enzima del efecto inhibitor del ácido cítrico presente en el zumo sintético.



**Figura 9.** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante ciclos sucesivos de tratamiento de zumo sintético ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de naringina). Condiciones de operación en el REM:  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,25 \text{ bar}$ .

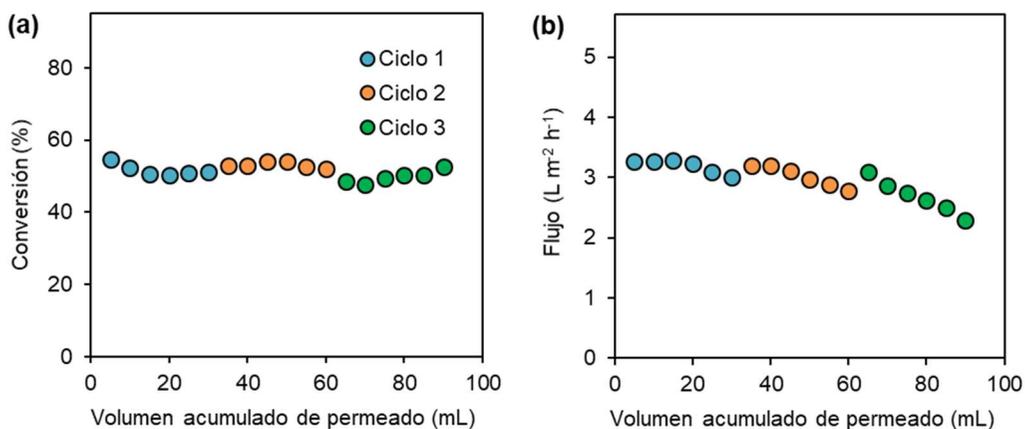
El flujo de permeado se mantenía también bastante estable a lo largo de los ciclos de operación (Figura 9b), no obstante, al final del tercer ciclo se observaba un ligero descenso, probablemente por el ensuciamiento de membrana provocado por los componentes del zumo sintético (sacarosa, naringina y ácido cítrico). El incremento del flujo de permeado observado al inicio del segundo y tercer ciclo de reacción, confirmaría la efectividad de lavados entre ciclos.

Los únicos estudios publicados hasta el momento sobre aplicación de naringinasa inmovilizada en membranas para la hidrólisis de naringina en zumo sintético son los de Gray y Olson (1981). En estos trabajos el REM de fibra hueca alimentado con 2 L de

sustrato y con una velocidad de recirculación de  $1 \text{ L min}^{-1}$  era capaz de degradar un 36% de naringina tras 175 min de operación.

### 4.2.3. Reducción del contenido de naringina en zumo natural de pomelo

El REM con naringinasa inmovilizada mediante ensuciamiento y entrecruzamiento con glutaraldehído se aplicó en zumo de pomelo natural para la reducción del contenido en naringina. En la Figura 10 se muestran los resultados del estudio de su estabilidad operativa. A pesar de que el zumo de pomelo tratado en el REM había sido previamente clarificado, se observó un ensuciamiento progresivo de la membrana, tal y como se constataba por el descenso del flujo de permeado (Figura 10b). No obstante, la capacidad para reducir el compuesto amargo se mantenía a lo largo de los tres ciclos de operación (Figura 10a), alcanzándose un grado total de conversión de  $50,1 \pm 0,3$ ;  $50,8 \pm 0,2$  y  $48,9 \pm 1\%$ , para el primer, segundo y tercer ciclo, respectivamente. La actividad catalítica era aproximadamente un 25% menor que en zumo sintético (apartado 4.2.2), resultados similares a los indicados por Gray y Olson (1981) con naringinasa inmovilizada en un reactor de fibra hueca. Esto hace pensar que los componentes presentes en el zumo de pomelo, distintos a la sacarosa y el ácido cítrico del zumo sintético, inhibían la actividad enzimática del REM. Como ya se ha indicado, los azúcares glucosa, fructosa y ramnosa, y los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  presentes en los zumos naturales, inhiben la actividad del complejo enzimático (Tsen, 1984; Norouzian *et al.*, 2000; Martearena *et al.*, 2008).



**Figura 10.** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante los ciclos sucesivos de tratamiento de zumo natural de pomelo ( $0,76 \text{ g L}^{-1}$  de flavonoides totales). Condiciones de operación en el REM:  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,25 \text{ bar}$ .

Las únicas referencias que recogen la aplicación de naringinasa inmovilizada en membranas de ultrafiltración para la reducción del amargor en zumo de pomelo son las de Olson *et al.*(1979) y Gray y Olson (1981). Estos autores desarrollaron un reactor de fibra hueca con naringinasa de *A. niger* que conseguía reducir el 67% de la naringina tras recircular el zumo varias veces a 45 °C. Observaron, además, que en este tipo de reactor el zumo se podía tratar enzimáticamente sin necesidad de ser clarificado. No obstante, no se tienen datos de la estabilidad operativa del reactor.

El efecto del tratamiento del zumo de pomelo en el REM sobre sus características físico-químicas se recoge en la Tabla 2. El tratamiento enzimático conseguía reducir el contenido de flavonoides totales desde 762 hasta 337 mg L<sup>-1</sup>, por debajo de los límites detectables de amargor que se sitúan entre 300-400 mg L<sup>-1</sup> (Soares y Hotchkiss, 1998; Ribeiro *et al.*, 2008). El tratamiento térmico y la clarificación del zumo no afectaban al contenido de flavonoides, en consonancia con los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2018).

**Tabla 2.** Caracterización físico-química del zumo de pomelo tratado en el REM.

Parámetros	Zumo de pomelo <sup>1</sup>	
	Natural	Procesado con el REM
Flavonoides totales (mg naringina L <sup>-1</sup> )	762 ± 18 <sup>b</sup>	337 ± 5 <sup>a</sup>
pH	2,94 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,08 ± 0,01 <sup>b</sup>
Acidez (g L <sup>-1</sup> ácido cítrico)	1,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,01 <sup>a</sup>
Sólidos solubles (°Brix)	9,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Color (Abs a 420 nm)	2,629 ± 0,016 <sup>b</sup>	0,109 ± 0,002 <sup>a</sup>
Turbidez (Abs a 660 nm)	1,756 ± 0,013 <sup>b</sup>	0,008 ± 0,002 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas (t-student,  $p < 0,05$ ) dentro de una misma fila.

Los valores de pH, grado de acidez y contenido de sólidos solubles del zumo natural de pomelo (Tabla 2) se encontraban dentro del rango indicado por otros autores (apartado 4.1.3). Además, el tratamiento con el REM no afectaba a estos parámetros, aunque el pH y el grado de acidez se veían ligeramente modificados por el tratamiento previo de temperatura y clarificación. Sin embargo, el color y la turbidez se reducían drásticamente (80 y 91%, respectivamente) al eliminar la pulpa en el proceso de

centrifugación, pasando el zumo de una coloración naranja a una tonalidad más amarillenta. Posteriormente, el paso a través del reactor hacía que el zumo perdiera coloración y quedara completamente clarificado.

Apenas existen referencias sobre el efecto del tratamiento con naringinasa libre o inmovilizada en las características del zumo de pomelo. Mishra y Kar (2003) indicaron que el tratamiento de zumos de pomelo con naringinasa atrapada en geles de alginato no afectaba al color ni a la acidez del zumo, mientras que el tratamiento con resinas de absorción Amberlite IR 400 daba lugar a pérdida de densidad óptica y acidez. Por otra parte, Huang *et al.* (2017) observaron que el tratamiento con naringinasa inmovilizada en nanofibras de acetato de celulosa, decoloraba el zumo desde una tonalidad más naranja hasta tonos más amarillos, similar a las modificaciones producidas por el proceso de centrifugación recogidas en esta Tesis.

Con el objetivo de conocer el efecto del procesado con el REM sobre las propiedades bioactivas del zumo de pomelo se determinó la capacidad antioxidante total obteniendo valores de  $3,69 \pm 0,20$ ;  $3,56 \pm 0,07$  y  $3,35 \pm 0,04$  mM equivalentes de Trolox para las muestras de zumo natural, procesado sin enzima y procesado con el REM, respectivamente. El ANOVA de estos resultados mostró que el tratamiento térmico y la clarificación no afectaban de forma significativa a la capacidad antioxidante, mientras que el tratamiento con el reactor provocaba un ligero pero significativo descenso ( $p < 0,05$ ) de este parámetro.

Como ya se ha indicado, el tratamiento de zumo de pomelo con naringinasa libre o inmovilizada en geles de PVA, mejoraba la capacidad antioxidante total, medida mediante el método ABTS, lo cual se asociaba al incremento en el contenido en naringenina (Busto *et al.*, 2014). Por tanto, es probable que la membrana de ultrafiltración, empleada en esta investigación para la inmovilización enzimática, adsorbiera pequeñas cantidades de compuestos con actividad antioxidante. No obstante, el tratamiento de zumo pomelo con el REM parecía tener menor efecto sobre la capacidad antioxidante que el tratamiento con resinas de adsorción, en base a los resultados encontrados por otros autores. En este sentido, la resina Amberlite IR-400 provocaba una pérdida de entorno al 25% de la actividad antioxidante (Cavia-Saiz *et al.*, 2011). Resultados similares se encontraron al tratar zumo de naranja con Lewait VPOC 1064 MD PH (Stinco *et al.*, 2013).

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este capítulo de la Tesis Doctoral se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. Los inmovilizados de naringinasa en criogeles de PVA-PEG presentan estabilidad operacional para reducción del amargor, con capacidad para 10 ó 6 reutilizaciones sin pérdida de capacidad catalítica en zumo sintético o zumo de pomelo, respectivamente.
2. El tratamiento de zumo de pomelo con naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG reduce sólo un 25% el contenido de flavonoides, sin alterar las características físico-químicas del zumo, y mejorando ligeramente su capacidad antioxidante.
3. La estabilidad operativa de los REM en la eliminación de naringina en medio tamponado, zumo sintético y zumo de pomelo posibilita la reutilización en 3 ciclos consecutivos.
4. El tratamiento de zumo de pomelo con el REM reduce en un 50% el contenido de naringina, sin modificar el pH, contenido de sólidos solubles y acidez titulable, aunque sí altera el color y reduce ligeramente la capacidad antioxidante total del zumo.



Finalmente, tras un análisis global de los resultados presentados en este trabajo se puede concluir que el REM presentaba mayor efectividad para reducir el contenido de naringina en zumo de pomelo por debajo del límite de detección del amargor, frente a la naringinasa inmovilizada en geles de PVA-PEG. La mayor capacidad catalítica exhibida por el REM es resultado de la combinación de reacción enzimática con separación del producto lo que reduce la inhibición de la enzima por ramnosa.

Los efectos observados sobre la calidad final del zumo tratado con el REM se podrían minimizar mediante la reconstitución de la pulpa tras el tratamiento enzimático, práctica habitual en las empresas procesadoras de cítricos, o mediante el empleo de reactores enzimáticos de membrana cuyo diseño permita el tratamiento directo del zumo exprimido.

## 6. REFERENCIAS

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z. y Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), pp. 3201-3206.
- Adikane, H. V. y Thakar, D. M. (2010). Studies of penicillin G acylase immobilization using highly porous cellulose-based polymeric membrane. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(4), pp. 1130-1145.
- AENOR (1997) «Zumos de frutas y hortalizas. Determinación de la acidez valorable. UNE-EN 12147». Madrid.
- Akyildiz, A. y Ağçam, E. (2014). Citrus juices technology. En: Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S. y Erten, H. (Eds.), *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*. Nueva York: Springer New York, pp. 37-103.
- Barreca, D., Gattuso, G., Bellocco, E., Calderaro, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Laganà, G., Daglia, M., Meneghini, S. y Nabavi, S. M. (2017). Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*, 43(4), pp. 495-506.
- Borrelli, F. y Izzo, A. A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14(8), pp. 581-591.
- Brasil, I. M., Maia, G. A. y de Figueiredo, R. W. (1995). Physical-chemical changes during extraction and clarification of guava juice. *Food Chemistry*, 54(4), pp. 383-386.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3), pp. 1177-1182.
- Busto, M. D., Cavia-Saiz, M., Ortega, N. y Muñoz, P. (2014). Enzymatic debittering on antioxidant capacity of grapefruit juice. En: Preedy, V. (Ed.), *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Waltham: Academic Press, pp. 195-202.
- Castro-Vazquez, L., Alañón, M. E., Rodríguez-Robledo, V., Pérez-Coello, M. S., Hermosín-Gutierrez, I., Díaz-Maroto, M. C., Jordán, J., Galindo, M. F. y Arroyo-Jiménez, M. M. (2016). Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M. y Muñoz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), pp. 1238-1244.
- Cavia-Saiz, M., Muñoz, P., Ortega, N. y Busto, M. D. (2011). Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry*, 125(1), pp. 158-163.

- Cirmi, S., Maugeri, A., Ferlazzo, N., Gangemi, S., Calapai, G., Schumacher, U. y Navarra, M. (2017). Anticancer potential of citrus juices and their extracts: A systematic review of both preclinical and clinical studies. *Frontiers in Pharmacology*, 8, p. 420.
- Cohen, E., Sharon, R., Volman, L., Hoening, R. y Saguy, I. (1984). Characteristics of Israeli citrus peel and citrus juice. *Journal of Food Science*, 49(4), pp. 987-990.
- Cristóbal-Luna, J. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. y Chamorro-Cevallos, G. (2018). Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food and Chemical Toxicology*, 112, pp. 224-234.
- Davis, W. B. (1947). Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry*, 19(7), pp. 476-478.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V. y Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), pp. 99-105.
- Gray, G. M. y Olson, A. C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin in grapefruit juice using a hollow fiber naringinase reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6), pp. 1298-1301.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. y Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), pp. 572-584.
- Housseiny, M. M. y Aboelmagd, H. I. (2019). Nano-encapsulation of naringinase produced by *Trichoderma longibrachiatum* ATCC18648 on thermally stable biopolymers for citrus juice debittering. *Journal of Microbiology*, 57(6), pp. 521-531.
- Huang, W., Zhan, Y., Shi, X., Chen, J., Deng, H. y Du, Y. (2017). Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp. 630-636.
- Igual, M. G. M. E., García-Martínez, E., Camacho, M. M. y Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118(2), pp. 291-299.
- Johnson, R. L. y Chandler, B. V. (1982). Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(3), pp. 287-293.
- Kola, O., Kaya, C., Duran, H. y Altan, A. (2010). Removal of limonin bitterness by treatment of ion exchange and adsorbent resins. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), pp. 411-416.
- Kranz, P., Adler, P. y Kunz, B. (2011). Sorption of citrus flavour compounds on XAD-7HP resin during the debittering of grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(1), pp. 30-36.
- La Cava, E. L. M. y Sgroppo, S. C. (2015). Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), pp. 1325-1333.

- Lei, S., Xu, Y., Fan, G., Xiao, M. y Pan, S. (2011). Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, 257(9), pp. 4096-4099.
- Martareana, M. R., Daz, M. y Ellenrieder, G. (2008). Synthesis of rutinoides and rutinose by reverse hydrolysis catalyzed by fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3), pp. 177-185.
- Miller, N. J. y Rice-Evans, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(3), pp. 195-199.
- Mishra, P. y Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Journal of Food Science*, 68(4), pp. 1229-1233.
- Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: Clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, 17(9), pp. 536-540.
- Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N. y Moazami, N. (2000). Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), pp. 471-473.
- Nunes, M. A. P., Vila-Real, H., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2010). Immobilization of naringinase in PVA–alginate matrix using an innovative technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), pp. 2129-2147.
- Nunes, M. A. P., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2012). High-affinity water-soluble system for efficient naringinase immobilization in polyvinyl alcohol–dimethyl sulfoxide lens-shaped particles. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), pp. 580-594.
- Nunes, M. A. P., Gois, P. M. P., Rosa, M. E., Martins, S., Fernandes, P. C. B. y Ribeiro, M. H. L. (2016). Boronic acids as efficient cross linkers for PVA: synthesis and application of tunable hollow microspheres in biocatalysis. *Tetrahedron*, 72(46), pp. 7293-7305.
- Olson, A. C., Gray, G. M. y Guadagni, D. G. (1979). Naringin bitterness of grapefruit juice debittered with naringinase immobilized in a hollow fiber. *Journal of Food Science*, 44(5), pp. 1358-1361.
- Puri, M. y Banerjee, U. C. (2000). Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 18(3), pp. 207-217.
- Puri, M., Kaur, H. y Kennedy, J. F. (2005). Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(10), pp. 1160-1165.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), pp. 1231-1237.

- Ribeiro, I. A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H. y Ribeiro, M. H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52-53(1-4), pp. 13-18.
- Ribeiro, I. A. y Ribeiro, M. H. L. (2008). Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1-2), pp. 10-18.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M., Oliveira, L. S., Macedo, G. A. y Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), pp. 635-641.
- Ribeiro, M. H. L. (2011). Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), pp. 1883-1895.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P. y González-Sanjosé, M. L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), pp. 5476-5483.
- Şekeroğlu, G., Fadiloğlu, S. y Göğüş, F. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 224(1), pp. 55-60.
- Soares, N. F. F. y Hotchkiss, J. H. (1998). Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Packaging Technology and Science*, 11(1), pp. 9-18.
- Stinco, C. M., Fernández-Vázquez, R., Hernanz, D., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J. y Vicario, I. M. (2013). Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. *Journal of Food Engineering*, 116(1), pp. 155-161.
- Tatum, J. H. y Berry, R. E. (1973). Method for determining naringin content in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 38, pp. 340-341.
- Torabizadeh, H. y Mikani, M. (2018). Kinetic and thermodynamic features of nanomagnetic cross-linked enzyme aggregates of naringinase nanobiocatalyst in naringin hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, pp. 717-725.
- Tsen, H. Y. (1984). Factors affecting the inactivation of naringinase immobilized on chitin during debittering of fruit juice. *Journal of Fermentation Technology*, 62, pp. 263-267.
- Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Rosa, M. E., Calado, A. R. y Ribeiro, M. H. (2010). An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(6), pp. 841-850.
- Wagner, C. J., Wilson, C. W. y Shaw, P. E. (1988). Reduction of grapefruit bitter components in a fluidized  $\beta$ -cyclodextrin polymer bed. *Journal of Food Science*, 53(2), pp. 516-518.
- Wang, C. Y., Wang, Y. T., Wu, S. J. y Shyu, Y. T. (2018). Quality changes in high hydrostatic pressure and thermal pasteurized grapefruit juice during cold storage. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), pp. 5115-5122.

- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y. y Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), pp. 545-551.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M. y Patil, B. S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp. 2009-2014.



## **ABREVIATURAS**

ABTS	Ácido 2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análisis de la varianza
CLEAs	“Cross linked enzyme aggregates”
I	Enzima inmovilizada
L	Enzima libre
PEG	Polietilenglicol
PVA	Alcohol polivinílico
REM	Reactor enzimático de membrana
TEAC	“Trolox equivalent antioxidant capacity”



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Variedades de pomelos (Moore, 2001).....	174
<b>Figura 2</b>	Esquema general del procesado de zumos de cítricos .....	175
<b>Figura 3</b>	Ejemplo de recta de calibrado de Trolox .....	181
<b>Figura 4</b>	Estabilidad operativa en medio tamponado (0,8 g L <sup>-1</sup> de naringina) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG (0,5 mg enzima g <sup>-1</sup> soporte). L: enzima libre; In: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a 50 °C, 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, p<0,05).....	183
<b>Figura 5</b>	Estabilidad operativa en zumo sintético (0,8 g L <sup>-1</sup> de naringina) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG (3,4 mg enzima g <sup>-1</sup> soporte). L: enzima libre; In: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a 50 °C, 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, p<0,05).....	185
<b>Figura 6</b>	Estabilidad operativa en zumo natural de pomelo (flavonoides totales 0,6 g L <sup>-1</sup> ) de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG (3,4 mg enzima g <sup>-1</sup> soporte). L: enzima libre; In: enzima inmovilizada, n: n° de ciclos de operación a 50 °C, 1 h y 150 rpm. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, p<0,05). .....	186
<b>Figura 7</b>	(a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido durante ciclos sucesivos de tratamiento de solución tamponada de naringina (0,8 g L <sup>-1</sup> ). Condiciones de operación del REM: 50 °C y 0,25 bar.....	188
<b>Figura 8</b>	(a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante los ciclos sucesivos de tratamiento de solución tamponada de naringina (0,8 g L <sup>-1</sup> ). Condiciones de operación en el REM: 50 °C y 0,25 bar.....	189
<b>Figura 9</b>	(a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante ciclos sucesivos de tratamiento de zumo sintético (0,8 g L <sup>-1</sup> de naringina). Condiciones de operación en el REM: 50 °C y 0,25 bar .....	190

**Figura 10** (a) Conversión de naringina y (b) flujo de permeado en el REM preparado mediante ensuciamiento inducido y entrecruzamiento con glutaraldehído durante los ciclos sucesivos de tratamiento de zumo natural de pomelo (0,76 g L<sup>-1</sup> de flavonoides totales). Condiciones de operación en el REM: 50 °C y 0,25 bar..... 191

## **LISTADO DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	Caracterización físico-química del zumo de pomelo tratado con naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG ..... 187
<b>Tabla 2</b>	Caracterización físico-química del zumo de pomelo tratado en el REM..... 192