

Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad catalítica de glucosa isomerasa inmovilizada durante la producción de jarabes fructosados a partir de almidón de yuca

L.F. Rojas, J.C. Mazo, C. Sánchez, R. Ríos, C. Figueroa
Grupo de Biotecnología, Universidad de Antioquia (Colombia)

1. Introducción

La producción de jarabes de alta fructosa (JAF) por isomerización de glucosa en fructosa, ha sido la mayor aplicación industrial de la tecnología de enzimas inmovilizadas durante las dos últimas décadas. En el proceso de isomerización se convierte en fructosa cerca del 45% de jarabe glucosado que ha sido obtenido por hidrólisis enzimática de almidón, mediante las etapas de licuefacción y sacarificación [1]. Estos jarabes tienen una amplia utilización en el mercado de edulcorantes particularmente en la industria de refrescos y bebidas reemplazando la sacarosa [2].

Estados Unidos se considera como uno de los mayores productores de JAF y Japón ocupa el segundo lugar; una producción comercial significativa también se presenta en Canadá, Argentina y Europa [3]. En Colombia, los JAF no están disponibles en el mercado, no son importados y tampoco son producidos a escala industrial. Sin embargo, en los últimos años, algunos centros de investigación y desarrollo han orientado sus actividades al desarrollo de paquetes tecnológicos que permitan la producción de JAF a gran escala. Algunas iniciativas han usado yuca como fuente de almidón, buscando obtener el menor costo de materia prima y dar valor agregado a un producto de uso

doméstico que actualmente es subvalorado.

En este trabajo se evaluaron las mejores condiciones para la producción de jarabe fructosado comercial (mínimo 42% de fructosa) mediante isomerización, a partir de jarabes glucosados obtenidos del almidón de yuca, empleando un catalizador industrial. Específicamente se evaluó el efecto de la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} sobre la actividad enzimática de glucosa isomerasa y la distribución del tiempo de residencia, durante el proceso de isomerización.

2. Materiales y métodos

Para el desarrollo experimental se adecuó un reactor de lecho fijo en pyrex de 2,5 cm de diámetro y 20 cm de altura, sumergido en un baño termostático Julabo PC, a una temperatura de 60°C; el sistema de alimentación y descarga es realizado por el tope y el fondo, respectivamente, mediante una bomba peristáltica MasterFlex, con una manguera Tygon MaterFlex 14, operando en continuo.

Para la isomerización de jarabe glucosado, se empleó la enzima comercial Sweetzyme T, suministrada por Novo Nordisk inc., un activo granular de Glucosa Isomerasa (D-Xilosa cetol-isomerasa) inmovilizada por ad-

En el presente trabajo, se adecuó un reactor de lecho fijo, que operando en continuo permitió estudiar el efecto de la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} sobre la actividad enzimática de glucosa isomerasa y la distribución del tiempo de residencia, evaluando las condiciones más apropiadas para la producción de jarabe fructosado mediante isomerización de jarabe glucosado a partir de almidón de yuca. Estadísticamente, las características de inhibición durante el proceso de isomerización son controladas cuando las concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} corresponden a 71, 117 y 1 ppm, respectivamente; el tiempo de residencia fue de 55 min con un grado de conversión esperado del 46%. El efecto inhibitorio de Ca^{2+} es significativo a niveles superiores a 100 ppm, mientras que la presencia de Mg^{2+} en niveles mayores a 110 ppm desempeña el papel de activador de glucosa isomerasa. Por su parte, la presencia de Co^{2+} , para el intervalo de concentración estudiado y contrario a lo reportado en la literatura, no ejerce ningún efecto sobre la actividad enzimática de glucosa isomerasa inmovilizada, cuando se expone a altas concentraciones de Ca^{2+} .

sorción con un soporte de sílica, producida por una cepa seleccionada de *Streptomyces murinus* y con apariencia de gránulos cilíndricos de color café, con tamaño de partícula entre 0,3 y 1,0 mm. La actividad inicial de la enzima fresca en glucosa pura es normalmente 350 IGIU/g [4].

Inicialmente, se preparó el jarabe glucosado empleado como sustrato, utilizando almidón de yuca comercial (Industrias del Maíz, S.A). El almidón, en una concentración de 400 g/l, se sometió a hidrólisis enzimática bajo condiciones operativas controladas, empleando las enzimas comerciales Termamyl y AMG300L (Novo Nordisk Inc.), en las etapas de licuefacción y sacarificación, respectivamente [5 y 6].

A continuación, se realizó el montaje y operación del sistema de reacción. Las variables a determinar fueron volumen de lecho empacado y tiempo de residencia, para las cuales se logra una conversión mínima de 42%.

Seguidamente, se realizó el estudio del efecto de inhibición en el proceso de isomerización; se formuló y desarrolló un diseño central compuesto de 3 factores a 3 niveles, que a partir de 6 puntos centrales, 8 puntos factoriales y 6 puntos en estrella permitió determinar los mejores niveles de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} inhibidores y/o activadores de la actividad enzimática para los cuales se obtiene

el mayor grado de conversión de glucosa en fructosa.

Finalmente, a partir de un diseño de factor único, se determinó el mejor tiempo de residencia para el cual se obtiene un jarabe fructosado comercial; la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} se fijó atendiendo a los resultados experimentales previos. Además, evaluando algunos de los puntos factoriales, se estudió el efecto de los cofactores y el tiempo de residencia sobre el grado de conversión, tomando como referencia el nivel más alto de Ca^{2+} para así garantizar la producción de un jarabe fructosado comercial bajo condiciones críticas de proceso. También, se determinaron los parámetros cinéticos K_M y V_M , constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima de reacción para el sustrato, respectivamente, evaluando el efecto que la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} causa sobre ellos.

Para la caracterización de los productos de hidrólisis del almidón se empleó el Equivalente de Dextrosa (ED) mediante el método colorimétrico DNS descrito por Gail Lorenz Miller [7], utilizando un Espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC; la cuantificación de glucosa se realizó por refractometría (Refractómetro Leyca Arias 500), midiendo el porcentaje de sólidos suspendidos en la muestra.

Tabla I. Condiciones estándar para el jarabe glucosado empleado como sustrato

| Jarabe glucosado a partir de almidón de yuca | |
|--|--------------|
| % de sólidos (w/w) | 34,70 ± 0,01 |
| Rotación óptica | -46,0 ± 0,1 |
| C. de glucosa (w/v) | 430,0 ± 0,1 |
| Ca ²⁺ (ppm) | 50,00 ± 0,01 |
| Mg ²⁺ (ppm) | 20,00 ± 0,01 |
| Co ²⁺ (ppm) | 0,00 ± 0,01 |

El avance de la reacción de isomerización se siguió por polarimetría (Polarímetro Steeg & Reuter D-35396 GieBen), cuantificando la concentración y el grado de conversión de glucosa mediante el ángulo de rotación óptica; la concentración de iones metálicos se determinó por absorción atómica (UNICAM 929 Spectrometer).

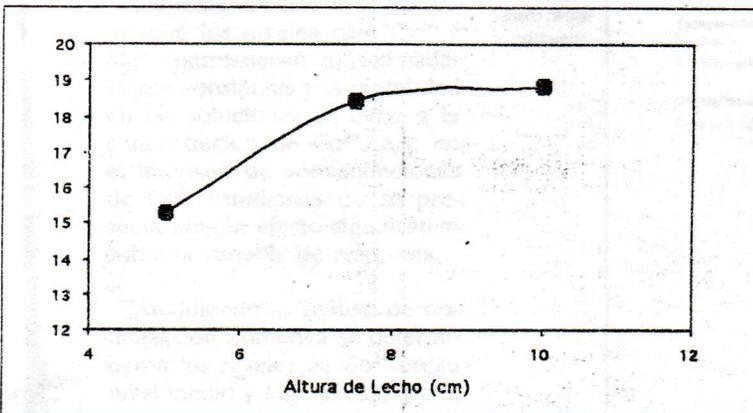
El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos del diseño experimental se realizó por medio del software Design Expert 5.0 (Stat Ease Co.).

3. Resultados y discusión

Empleando las mejores condiciones para las etapas de licuefacción y sacarificación, se logró la producción de un jarabe glucosado con características homogéneas en cuanto a su concentración; de esta manera se obtuvo una materia prima con condiciones estándar para el desarrollo de la fase experimental (Tabla I).

Las condiciones operativas del sistema de reacción se determinaron cuando este alcanzó el estado estacionario. Para el volumen de reacción se observa que no hay un efecto apreciable sobre el grado de conversión para una altura de lecho mayor a 7,5 cm, equivalente a una relación altura/diámetro (L/D) de 1/3 (Fig. 1). Este volumen de re-

Figura 1. Efecto de la variación del volumen de reacción sobre el grado de conversión. Área de sección transversal 4,9 cm², Flujo volumétrico 1,19 ml/min, Glucosa 34,72 (w/w), pH 7,5, Temp. 60°C



acción se fijó para todo el desarrollo experimental.

En relación con el efecto del tiempo de residencia (t_R) sobre el grado de conversión (Fig. 2), se observa que para un t_R cercano a 65 min se obtiene un grado de conversión del 42%, el cual disminuye cuando el t_R es menor a 40 min, presentando un comportamiento lineal decreciente, más apreciable a tiempos de residencia bajos.

No obstante, para la experimentación posterior, se fijó un t_R de 70 min que garantizara una operación en continuo con una conversión siempre mayor al 42% aún en presencia de concentraciones de Ca^{2+} superiores a 50 ppm.

3.1. Efecto de inhibición

Como resultado del tratamiento estadístico realizado se encontró experimentalmente que para altos niveles de Ca^{2+} , aproximadamente mayores a 80 ppm, se presenta una rápida disminución en el grado de conversión de glucosa en fructosa. Los mejores niveles para los cuales el efecto inhibitorio es controlado, oscilan entre (62,5-80) ppm para el Ca^{2+} y (65-175) ppm para el Mg^{2+} (Fig. 3).

En la optimización numérica se encontraron 6 posibles soluciones que cumplen con el criterio de máximo grado de conversión (Tabla II).

De estas soluciones se encontró que los niveles para Ca^{2+} y Mg^{2+} permanecen aproximadamente constantes y la pluralidad en las soluciones se debe a la concentración de Co^{2+} . Así, en el intervalo de concentraciones de Co^{2+} estudiadas no se presenta ningún efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Atendiendo al análisis de optimización numérica se determinaron los niveles de Co^{2+} en su nivel medio y Mg^{2+} en 117 ppm, como las concentraciones ópti-

Figura 2. Efecto del tiempo de residencia sobre el grado de conversión en una reacción de isomerización. Volumen de reacción 36,8 cm³, Glucosa 34,72 (w/w), pH 7,5, Temp. 60°C.

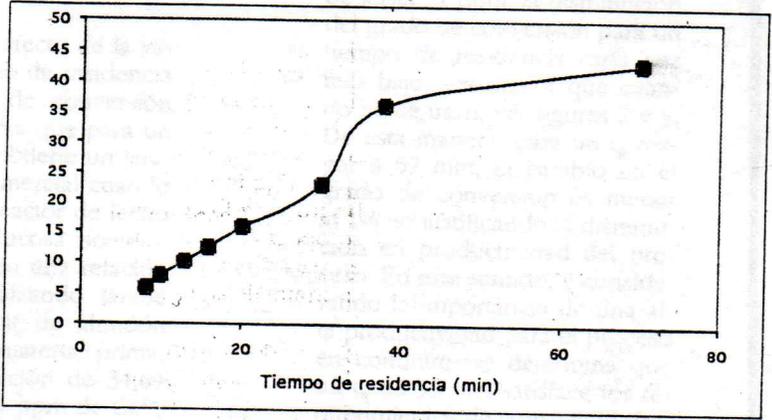
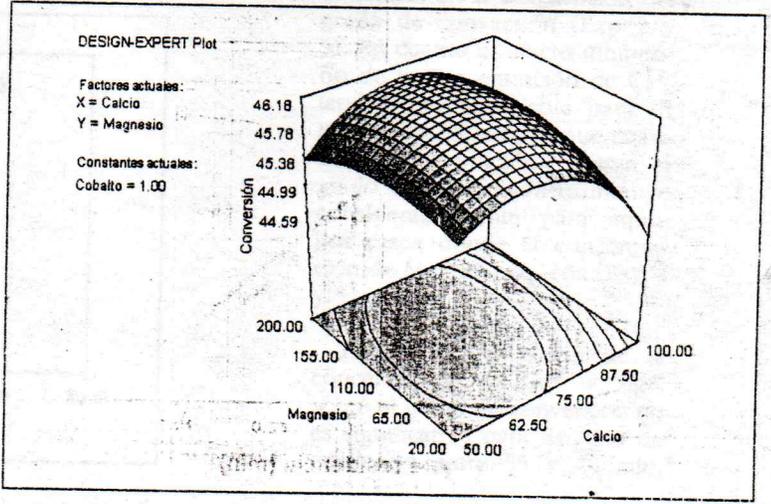


Tabla II. Optimización numérica

| RESTRICCIONES | | | | | |
|---------------|----------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| Nombre | Marca | Limite bajo | Limite alto | Peso bajo | Peso alto |
| Calcio | 56.00 - 160.00 | 56 | 100 | 1 | 1 |
| Magnesio | 70.00 - 240.00 | 70 | 200 | 1 | 1 |
| Cobalto | 0.00 - 2.00 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| Conversión | 46.00 - 46.00 | 46 | 46 | 1 | 1 |

| SOLUCIONES | | | | | |
|------------|--------|----------|---------|------------|--------------|
| | Calcio | Magnesio | Cobalto | Conversión | Conveniencia |
| 1 | 70.05 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |
| 2 | 70.06 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |
| 3 | 70.09 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |
| 4 | 70.11 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |
| 5 | 70.16 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |
| 6 | 70.18 | 117.00 | 1.00 | 46.1779 | 0.930 |

Figura 3. Superficie de respuesta para el diseño central compuesto.



mas, desde el punto de vista estadístico, para la cuales se obtiene el mayor grado de conversión aún en presencia de Ca^{2+} en concentraciones hasta de 71 ppm.

Para la optimización gráfica se tomó como base el grado de conversión hallado en el estudio de optimización numérica, fijando como limite inferior una conversión de 46,1%; este análisis permite observar en cual región de la superficie de respuesta hallada y para cual combinación de factores se obtiene una conversión igual o superior a esta (Fig. 4). La parte sombreada de la figura representa la región de la superficie de respuesta que no cumple con el criterio de optimización.

3.2. Determinación del mejor tiempo de residencia

Al estudiar el efecto de la variación del tiempo de residencia sobre el grado de conversión (Fig. 5), se observa que para un t_R de 47 min se obtiene un jarabe fructosado comercial cuando se opera en un reactor de lecho empacado con glucosa isomerasa inmovilizada en una relación L/D de 1/3, utilizando jarabe glucosado a partir de almidón de yuca como materia prima, con una composición de 34,69 (w/w) glucosa, 71 ppm de Ca^{2+} , 117 ppm de Mg^{2+} y 1 ppm de Co^{2+} .

Además, la presencia de iones metálicos Co^{2+} y Mg^{2+} en las

condiciones más apropiadas, hacen que en presencia de Ca^{2+} de hasta 71 ppm, la disminución del grado de conversión para un tiempo de residencia cada vez más bajo, sea menor que cuando no se usan, ver figuras 2 y 5. De esta manera, para un t_R mayor a 57 min, el cambio en el grado de conversión es menor al 1% no justificando la disminución en productividad del proceso. En este sentido, y considerando la importancia de una alta productividad para el proceso en continuo, se determina que un t_R de 55 min satisface los requerimientos de conversión desde el punto de vista técnico.

De otra parte, se realizó un análisis del efecto, sobre el grado de conversión, de distintas concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} , en sus niveles más críticos, y el tiempo de residencia, evaluado a 5 niveles (Fig. 6). En esta figura se observa que el tiempo de residencia para la obtención de un jarabe fructosado comercial disminuye con la presencia de Mg^{2+} , pasando de 65 min, para un matriz con el nivel más bajo de Mg^{2+} , a 47 min para una matriz con su nivel más apropiado (Exp 1 y 3).

Adicionalmente, el efecto activante del Mg^{2+} sobre glucosa isomerasa solo se aprecia para tiempo de residencia bajos (30-55 min) (Exp 2 y 4), contrario al efecto del Co^{2+} , que para estos t_R no tiene un efecto activante sobre la enzima, no permitiendo el control en la disminución del grado de conversión (Exp 2 y 5). En cuanto al efecto inhibitorio de la concentración de Ca^{2+} también es apreciable para t_R menores a 55 min, ya que cuando su concentración aumenta, el grado de conversión disminuye considerablemente para aquellos casos donde la concentración de Mg^{2+} es pequeña (Exp 2 y 3).

Finalmente, el efecto de la concentración de Co^{2+} y Mg^{2+} sobre el grado de conversión no es significativo para tiempos de residencia entre 55 y 70 min,

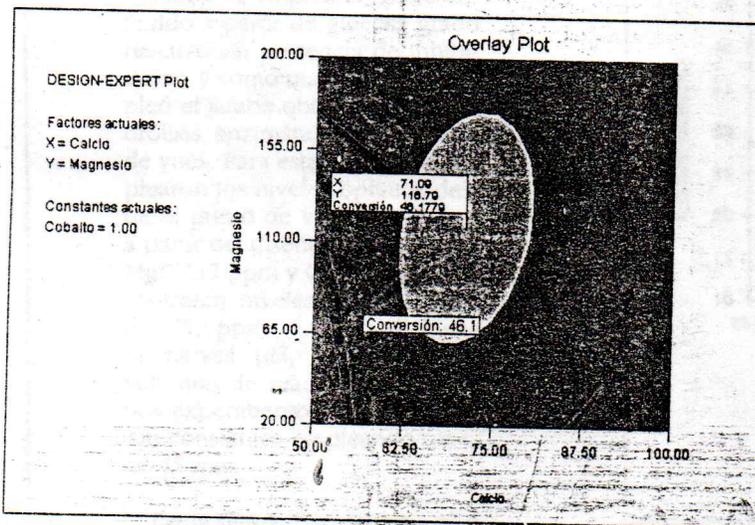
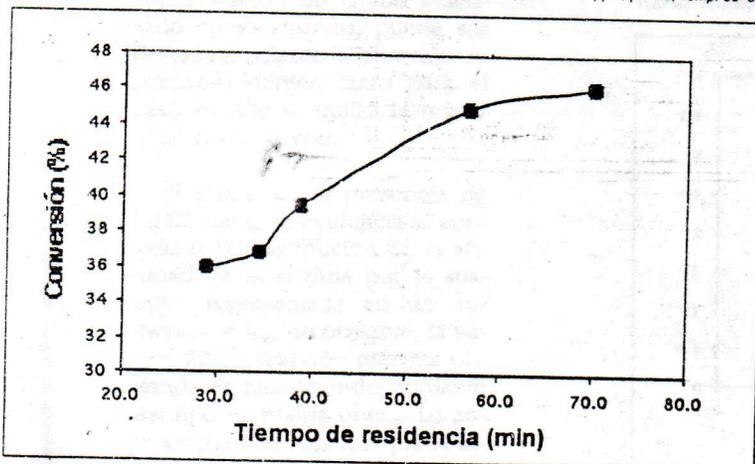


Figura 4. Optimización gráfica.

Figura 5. Efecto del tiempo de residencia sobre el grado de conversión para las mejores condiciones de operación. Volumen de reacción 36,8 cm³. Glucosa 34,69 (w/w), Ca²⁺ 71 ppm, Mg²⁺ 117 ppm, Co²⁺ 1 ppm, pH 7,5, Temp. 60°C.



cuando se compara con el efecto obtenido a tiempos de residencia menores; para estos tiempos de residencia, el cambio en el grado de conversión es menor al 1% no siendo apreciable el efecto activante o inhibitor de los cofactores, posiblemente, debido a que la probabilidad de contacto entre el sustrato y el sitio activo de la enzima es mayor a altos tiempos de residencia, logrando así contrarrestar el efecto inhibitorio para la concentración de Ca^{2+} presente [8].

3.3. Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos K_M y V_M , se determinaron para las matrices ideal y real. Como matriz ideal se empleó el jarabe obtenido a partir de glucosa grado reactivo sin presencia de inhibidores; y como matriz real se empleó el jarabe obtenido de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca. Para esta última, se emplearon los niveles óptimos desde el punto de vista estadístico, a partir del diseño experimental: Mg^{2+} 117 ppm y Co^{2+} 1 ppm que controlan niveles de Ca^{2+} hasta de 71 ppm. Las condiciones operativas pH, temperatura y volumen de reacción, para ambos experimentos, se mantuvieron constantes empleando un t_R de 55 min.

De la figura 7 se observa que la variación en la velocidad de reacción como función de la concentración de jarabe glucosado como sustrato, puede ser descrita mediante la ecuación de Michaelis-Menten tanto para el caso en que se utiliza la matriz ideal como la real.

El efecto de la presencia de inhibidores, se evidencia al considerar la disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato, representada en un aumento de K_M ; no obstante, la velocidad de reacción máxima obtenida es igual e independiente del tipo de matriz usada. Lo anterior permite concluir que la inhibición que se presenta dada la

alta concentración de Ca^{2+} es de tipo competitivo y que tal inhibición no puede ser contrarrestada aún con la presencia de Co^{2+} y Mg^{2+} como activadores, en los niveles indicados.

Los resultados obtenidos se linealizaron mediante el método de Lineweaver-Burk [9], del cual se obtuvieron los valores de K_M y V_M ; para la matriz ideal fueron 5,388 g/l min y 1,328 mol/l, y para la real 20,284 g/l min y 11,584 mol/l, respectivamente.

El valor de la constante de

Michaelis-Menten para el producto (K_p) determinado para la matriz ideal y real fue 1,226 mol/l y 10,693 mol/l, respectivamente; asumiendo la velocidad máxima de reacción para el producto (V_p) igual a V_M para simplificar el modelo cinético [10].

La constante de Michaelis-Menten para la matriz real fue mayor que la hallada para la matriz ideal; el Ca^{2+} como inhibidor y el sustrato presente, compiten por el sitio activo de la enzima. El valor de K_M obtenido para la matriz ideal, es ma-

Figura 6. Efecto del tiempo de residencia sobre el grado de conversión cuando se estudia la concentración de iones metálicos en sus niveles más críticos. Volumen de reacción 36,8 cm³, Glucosa 34,73 (w/w), pH 7.5, Temp. 60°C.

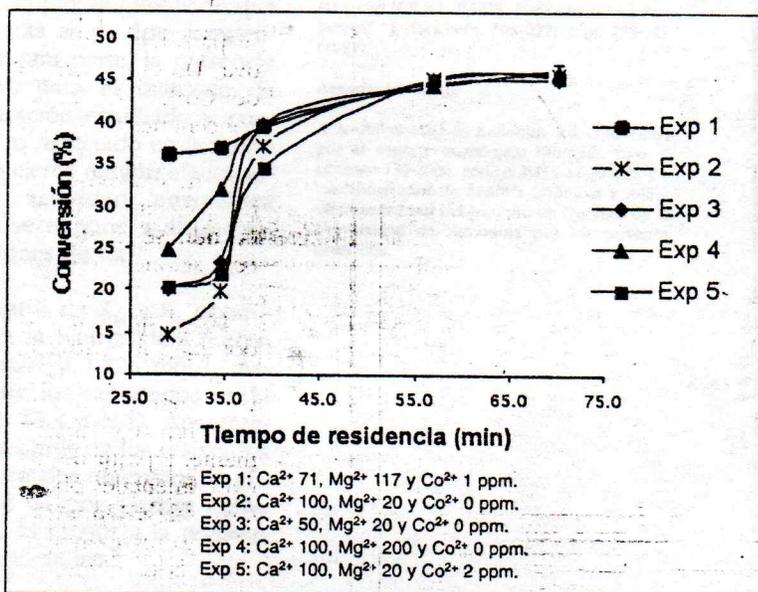
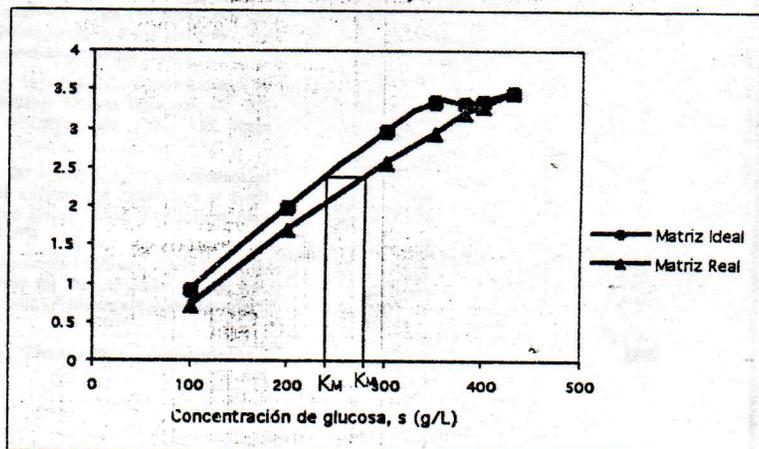


Figura 7. Efecto de la concentración de glucosa como sustrato sobre la velocidad de reacción. Volumen de reacción 36,8 cm³, Tiempo de residencia 55 min, Ca^{2+} 71, Mg^{2+} 117 y Co^{2+} 1 ppm, pH 7.5, Temp 60°C.



yor que el informado en la literatura para glucosa isomerasa (0,4 Molar); tal diferencia bien puede obedecer a las concentraciones de sustrato empleadas durante el experimento. De este estudio se desprende que, aparentemente para las condiciones operativas estudiadas, glucosa isomerasa presenta más baja afinidad por la glucosa como sustrato que la reportada en la literatura científica.

Para el tipo de inhibición presente, y a partir de los valores de K_M hallados en presencia y ausencia de inhibidor, fue posible hallar el valor de la constante de inhibición ($K_i = 0,24$ mM). No se dispone de datos en la literatura de la constante de inhibición, K_i para glucosa isomerasa con este tipo inhibidor. Sin embargo, si se compara con el valor de $K_i = 0,3$ mM para glucosa isomerasa inhibida por xilitol [11], se observa que esta es menor.

De otro parte, no hay suficiente evidencia experimental para afirmar que tal efecto inhibitorio es particularmente obtenido para glucosa isomerasa actuando sobre el jarabe de glucosa producido a partir de almidón de yuca, o si por el contrario, los mismos niveles de inhibición pueden llegar a ser obtenidos de un almidón de maíz como materia prima.

4. Conclusiones

El jarabe glucosado obtenido mediante hidrólisis enzimática de almidón de yuca, es un buen sustrato para la síntesis de jarabe fructosado; a pesar de contener una concentración de Ca^{2+} alrededor de 50 ppm, se logró la producción de un jarabe fructosado con características comerciales (42%).

El tiempo de residencia para la producción de un jarabe fructosado comercial logra reducirse

de 65 a 47 min con un concentración apropiada de iones metálicos en la alimentación. Sin embargo, es recomendable un tiempo de residencia de 55 min, cuyo grado de conversión es cercano al 46%, garantizando así, la obtención de un jarabe fructosado comercial aún a escalas de operación mayores, para las cuales los problemas hidrodinámicos son cada vez más significativos.

La actividad de la glucosa isomerasa durante el proceso de isomerización, se ve afectada por la presencia de Ca^{2+} en niveles superiores a 100 ppm, a pesar del efecto activante del Mg^{2+} presente en niveles mayores a 100 ppm; la inhibición que se presenta es de tipo competitiva. De otra parte, la presencia de Co^{2+} , para el intervalo de concentración estudiado y contrario a lo reportado en la literatura, no ejerce ningún efecto sobre la actividad enzimática cuando se expone a altas concentraciones de Ca^{2+} .

Los datos de K_M y K_D obtenidos para la matriz ideal fueron 1,328 mol/l y 1,226 mol/l, mayores que los reportados en la literatura (0,4 mol/l). Aparentemente, a partir de los resultados experimentales obtenidos, la afinidad de GI por glucosa como sustrato, es menor a la registrada en la literatura.

5. Bibliografía

- [1] Klyosov, A., "Industrial production with immobilized enzymes: High Fructose Corn Syrups and Amino Acids for Food and Feed". *Industrial Enzyme Engineering* (1995).
- [2] Benaiges, M. y Solá, C., "Isomerización de Glucosa Mediante Enzima Inmovilizada". *INGENIERÍA QUÍMICA*, pág. 131 - 135, Mayo (1985).
- [3] Carasik, W. y Carroll, J., "Development of Immobilized Enzyme for Production of High Fructose Corn Syrup". *Food Technology*, pág. 37, 85-91 (1983).
- [4] Novo Industries. Método AF-230/1- GB. "Novo Method for Determination of the Immobilized Glucose" *Isomerase - Sweetzyme T* (1987).
- [5] Alzate, M., "Producción de Maltodextrinas a

partir de la Hidrólisis Enzimática del Almidón de Yuca". Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería, Medellín (2002).

[6] Agudelo, B., "Producción de Jarabe Glucosado Mediante Sacarificación Enzimática utilizando un Reactor con Membranas". Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería, Medellín (2002).

[7] Miller, G., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry*. Vol. 31, No 3, pág. 426-428 (1959).

[8] Dixon, M. y Webb, E., "Enzymes". 2° Ed. New York: Academic press Inc, pág. 360-429 (1964).

[9] Duarte, A., "Introducción a la Ingeniería Bioquímica". SantaFé de Bogotá: Ed. Universidad Nacional, pág. 201-221 (1995).

[10] Gramkow, J., Raerup, B. y Snabe, T., "Production of High Fructose Syrup from Glucose using Immobilized Glucose Isomerase". Denmark (1999).

[11] Smith, C., Rangarajan, M. y Hartley, B., "D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Purification and Properties". *J. Biochem.* No 277, pág. 255-261 (1991).

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia y a Colciencias por el soporte económico brindado bajo el contrato 139-2000, código 1.115-12-10.405; y a los laboratorios de Análisis Químicos y Análisis Instrumental del Instituto de Química de la Universidad de Antioquia por los servicios prestados.