

Optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol

Yaiza González-Temiño, Natividad Ortega y María D. Busto

Facultad de Ciencias, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Burgos, Plza. Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, España. (e-mail: nortega@ubu.es; dbusto@ubu.es)

Recibido Jun. 26, 2019; Aceptado Ago. 22, 2019; Versión final Oct. 7, 2019, Publicado Feb. 2020

Resumen

El objetivo de esta investigación fue optimizar la inmovilización de naringinasa de *Penicillium decumbens* mediante atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico y polietilenglicol. En primer lugar, se determinó el efecto de las características de los componentes de la matriz sobre la eficacia de inmovilización y la estabilidad mecánica de los biocatalizadores obtenidos. Se empleó la herramienta de diseño de experimentos y superficie de respuesta para analizar el efecto del pH (3,0–8,0), de las concentraciones de alcohol polivinílico (5,3–8,7%) y polietilenglicol (7,0–12,0%) sobre la eficacia de inmovilización, y para optimizar estos parámetros. Adicionalmente, se estudió la capacidad de reutilización de los inmovilizados en zumos sintéticos. Se consiguieron biocatalizadores inmovilizados que conservaban un 45-47% de la enzima activa y que, tras tres ciclos de reutilización en zumo sintético, mantenían un 54,3% de la actividad inicial. Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones de inmovilización afectaban a la eficacia de inmovilización y a la estabilidad operativa de la naringinasa atrapada.

Palabras clave: alcohol polivinílico; inmovilización enzimática; naringinasa; polietilenglicol

Optimization of naringinase immobilization in poly(vinyl alcohol) and polyethylene glycol cryogels

Abstract

The objective of this investigation was the optimization of the immobilization of naringinase from *Penicillium decumbens* by entrapment in poly(vinyl alcohol) and polyethylene glycol cryogels. First, the effect of the characteristics of the matrix components on immobilization efficiency and mechanical stability of the biocatalyst obtained, was determined. Experimental design and response surface methodology was used to analyse the effect of pH (3.0–8.0), the concentrations of poly(vinyl alcohol) (5.3–8.7%) and polyethylene glycol (7.0–12.0%) on the immobilization efficiency, and to optimize these parameters. Additionally, reuse capacity in synthetic juices of immobilized enzyme was studied. The immobilized biocatalysts obtained, conserved 45-47% of active enzyme, and, after three cycles of reuse in synthetic juice, retained 54.3% of their initial activity. Results showed that immobilization efficiency and operational stability of entrapped naringinase were affected by immobilization conditions.

Keywords: poly(vinyl alcohol); enzyme immobilization; naringinase; polyethylene glycol

INTRODUCCIÓN

La naringinasa es un complejo enzimático con actividad α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) y β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21), que hidroliza el flavonoide naringina, principal responsable del amargor en zumos de cítricos, en su aglicona, la naringenina, que es insípida (Ribeiro, 2011). Como se muestra en la Figura 1 la reacción se lleva a cabo en dos pasos, primero la α -L-ramnosidasa transforma la naringina en prunina y ramnosa y, después, la β -D-glucosidasa hidroliza la prunina en naringenina y glucosa.

Los métodos que se están utilizando en la industria para eliminación del amargor emplean mayoritariamente resinas de adsorción que, además del componente amargo, eliminan otros compuestos presentes en el zumo como vitaminas y antioxidantes (Stinco et al., 2013). A diferencia de estos métodos, la alternativa biotecnológica con naringinasa presenta la ventaja de actuación específica sobre el principio amargo, por lo que la composición y la calidad final del zumo no se vería alterada (Busto et al., 2014). La naringinasa es también una enzima de interés para otros sectores de la industria alimentaria (Ribeiro, 2011; Puri, 2012; Zhu et al., 2017), y para la industria farmacéutica y cosmética (Yadav et al., 2018; Patil et al., 2019).

La aplicación directa de naringinasa en el procesado de zumos cítricos presenta como inconvenientes, el pH ácido y la presencia de inhibidores (Norouzián et al., 2000), que reducen su efectividad. Estos inconvenientes, pueden verse reducidos si se inmoviliza la naringinasa mediante atrapamiento en una matriz sólida, ya que se genera un microambiente entorno a la enzima, diferenciado de las condiciones características del zumo. Adicionalmente, la asociación de enzimas a soportes de inmovilización mejora su estabilidad y posibilita su reutilización durante el proceso. El alcohol polivinílico (PVA) es un material de gran interés en la inmovilización de enzimas debido a que no es tóxico, a su elevada disponibilidad a bajo coste, y buena estabilidad mecánica (Lozinsky y Plieva, 1998). Los hidrogeles de PVA para el atrapamiento de biocatalizadores (microorganismos o enzimas) se pueden obtener mediante técnicas de congelación-descongelación, irradiación o entrecruzamiento con agentes químicos. El método de congelación y descongelación presenta la ventaja de no utilizar compuestos químicos tóxicos para la formación del hidrogel. Además, los criogeles de alcohol polivinílico dan lugar a una estructura heterogénea y muy porosa que se puede controlar modificando las características y la concentración del polímero (Lozinsky y Plieva, 1998). La incorporación de otros polímeros como el polietilenglicol (PEG) permite la formación de hidrogeles con propiedades mejoradas, ya que su incorporación al proceso de polimerización modifica la porosidad y la estabilidad mecánica de la matriz de PVA (Lozinsky et al., 1995) y, por tanto, la estabilidad y operatividad de la enzima.

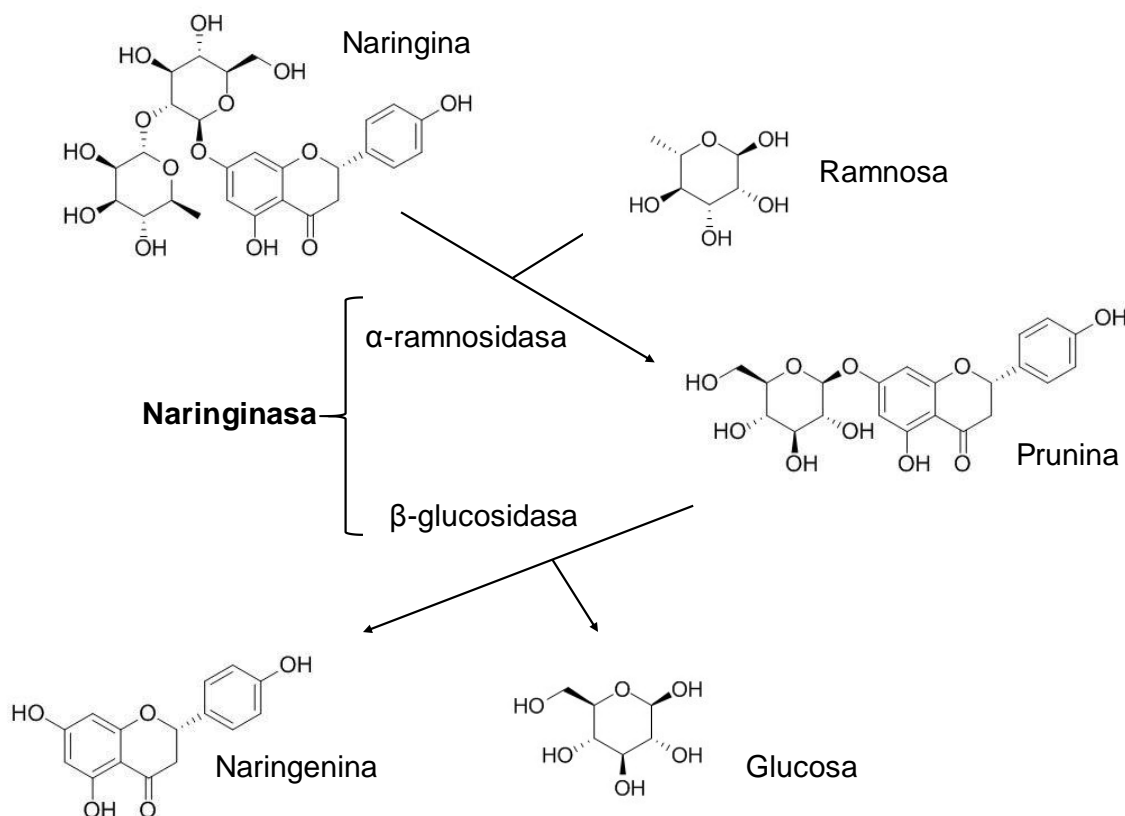


Fig. 1: Hidrólisis enzimática de naringina. (Adaptado de Puri, 2012)

El interés de la enzima objeto de estudio, queda reflejado en los numerosos trabajos de investigación descritos en la literatura en los últimos años. Esta enzima ha sido inmovilizada mediante enlace covalente a soportes de diferente naturaleza, como chips de madera (Puri et al., 2005), Amberlite XAD 16N y Amberlite XAD-1600 (Amaro et al., 2009), nanopartículas de fibroína de seda (Wu et al., 2013), óxidos de grafeno (Carceller et al., 2019) o materiales silíceos del tipo MCM-41, SBA-15 (Luo et al., 2019), entre otros. También se ha inmovilizado por atrapamiento en diferentes matrices como PVA (Busto et al., 2007; Nunes et al., 2016), κ -carragenato (Ribeiro y Ribeiro, 2008), nanofibras de triacetato de celulosa (Huang et al., 2017), alginato o quitosano (Housseiny y Aboelmagd, 2019). No obstante, a pesar de los diferentes estudios sobre inmovilización de esta enzima, su aplicación comercial todavía es limitada. Por ello, se hace necesario la mejora de los procesos y soportes de inmovilización para que pueda ser utilizada a nivel industrial en el procesado de zumos cítricos.

El objetivo de este trabajo fue la inmovilización de naringinasa de *Penicillium decumbens* en criogeles de PVA-PEG para obtener un catalizador activo y estable. En primer lugar, se seleccionaron las características de los componentes de la matriz de inmovilización (peso molecular, grado de hidrólisis y grado de polimerización del PVA y peso molecular del PEG) en base a la mayor retención de enzima activa en los inmovilizados y a su estabilidad mecánica. Posteriormente, se analizó, mediante diseño de experimentos y modelo de superficie de respuesta, el efecto del pH y de las concentraciones de PVA y PEG sobre la eficacia de inmovilización. Adicionalmente, se realizaron también estudios de estabilidad operacional en zumo sintético.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se presenta estructurada en los siguientes apartados: inmovilización de naringinasa, medida de actividad enzimática, caracterización morfológica de los inmovilizados, diseño de experimentos y estabilidad operacional.

Inmovilización de naringinasa

La naringinasa de *Penicillium decumbens* (Sigma) fue inmovilizada mediante el método de congelación-descongelación previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Busto et al., 2007). Para ello, se preparaba una disolución de PVA-PEG, a las concentraciones definidas por el diseño, a la que se adicionaba NaOH en la proporción NaOH/PVA del 2,5-10% (p/p), en función de las características del polímero. La mezcla se autoclavaba durante 15 min a 121 °C. Una vez enfriada la solución, el pH se ajustaba con HCl y NaOH y se adicionaba la enzima, disuelta en tampón acetato 0,2 M a pH 5, para obtener una concentración final de 0,5-mg ml⁻¹. La mezcla se goteaba sobre nitrógeno líquido formándose instantáneamente perlas con la enzima atrapada en su interior. Estas perlas se mantenían durante 1 h en nitrógeno líquido, después de lo cual se retiraba el nitrógeno líquido y los inmovilizados se recogían y almacenaban a 4 °C durante 24 h para su completa descongelación. Finalmente, las perlas se lavaban con agua destilada durante 2 h, se secaban sobre papel de filtro estéril y se almacenaban a 4°C hasta su uso. Se cuantificó con el método de Lowry (Lowry et al., 1951) un contenido en proteína de 22 mg g⁻¹ de soporte.

Medida de actividad enzimática

La medida de actividad de la enzima libre e inmovilizada se basó en la cuantificación de la naringina residual mediante el método de Davis (Davis, 1947). El procedimiento implicaba mezclar 5 ml de solución de sustrato (0,8 mg ml⁻¹ de naringina en tampón acetato 0,2 M a pH 5 o en zumo sintético) con 0,1 ml de solución de enzima (5 mg ml⁻¹ de naringinasa en tampón acetato 0,2 M a pH 5), o la cantidad equivalente de enzima inmovilizada. Esta mezcla se incubaba durante 1 h a 50 °C con agitación orbital a 150 rpm, paralizando la reacción con hielo. Paralelamente, se incluía un control de soporte de inmovilización (perlas de PVA-PEG) sin enzima. Tras la reacción enzimática, se tomaron alícuotas (0,1 ml) a las que se añadían NaOH 4 M (0,1 ml) y dietilenglicol al 90% (v/v) (0,8 ml). Pasados 20 min la intensidad del color amarillo formado se determinaba espectrofotométricamente a 420 nm. Para la cuantificación se empleaba una recta patrón de naringina (Sigma) de 0 a 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. No se detectó liberación de la enzima inmovilizada durante la reacción.

Caracterización morfológica de los inmovilizados

Las perlas de naringinasa inmovilizada fueron preparadas para microscopía electrónica de barrido (MEB) siguiendo el protocolo descrito por Li et al. (2015). Primero, se fijaban las muestras con glutaraldehído al 2% (p/v) durante 20 min. Posteriormente, se deshidrataban mediante inmersión secuencial en concentraciones crecientes de acetona (50, 60, 70, 80 y 90% (p/v)) y, finalmente, para retirar las trazas de agua se trataban dos veces con acetona anhidra. Las perlas deshidratadas se liofilizaban, se cortaban por la mitad con un

bisturí estéril y se recubrían con oro. De esta forma, las muestras estaban ya preparadas para la observación con el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6400LV). Se tomaron imágenes a un voltaje de aceleración de 10 kV y aumentos de 45x y de 3000x para la observación de la superficie e interior de las perlas, respectivamente.

Diseño de experimentos

La optimización del proceso de inmovilización de naringinasa se llevó a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta. Se escogió un diseño de experimentos del tipo 2^3 con estrella, rotable, con tres réplicas en el centro. Las variables independientes estudiadas fueron la concentración de PVA (A), la concentración de PEG (B) y el pH de inmovilización (C), cuyos niveles se muestran en la Tabla 1. La respuesta analizada fue la eficacia de inmovilización (Y).

Tabla 1: Niveles de los factores estudiados para la inmovilización de naringinasa.

Variables	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
A: Concentración de PVA (%)	5,3	6,0	7,0	8,0	8,7
B: Concentración de PEG (%)	7,0	8,0	9,5	11,0	12,0
C: pH de inmovilización	3,0	4,0	5,5	7,0	8,0

La eficacia de inmovilización (EI%) relaciona la actividad de la enzima inmovilizada frente a la libre, en las condiciones de ensayo, tal y como se describe en la siguiente expresión (ecuación (1)):

$$EI (\%) = \frac{\text{Actividad naringinasa inmovilizada}}{\text{Actividad naringinasa libre}} \times 100 \quad (1)$$

La relación entre la variable respuesta y las variables independientes fue explicada mediante una ecuación polinómica de segundo grado (ecuación (2)):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

En esta ecuación, Y es la variable respuesta predicha, β_0 es el término independiente, β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el coeficiente cuadrado, β_{ij} es el coeficiente de interacción, y X_i o X_j representan las variables independientes. 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 la variable respuesta.

Reutilización de naringinasa inmovilizada en zumo sintético

Con el fin de determinar la reutilización, la naringinasa inmovilizada se aplicaba en tres ciclos consecutivos de reacción en zumo sintético (C1, C2, C3). Para ello, se trataban 5 mL de zumo con una concentración de enzima del 0,01 % (p/v), durante 1 h a 50 °C y 150 rpm. Después de cada ciclo, las perlas de PVA-PEG se filtraban y lavaban con tampón acetato 0,2 M a pH 5 para incorporarlas a otros 5 mL de zumo. Se determinaba la actividad naringinasa en los inmovilizados utilizados después de cada ciclo, cuantificando la reducción del contenido en naringina en el zumo tratado. El zumo sintético se preparó siguiendo las indicaciones de Gray y Olson (1981). Para un litro de zumo, se pesaban 0,8 g de naringina, 47,5 g de sacarosa y 0,25 g de ácido cítrico. Para facilitar la disolución de la naringina se mantenía la mezcla a 50 °C en baño María. El pH se ajustaba a 3,2 y, posteriormente, se eliminaban los sólidos insolubles mediante filtración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudió, en primer lugar, cómo afectaban las características del alcohol polivinílico y el polietilenglicol a la inmovilización de la naringinasa. Una vez seleccionadas las características más adecuadas se procedió a optimizar las condiciones de inmovilización mediante la herramienta de diseño de experimentos y superficie de respuesta.

Selección de los componentes de la matriz

Para llevar a cabo este estudio, se partió de las condiciones óptimas determinadas por Busto et al. (2007) para inmovilización de naringinasa en geles de PVA: concentración de PVA del 8% (p/v), concentración de naringinasa de 0,5 mg ml⁻¹ y pH del medio de inmovilización de 7. Con estas condiciones iniciales se seleccionaron PVA comerciales con características diferenciadas, ya que la formación de geles de PVA se ve influida por el grado de hidrólisis (GH), el grado de polimerización (GP) y el peso molecular (PM) del polímero. Para la formación de hidrogeles estables se necesitan GH altos, ya que la presencia de grupos ésteres residuales interfiere en la formación de enlaces intermoleculares entre las cadenas de PVA (Lozinsky y Plieva, 1998). El GP afecta a la viscosidad de la solución de PVA, de forma que GP bajos dan soluciones poco viscosas que no forman el hidrogel, mientras que, GP muy altos hacen que la solución sea muy difícil de manipular por su elevada viscosidad. El incremento del PM del polímero, en general, favorece la gelificación.

En la Tabla 2 se detallan los valores de eficacia de inmovilización obtenidos con PVA de características diferenciadas. Los resultados se presentan como la media de tres réplicas \pm SD. Letras minúsculas diferentes (a, b) en el superíndice indican diferencias significativas ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la eficacia de inmovilización, 50-56%, entre los distintos PVA. Se observó que a medida que aumentaba el peso molecular y el grado de polimerización del polímero, las perlas obtenidas eran más estables mecánicamente y se rompían menos durante la manipulación. No obstante, valores de PM de 205 kDa daban soluciones cuya elevada viscosidad dificultaba enormemente su manipulación, por lo que se descartó este PVA para las pruebas posteriores.

Tabla 2: Influencia del peso molecular (PM), grado de polimerización (GP) y grado de hidrólisis (GH) del PVA en la eficacia de inmovilización (EI%) de naringinasa.

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

Con el objetivo de mejorar la estabilidad mecánica de los criogeles se decidió incorporar a la matriz de PVA, polietilenglicol (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 se incorporó, para inmovilización de la naringinasa, PEG de distinto peso molecular (400, 600 y 1000 Da). Los resultados obtenidos (Tabla 3) se presentan como la media de tres réplicas \pm SD. Letras minúsculas diferentes (a, b, c) en el superíndice indican diferencias significativas dentro de la misma columna ($p < 0,05$). Letras griegas diferentes (α , β , γ) indican diferencias significativas dentro de una misma fila ($p < 0,05$). Se puede observar que la incorporación de PEG da lugar, en todos los casos, a una disminución de la capacidad de inmovilización del criogel formado, con eficacias de inmovilización del 26-44%. Para PVA de 61.000 Da la eficacia de inmovilización disminuye al incrementar el peso molecular 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, aunque sí se observó disminución del porcentaje de inmovilización con PEG de 1000 Da. Para PVA de 145.000 Da el menor porcentaje de inmovilización se obtuvo con PEG de 600 Da, mientras que no se detectaron diferencias significativas con PEG 400 y PEG 1000.

Tabla 3: Efecto de la incorporación de PEG de distintos pesos moleculares (400, 600 y 1000 Da) a la matriz de PVA en la inmovilización de naringinasa.

PM de PVA (Da)	EI (%)		
	PEG 400	PEG 600	PEG 1000
61.000	46,2 \pm 1,2 ^{a,α}	36,2 \pm 3,1 ^{b,β}	25,8 \pm 1,3 ^{c,γ}
125.000	44,9 \pm 4,0 ^{a,α}	41,7 \pm 3,1 ^{a,$\alpha\beta$}	36,8 \pm 1,3 ^{b,β}
145.000	44,9 \pm 3,7 ^{a,α}	34,8 \pm 1,7 ^{b,β}	43,6 \pm 1,5 ^{a,β}

No hay referencias previas sobre inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA-PEG, los datos disponibles con este soporte de inmovilización se refieren a peroxigenasas inmovilizadas con PVA (61000 Da) y PEG (1000 Da), con resultados que no superaban el 60% de retención de la actividad inicial (Poraj-Kobielska et al., 2015). En esta experiencia se pudo comprobar que las soluciones de PVA de 125.000 Da eran menos viscosas y más fáciles de manipular que las de PVA de 145.000 Da. Además, los inmovilizados enzimáticos obtenidos con este PVA eran también más estables a la ruptura mecánica que las perlas formadas con PVA de 61.000 Da. De lo expuesto, dado que no había diferencias significativas entre los resultados de inmovilización con PVAs de distinto PM, se seleccionó el de 125.000 Da.

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio morfológico comparativo de la enzima inmovilizada en los criogeles de PVA, con y sin PEG, mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 2 se muestran imágenes de la superficie y del interior de las perlas obtenidas con PVA de 125.000 Da, sin PEG (Figura 2a y 2c) y con PEG de 400 Da (Figura 2b y 2d). Las imágenes de los inmovilizados muestran que, al incorporar PEG, mejora la homogeneidad en la morfología exterior con surcos más definidos y profundos (Figura 2a y 2b), dando también lugar a una estructura interna más homogénea y compacta (Figura 2c y 2d). Esta compactación estructural explicaría la mejora en la estabilidad mecánica de los inmovilizados y, también, la menor actividad enzimática debido a limitaciones difusionales.

No hay referencias previas sobre estudios morfológicos de geles de PVA-PEG como soportes de inmovilización enzimática, exceptuando el trabajo de Bieler et al. (2010) que describieron una estructura tipo esponja de los inmovilizados de benzaldehído liasa en geles de PVA-PEG. Cheng et al. (2014) estudiaron el efecto de la incorporación de PEG sobre la morfología de perlas de alginato de calcio utilizadas para la inmovilización de la bacteria *Pseudomonas putida* XY4. Observaron que la adición de PEG incrementaba la porosidad del gel y el tamaño de los poros a medida que se incrementaba su PM. Por otra parte, Zhang y Ye (2011) estudiaron el efecto de la incorporación de PEG en perlas de PVA-alginato de calcio entrecruzadas con ácido bórico. Determinaron que el incremento de la concentración y del peso molecular de PEG daba lugar a un incremento de la porosidad del gel y mejora de la transferencia de masa, a diferencia de lo observado en los inmovilizados de naringinasa en criogeles de PVA-PEG. De este primer bloque de experiencias se seleccionó para las pruebas de optimización, PVA de 125.000 Da y PEG de 400 Da, ya que a pesar de que la incorporación de PEG daba lugar a la disminución de la eficacia de inmovilización, las perlas obtenidas presentaban una mayor estabilidad a la manipulación mecánica.

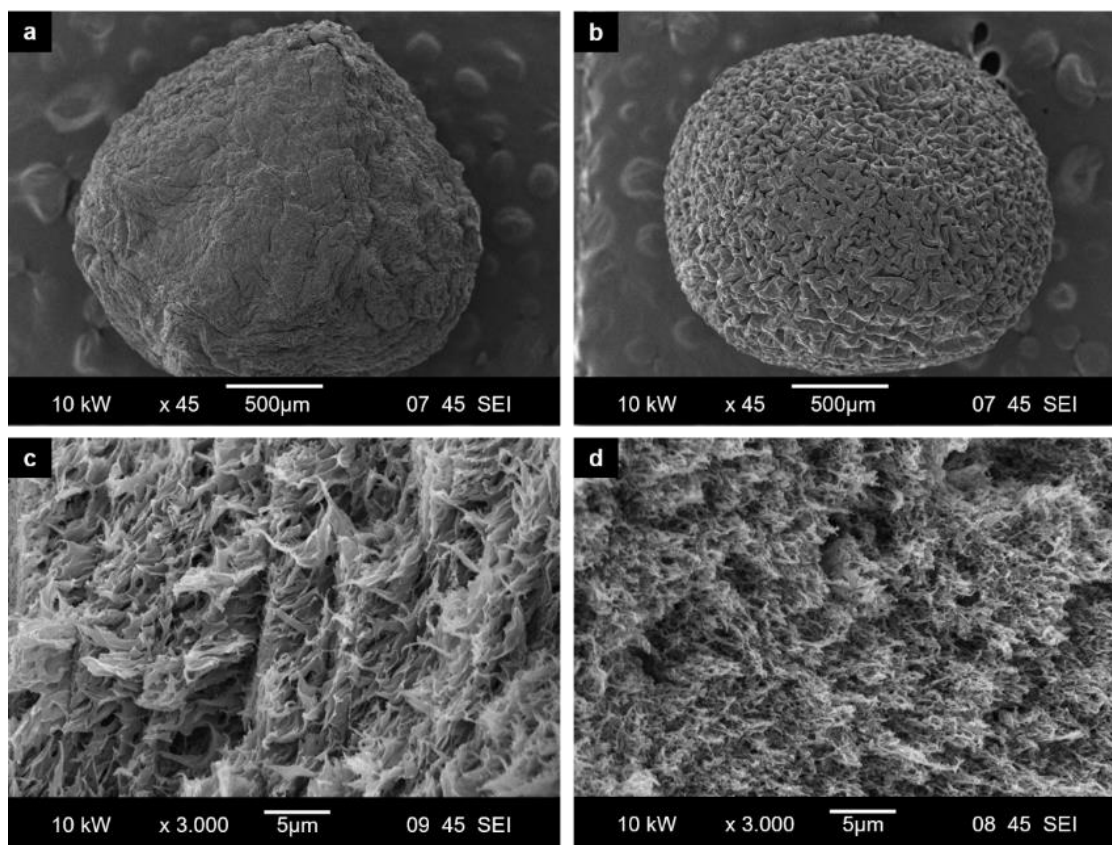


Fig. 2: Imágenes de MEB de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA de 125.000 Da. Superficie de la perla: (a) sin PEG y (b) con PEG de 400 Da; Interior de la perla: (c) sin PEG y (d) con PEG de 400 Da.

Optimización de la inmovilización de naringinasa

La optimización de la inmovilización de naringinasa en criogeles de PVA de 125.000 Da y PEG de 400 Da se llevó a cabo mediante la metodología de diseño de experimentos y superficie de respuesta. En la Tabla 4 se presentan los 17 experimentos propuestos por el diseño junto a los valores experimentales obtenidos para la respuesta analizada (EI%). El experimento 16 se eliminó del diseño por considerarse un punto atípico. El efecto de las variables independientes sobre la eficacia de inmovilización se estudió mediante el análisis de la varianza (ANOVA) representado en la Tabla 5. Los factores que tienen una influencia significativa sobre la respuesta, a un nivel de confianza del 95%, deben presentar valores de *P* inferiores a 0,05 (Morales et al., 2017). Del ANOVA se deduce, por tanto, que, la concentración de PEG (B), el pH de inmovilización (C), y las interacciones [PVA]-pH (AC), [PEG]-pH (BC) tienen un efecto significativo sobre la inmovilización. Por el contrario, en el intervalo estudiado, la concentración de PVA (A) y las interacciones [PVA]-[PEG] (AB) no ejercían un efecto significativo.

La adecuación del modelo matemático para la eficacia de inmovilización puede ser confirmada mediante el ANOVA (Tabla 5). La prueba de fallo de ajuste permite determinar si el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Por consiguiente, y debido a que el valor de *P* es mayor de 0,05 (0,1066) se puede concluir que el modelo obtenido se ajusta a los datos experimentales. Además, se puede confirmar que el modelo matemático explica un porcentaje elevado de la varianza de los datos, ya que el coeficiente de regresión *R*² es 92,1%. Así pues, la ecuación (3) que explica la relación entre la respuesta y las variables independientes es la siguiente:

$$Y (\%) = 292,759 - 10,1782A - 1,09203B - 76,3062C + 0,881356A^2 - 0,49858B^2 + 1,33022C^2 - 2,51786AB + 3,58286AC + 4,29857BC \quad (3)$$

En esta ecuación, *Y* es la eficacia de inmovilización y *A*, *B*, y *C* son los valores de concentración de PVA, concentración de PEG y pH de inmovilización, respectivamente.

Tabla 4: Diseño experimental y respuesta obtenida en la inmovilización de naringinasa.

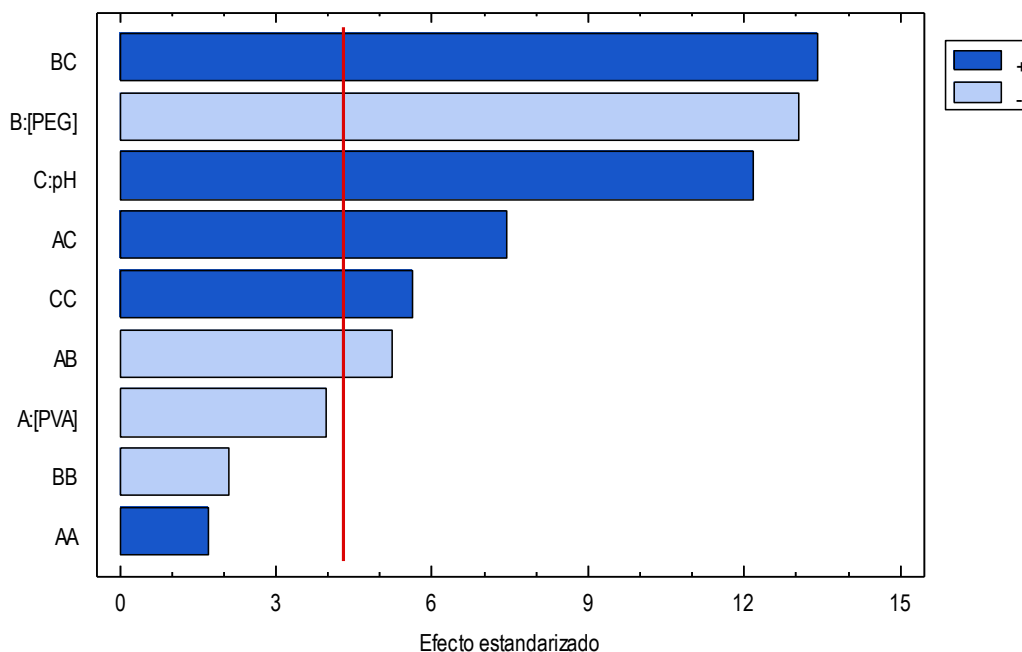
<i>Experimento</i>	Variables independientes			Respuesta
	<i>A: [PVA] (%)</i>	<i>B: [PEG] (%)</i>	<i>C: pH</i>	<i>EI (%)</i>
1	8,7	9,5	5,5	24,8
2	7,0	9,5	5,5	25,8
3	7,0	9,5	3,0	19,7
4	8,0	8,0	7,0	39,1
5	7,0	9,5	8,0	47,5
6	8,0	11,0	7,0	32,1
7	6,0	8,0	7,0	23,7
8	6,0	11,0	4,0	14,8
9	6,0	8,0	4,0	45,4
10	7,0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

El diagrama de Pareto es una representación gráfica del efecto estandarizado de los factores sobre la respuesta. Las barras representadas tienen una longitud proporcional al efecto sobre la respuesta. Se considera que sólo las variables cuyas barras atraviesan la línea vertical interna del diagrama tendrán significancia estadística a un nivel de confianza del 95%. Del análisis de este diagrama (Figura 3) se deducía que la interacción [PEG]-pH era el parámetro que mayor efecto ejercía sobre la eficacia de inmovilización, seguido de la concentración de PEG y el pH. Además, se puede decir que de los factores que tienen un efecto significativo, la concentración de PEG y la interacción [PVA]-[PEG] ejercen un efecto negativo sobre la eficacia de inmovilización, mientras que el pH de inmovilización, y las interacciones [PEG]-pH y [PVA]-pH son directamente proporcionales a la respuesta.

Tabla 5: Análisis de la Varianza para la eficacia de inmovilización.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor F	Valor P
A: [PVA]	47,6	1	47,6	15,74	0,0580
B: [PEG]	515,404	1	515,404	170,48	0,0058
C: pH	448,54	1	448,54	148,36	0,0067
AA	8,87493	1	8,87493	2,94	0,2288
AB	82,7184	1	82,7184	27,36	0,0347
AC	167,494	1	167,494	55,40	0,0176
BB	13,4201	1	13,4201	4,44	0,1697
BC	542,463	1	542,463	179,43	0,0055
CC	95,5281	1	95,5281	31,60	0,0302
Fallo de ajuste	104,323	4	26,0808	8,63	0,1066
Error puro	6,04647	2	3,02323		
Total (corr.)	1396,81	15			

$R^2 = 92,1\%$; $R^2_{adj} = 80,25\%$

Fig. 3: Diagrama de Pareto para la eficacia de inmovilización (Y_1).

Mediante la ec (3) se pueden construir los diagramas de superficie de respuesta en los que se representan dos de las variables independientes frente a la eficacia de inmovilización, manteniendo constante la variable no representada (Figura 4). Estos diagramas permiten deducir la dirección hacia la que hay que moverse sobre dicha superficie para alcanzar un determinado valor en la respuesta. En la Figura 4a se representa la concentración de PVA frente al pH de inmovilización, fijando la concentración de PEG en el centro del diseño (9,5%). Se observa que, a bajas concentraciones de PVA (5,3-6,3%), la modificación del pH no tiene efecto sobre la respuesta, sin embargo, al aumentar la concentración de PVA a niveles máximos del rango estudiado (8,7%) se observa que el incremento del pH se traduce en un aumento de la eficacia de inmovilización llegando a alcanzar valores, según el modelo, en torno al 60%.

En la Figura 4b se observa que al fijar el pH de inmovilización en los valores centrales del diseño (5,5), la eficacia de inmovilización apenas se modifica a valores bajos de concentración de PVA (5,3-6,3%), manteniéndose en torno al 30%. Sin embargo, a concentraciones altas de PVA (8,7%), la eficacia de inmovilización se ve incrementada cuando se reduce la concentración de PEG, alcanzando entorno al 45% cuando la concentración de PEG se encuentra en el valor mínimo estudiado (7%). En la Figura 4c se

muestra representada la concentración de PEG frente al pH de inmovilización, mientras que la concentración de PVA está fijada en el valor central del diseño (7%). Destaca que aplicando concentraciones elevadas de PEG (12%) junto con un pH ácido de 3, prácticamente la eficacia de inmovilización es nula. Sin embargo, concentraciones altas de PEG (12%) y valores básicos de pH de 8, o concentraciones bajas de PEG (7%) y pH ácidos de 3, la eficacia de inmovilización se incrementaba notablemente alcanzando valores óptimos, cercanos al 60%. Por tanto, del análisis del diagrama de Pareto y de las superficies de respuesta puede concluirse que el pH de inmovilización y sus interacciones con las otras variables (concentración de PVA y de PEG) tienen un efecto muy importante sobre la eficacia de inmovilización.

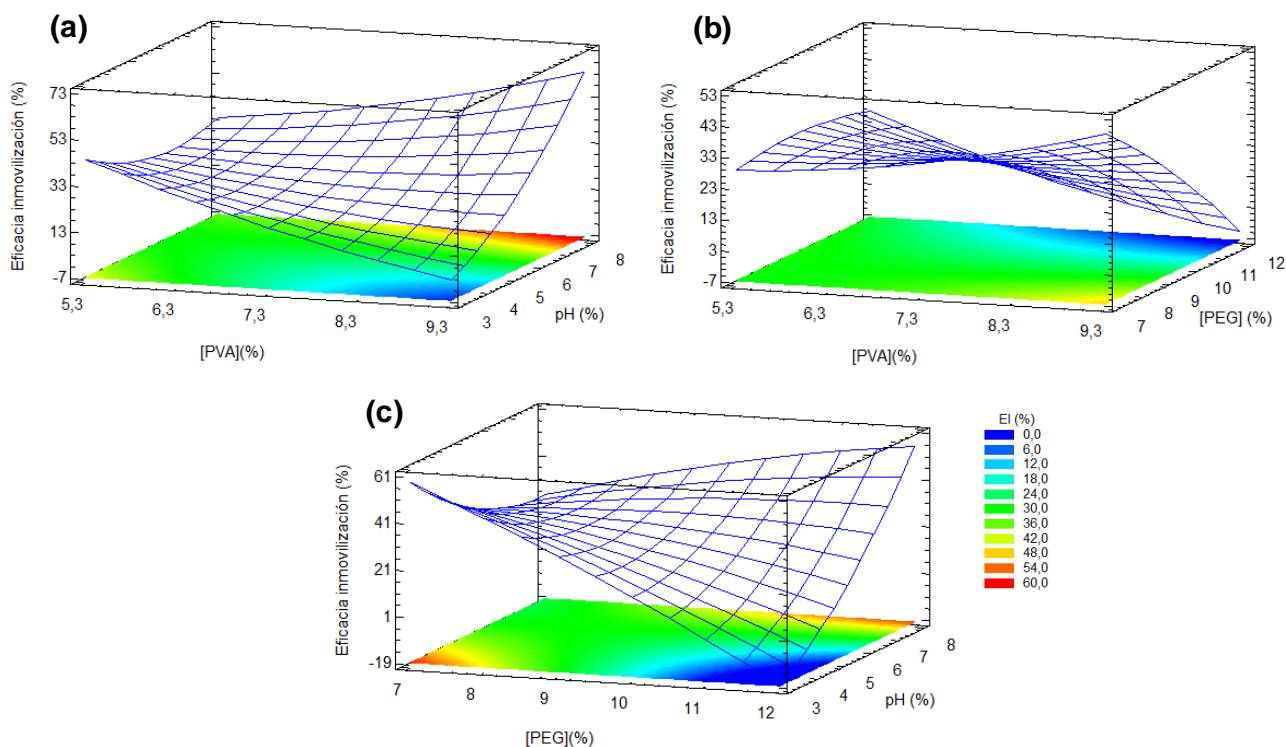


Fig. 4: Diagrama de superficie de respuesta estimada para la eficacia de inmovilización (EI%). (a) [PEG]= 9,5%; (b) pH= 5,5; (c) [PVA]= 7,0%.

A partir del modelo obtenido (ecuación (3)) 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 el modelo predecía una eficacia de inmovilización del 59,8%, resultado muy alejado del valor experimental obtenido del 37,9% (SD= $\pm 1,8$). Esta discrepancia (desviación) entre la respuesta estimada y el valor experimental, suele producirse, como es el caso, cuando los niveles de los factores se encuentran en los extremos de un diseño central compuesto. Por ello, se seleccionaron las condiciones del diseño, experimento 5 y 9 (Tabla 4), en las que la eficacia de inmovilización obtenida experimentalmente era mayor y, además, presentaban menos discrepancias con las respuestas estimadas por el modelo teórico. En concreto, una concentración de PVA del 7%, PEG del 9,5% y pH 8 (experimento 5) y PVA del 6%, PEG del 8% y pH 4 (experimento 9) daban lugar a eficacias de inmovilización experimentales del $47,5 \pm 3,9\%$ y $45,4 \pm 4,0\%$, respectivamente. Para estas condiciones de ensayo, el modelo daba como resultado respuestas del 43,9% y 41,5%, respectivamente.

Las pérdidas en la eficacia de inmovilización observadas al inmovilizar la enzima naringinasa en geles de PVA-PEG pueden ser consecuencia de la desnaturalización e inactivación de la proteína enzimática durante el proceso de congelación-descongelación y de una difusión limitada del sustrato y del producto de reacción. La difusión limitada contribuye a la inhibición de la enzima por los productos de reacción, glucosa y ramnosa (Norouzián et al., 2000).

Reutilización de naringinasa inmovilizada en zumo sintético

Finalmente, se llevó a cabo el estudio de la capacidad de reutilización de la enzima inmovilizada obtenida en las dos condiciones experimentales indicadas anteriormente (experimento 5 y 9) en zumo sintético. Los resultados de estas experiencias se plasman en la Figura 5. Letras minúsculas diferentes (a, b) indican

diferencias significativas entre los diferentes experimentos para cada ciclo de reutilización ($p < 0,05$). Se puede observar que no existían diferencias significativas en la actividad enzimática después del primer ciclo de tratamiento del zumo (C1). No obstante, la estabilidad de los inmovilizados era muy diferente en los siguientes ciclos. Mientras que el biocatalizador obtenido en las condiciones del experimento 5 (PVA al 7%, PEG al 9,5%, pH 8) mantenía después del segundo (C2) y tercer ciclo (C3) un 86,6% y un 54,3% de actividad, respectivamente, con respecto a la del primer ciclo (C1) (Fig. 5), los inmovilizados del experimento 9 (PVA al 6%, PEG al 8%, pH 4) (Fig. 5) retenían sólo el 41,5% después del segundo ciclo (C2), perdiendo toda la actividad enzimática tras la tercera aplicación en el zumo (C3).

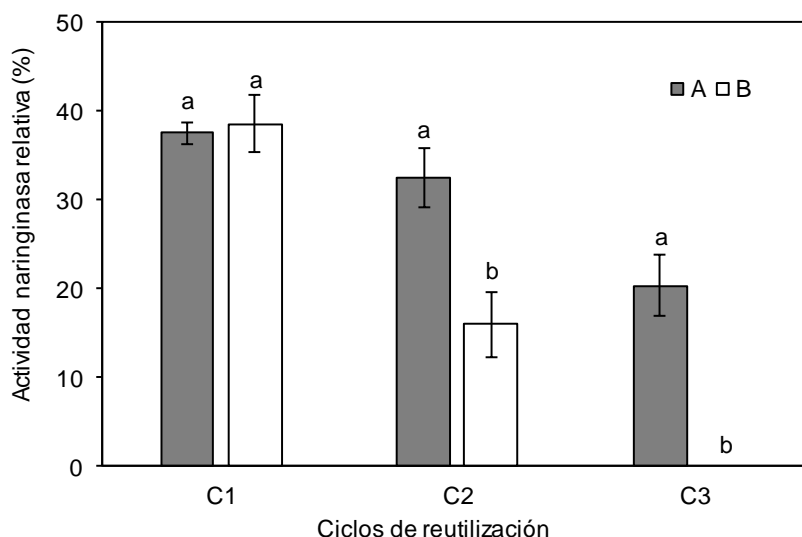


Fig. 5: Estudio de reutilización en zumo sintético de naringinasa inmovilizada en criogeles de PVA-PEG. Condiciones de inmovilización: A) PVA al 7%; PEG al 9,5% y pH8 (experimento 5); B) PVA al 6%; PEG al 8% y pH 4 (experimento 9). Cn: ciclos de aplicación en el zumo de 1 h a 50°C y 150 rpm. Actividad de la enzima libre en el zumo sintético (100%).

CONCLUSIONES

De las experiencias realizadas se ha podido comprobar que la incorporación de PEG en la matriz de inmovilización mejoraba la estabilidad mecánica de los inmovilizados sin reducciones importantes en la actividad enzimática. El diseño de experimentos y la metodología de superficie de respuesta permitieron, con el menor número de pruebas experimentales, determinar las condiciones de inmovilización con los niveles más altos de enzima activa. No obstante, es necesario optimizar de forma simultánea la eficacia de inmovilización y la estabilidad operativa ya que condiciones que daban lugar a elevados porcentajes de actividad, no aseguraban la misma capacidad de reutilización del inmovilizado.

REFERENCIAS

- Amaro, M.I., J. Rocha y otros cinco autores, *Anti-inflammatory Activity of Naringin and the Biosynthesised Naringenin by Naringinase Immobilized in Microstructured Materials in a Model of DSS-induced Colitis in Mice*, doi: 10.1016/j.foodres.2009.04.016, *Food Res. Int.*, 42(8), 1010-1017 (2009).
- Bieler, N.C., M.B. Ansorge-Schumacher y L. Greiner, *Automated Lab-scale Production of PVA/PEG-enzyme Immobilisates*, doi: 10.1002/biot.201000070, *Biotechnol. J.*, 5(8), 881-885 (2010).
- Busto, M.D., M. Cavia-Saiz y otros dos autores, *Enzymatic Debittering on Antioxidant Capacity of Grapefruit Juice; in Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Academic Press, 195-202 (2014).
- Busto, M.D., V. Meza y otros dos autores, *Immobilization of Naringinase from Aspergillus niger CECT 2088 in Poly (vinyl alcohol) Cryogels for the Debittering of Juices*, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.033, *Food Chem.*, 104(3), 1177-1182 (2007).
- Carceller, J., J.P. Galán y otros seis autores, *Selective Synthesis of Citrus Flavonoids Prunin and Naringenin Using Heterogeneous Biocatalyst on Graphene Oxide*, doi: 10.1039/C8GC03661F, *Green Chem.*, 21(4), 839-849 (2019).
- Cheng, Y., L. Ma y otros tres autores, *Effect of PEG-mediated Pore Forming on Ca-alginate Immobilization of Nitrilase-producing Bacteria Pseudomonas putida XY4*, doi: 10.1007/s00449-014-1137-1, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37(8), 1653-1658 (2014).

- Davis, W. B., *Determination of Flavanones in Citrus Fruits*, doi: 10.1021/ac60007a016, Anal. Chem., 19(7), 476-478 (1947).
- Gray, G.M. y A.C. Olson, *Hydrolysis of High Levels of Naringin in Grapefruit Juice using a Hollow Fiber Naringinase Reactor*, doi: 10.1021/jf00108a051, J. Agric. Food Chem., 29(6), 1298-1301 (1981).
- Housseiny, M.M. y H.I. Aboelmagd, *Nano-encapsulation of Naringinase Produced by Trichoderma longibrachiatum ATCC18648 on Thermally Stable Biopolymers for Citrus Juice Debittering*, doi: 10.1007/s12275-019-8528-6, J. Microbiol. 57(6), 521-531 (2019).
- Huang, W., Y. Zhan y otros cuatro autores, *Controllable Immobilization of Naringinase on Electrospun Cellulose Acetate Nanofibers and their Application to Juice Debittering*, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.018, Int. J. Biol. Macromol., 98, 630-636 (2017).
- Li, F., W. Mao y otros cinco autores, *Characterization of Microcystis Aeruginosa Immobilized in complex of PVA and Sodium Alginate and its Application on Phosphorous Removal in Wastewater*, doi: 10.1007/s11771-015-2499-5, J. Cent. South Univ., 22(1), 95-102 (2015).
- Lowry, O., N. Rosebraugh y otros dos autores, *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- Lozinsky, V.I. y F.M. Plieva, *Poly (vinyl alcohol) Cryogels Employed as Matrices for Cell Immobilization. 3. Overview of Recent Research and Developments*, doi: 10.1016/S0141-0229(98)00036-2, Enzyme Microb. Technol., 23(3-4), 227-242 (1998).
- Lozinsky, V.I., E. V. Solodova y otros dos autores, *Study of Cryostructuring of Polymer Systems. XI. The Formation of PVA Cryogels by Freezing-Thawing the Polymer Aqueous Solutions Containing Additives of Some Polyols*, doi: 10.1002/app.1995.070580119, J. Appl. Polym. Sci., 58(1), 171-177 (1995).
- Luo, J., Q. Li y otros seis autores, *The Study of the Characteristics and Hydrolysis Properties of Naringinase Immobilized by Porous Silica Material*, doi: 10.1039/c9ra00075e, RSC Adv., 9(8), 4514-4520 (2019).
- Morales, J.A., O.A. Figueroa y J.E. Zapata, *Optimización de Hidrólisis Enzimática de la Fracción Globular de Sangre Bovina por Metodología de Superficie Respuesta y Evaluación de sus Propiedades Antioxidantes*, doi: 10.4067/S0718-07642017000200009, Inf. Tecnol., 28(2), 75-86 (2017).
- Moriyama, K., R. Wakabayashi y otros dos autores, *Characterization of Enzymatically Gellable, Phenolated Linear Poly (ethylene glycol) with Different Molecular Weights for Encapsulating Living Cells*, doi: 10.1016/j.bej.2014.09.003, Biochem. Eng. J., 93, 25-30 (2015).
- Norouzian, D., A. Hosseinzadeh y otros dos autores, *Production and Partial Purification of Naringinase by Penicillium decumbens PTCC 5248*, doi: 10.1023/A:100896213, World J. Microbiol. Biotechnol., 16(5), 471-473 (2000).
- Nunes, M.A., P.M.P. Gois y otros cuatro autores, *Boronic Acids as Efficient Cross Linkers for PVA: Synthesis and Application of Tunable Hollow Microspheres in Biocatalysis*, doi: 10.1016/j.tet.2016.02.017, Tetrahedron, 72(46), 7293-7305 (2016).
- Patil, S.V., S.H. Koli y otros cinco autores, *A novel Screening Method for Potential Naringinase-Producing Microorganisms*, doi: 10.1002/bab.1728, Biotechnol. Appl. Biochem. (2019).
- Poraj-Kobielska, M., S. Peter y otros cuatro autores, *Immobilization of Unspecific Peroxygenases (EC 1.11. 2.1) in PVA/PEG Gel and Hollow Fiber Modules*, doi: 10.1016/j.bej.2015.02.037, Biochem. Eng. J., 98, 144-150 (2015).
- Puri, M., H. Kaur y J.F. Kennedy, *Covalent Immobilization of Naringinase for the Transformation of a Flavonoid*, doi: 10.1002/jctb.1303, J. Chem. Technol. Biotechnol., 80(10), 1160-1165 (2005).
- Puri, M., *Updates on Naringinase: Structural and Biotechnological Aspects*, doi: 10.1007/s00253-011-3679-3, Appl. Microbiol. Biotechnol., 93(1), 49-60 (2012).
- Ribeiro, I.A. y M.H. Ribeiro, *Kinetic Modelling of Naringin Hydrolysis using a Bitter Sweet Alfa-rhamnopyranosidase Immobilized in k-carrageenan*, doi: 10.1016/j.molcatb.2007.09.023, J. Mol. Catal., B Enzym., 51(1-2), 10-18 (2008).
- Ribeiro, M.H., *Naringinases: Occurrence, Characteristics, and Applications*, doi: 10.1007/s00253-011-3176-8, Appl. Microbiol. Biotechnol., 90(6), 1883-1895 (2011).
- Stinco, C.M., R. Fernández-Vázquez y otros cuatro autores, *Industrial Orange Juice Debittering: Impact on Bioactive Compounds and Nutritional Value*, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.11.009, J. Food Eng., 116(1), 155-161 (2013).
- Wu, M.H., L. Zhu y otros dos autores, *Coimmobilization of Naringinases on Silk Fibroin Nanoparticles and its Application in Food Packaging*, doi: 10.1155/2013/901401, J. Nanopart., 2013, 1-5 (2013).
- Yadav, M., N. Sehrawat y otros tres autores, *Naringinase: Microbial Sources, Production and Applications in Food Processing Industry*, doi: 10.15414/jmbfs.2018.8.1.717-720, J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci., 8(1), 717(2018).
- Zhang, Y. y L. Ye, *Improvement of Permeability of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel by using Poly (ethylene glycol) as Porogen*, doi: 10.1080/03602559.2010.551443, Polym. Plast. Technol. Eng., 50(8), 776-782 (2011).
- Zhu, Y., H. Jia y otros cuatro autores, *Purification and Characterization of a Naringinase from a Newly Isolated Strain of Bacillus amyloliquefaciens 11568 Suitable for the Transformation of Flavonoids*, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.108, Food Chem., 214, 39-46 (2017).

Página en blanco