

# ESTUDIO DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE FRACCIONAMIENTO DE PECTINA PROVENIENTE DE CÁSCARA DE CHONTADURO

Escobar, Sebastian<sup>a</sup>; Parra, Marcelo<sup>a</sup>; Álvarez, Carlos<sup>b</sup> & Ceballos, Andrés<sup>b</sup>. (2022).

<sup>a</sup> Estudiante de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali - Colombia.

<sup>b</sup> Profesor del Dpto. Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali - Colombia

Las cáscaras de chontaduro han sido vistas como residuos por muchas personas quienes desconocen el potencial que tiene esta materia prima, la cual podría aprovecharse para crear diferentes recetas que aporten nutrientes y vitaminas a nuestros cuerpos, extractos como pigmentos o concentrados de alto potencial para la ganadería; asimismo, por medio de procesos físicos, químicos y/o bioquímicos se puede transformar en pectina - un compuesto usado en industrias de alimentos y cosméticas, el cual puede fraccionarse por medio de enzimas dando origen a productos como el ácido galacturónico y los pecto oligosacáridos, los cuales tienen un alto valor agregado debido a los diversos beneficios que ocasionan en la salud humana como actividad anticancerígena y favorecimiento en la eliminación de metales pesados a través de la orina-; sin embargo, este último proceso requiere un amplio conocimiento de la cinética para lograr un gran resultado a escala industrial. En este sentido, el presente trabajo tiene como finalidad proponer una cinética de la transformación enzimática de pectina proveniente de cáscaras de chontaduro. Inicialmente se evaluaron a escala de planta piloto dos métodos para la obtención de pectina, modificando el tiempo de la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática y el secado, manteniendo el resto de los parámetros iguales y se encontró que dichas modificaciones tienen un efecto en el grado de metilesterificación del compuesto obtenido. Por otro lado, se realizó un seguimiento del cambio en las concentraciones de pectina, metil oligosacáridos y ácido galacturónico para posteriormente determinar que las constantes cinéticas de estos compuestos son respectivamente 0.072, 0.00062 y 0.017 min<sup>-1</sup> cuando se utiliza como sustrato pectina cítrica y 0.092, 0.000425, 0,012 min<sup>-1</sup> al utilizarse pectina de chontaduro. Finalmente, con la información recogida se realizó un modelo en Matlab que permite calcular el cambio en la concentración de pectina, metil oligosacáridos y ácido galacturónico, además de predecir la formación de pectooligosacáridos en el tiempo.

**Palabras clave:** Pectina, Ácido galacturónico, POS, Cinética enzimática, Reacciones en serie.

## INTRODUCCIÓN

La pectina es un polisacárido complejo que se emplea como aditivo en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y médica, dadas sus propiedades gelificantes, endurecedoras y estabilizantes (Round et al., 2010), las cuales dependen en gran medida del grado de metilesterificación (GME); es decir, del porcentaje de grupos carboxilos esterificados con metanol. De acuerdo con esta propiedad, las pectinas se dividen en dos grupos: pectinas de alto metoxilo (HMP) con GME>50% y de bajo metoxilo (LMP) con GME<50% (Hosseini et al., 2016). Las principales fuentes comerciales de pectina son la pulpa de remolacha azucarera, el orujo de manzana y las cáscaras de frutas cítricas (Garna et al, 2003); sin

embargo, una materia prima alternativa son las cáscaras de chontaduro, residuos que representan alrededor del 11% del peso total del fruto (Márquez,2014); teniendo en cuenta que durante el 2019 solo en el Valle del Cauca se produjeron 40.782 toneladas del fruto (Ministerio de Agricultura, 2020) y que en la actualidad son desaprovechados al terminar principalmente en rellenos sanitarios o como contaminante en fuentes hídricas.

La pectina es de especial interés debido a que a partir de métodos físicos, químicos o enzimáticos se puede transformar en productos como el ácido galacturónico y los pecto oligosacáridos (POS). El ácido galacturónico es el principal constituyente de la pectina y es utilizado como prebiótico, como

precursor de la vitamina C y que en la actualidad ha aumentado el estudio de su actividad antimicrobiana. (Hemavathi et al, 2009; Zhang et al, 2011). Por su parte, los POS son polímeros heterogéneos complejos que varían de forma significativa entre sí en cuanto al peso molecular, composición en monosacáridos, grado de metilación, entre otros. El interés en su obtención radica en los efectos beneficiosos de los POS en la salud, incluyendo su actividad anticancerígena y su favorecimiento en la eliminación de metales pesados como cadmio, arsénico y plomo a través de la orina (Ferreira, 2015). Por el contrario, uno de los factores que ha impedido la obtención de estos compuestos a escala industrial es el desconocimiento en su cinética de reacción, la cual es de gran utilidad para predecir la velocidad de una reacción a condiciones definidas de presión, temperatura y concentración, además que, ayuda a determinar y comprender el mecanismo por el cual tiene lugar una transformación química o bioquímica (Panales, 2021).

En la actualidad se conoce poco de la cinética de la transformación de pectina, aunque en otro sentido, dado que se trata de un polisacárido, se sabe que su fraccionamiento no se da mediante una reacción de un solo paso o etapa (Chávez et al., 2016), sino que por el contrario ocurre mediante reacciones en serie que se pueden resumir en los siguientes pasos principales: (i) pectina macromolecular, (II) ácidos poligalacturónicos, (III) ácidos oligogalacturónicos, (IV) ácido monogalacturónico o sus productos de reordenamiento, y (V) AGCC (ácidos grasos de cadena corta) (Ferreira, 2015). Para lograr lo anterior, por medios enzimáticos, se requiere de diversas actividades entre las que se encuentran la poligalacturonasa (PG), poligalacturonato esterasa (PGE), polimetilgalacturonato liasa (PMGL) y la pectínlíasa (PL) (Ferreira, 2015). Esta última es de especial interés dado que corta la pectina por  $\beta$ -eliminación produciendo compuestos intermediarios metil oligosacáridos con un doble enlace c3-c5 cuyo máximo de absorción se encuentra en la región UV entre 232 y 235 nm (Ríos & Arias, 2002; Hanson & Moeller, 2000).

Por otro lado, un aspecto que ha limitado la caracterización cinética de la hidrólisis de pectina es la cuantificación de los compuestos formados, proceso que para el ácido galacturónico se suele hacer empleando métodos espectrofotométricos como el del m-hidroxifenilfenol y el del carbazol (Barazarte, 2010) en los cuales se forma un complejo de color en el que la coloración obtenida es proporcional a la concentración de ácido galacturónico. Como contrapartida, estos métodos están sujetos a la interferencia de carbohidratos no uronidos y azúcares neutros obtenidos como subproductos de la reacción, que provocan dificultades para obtener medidas fiables pues se sobrestima el contenido de ácido galacturónico producido (Garna et al, 2006); así como, para la cuantificación de los POS se requiere de métodos complejos como la cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento y detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) (Ferreira, 2015).

Concretizando y de acuerdo a lo anterior, el siguiente estudio es en aras de proponer una cinética del fraccionamiento enzimático de pectina obtenida de cáscaras de chontaduro, modelando el cambio de las concentraciones en el tiempo de cuatro compuestos diferentes y determinando sus respectivas constantes cinéticas; por lo cual, en experimento se relacionó el consumo de pectina con la disminución de la viscosidad de la solución, la formación de ácido galacturónico se relacionó con la disminución del pH, el metil oligosacárido se cuantificó espectrofotométricamente y dada la dificultad de la determinación experimental de la concentración de POS (dichos datos se determinaron mediante un modelo matemático realizado en MatLab).

## **METODOLOGÍA**

El proceso realizado puede dividirse principalmente en tres etapas: la obtención de pectina a partir de cáscaras de chontaduro, la transformación enzimática de la pectina y el procesamiento de datos. A continuación, se detallarán cada una de dichas etapas.

## OBTENCIÓN DE PÉCTINA A PARTIR DE CÁSCARAS DE CHONTADURO.

### PRIMERA EXTRACCIÓN DE PECTINA:

- Pretratamiento de la materia prima

Se recibieron 2,5 kg de cáscaras de chontaduro que fueron donadas por Frudelpa, empresa procesadora de frutos del pacífico colombiano. En el pretratamiento de las cáscaras de chontaduro se realizó un proceso de limpieza y selección manual para eliminar materia contaminada, restos de fibra, pulpa y las semillas de los frutos, de esta forma se obtuvieron los 2kg de cáscaras de chontaduro que posteriormente se usaron para la extracción de pectina.

- Obtención de la harina de chontaduro

Fueron seleccionados 2 kg de cáscaras para ser llevadas a un proceso de secado en un horno de convección por 12h a 40°C, posterior a eso se empleó el molino CM-20,000 para realizar una molienda hasta lograr el paso por un poro de 0,5mm, obteniendo 1.8 kg de harina de chontaduro (HC). Las condiciones que se emplearon para el pretratamiento de la materia prima fueron las propuestas por Walteros en su proyecto de grado (Walteros et al., n.d.)

- Extracción de lípidos y polifenoles

Para la extracción de los polifenoles se añadió agua y HC con una relación 1:15 p/p en un reactor de tanque agitado operando durante una hora a 60°C y con agitación de 100 rpm, luego se filtró el medio empleando un tamaño de poro de 125 µm y la torta obtenida se volvió a cargar al reactor para remover lípidos empleando etanol al 96% y operando durante dos horas a las condiciones anteriormente nombradas, se filtró el medio con ayuda de un tamiz de tamaño de poro de 125 µm. Los equipos, materiales y condiciones consideradas para este proceso fueron los planteados por las estudiantes Guithis y Sichel en su proyecto de grado (Sichel et al., n.d.).

- Hidrolisis química y enzimática

La extracción de la pectina presente en la harina de chontaduro consistió en dos etapas de hidrólisis, procesos que se realizaron siguiendo lo planteado por las estudiantes Guithis y Sichel en su proyecto de grado (Sichel et al., n.d.) y que consiste en: una hidrólisis acida ajustando el pH en 2,2 con ácido sulfúrico al 96% y NaOH al 5 M para romper la estructura de la pared celular de las cáscaras y así acceder fácilmente a sus componentes; posteriormente se realizó una hidrólisis enzimática empleando el complejo enzimático viscozyme L para romper los enlaces de la celulosa y hemicelulosa presente en la pared de las cáscaras y liberar la pectina presente en su estructura (Ptichkina et al., 2008), seguidamente se efectuó una filtración, luego se decantó la pectina presente en el filtrado empleando etanol al 89% en una relación másica 1/2, la fase más densa fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 minutos, recolectando el gel de pectina como pellet al que se le realizó un lavado con agua para remover trazas de ácido para luego realizar nuevamente una centrifugación y finalizar con un proceso de secado durante 20 horas a 40°C.

### SEGUNDA EXTRACCIÓN DE PECTINA

Para esta segunda extracción se procesaron 1,5 kg de cáscaras de chontaduro provenientes de Frudelpa. El proceso de pretratamiento de la materia prima y la obtención de la harina de chontaduro se realizó empleando las mismas condiciones y equipos mencionados anteriormente y se obtuvieron 1.28 kg de HC, tampoco se realizaron modificaciones en el proceso de extracción de lípidos y polifenoles. No obstante, se realizó una reducción en el tiempo de las hidrólisis, en el caso de la hidrólisis ácida su duración fue de 75 minutos, mientras que la hidrólisis enzimática fue de 60 minutos, asimismo, se aumentó el número de lavados de la pectina a 4 y se optó por no realizar el proceso de secado al final de la purificación.

### ANÁLISIS DE LAS PECTINAS OBTENIDAS

- Medición del grado de metilación

Para la medición del grado de metilación de la pectina proveniente de cada extracción y de la

pectina cítrica empleada como referencia, se tomaron 100mg de muestra y se enviaron al Laboratorio de Instrumentación Química de la universidad Icesi para hacerles un análisis de espectroscopía infrarroja FTIR, de dicho análisis solo se tomaron los datos del %transmitancia de la banda a  $1740\text{ cm}^{-1}$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$ , ya que son requeridos en las ecuaciones 1, 2 y 3, las cuales se tomaron de Manrique & Malojo (2002).

$$A = \log_{10} \frac{100}{\% T}$$

*Ecuación 1 Absorbancia*

Donde:

A= absorbancia; %T = porcentaje de transmitancia.

$$R = \frac{A_{1740}}{A_{1740} + A_{1630}}$$

*Ecuación 2 parámetro R*

$$GME = 124.7R + 2.2023$$

*Ecuación 3 Grado de metil esterificación*

- Porcentaje de recuperación (%R)

Teniendo en cuenta la cantidad inicial de cáscaras de chontaduro, luego del proceso de limpieza y selección, así como la cantidad final de pectina recuperada, se calcularon los gramos de pectina obtenida por cada gramo de cáscara de chontaduro, y considerando el dato teórico de porcentaje de pectina de esta materia prima, se calculó el porcentaje de recuperación con la ecuación 4

$$\%R = \frac{\frac{g_{pectina}}{g_{materia\_prima}}_{experimental}}{\frac{g_{pectina}}{g_{materia\_prima}}_{teorico}} * 100$$

*Ecuación 4 porcentaje de recuperación*

- Prueba de solubilidad

La pectina obtenida en ambos procesos de extracción fue sometida a una prueba de solubilidad en la que se prepararon dos soluciones, ambas con un volumen de 30mL y una concentración de

pectina de 20 mg/mL; se utilizó una plancha de calentamiento para llevar la solución hasta  $50^{\circ}\text{C}$  y posterior a ello se fue agregando la pectina requerida -teniendo en cuenta su humedad-, propiedad que fue previamente medida empleando una termobalanza. Luego de preparar las soluciones, cada una fue sometida a centrifugación durante 5 minutos a 4500 rpm, con el objetivo de separar la pectina que no se solubilizó. Prospectivamente, se empleó una termobalanza para medir el porcentaje de humedad de la pectina no solubilizada y así calcular el porcentaje de pectina solubilizada empleando la siguiente ecuación:

$$\% S = \frac{(Ps - Pp)}{Ps} * 100$$

*Ecuación 5 porcentaje de pectina solubilizada*

Donde:

Ps = peso seco de la pectina agregada a la solución

Pp = Peso seco de la pectina no solubilizada.

Este proceso se realizó por triplicado y se calculó la desviación estándar de los datos.

## TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA

- Barrido espectrofotométrico

Para seleccionar la longitud de onda a la cual se realizaron las mediciones de absorbancia para cuantificar la formación del intermediario metil-oligosacárido durante la transformación de pectina, se utilizó un volumen de reacción de 30mL, teniendo una concentración de 4 mg/mL de pectina y 22,5mL de buffer; en adelante, con la ayuda de una plancha de calentamiento se llevó la solución hasta  $50^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se agregó 1,5mL de solución de enzima Pectinase 831L, la cual contenía 0,03 uL enzima/mg de pectina y se agregó buffer hasta completar el volumen anteriormente mencionado. Una vez que se agregó la enzima, se tomaron muestras de 1mL para realizar un barrido espectrofotométrico en un rango de longitud de onda de 200 a 310 nm, las muestras se tomaron cada minuto hasta que transcurrieron 20 minutos de reacción.

- Determinación del dosaje del complejo enzimático Pectinase 831L

Para la selección del dosaje de enzima a emplear para la medición del intermediario metil-oligosacárido, se evaluaron 3 dosajes de enzima: 0,015, 0,02 y 0,03 uL de enzima/mg de pectina. En cada caso, el volumen de reacción fue de 30 mL, se utilizó una concentración de pectina de 4 mg/mL y con ayuda de una plancha de calentamiento se llevó la solución a 50°C para luego agregar la enzima a la concentración evaluada. Posteriormente, cada minuto se tomó 1mL de muestra para realizar la medición de absorbancia empleando un espectrofotómetro UV. Los datos de absorbancia obtenidos por cada dosaje de enzima fueron graficados con respecto al tiempo para así determinar cuál es el dosaje de enzima que permite tomar datos apropiados de absorbancia en el tiempo.

- Cuantificación del intermediario metil-oligosacárido en solución de pectina cítrica y de chontaduro

Una vez determinada la longitud de onda y el dosaje de enzima por emplear, se prepararon los ensayos enzimáticos en los que se evaluaron 12 concentraciones de pectina cítrica en un rango de 0 a 7 mg/mL y 11 soluciones de pectina de chontaduro en un rango de concentración de 0 a 6,5 mg/mL, en ambos casos la solución se preparó empleando buffer citrato-fosfato.

Concentraciones pectina de chontaduro (mg/mL)	Concentraciones pectina cítrica (mg/mL)
0,0	0,0
0,5	0,5
1,0	1,0
1,3	1,3
2,2	2,2
3,5	3,5
4,0	4,0
4,6	4,6
5,2	5,2
5,5	5,5
6,0	6,0
6,5	6,5

*Tabla 1 Concentraciones de las soluciones de pectina empleadas en los ensayos experimentales.*

Cada ensayo se realizó empleando un volumen de reacción de 38 mL, las condiciones de reacción fueron 50°C y pH=5. Luego de alcanzar la temperatura deseada, se agregó la solución de enzima y a partir de este momento, se tomaron muestras para medición de absorbancia empleando un espectrofotómetro UV, durante los primeros 3 minutos se tomaron muestras cada 30 segundos y posteriormente se tomaron cada minuto hasta llegar a un tiempo de 20 minutos. A cada una de las reacciones se les realizó una réplica.

Para convertir los datos de absorbancia recolectados en cada ensayo en términos de concentración, se utilizó la ecuación de Lambert Beer:

$$A = \varepsilon * B * C$$

*Ecuación 6 Ecuación de Lambert Beer*

A=Absorbancia

B=Longitud de paso de la cubeta (cm)

$\varepsilon$  =Coeficiente de extinción molar (cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)

C=Concentración (M)

- Seguimiento en el cambio de la concentración de pectina

Para la medición del cambio en la concentración de pectina en el tiempo se empleó un método indirecto el cual consistía en medir la disminución de la viscosidad cinemática de la solución en el tiempo que duraba la reacción como consecuencia de la hidrólisis de la pectina. Para realizar esta medición se empleó un viscosímetro de Ostwald CANNON CFRC-400 cuyo funcionamiento y manual de uso se encuentra en los anexos en el apartado de viscosidad. Antes de realizar las mediciones de los ensayos, se hicieron dos curvas de calibración para la viscosidad de la pectina cítrica y la pectina de chontaduro en un rango de concentración de 0 - 7,5 mg/mL, en las cuales se relacionaba una concentración conocida de pectina con la viscosidad de una solución realizada en buffer

citrato fosfato. Para realizar las mediciones se prepararon ensayos de 200 mL, en los cuales se evaluaron las mismas concentraciones presentadas en la tabla 1 y también se utilizó buffer citrato fosfato. La reacción de cada ensayo se llevó a cabo empleando el dosaje de enzima definido de 0.03 uL enzima/mg pectina, a una temperatura de 50°C y un pH 5; se tomaron muestras de la reacción en intervalos de 30 segundos los primeros 3 minutos y luego cada minuto hasta llegar a un tiempo de reacción de 20 min. A cada una de las reacciones se les realizó una réplica.

Para el cálculo de la viscosidad de cada muestra se empleó la ecuación 7 reemplazando el tiempo de caída de la muestra durante la medición en el viscosímetro.

$$\text{Viscosidad} = K * t$$

*Ecuación 7 determinación de viscosidad.*

Donde:

K = constante del viscosímetro.

t = tiempo de caída de la muestra.

- Cuantificación del ácido galacturónico

Dado que no se poseían los equipos requeridos para medir de forma directa la concentración de ácido galacturónico en el tiempo, se optó por evaluar dos métodos indirectos: en primer lugar, se intentó hacer seguimiento de la reacción determinando si la formación de ácido galacturónico modificaba la conductividad de la solución; en segundo lugar, se relacionó la formación de ácido galacturónico con la disminución del pH en el tiempo y posterior neutralización mediante la adición de NaOH hasta obtener nuevamente un valor de pH=5 con el propósito de que todos los ensayos contaran con las mismas condiciones de reacción. Inicialmente se hizo una curva de calibración, para su construcción se tomó un volumen de 80mL de agua tipo I, la cual se llevó a 50°C y luego se adicionaron cantidades conocidas de ácido galacturónico con el objetivo de evaluar un rango de concentración de 0-5 mg/mL y en cada caso medir la conductividad con un conductímetro de Hanna Instruments referencia HI99300. Por otro lado, para desarrollar el método

que involucra el seguimiento en el cambio en el pH, primero se determinó la relación de cuánto NaOH debe ser agregado por gramo de ácido galacturónico, para ello se tomó un volumen de 80 mL de agua tipo I, la cual se llevó a 50°C con ayuda de una plancha y posteriormente se ajustó su pH a 5 usando ácido sulfúrico 0,01M y se monitoreó empleando un pHmetro de Hanna Instruments de referencia HI99300, luego se agregaron cantidades conocidas de ácido galacturónico con el objetivo de evaluar un rango de concentración de 0-5 mg/mL.

Ahora bien, para realizar las mediciones del ácido galacturónico producido durante la reacción enzimática, se prepararon ensayos de 80 mL, se evaluaron las concentraciones presentadas en la tabla 1 y en este caso, en lugar de utilizar buffer citrato fosfato, se empleó agua tipo I. La reacción de cada ensayo se llevó a cabo empleando el dosaje de enzima definido de 0.03 uL de enzima/mg pectina, a una temperatura de 50°C y un pH 5; el pH fue monitoreado todo el tiempo de reacción con un pHmetro y se registró la cantidad de NaOH agregado en el tiempo para mantener el pH en 5 cada vez que este disminuía. Para calcular la cantidad de ácido galacturónico producido se empleó la ecuación 8.

$$AG \text{ producido} = N * R$$

*Ecuación 8: Ácido galacturónico producido*

Donde:

N = cantidad de NaOH agregado;

R = relación de ácido galacturónico por NaOH agregado determinada experimentalmente.

## PROCESAMIENTO DE DATOS

Para cada una de las reacciones realizadas, inicialmente se hizo la respectiva conversión de los datos obtenidos a términos de concentración (mg/mL) utilizando las curvas de calibración realizadas y la ecuación 6. Posteriormente, se graficaron las concentraciones vs el tiempo seleccionando la parte más lineal de la gráfica, que permitiera emplear la mayor cantidad de datos posibles y obtener un  $R^2 > 0.98$ . Se debe resaltar que

este proceso se hizo de forma simultánea para determinar la actividad pectínliasa mediante el seguimiento de la formación del intermediario metil oligosacárido y para la actividad poligalacturonasa siguiendo la formación de ácido galacturónico.

- Linealización de los datos usando el método de Lineweaver-burk

Con el propósito de encontrar la  $V_{max}$  para los dos tipos de enzimas previamente mencionadas, se realizó una linealización empleando la representación gráfica de Lineweaver-Burk mediante la ecuación 9.

$$\frac{1}{v} = \frac{km}{vmax} * \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{vmax}$$

*Ecuación 9 linealización de Lineweaver-burk.*

- Determinación de los parámetros cinéticos enzimáticos.

Una vez calculada la  $V_{max}$ , se utilizaron los códigos 1 y 2 adjuntos en anexos para determinar el  $k_m$  y la constante de inhibición teniendo en cuenta que la enzima pectínliasa presenta inhibición por alta concentración de sustrato mientras que la enzima poligalacturonasa presenta una inhibición por producto.

$$V = \frac{Vmax * S}{Km + S + \frac{S^2}{K_s}}$$

*Ecuación 10 inhibición por sustrato*

$$V = \frac{Vmax * S}{Km + \frac{K_i + I}{K_I} + S}$$

*Ecuación 11 inhibición por producto*

En dichos códigos se realizó la simulación de la cinética de Michaelis Menten con su respectiva inhibición; en donde se fijó la  $V_{max}$  calculada a partir de la linealización de L-B, y se realizó una iteración de la concentración de sustrato en un

rango de 0 a 7 mg/mL puesto que fue el empleado en los ensayos experimentales. Para el modelo de inhibición por producto además de iterar la concentración de sustrato, también se realizó un proceso de iteración de la concentración de producto en un rango de 0 a 2mg/mL ya que fue lo observado para la producción del AG durante los ensayos experimentales. Luego, para dar inicio al modelamiento el código requiere que se ingrese un aproximado del  $K_m$  y las constantes de inhibición, los cuales son despejados de la linealización, finalmente a partir de estos datos el código realiza la iteración de las velocidades iniciales y el modelamiento completo. Adicionalmente, los datos de la velocidad inicial, concentración de sustrato y producto obtenidos mediante experimentación también son ingresados en el código con el propósito de graficar los datos experimentales versus los determinados por el modelo y observar la similitud entre ambos y calcular el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que da cuenta del ajuste del modelo a los datos experimentales. Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$SS_{error} = \sum (V_{o_{experimental}} - V_{o_{modelado}})^2$$

*Ecuación 12 cálculo del SSerror*

$$SS_{total} = \sum (V_{o_{experimental}} - V_{o_{experimental}}_{medio})^2$$

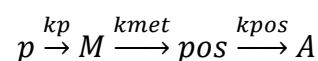
*Ecuación 13 Calculo de SStotal*

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{error}}{SS_{total}}$$

*Ecuación 14 Calculo del R^2*

- Determinación de constantes cinéticas.

Retomando la idea de que el fraccionamiento de la pectina no ocurre en una sola etapa o paso, se plantearon las siguientes reacciones en serie:



*Ecuación 15 fraccionamiento de pectina*

En las que se considera el fraccionamiento de pectina por medio del complejo enzimático Pectinase 831L, teniendo en cuenta el fraccionamiento por b-eliminación de la pectina por acción de la enzima pectínliasa y la hidrólisis realizada por la enzima poligalacturonasa.

Posteriormente se plantearon las siguientes ecuaciones diferenciales para hacer seguimiento de los diferentes compuestos de interés en el tiempo:

$$\frac{dp}{dt} = -kp * P$$

*Ecuación 16 consumo de pectina*

$$\frac{dA}{dt} = kpos * Pos$$

*Ecuación 17 Formación de ácido galacturónico*

$$\frac{dM}{dt} = kp * P - kp * Pos$$

*Ecuación 18 Formación de metil oligosacáridos*

$$\frac{dpos}{dt} = -kpos * + km * m$$

*Ecuación 19 Formación de POS*

Con el propósito de simplificar los cálculos y debido a que no se tenía la suficiente información, se hizo una modificación en la ecuación 17, dado que los datos tomados experimentalmente dan cuenta de la transformación de pectina en ácido galacturónico y en la ecuación 17 la formación de AG está en función de la concentración de POS (incógnita del modelo), se planteó una nueva ecuación en la que el AG se expresa en términos de pectina:

$$\frac{dA}{dt} = kA * P$$

*Ecuación 20 producción de AG en términos de pectina*

Otro aspecto por considerar es que, dado que se tenía la información del cambio en la concentración de pectina, AG y metil oligosacáridos en el tiempo, se hizo un estimativo inicial del kp, ka y kmo resolviendo de forma individual las respectivas ecuaciones diferenciales y sacando un promedio del

valor de dichas constantes para las réplicas y para las diferentes concentraciones evaluadas.

- Modelo matemático del cambio de concentración de los compuestos.

Para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales compuesto por las ecuaciones 16, 18, 19 y 20, se realizó el código 3 en Matlab utilizando el método de Runge-kutta de cuarto orden, proceso iterativo en el que cada valor calculado depende del valor anterior mediante las siguientes ecuaciones tomadas de Caste (2014):

$$y_{i+1} = y_i + \frac{h}{6} * (k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$$

*Ecuación21 21 Valores calculados por el método*

$$k_1 = f(x_1, y_1)$$

*Ecuación 22 22 parámetro k1*

$$k_2 = f(x_1 + \frac{h}{2}, y_1 + \frac{k_1 h}{2})$$

*Ecuación23 23 parámetro k2*

$$k_3 = f(x_1 + \frac{h}{2}, y_1 + \frac{k_2 h}{2})$$

*Ecuación24 24 parámetro k3*

$$k_4 = f(x_1 + h, y_1 + k_3 h)$$

*Ecuación25 25 parámetro k4*

Donde:

F: Ecuación diferencial que se desea resolver.

Y(i+1): Valores calculados por el método

K: parámetros requeridos en el método

h: Salto en los valores de x.

El modelo realizado solicita el valor de concentración inicial de pectina (y1), el tiempo de reacción (b) y el salto en los valores de tiempo (h) y da como resultado una tabla con un estimativo de la producción de POS en el tiempo y una gráfica que muestra el consumo de pectina, la formación de ácido galacturónico, metil oligosacáridos y POS en el tiempo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### OBTENCIÓN DE PÉCTINA A PARTIR DE CÁSCARAS DE CHONTADURO.

- *Grado de metilesterificación*

El análisis de espectroscopia infrarroja FTIR efectuado en el Laboratorio de Instrumentación Química de la universidad Icesi para las pectinas de ambas extracciones se encuentra en el apartado de análisis de la pectina en la sección de anexos. Como se mencionó anteriormente, para determinar el grado de metilesterificación de las pectinas únicamente se requiere de la intensidad de la absorbancia de la banda  $1740\text{ cm}^{-1}$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$  ya que representan respectivamente los grupos carboxilos metilesterificados y los grupos carboxilos libres. Empleando las ecuaciones 1-3, se obtuvieron los siguientes resultados:

Pectina	Absorbancia celda 1630	Absorbancia celda 1740	GME
Primera extracción	0,0066	0,0022	33,26%
Segunda extracción	0,0269	0,0246	61,76%
Cítrica	0,0400	0,0292	54,81%

Tabla 2 Resultados GME

Como se puede observar en la tabla 2, la pectina obtenida en la primera extracción tuvo un grado de metilesterificación del 33,26%, mientras que para la segunda extracción el GME fue del 61,76% y para la pectina cítrica empleada como referencia fue de 54,81%. De acuerdo con la clasificación de las pectinas mencionada previamente, el producto de la segunda extracción junto con la pectina cítrica entran en el grupo de las de alto metoxilo y se encuentra en el rango comercial que es del 60-70% de GME, por su parte, la pectina de la primera extracción es de bajo metoxilo y también se encuentra en el rango comercial para dichos compuestos, el cual es del 20-40% de GME (Sriamornsak, 2003).

Se debe tener en cuenta que, dependiendo de las materias primas empleadas, los residuos de ácido galacturónico de la pectina se esterifican en diversos grados (Constela et al. 2003) y aunque el proceso de obtención de pectina a partir de cáscaras de chontaduro es relativamente reciente y por ende no se encontraron datos disponibles sobre el GME cuando se emplea esta materia prima específica, se puede afirmar que durante la segunda extracción se

obtuvieron resultados congruentes, pues el proceso de extracción convencional por hidrólisis ácida de la pectina de residuos de naranja (70 min,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH } 2$ ) da como resultado una pectina con aproximadamente 70 % de GME (Gilbert, 1998), resultado similar al obtenido durante el proceso.

Por otro lado, el bajo valor de GME obtenido en la primera extracción podría deberse a la extensa duración de la hidrólisis ácida realizada, ya que industrialmente cuando se desean obtener pectinas con bajo grado de metilesterificación, deben hidrolizarse algunos ésteres metílicos adicionales y generalmente esto se hace mediante una extracción prolongada, tratamientos ácidos o alcalinos en alcohol o haciendo uso de enzimas desesterificantes (Constela et al, 2003). Agregando a lo anterior, se debe resaltar que el tiempo de hidrólisis ácida para la obtención de pectina varía entre 30 min y 6h (Voragen et al., 2003) y en nuestro caso, al realizar dicha hidrólisis en la primera extracción durante 20h, es probable que, además de romper la estructura celular de las cáscaras de chontaduro e hidrolizar los enlaces de la celulosa y hemicelulosa para liberar la pectina, se hayan desesterificado gran parte de los residuos de ácido galacturónico.

- *Porcentaje de recuperación*

Realizando los respectivos balances de masa y teniendo en cuenta el porcentaje de humedad de las dos pectinas, se obtuvo lo siguiente:

	Primera extracción	Segunda extracción
Cáscaras de chontaduro (g)	2000	1310
Solución pectina (g)	87,71	730,5
%Humedad	9,61%	82,64%
Pectina seca (g)	79,28	82,64
gpectina/gcáscaras	0,0396	0,0631

Tabla 3 Resultados del balance de masa

Considerando que el contenido promedio de pectina en las cáscaras de chontaduro es de aproximadamente el 9% (Memon, 2013), es decir, 0,09g pectina/g cáscaras de chontaduro y usando la ecuación 4, se obtuvo que el rendimiento de recuperación fue del 44% y del 70,11% para la extracción 1 y para la extracción 2 respectivamente.

De lo anterior se puede afirmar que el porcentaje de recuperación de la segunda extracción fue aproximadamente 1.8 veces mayor en comparación con la primera extracción, esta diferencia puede deberse a que, la exposición de la pectina a altas temperaturas y bajos valores de pH durante periodos de tiempo prolongados ocasiona la despolimerización de dicho compuesto (Constela et al., 2003), por consiguiente, se podría atribuir la baja obtención de pectina en la primera extracción a que el largo tiempo de hidrólisis de la harina de chontaduro permitió inicialmente obtener pectina, pero dado que no se finalizó la reacción en un tiempo adecuado, se produjo una despolimerización, es decir, parte del compuesto de interés fue degradado durante esta parte del proceso.

En otro orden de ideas, para intentar incrementar aún más el porcentaje de recuperación de la segunda extracción podrían evaluarse tiempos de hidrólisis tanto ácida como enzimática que permitan liberar una mayor cantidad de pectina de las cáscaras de chontaduro, pero teniendo la precaución de no realizar el proceso de forma tan prologada y causar la degradación de este compuesto.

- *Porcentaje de solubilidad*

Siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, se realizaron por triplicado análisis de solubilidad para las pectinas de ambas extracciones, los resultados y el cálculo respectivo se encuentran en la sección de anexos. A continuación, se presenta un resumen de la información más relevante.

	<b>Primera extracción</b>	<b>Segunda extracción</b>
<b>% pectina solubilizada promedio</b>	32,39	58,63
<b>Desviación estándar</b>	3,10	2,26

Tabla 4 Resultados del análisis de solubilidad.

Como se puede observar en la tabla 4, en promedio se solubilizó un 32.39% de la pectina proveniente del primer proceso de extracción; este bajo porcentaje se le puede atribuir al grado de metilesterificación de la pectina, el cual la clasifica como pectina de bajo metoxilo y dichos compuestos para solubilizarse y formar geles necesitan la presencia de cationes divalentes como el calcio y así favorecer la formación de enlaces que dan lugar a

una red tridimensional con los grupos carboxilo de la pectina generando la estructura del gel (Ferreira Ardila, 2007). En nuestro caso, dichos cationes no se encontraban presentes en la solución de buffer citrato fosfato empleada.

Por otro lado, para la pectina proveniente de la segunda extracción se tiene un promedio de pectina solubilizada del 58.63%, este valor relativamente bajo puede deberse a múltiples factores que incluyen propiedades de la pectina como su grado de polimerización, presencia de grupos acetilos y el grado de metilesterificación (Gilabert, 1998). En este caso nos enfocaremos en el GME de la pectina debido a que se conoce que la pectina de la segunda extracción al ser de alto metoxilo requiere para la formación de geles que se garantice su disolución total, proceso que para este caso necesita que el pH de la solución esté en un rango entre 2,8 y 3,5, para así controlar el grado de disociación de los grupos carboxilos de la pectina, disminuyendo la repulsión entre sus cadenas y facilitando la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo dando lugar a la estructura del gel (Ferreira Ardila, 2007). Sin embargo, los ensayos realizados y las reacciones enzimáticas se prepararon en un pH=5 para asegurar el óptimo funcionamiento del coctel enzimático y para evitar una posible hidrólisis ácida de la pectina ocasionada por la alta temperatura de reacción y la exposición de este compuesto a medios con valores de pH bajos.

## TRANSFORMACIÓN DE PECTINA

- *Barrido espectral*

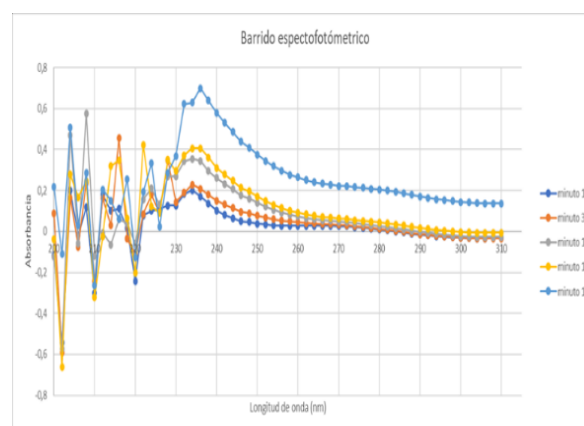
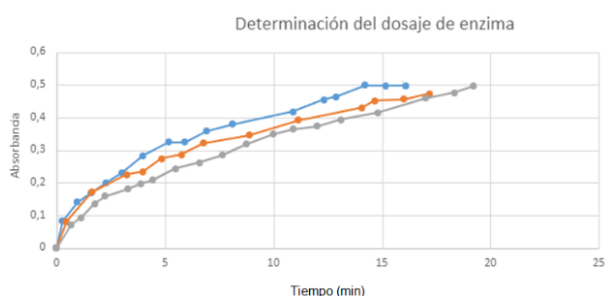


Ilustración 1 barrido espectral

En la figura 1 se puede observar que dentro del rango de 200 a 225 nm hay una fuerte interferencia en las medidas, esto se evidencia

en los drásticos cambios de los valores de absorbancia entre una longitud de onda y otra, por lo que es conveniente considerar estas mediciones como ruido. Adicionalmente, a los tiempos evaluados (con excepción del minuto 3), la longitud de onda a la que se presentan los mayores valores de absorbancia fue a 235 nm, por consiguiente, este fue el valor empleado durante los siguientes ensayos enzimáticos.

- *Dosaje de enzima*



*Ilustración 2 Determinación del dosaje de enzima*

Como se puede apreciar en la figura 2, cuando se emplean las concentraciones de 0,015 y 0,02 uL de enzima/mg de pectina no se estabilizan los valores de absorbancia en el tiempo evaluado, mientras que cuando el dosaje de enzima es de 0,03 uL/mg, la reacción se estabiliza en aproximadamente 14 minutos y medio. Debido a que empleando la concentración anteriormente nombrada se puede apreciar de forma clara los cambios de absorbancia en el tiempo, pero la reacción se estabiliza de forma rápida, para los siguientes ensayos el dosaje seleccionado es de 0,03 uL/mg

- *Curvas de calibración para la cuantificación de pectina*

Para hacer seguimiento del consumo de pectina, se midió el cambio en la viscosidad de la solución a medida que avanzaba la reacción enzimática, ya que a concentraciones altas de pectina (superiores 1,5% p/v), se forman enlaces por interacciones físicas, dando lugar a la producción de geles y aumentando la viscosidad de la solución (Chasquibol et al, 2010), sin embargo, a medida que avanza la reacción y disminuye la concentración de sustrato a

causa del fraccionamiento de pectina, esta propiedad también disminuye.

Los datos obtenidos durante estas mediciones fueron:

Concentración (mg/mL)	Viscosidad pectina cítrica (mm <sup>2</sup> /s)	Viscosidad pectina chontaduro (mm <sup>2</sup> /s)
0	1,56	1,56
0,05	1,62	1,608
0,1	1,656	1,692
0,5	1,704	1,668
1	1,728	1,728
1,3	1,872	1,644
2,2	1,98	1,728
2,8	1,992	1,728
3,5	2,148	1,764
4	2,292	1,8
4,6	2,316	1,944
5,2	2,376	1,872
6	2,448	1,86
6,5	2,52	1,968

*Tabla 5 Datos empleados para la curva de calibración de la viscosidad de la pectina cítrica*

Realizando las curvas de calibración (adjuntas en la sección de anexos graficas en el apartado de viscosidad), que relacionan la viscosidad con la concentración de pectina cítrica y de chontaduro se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$Y = 0.1394t + 1.6341$$

*Ecuación 26 26 viscosidad pectina cítrica*

$$Y = 0.049x + 1.6225$$

*Ecuación 27 27 viscosidad pectina chontaduro*

Donde:

Y = viscosidad; x = concentración

Aunque en ambos casos se observó un aumento de la viscosidad con el incremento en la concentración de pectina, los valores de viscosidad de la pectina de chontaduro fueron menores que los de la pectina cítrica, esto se puede deber a que el comportamiento de esta propiedad además de depender de la concentración y la temperatura, también se ve afectado por el peso molecular, el grado de

metilesterificación, el pH, la presencia de contraiones, entre otros (Espinosa et al, 2014).

- **CONDUCTIVIDAD DEL ÁCIDO GALACTURÓNICO**

La conductividad es una medida de la propiedad que poseen las soluciones acuosas de conducir corriente eléctrica, que depende de la presencia de iones, su concentración, movilidad, valencia y temperatura de medición (Sanabria, 2006). Algunos ácidos como el ácido arabinónico, glicérico, glicólico y fórmico han sido cuantificados por medio de esta propiedad (Metrohm AG, 2020), además, se ha reportado que la presencia de ácido galacturónico en una solución produce una disminución en la conductividad eléctrica (Molnár et al., 2010). Por lo anterior, se evaluó el cambio en la conductividad de una solución con agua tipo I a medida que aumentaba la concentración de ácido galacturónico:

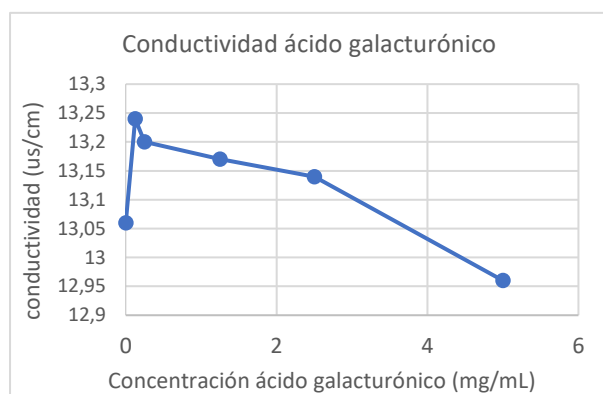


Ilustración 3: relación entre conductividad y concentración de AG.

Sin embargo, se decidió no utilizar esta propiedad para cuantificar la concentración de ácido galacturónico pues como se observa en la anterior gráfica, inicialmente el ácido galacturónico provoca un aumento en la conductividad, pero luego de un determinado punto la tendencia cambia y esta propiedad disminuye drásticamente. Adicionalmente, se tuvo en cuenta lo reportado por Ninga et al (2021), quienes afirmaron que durante la hidrólisis enzimática de pectina hay un aumento de la conductividad eléctrica en el transcurso del tiempo, que podría deberse a la liberación de iones de calcio durante la reacción; por consiguiente, al medir esta propiedad no solo se tendría en cuenta la conductividad debida a la generación de ácido

galacturónico sino que también se incluiría la debida a la liberación de iones calcio y ambos procesos tienen tendencias contrarias.

- **SEGUIMIENTO DEL AUMENTO DEL PH**

Para llevar registro de la formación de ácido galacturónico en el tiempo mediante la disminución del pH de la solución fue requerido inicialmente determinar una relación de cuanto NaOH se debía agregar para llevar nuevamente la solución a un pH=5 una vez que experimentalmente bajaba a aproximadamente 4,95, dicho valor fue seleccionado antes de realizar los ensayos dado que el pH puede afectar las fuerzas intramoleculares y cambiar la forma de la enzima hasta el punto en que se vuelve ineficaz y/o inactiva (Timberlake, 2013), además, desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente la actividad enzimática (González, 2010), por lo que durante todas las reacciones fue de suma importancia que el valor de pH se mantuviera prácticamente constante y no variara entre concentraciones iniciales de sustrato o en el tiempo.

Experimentalmente se encontró que empleando un volumen de reacción de 80mL, para neutralizar 1 mg de ácido galacturónico producido, se requerían aproximadamente 6,73 mg de NaOH con una concentración de 0,5M. Se decidió utilizar esta baja concentración con el propósito de tener un mayor control del pH y no correr el riesgo de que agregando una pequeña cantidad de compuesto, el pH incrementara de forma drástica, ocasionando errores en los resultados obtenidos.

Por otro lado, los datos obtenidos de absorbancia en la cuantificación de metil oligosacáridos, viscosidad en la cuantificación de pectina y NaOH agregado durante la cuantificación de ácido galacturónico se encuentran en la sección de anexos en el apartado de transformación de la pectina.

## PROCESAMIENTO DE DATOS

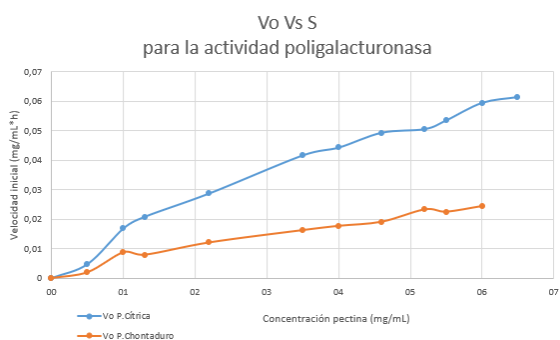
- **DETERMINACIÓN DE VELOCIDADES INICIALES**

Una vez realizados los cálculos correspondientes para convertir los datos obtenidos en unidades de concentración (mg/mL), se procedió a determinar la velocidad inicial para cada uno de los ensayos

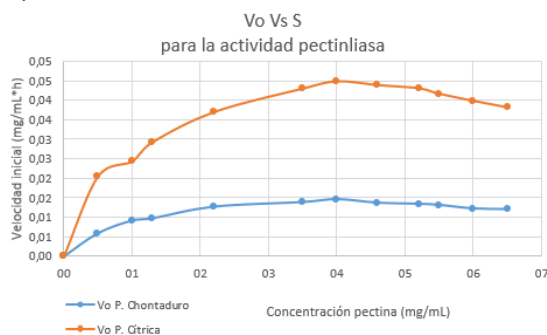
teniendo en cuenta que se estudiaron dos actividades enzimáticas diferentes, pues a partir de los datos del cambio en la concentración de metil oligosacáridos en el tiempo se estudió la cinética de la enzima pectínliasa y a partir de los datos del ácido galacturónico producido se estudió la cinética de la enzima poligalacturonasa. En ambos casos se determinó la velocidad inicial para las dos réplicas de todos los ensayos realizados calculando la pendiente del cambio en la concentración del compuesto de interés en el tiempo usando la parte más lineal de la gráfica que permitiera tomar la mayor cantidad de puntos teniendo un  $R^2 > 0,98$ . A continuación se resumen los resultados obtenidos:

enzima empleada y por consiguiente es difícil comparar dicho resultado con los obtenidos en investigaciones previas.

Se puede observar en las tablas 8 y 9 que hay una baja desviación entre los datos obtenidos y que el  $V_{max}$  de la enzima poligalacturonasa es mayor al de la enzima pectínliasa. En resumen, una vez se saturan ambos tipos de enzima, la producción de ácido galacturónico es superior que la de metil oligosacáridos, esto es concuerda con las especificaciones del complejo enzimático Pectinase 831L, el cual reporta que la principal actividad proporcionada es la endopoligalacturonasa.



*Ilustración 4:* Datos de velocidad inicial obtenidos experimentalmente para la actividad poligalacturonasa en pectina cítrica.



*Ilustración 5:* Datos de velocidad inicial obtenidos experimentalmente para actividad pectínliasa en pectina cítrica y de chontaduro.

## • VELOCIDAD MÁXIMA

Las velocidades máximas se calcularon para cada enzima utilizando la ecuación de Lineweaver-burk, y los datos de las tablas 6-8. Las gráficas obtenidas se encuentran en la sección de anexos en el apartado de velocidad máxima.

Debido a que la  $V_{max}$  es la velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unida al sustrato (Gonzales, 2010), este es un valor que depende de la concentración de

• **PARÁMETROS CINÉTICOS**

Para la determinación de los parámetros cinéticos de cada enzima, se tuvieron en cuenta las características reportadas en fuentes bibliográficas, pues como se mencionó anteriormente, en el modelamiento cinético de la enzima pectínliasa se consideró una inhibición por sustrato ya que en diversos estudios como el realizado por Acuña et al. (1995) han informado su ocurrencia cuando se emplean concentraciones cercanas a 4,5mg/mL. Por otro lado, para la enzima poligalacturonasa se consideró una inhibición competitiva con el producto acorde con lo reportado por Bélafi-Bakó et al (2007).

**ENZIMA PECTINLIASA**

Los parámetros cinéticos de la enzima pectínliasa fueron calculados empleando el código realizado y teniendo en cuenta los datos experimentales recolectados. A continuación, se muestran las gráficas de Michaelis Menten obtenidas para las réplicas realizadas para la pectina cítrica y la pectina de chontaduro:

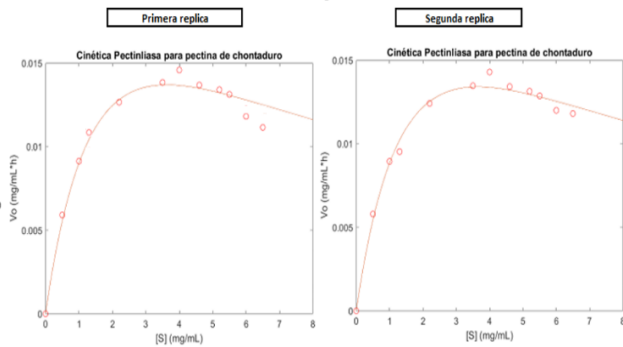


Ilustración 6: Cinética enzima pectínliasa para pectina de chontaduro

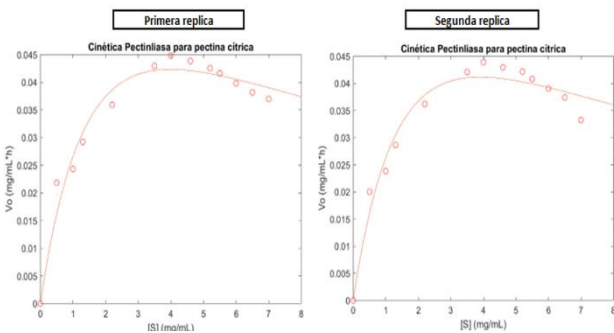


Ilustración 7: Cinética enzima pectínliasa en pectina cítrica

Los parámetros cinéticos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

	Pectina de chontaduro		pectina cítrica	
	Dato promedio	Desviación estandar	Dato promedio	Desviación estandar
Vmax [mg/mL*h]	0,030	0,001	0,089	0,001
Km [mg/mL]	2,138	0,029	2,204	0,056
Ks [mg/mL]	6,180	0,113	7,055	0,066

Tabla 6: Parámetros cinéticos de la enzima pectínliasa.

Como se observa, hay una drástica diferencia en la v<sub>max</sub> cuando se utilizan los diferentes tipos de pectina aun cuando la concentración de enzima fue igual. Teniendo en cuenta que, además de la concentración de enzima, el v<sub>max</sub> se ve influenciado por el k<sub>cat</sub>, el número de recambio de una enzima, que es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando esta está totalmente saturado de sustrato (Mendoza, 2013), en este caso al tratarse de polisacáridos tan heterogéneos como las pectinas, es posible que la pectina cítrica cuente con propiedades físicas o fisicoquímicas que permitan una mayor interacción con el sitio activo de la enzima y por consiguiente teniendo valores de v<sub>max</sub> mayores.

La enzima es un poco más afín a la pectina de chontaduro lo que se ve reflejado en un menor valor de k<sub>m</sub>. Por el contrario, para ambas pectinas el valor obtenido fue similar, el cual también coincide con el reportado en la base de datos Brenda, donde se informa que la pectínliasa proveniente de *Aspergillus niger* tiene un k<sub>m</sub> de 2,2mg/mL.

## ENZIMA POLIGALACTURONASA

De forma similar a la mencionada anteriormente, se utilizó el código 2 de Matlab encontrado en anexos para analizar la cinética de la enzima poligalacturonasa, obteniendo lo siguiente:

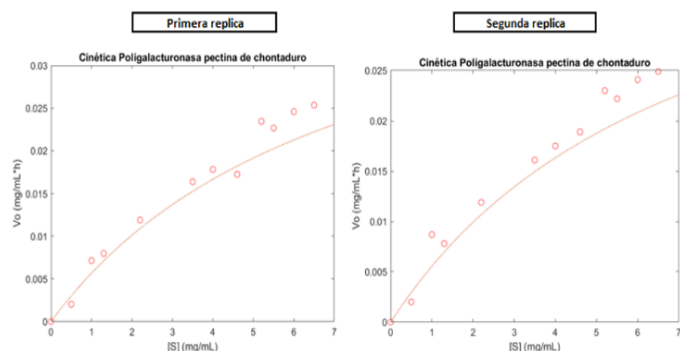


Ilustración 8: Cinética enzima poligalacturonasa en pectina chontaduro

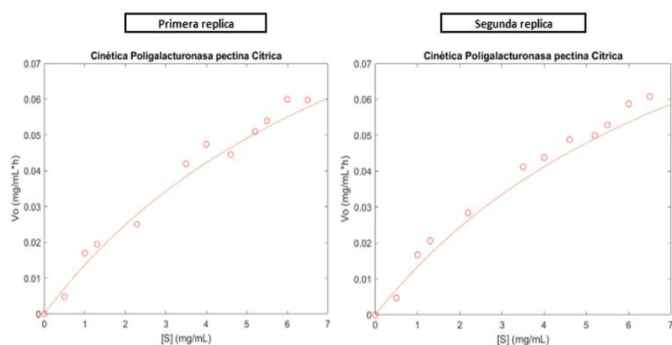


Ilustración 9: Cinética enzima poligalacturonasa en pectina cítrica

El resumen de los parámetros cinéticos obtenidos se muestra en la tabla 9.

	Pectina de chontaduro		Pectina cítrica	
	Dato promedio	Desviación estándar	Dato promedio	Desviación estándar
Vmax [mg/mL·h]	0,079	0,001	0,272	0,004
Km [mg/mL]	5,454	0,011	7,915	0,096
Kp [mg/mL]	2,275	0,007	2,293	0,033

Tabla 7: Parámetros cinéticos de la enzima poligalacturonasa

En este caso, también se observa que, para una misma concentración de enzima, los valores de Vmax son drásticamente diferentes entre los dos sustratos, pues el Vmax de la pectina cítrica es 3,44 veces mayor que el de la pectina de chontaduro.

De forma similar a la ocurrida con la pectínliasa, la enzima poligalacturonasa presenta una mayor afinidad por la pectina de chontaduro, lo cual se evidencia en un Km menor. Adicional, se encontró que los datos obtenidos fueron similares a los reportados por Bélafi-- Bakó et al (2007), quienes empleando pectina cítrica para hacer un estudio cinético de la enzima poligalacturonasa obtuvieron un  $k_m=8,3\text{mg/mL}$  y un  $k_p=3,13\text{mg/mL}$

En otro término, se utilizaron las ecuaciones 12-14 para calcular el  $R^2$  de los modelos realizados y ver que tan bien se ajustan a los datos experimentales.

	Pectinliasa	Poligalacturonasa
$R^2$ promedio del modelo para pectina de chontaduro	0,9889	0,8967
$R^2$ promedio del modelo para pectina cítrica	0,9752	0,9324

Tabla 8:  $R^2$  de los modelos realizados.

De acuerdo con lo anterior, el modelo obtenido para la pectínliasa se ajusta mejor a los datos experimentales, esto puede deberse a que el método utilizado para el estudio de la cinética de esta enzima es más preciso al realizar la cuantificación del producto por medios espectrofotométricos, en contraste, en el caso de la enzima poligalacturonasa, la reacción fue analizada mediante el cambio de pH, este es un método indirecto y presenta el inconveniente de que la propiedad monitoreada se vea afectada por factores externos como la temperatura, una mala calibración de los equipos, entre otros.

### • CONSTANTES CINÉTICAS

Con la información recogida durante los ensayos experimentales y utilizando las ecuaciones 16,18, 19 y 20, se calcularon las constantes  $k_p$ ,  $k_m$  y  $k_a$ , presentadas en la tabla 11, estas constantes fueron empleadas durante la realización del modelo cinético.

	Kp	Kmo	Ka
Pectina cítrica	0,072	0,000615	0,017
Pectina de chontaduro	0,092	0,000425	0,012

Tabla 9: Constantes empleadas para realizar el modelo cinético

Como se puede apreciar, durante la reacción la velocidad más grande es la relacionada con el consumo de sustrato, siendo dos órdenes mayores a la velocidad de formación de metil oligosacáridos y aproximadamente 6 veces mayor a la velocidad de aparición del ácido galacturónico, lo anterior podría indicar que el principal producto de la reacción en los tiempos evaluados son los POS.

- **MODELO CINÉTICO**

El código 3 disponible en anexos, permite a partir de una concentración inicial de pectina y un tiempo de reacción ingresados por el usuario, determinar una aproximación del consumo de sustrato y de la generación de tres compuestos producidos en la reacción enzimática (POS, AG y metil oligosacáridos) utilizando las constantes cinéticas y el sistema de ecuaciones diferenciales planteado con anterioridad.

A continuación, se presenta un ejemplo en el cual se corrió el código ingresando una concentración inicial de pectina cítrica de 5mg/mL y un tiempo de reacción de 20 min, en la tabla 12 se muestra la predicción del modelo de la concentración de POS en el tiempo

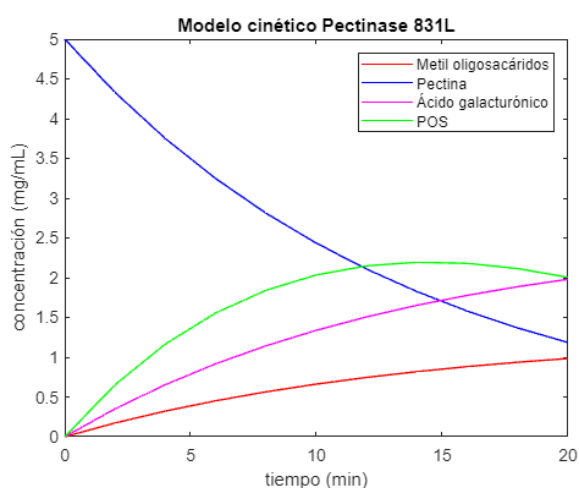


Ilustración 9: modelamiento de la concentración de sustrato, ácido galacturónico y metil oligosacárido en el tiempo.

POS	Tiempo_min
0	0
0.65382	2
1.1666	4
1.5572	6
1.842	8
2.0352	10
2.1491	12
2.1944	14
2.1802	16
2.1145	18
2.0042	20

Tabla 10: presentación de las concentraciones de POS en el tiempo calculadas por el modelo

El modelo cumplió con la tendencia esperada, pues al inicio de la reacción hay una rápida formación de POS debido al fraccionamiento de pectina por el complejo enzimático con actividad poligalacturonasa (PG), poligalacturonato esterasa (PGE), polimetilgalacturonato liasa (PMGL) y la pectínliasa (PL) que transforman el polisacárido en oligosacáridos con diferentes grados de polimerización y composición en monosacáridos. No obstante, a medida que transcurre el tiempo de reacción los oligosacáridos son empleados como sustrato por las enzimas y su nueva tendencia es de consumo dando lugar al monómero de ácido galacturónico. Los bajos valores de concentración de metil oligosacáridos en el tiempo son debidos a que estos son producidos por las enzimas pectínliasa y al no ser la actividad principal del complejo enzimático su concentración en el tiempo no es muy grande, además de que parte de estos compuestos son transformados en POS.

### Conclusión

En el presente trabajo se construyó un modelo matemático a partir de datos tomados - experimentalmente - que permitieron proponer una cinética del conjunto de reacciones en serie involucradas en el fraccionamiento enzimático de pectina obtenida de cáscaras de chontaduro y de pectina cítrica comercial. Lo anterior hizo posible conocer un poco más del mecanismo de esta reacción pues mediante la determinación de las constantes cinéticas se pudo modelar el cambio de las concentraciones en el tiempo de pectina, metil oligosacáridos y ácido galacturónico, tomando como referencia el valor de la concentración inicial



de sustrato; adicional, se hizo un estimativo matemático de la concentración de POS, compuestos de interés para los cuales al momento de la realización de este trabajo no se contaba con equipos ni metodologías que permitieran su cuantificación experimental.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Frudelpa por la donación de las cáscaras de chontaduro utilizadas.

Agradecemos a G. Escobar, L. Mejía y a H. Rubiano por su participación durante el pretratamiento de la materia prima y las mediciones espectrofotométricas.

Agradecemos a C. Campo por permitimos utilizar equipos del Departamento de ciencias de la universidad Icesi.

## BIBLIOGRAFIA

- Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 808–814. <https://doi.org/10.1007/bf02431912>
- Barazarte, H. García, T. Garrido, E. Pérez, H. Terán, Y. (2010) Evaluación de dos métodos colorimétricos para cuantificar sustancias pécticas en parchita (*passiflora edulis*). Tomado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612010000200010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612010000200010)
- Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., & Gubicza, L. (2007). Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 438–442. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.012>
- Caste, J. (2014, May 6). MÉTODO NÚMÉRICO DE RUNGE KUTTA. Análisis Numérico.; Análisis Numérico. <https://esimecuanalisisnumerico.wordpress.com/2014/05/06/metodo-numerico-de-runge-kutta/>
- Constela, D & Lozano, E. (2022). Kinetic model of pectin demethylation. *Scielo.org.ar*. <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/laar/v33n2/html/v33n2a05.htm>
- Chasquibol Silva, Nancy, & Morales Gomero, Juan Carlos (2010). Contribución al estudio del proceso de gelación de la pectina del níspero de la sierra. *Ingeniería Industrial*, (28), 157-176.[fecha de Consulta 12 de Junio de 2022]. ISSN: 1025-9929. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337428494010>
- Chávez, J., Torres, C., Ríos, P., Mendoza, R., (2016). UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO FACULTAD DE BIOLOGÍA MANUAL DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.
- Espinosa, J; García, E; Torres, B. (2014). PROPIEDADES DE PECTINA CÍTRICA COMO AGENTE EMULSIONANTE DE ACEITE DE UVA. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química*. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/222/1/2014%20-%20PROPIEDADES%20DE%20PECTINA%20C%3%8DTRICA%20COMO%20AGENTE%20EMULSIONANTE%20DE.pdf>
- ES2241595T3 - Pectina que contiene sensibilidad reducida al calcio. - Google Patents. (n.d.). <https://patents.google.com/patent/ES2241595T3/es>
- F. Voragen et al. *Advances in Pectin and Pectinase Research*. Ed. Springer, 2003. ISBN 9789401703314

- FERREIRA, A. (2015) OBTENCIÓN DE PECTOOLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE PECTINAS DE CÍTRICOS Y DE MANZANA UTILIZANDO EXTRACTOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES. Universidad Autónoma de Madrid. Tomado de: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/152124/4/TFMObtencionPOS.pdf>
- Ferreira Ardila, S. (2007). Pectinas: aislamiento, caracterización y producción a partir de frutas tropicales y de los residuos de su procesamiento industrial. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
- GARNA, H., MABON, N., NOTT, K., WATHELET, B., & PAQUOT, M. (2006). Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*, 96(3), 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.002>
- Garza, S & Puigvert, Y. (2022). Los geles de pectina y su aplicación en la industria alimentaria. *Alimentaria: Revista de Tecnología E Higiene de Los Alimentos*, 342, 93–98. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=309886>
- Gilabert, J. (1998). Degradación Enzimática y Características Físicas y Químicas de la Pectina de Bagazo de Melocotón. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8370/jpagan.pdf>
- Gonzales, M. (2010) CINÉTICA ENZIMÁTICA. Ehu.eus. <https://www.ehu.es/biomoleculas/index.htm>
- Hemavathi, Chandrama Prakash Upadhyaya, Ko Eun Young, & Se Won Park. (2009). Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C... Retrieved March 7, 2022, from ResearchGate website: [https://www.researchgate.net/publication/222645477\\_Over-expression\\_of\\_strawberry\\_D-galacturonic\\_acid\\_reductase\\_in\\_potato\\_leads\\_to\\_accumulation\\_of\\_vitamin\\_C\\_with\\_enhanced\\_abiotic\\_stress\\_tolerance](https://www.researchgate.net/publication/222645477_Over-expression_of_strawberry_D-galacturonic_acid_reductase_in_potato_leads_to_accumulation_of_vitamin_C_with_enhanced_abiotic_stress_tolerance)
- Hosseini, S; Khodaiyan, F & Yarmand, M. (2015, November 9). Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and its preliminary physicochemical properties. ResearchGate; Elsevier. [https://www.researchgate.net/publication/283640201\\_Aqueous\\_extraction\\_of\\_pectin\\_from\\_sour\\_orange\\_peel\\_and\\_its\\_preliminary\\_physicochemical\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/283640201_Aqueous_extraction_of_pectin_from_sour_orange_peel_and_its_preliminary_physicochemical_properties)
- Ibarz, A., Pagán, A., Tribaldo, F., & Pagán, J. (2006). Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods. *Food Control*, 17(11), 890–893. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.06.007>

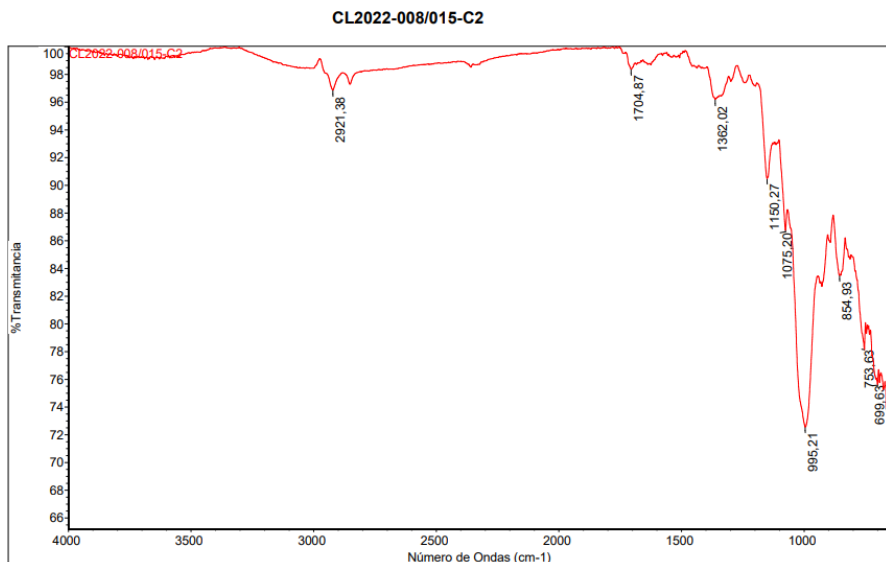
- J. Gilabert. "Degradación Enzimática y Características Físicas y Químicas de la Pectina de Bagazo de Melocotón." Tesis Doctoral. Universitat de Lleida, 1998.
- Maldonado, Y, Salazar, S (2010). Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. Tomado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/as/v3n2/a05v3n2http://www.scielo.org.pe/pdf/as/v3n2/a05v3n2>
- Márquez, L. (2014) EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE LA CASCARA DE CHONTADURO (*Bactris gasipaes*) COMO ALTERNATIVA EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. Tomado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4964/6360852M357.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20c%20A1scara%20de%20chontaduro%20es, Tapicha%2DUnda%2C%202000>
- Melton, L. (2001). Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Assay.
- Memon, Saima Q. Kouotou, Daouda, Manga, Horace Ngomo, Baçaoui, Abdelaziz, Yaacoubi, Abdelrani, Mbadcam, Joseph Ketcha (2013). Optimization of Activated Carbons Prepared by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and Steam Activation of Oil Palm Shells. 2090-9063. <https://doi.org/10.1155/2013/654343>. 10.1155/2013/654343. Journal of Chemistry. Hindawi Publishing Corporation
- Metrohm.AG. (2022) Organic acids in organic compounds using conductivity detection after inverse suppression. <https://www.metrohm.com/en/applications/application-notes/aa-o-001-100/an-o-042.html>
- Molnár, E., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2010). Utilisation of bipolar electro dialysis for recovery of galacturonic acid. *Desalination*, 250(3), 1128–1131. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.124>
- Montero, Y. S., Bouza, A., & Filippo, J. M. (2011). MODELAJE Y SIMULACIÓN DE UN BIORREACTOR ENZIMÁTICO NO ISOTÉRMICO PARA UNA REACCIÓN SERIE-PARALELO / Modelling and Simulation of a Non-Isothermal Enzymatic Bioreactor for a Serie-Paralel Reaction. *Revista de la Facultad de Ingeniería. Universidad Central de Venezuela*, 26(1).
- Ninga, K. A., Carly Desobgo, Z. S., De, S., & Nso, E. J. (2021). Pectinase hydrolysis of guava pulp: effect on the physicochemical characteristics of its juice. *Heliyon*, 7(10), e08141. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08141>
- P. Sriamornsak. "Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review." *Silpakorn University International Journal*, vol. 3, pp. 206-208, 2003.

- Panales, P. (2021). ¿cuál es la importancia de la cinetica? Retrieved March 8, 2022, from Aleph.org.mx website: <https://aleph.org.mx/cual-es-la-importancia-de-la-cinetica>
- Ptichkina, N. M., Markina, O. A., & Romyantseva, G. N. (2008). Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 192–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.002>
- Rios, R Alzate Francisco Javier Arias Vargas, L. (n.d.). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA INGENIERIA QUÍMICA 2002.
- Sanabria, D. (2006). CONDUCTIVIDAD ELECTRICA POR EL MÉTODO ELECTROMÉTRICO EN AGUAS. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Tomado de: <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Conductividad+El%C3%A9ctrica.pdf/f25e2275-39b2-4381-8a35-97c23d7e8af4#:~:text=La%20conductividad%20es%20una%20medida,la%20temperatura%20de%20la%20medici%C3%B3n>.
- Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 345(4), 487–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019>
- Sichel Sara Sofia, G. A. B. A. C. C. Á. V. (2021). EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO A PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL DE CHONTADURO (*Bactris gasipaes*). *CyTA-Journal of Food*.
- Sriamornsak, P. (2003) "Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review." *Silpakorn University International Journal*, vol. 3, pp. 206-208.
- Timberlake, K. (2013). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. México: Pearson Educación
- Voragen, A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*, 20, pp. 263–275
- Walteros, V. A., Ceballos, A., & Alvarez-vasco, C. (n.d.). *CyTA-Journal of Food*.
- Zhang, L., Thiewes, H., & van Kan, J. A. L. (2011). The d-galacturonic acid catabolic pathway in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(10), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.06.002>

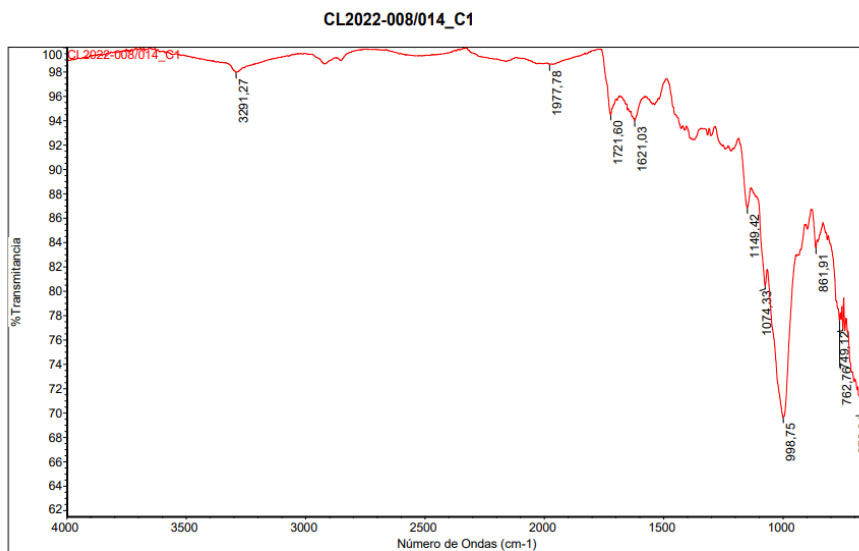
## ANEXOS

- **ANÁLISIS DE LA PECTINA**

Grado de metilesterificación



análisis FTIR pectina primer extracción



Análisis FTIR pectina segunda extracción

Solubilidad

	<b>Pectina primera extracción</b>	<b>Pectina segunda extracción</b>
<b>Humedad inicial de la pectina (% peso)</b>	11,53	90,01
<b>Volumen de solución (mL)</b>	30,00	30,00
<b>pectina agregada de cada muestra (g)</b>	0,60	5,31
<b>pectina agregada (g peso seco)</b>	0,53	0,53

<b>concentración esperada (mg/mL)</b>	20,00	20,00
<b>Peso pectina precipitada (g)</b>	2,01	1,19
<b>Humedad pectina precipitada (% peso)</b>	80,49	80,67
<b>Porcentaje pectina solubilizada (%)</b>	34,67	56,67

Datos obtenidos de la primera prueba de solubilidad de la pectina

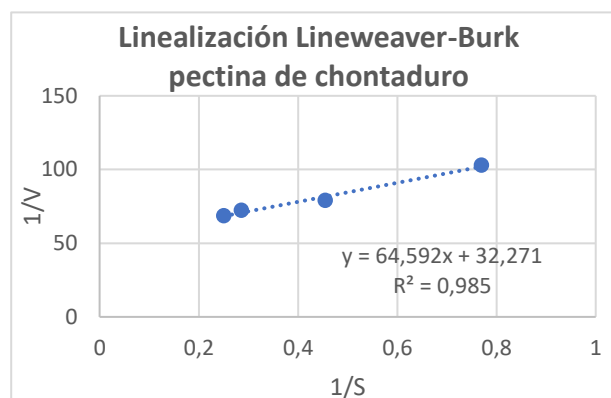
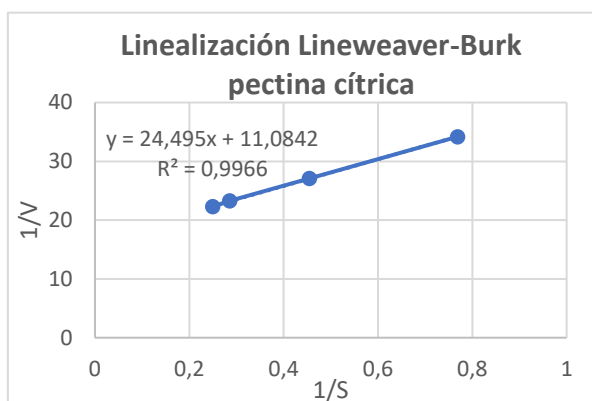
	<b>Pectina primera extracción</b>	<b>Pectina segunda extracción</b>
<b>Humedad inicial de la pectina (% peso)</b>	10,00	86,86
<b>Volumen de solución (mL)</b>	30,00	30,00
<b>pectina agregada de cada muestra (g)</b>	0,60	4,26
<b>pectina agregada (g peso seco)</b>	0,54	0,56
<b>concentración esperada (mg/mL)</b>	20,00	0,00
<b>Peso pectina precipitada (g)</b>	1,97	1,21
<b>Humedad pectina precipitada (% peso)</b>	80,49	80,67
<b>Porcentaje pectina solubilizada (%)</b>	28,86	58,12

Datos obtenidos de la segunda prueba de solubilidad de la pectina

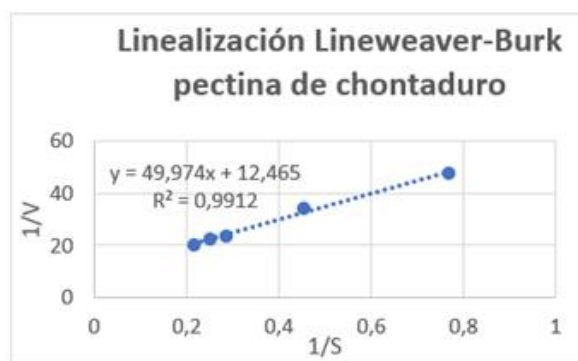
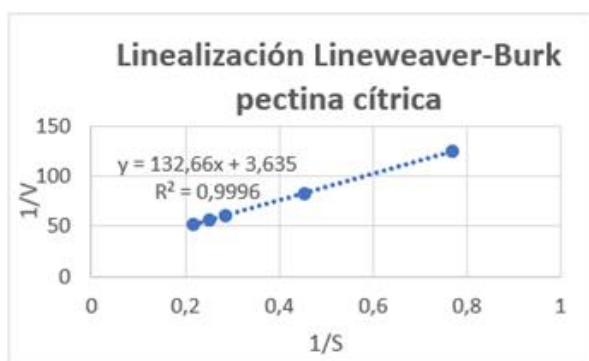
	<b>Pectina primera extracción</b>	<b>Pectina segunda extracción</b>
<b>Humedad inicial de la pectina (% peso)</b>	9,69	88,21
<b>Volumen de solución (mL)</b>	30,00	30,00
<b>pectina agregada de cada muestra (g)</b>	0,60	4,60
<b>pectina agregada (g peso seco)</b>	0,54	0,54
<b>concentración esperada (mg/mL)</b>	20,00	20,00
<b>Peso pectina precipitada (g)</b>	2,01	1,19
<b>Humedad pectina precipitada (% peso)</b>	82,10	82,28
<b>Porcentaje pectina solubilizada (%)</b>	33,63	61,10

Datos obtenidos de tercera prueba de solubilidad de la pectina

- Velocidad máxima



Linealizaciones empleadas para el cálculo de la  $V_{max}$  de la cinética de la pectínliasa para pectina cítrica y pectina de chontaduro respectivamente.



Linealizaciones empleadas para el cálculo de la Vmax de la cinética de la poligalacturonasa para pectina cítrica y pectina de chontaduro respectivamente.

### • TRANSFORMACIÓN DE LA PECTINA

En las siguientes tablas se encuentran los datos experimentales de concentración de pectina, concentración de ácido galacturónico y concentración de metil oligosacárido en el tiempo; en donde se encuentran promediadas de las réplicas de cada ensayo realizado para la pectina cítrica y pectina de chontaduro.

Pectina de chontaduro (0,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	0,4200	0,0000	0,0000
2,8158	0,3851	0,0045	0,0010
4,4320	0,3489	0,0046	0,0021
6,2598	0,3127	0,0050	0,0031
9,6867	0,2043	0,0053	0,0042
18,1475	0,0437	0,0065	0,0052
19,0100	0,0235	0,0067	0,0063
19,7627	0,0163	0,0068	0,0073

Pectina de chontaduro (1 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	0,4116	0,0000	0,0000
2,4573	0,3773	0,0052	0,0787
4,6785	0,3419	0,0054	0,1129
8,8215	0,2002	0,0057	0,1234
12,6320	0,0799	0,0059	0,1339
20,2878	0,0159	0,0063	0,1444

Pectina de chontaduro (1,3 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	1,8480	0,0000	0,0000
5,1583	1,5782	0,0039	0,0525
8,7160	1,5059	0,0042	0,1050
14,0867	0,7104	0,0046	0,1575
17,1485	0,2043	0,0047	0,2100
19,1587	0,0597	0,0047	0,2625

Pectina de chontaduro (2,2 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	2,3520	0,0000	0,0000
1,8167	2,1077	0,0032	0,1050
4,0000	1,9631	0,0034	0,1575
7,3000	1,8908	0,0040	0,2100
9,8000	1,6505	0,0042	0,2625
11,5000	1,5782	0,0044	0,2730
18,0000	0,7104	0,0045	0,2835
20,0000	0,2043	0,0045	0,2923

Pectina de chontaduro (3,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	2,9376	0,0000	0,0000
1,7372	2,8893	0,0032	0,0525
3,9915	1,8440	0,0034	0,1050
6,3343	1,5665	0,0035	0,1575
10,7068	0,9646	0,0039	0,2100
14,8117	0,7660	0,0042	0,2625
18,5953	0,7104	0,0044	0,3150
19,1787	0,4935	0,0045	0,3675

Pectina de chontaduro (4 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	3,3865	0,0000	0,0000
0,9328	3,3504	0,0042	0,0525
1,9953	3,3142	0,0042	0,1050
3,3595	2,9524	0,0046	0,1575
5,9005	2,6629	0,0047	0,2100
7,3573	2,3735	0,0049	0,2625
8,8723	1,5775	0,0050	0,3150
12,2998	1,5051	0,0055	0,3675
15,9358	1,2880	0,0062	0,4200
18,6340	0,7091	0,0067	0,4724
19,5212	0,2026	0,0070	0,5249



Pectina de chontaduro (4,6 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	3,8921	0,0000	0,0000
1,8833	2,9572	0,0037	0,0682
2,1500	2,6271	0,0044	0,1732
3,0667	2,3809	0,0046	0,2257
5,1333	2,2363	0,0047	0,3307
8,5500	1,0720	0,0049	0,4357
11,8000	0,9997	0,0052	0,5407
14,7000	0,8551	0,0056	0,6457
15,7167	0,6381	0,0058	0,6982
18,9667	0,4935	0,0059	0,7507

Pectina de chontaduro (5,2 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	4,3982	0,0000	0,0000
0,5000	3,3136	0,0050	0,0262
2,4500	2,6628	0,0062	0,1837
3,8667	1,7951	0,0065	0,2625
5,5833	1,7228	0,0071	0,3675
7,5000	1,2889	0,0074	0,4724
9,4333	1,2889	0,0077	0,5774
12,4000	1,1443	0,0084	0,6562
15,2667	1,0720	0,0085	0,7874
17,3500	0,7828	0,0087	0,8399
19,1000	0,5658	0,0089	0,9449

Pectina de chontaduro (6 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	5,0490	0,0000	0,0000
0,5000	4,9746	0,0009	0,1050
1,4167	4,8416	0,0014	0,2100
2,5667	3,8081	0,0021	0,3150
6,2500	1,2889	0,0049	0,5249
9,1667	0,7828	0,0058	0,6299
12,2500	0,6381	0,0075	0,7349
13,9167	0,5658	0,0081	0,8399
19,5000	0,2766	0,0094	0,9974

Pectina de cítrica (0,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	0,5014	0,0000	0,0000
2,8158	0,4584	0,0271	0,0013
4,4320	0,4154	0,0294	0,0027
6,2598	0,3723	0,0340	0,0040
9,6867	0,2432	0,0390	0,0054
18,1475	0,0521	0,0422	0,0067
19,0100	0,0280	0,0430	0,0081
19,7627	0,0194	0,0438	0,0094

Pectina de cítrica (1 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	0,7564	0,0000	0,0000
2,4573	0,4538	0,0055	0,1010
4,6785	0,4112	0,0062	0,1447
8,8215	0,2408	0,0071	0,1582
12,6320	0,0961	0,0090	0,1716
20,2878	0,0192	0,0094	0,1851

Pectina de cítrica (2,2 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	2,2000	0,0000	0,0000
5,1583	1,8788	0,0560	0,0673
8,7160	1,7927	0,0673	0,1346
14,0867	0,8458	0,0800	0,2019
17,1485	0,2432	0,0809	0,2692
19,1587	0,0710	0,0816	0,3365

Pectina de cítrica (3,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	3,4985	0,0000	0,0000
1,8167	3,4205	0,0062	0,1346
4,5813	2,7484	0,0096	0,2019
7,3672	1,9692	0,0117	0,2692
9,8124	1,2762	0,0143	0,3365
11,5675	1,1901	0,0152	0,3500
18,2389	0,5875	0,0173	0,3634
20,0145	0,5014	0,0177	0,3748

Pectina de cítrica (4 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	3,4971	0,0000	0,0000
1,7372	3,4396	0,0069	0,0673
3,9915	2,1953	0,0099	0,1346
6,3343	1,8648	0,0113	0,2019
10,7068	1,1484	0,0125	0,2692
14,8117	0,9119	0,0146	0,3365
18,5953	0,8458	0,0159	0,4038
19,1787	0,5875	0,0174	0,4711

Pectina de cítrica (4,6 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	4,0316	0,0000	0,0000
1,0833	3,9885	0,0064	0,0673
2,7833	3,9454	0,0093	0,1346
3,8667	3,5147	0,0123	0,2019
5,5833	3,1701	0,0132	0,2692
7,5000	2,8256	0,0148	0,3365
9,4333	1,8780	0,0157	0,4038
12,4000	1,7918	0,0173	0,4711
15,2667	1,5334	0,0197	0,5384
17,3500	0,8442	0,0204	0,6057
19,1000	0,2412	0,0206	0,6730

Pectina de cítrica (5,2 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	4,6334	0,0000	0,0000
1,8833	3,5205	0,0084	0,0875
2,1500	3,1275	0,0095	0,2221
3,0667	2,8344	0,0103	0,2894
5,1333	2,6623	0,0131	0,4240
8,5500	1,2762	0,0150	0,5586
11,8000	1,1901	0,0162	0,6932
14,7000	1,0179	0,0185	0,8278
15,7167	0,7597	0,0189	0,8951
18,9667	0,5875	0,0190	0,9624

Pectina de cítrica (5,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	5,2360	0,0000	0,0000
0,5000	3,9448	0,0059	0,0337
2,4500	3,1700	0,0099	0,2356
3,8667	2,1370	0,0107	0,3365
5,5833	2,0509	0,0131	0,4711
7,5000	1,5344	0,0139	0,6057
9,4333	1,5344	0,0150	0,7403
12,4000	1,3623	0,0164	0,8413
15,2667	1,2762	0,0175	1,0095
17,3500	0,9319	0,0175	1,0768
19,1000	0,6736	0,0178	1,2114

Pectina de cítrica (6 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	6,0108	0,0000	0,0000
0,5000	5,9221	0,0195	0,1346
1,4167	5,7638	0,0341	0,2692
2,5667	4,5334	0,0417	0,4038
6,2500	1,5344	0,0637	0,6730
9,1667	0,9319	0,0725	0,8076
12,2500	0,7597	0,0786	0,9422
13,9167	0,6736	0,0826	1,0768
19,5264	0,3293	0,0919	1,2787

Pectina de cítrica (6,5 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	6,5273	0,0000	0,0000
0,3500	5,8360	0,0028	0,0337
1,5667	4,2030	0,0057	0,2019
3,1500	3,5118	0,0063	0,6057
4,7333	2,8370	0,0069	0,7403
6,7333	2,1370	0,0080	1,0095
9,1667	1,7066	0,0094	1,1441
11,3833	0,7597	0,0111	1,2787
13,6000	0,5875	0,0117	1,4133
15,9500	0,6736	0,0131	1,5479
17,6000	0,5014	0,0144	1,6825
19,9000	0,2432	0,0148	1,8287

Pectina de cítrica (7 mg/mL)			
Tiempo (min)	Concentraciones (mg/mL)		
	Pectina	Metil oligosacárido	Ácido galacturónico
0,0000	7,0215	0,0000	0,0000
1,0000	6,7855	0,0027	0,1346
1,5000	5,2360	0,0030	0,2019
2,9000	4,4396	0,0032	0,4038
3,2000	4,1370	0,0035	0,5384
4,7167	3,0344	0,0038	0,6730
5,6167	3,1901	0,0042	0,7403
7,0000	2,7360	0,0055	0,8749
8,5500	2,7396	0,0065	1,0768
10,0833	2,1370	0,0068	1,1441
12,0000	1,5344	0,0083	1,3460
13,4667	1,1901	0,0084	1,4806
14,7667	1,1040	0,0091	1,6152
17,0500	0,2432	0,0095	1,7498
18,7167	0,1571	0,0097	1,8844
20,0000	0,0710	0,0101	1,8980

- **VISCOSIDAD**

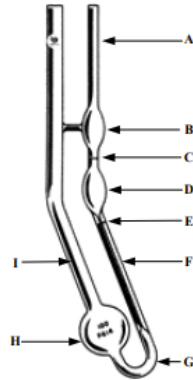
Manual para realizar las mediciones de viscosidad empleando el viscosímetro de Ostwald CANNON CFRC-400 con una constante K de 1.2 mm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>:

**Viscosity Measurement Using CANNON-FENSKE Viscometers**

Tianguang Fan  
October 26, 2001

**Instructions**

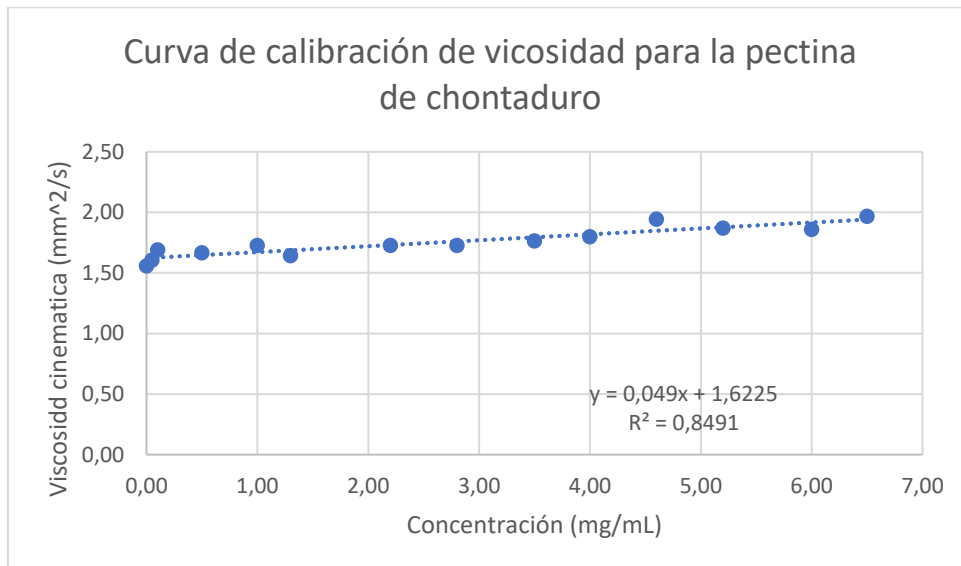
(adapted from Cannon Instruments)

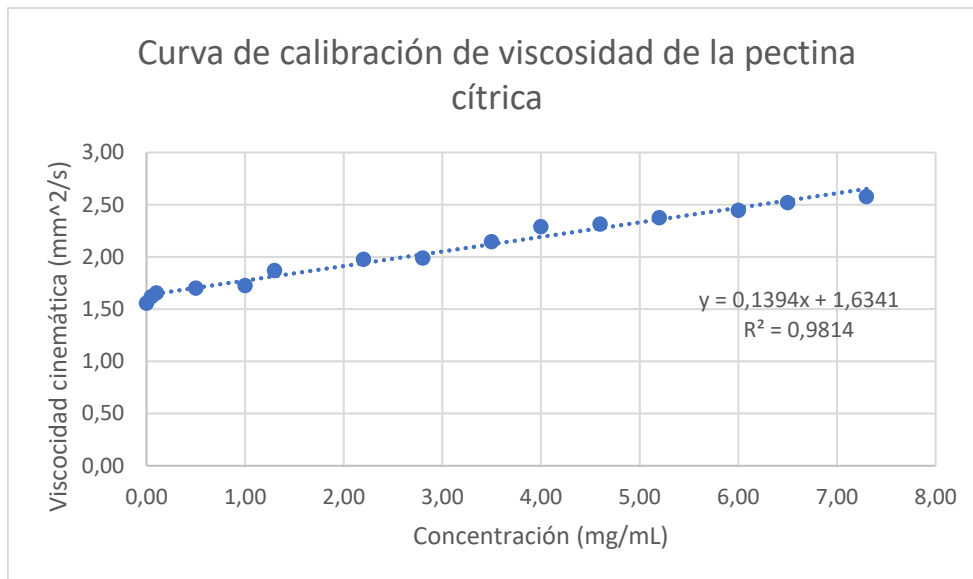


1. The viscometer should be cleaned with a suitable solvent and dried in a stream of clean, filtered or N<sub>2</sub>.
2. The instrument should be periodically cleaned with chromic acid to remove any possible traces of organic deposits.
3. If a possibility of lint, dust, or other solid material is present in the liquid sample, this may be removed by filtering through sintered glass filter or fine mesh screen. (NB: This may not be feasible with crude oils.)
4. To introduce sample into the viscometer, invert viscometer, immerse tube "A" into liquid and apply suction to "I", which causes the sample to rise to etched line "E". Turn the viscometer to normal position and wipe tube "A" clean.
5. Insert the viscometer into a holder and place in constant temperature bath. Allow 10 minutes for viscometer to reach equilibrium at 100°F (38°C) or 15 min at 210°F (98.89°C), or whatever amount of time is required for temperature equilibration.
6. Vertical alignment may be accomplished in bath by suspending a plumb bob in tube "I".
7. Apply suction to tube "A" and bring sample into bulb "B" a short distance above mark "C".
8. The efflux time is measured by allowing the sample to flow freely through mark "C", measuring the time for the meniscus to pass from "C" to "E".
9. To repeat efflux time measurement, repeat steps 7 and 8.
10. The kinematic viscosity is calculated by multiplying the efflux time by the viscometer constant.

dynamic viscosity (cP) = kinematic viscosity (cSt) × density (g/cm<sup>3</sup>)  
See ASTM D445 and D2515 for more complete instructions.

**Curvas de viscosidad de la pectina:**





- **MODELAMIENTO**

Parámetros cinéticos:

**CODIGO 1:** Código de Matlab para la cinética de Michaelis Menten con inhibición de sustrato para la pectínliasa: Este código aplica tanto para la pectina cítrica como para la pectina de chontaduro; solo se deben reemplazar sus respectivos datos de concentración de sustrato, velocidades iniciales y Vmax.

```

% modelamiento de la cinética de M_M con inhibición por sustrato,
%dejando constante la Vmax
% El dato de Vmax, el cual es constante, es obtenido mediante la
% linealización de LB en Excel
function [Vmax, Km, Ks]=parametros_chonta (Datos)
Data.S=[0;0.5;1;1.3;2.2;3.5;4;4.6;5.2;5.5;6;6.5]; %(g/l)
Data.Vo=[0;0.005917;0.009137;0.009724;0.01267;0.01385;0.01459;0.01369;0.01341
;0.0131288;0.01224;0.01205]; % mg/mL*h
plot(Data.S,Data.Vo,'ro')
xlabel('[S] (mg/mL)')
ylabel('Vo (mg/mL*h)')
title('Cinética Pectinliasa para pectina de chontaduro')
Km_0=input('Escriba el valor para Km');
Ks_0=input('Escriba el valor para Ks');
theta_0=[Km_0; Ks_0];
theta=fminsearch(@SSMIN,theta_0,[],Data);
Km=theta(1)
Ks=theta(2)
sys.Km=theta(1);
sys.Ks=theta(2);
S=linspace(0,8,1000);
Voi=Vel(sys,S);
hold on
plot(S,Voi)
return
function sse=SSMIN(theta,Data);
sys.Km=theta(1);
sys.Ks=theta(2);
Vos=Vel(sys,Data.S);

```

```

res=Data.Vo-Vos;
sse=0.5*dot(res,res);
return
function Voi=Vel(sys,S);
Voi =( 0.03*S)./(sys.Km+S+((S.^2)/sys.Ks));
return

```

**CODIGO 2:** Código de Matlab para la cinética de Michaelis Menten con inhibición por producto para la poligalacturonasa: Este código aplica tanto para la pectina cítrica como para la pectina de chontaduro; solo se deben reemplazar sus respectivos datos de concentración de sustrato, concentración de inhibidor (producto), velocidades iniciales y Vmax.

```

% modelamiento de la cinética de M_M con inhibición por producto,
%dejando constante la Vmax
% El dato de Vmax, el cual es constante, es obtenido mediante la
% linealización de LB en Excel
function [Vmax, Km, Ki]=parametros_product(Datos)
Data.S=[0;0.5;1;1.3;2.2;3.5;4;4.6;5.2;5.5;6;6.5]; %(g/l)
Data.Vo=[0;0.0048;0.017;0.021;0.029;0.042;0.04466;0.04976;0.051;0.054;0.06;0.062]; % mg/mL*h
Data.I=[0;0.0942;0.1346;0.1851;0.3365;0.3634;0.4711;0.6730;0.9624;1.2114;1.2787;1.3527];
plot(Data.S,Data.Vo,'ro');
xlabel('[S] (mg/mL)')
ylabel('Vo (mg/mL*h)')
title('Cinética Poligalacturonasa pectina Cítrica')
Km_0=input('Escriba el valor para Km');
Ki_0=input('Escriba el valor para Ki');
theta_0=[Km_0; Ki_0];
theta=fminsearch(@SSMIN,theta_0,[],Data);
Km=theta(1)
Ki=theta(2)
sys.Km=theta(1);
sys.Ki=theta(2);
S=linspace(0,7,1000);
I=linspace(0,2,1000);
Voi=Vel(sys,S,I);
hold on
plot(S,Voi)
return
function sse=SSMIN(theta,Data);
sys.Km=theta(1);
sys.Ki=theta(2);
Vos=Vel(sys,Data.S,Data.I);
res=Data.Vo-Vos;
sse=0.5*dot(res,res);
return
function Voi=Vel(sys,S,I);
Voi =( 0.2752*S)./((sys.Km*(sys.Ki+I./sys.Ki))+S);
return

```

### CODIGO 3: MODELO CINÉTICO

#### Pegar en function

```
function []=rk4(f,g,j,p,a,b,y1,h)
x=a:h:b;
n=length(x)
y=[y1];
z=[0];
w=[0];
s=[0];

for i=1:n-1
    k1=f(x(i),y(i));
    k2=f(x(i)+h/2,y(i)+k1*h/2);
    k3=f(x(i)+h/2,y(i)+k2*h/2);
    k4=f(x(i)+h,y(i)+k3*h);
    y(i+1)= y(i)+(h/6)*(k1+2*k2+2*k3+k4);
    if y(i)<0
        y(i)=0;
    end
    l1=g(x(i),y(i));
    l2=g(x(i)+h/2,y(i)+l1*h/2);
    l3=g(x(i)+h/2,y(i)+l2*h/2);
    l4=g(x(i)+h,y(i)+l3*h);
    z(i+1)= z(i)+(h/6)*(l1+2*l2+2*l3+l4);

    t1=p(x(i),y(i), z(i));
    t2=p(x(i)+h/2,y(i)+t1*h/2, z(i)+t1*h/2);
    t3=p(x(i)+h/2,y(i)+t2*h/2,z(i)+t2*h/2);
    t4=p(x(i)+h,y(i)+t3*h,z(i)+t3*h);
    s(i+1)= s(i)+(h/6)*(t1+2*t2+2*t3+t4);
    if s(i)<0
        s(i)=0
    end

    m1=j(x(i),y(i),s(i));
    m2=j(x(i)+h/2,y(i)+m1*h/2, s(i)+m1*h/2);
    m3=j(x(i)+h/2,y(i)+m2*h/2, s(i)+m2*h/2);
    m4=j(x(i)+h,y(i)+m3*h, s(i)+m3*h);
    w(i+1)= w(i)+(h/6)*(m1+2*m2+2*m3+m4);
    if w(i)<0
        w(i)=0
    end

end

plot(x,z,'r',x,y,'b',x,w,'m',x,s,'g')
legend('Metil oligosacáridos','Pectina','Ácido galacturónico','POS')
xlabel('tiempo (min)')
ylabel('concentración (mg/mL)')
title('Modelo cinético Pectinase 831L')

POS=transpose(s);
Tiempo_min=transpose(x);
```

```
t=table(POS,Tiempo_min)
```

```
end
```

pegar en command window

```
clear
```

```
close all
```

```
f=@(x,y)y*(-0.072);a=0;b=20;y1=5;h=2;
```

```
g=@(x,y)y*(0.017);a=0;b=20;y1=5;h=2;
```

```
p=@(x,y,z)y*(0.072)-z*(0.17);a=0;b=20;y1=5;h=2;
```

```
j=@(x,y,s)s*(-0.000615)+ y*(0.034);a=0;b=20;y1=5;h=2;
```

```
rk4(f,g,j,p,a,b,y1,h)
```