

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**



Título

Inmovilización por microencapsulación de una pectinasa de *Aspergillus aculeatus* mediante gelación iónica: aplicación en la extracción enzimática de licopeno a partir de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Por:

Marisol Sánchez Molina

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

Ingeniero en Biotecnología

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

"Inmovilización por microencapsulación de una pectinasa de *Aspergillus aculeatus* mediante gelación iónica: aplicación en la extracción enzimática a partir de licopeno de tomate (*Solanum lycopersicum*)"

Por:

Marisol Sánchez Molina

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Xochitl Ruelas Chacón

Asesor Principal



Dra. Sonia Noemi Ramírez Barrón

Coasesor



Dr. Pedro Aguilar Zarate

Coasesor externo

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
Programa Docente de Ingeniero en Biotecnología

TESIS TITULADA

Inmovilización por microencapsulación de una pectinasa de *Aspergillus aculeatus* mediante gelación iónica: aplicación en la extracción enzimática de licopeno a partir de tomate (*Solanum lycopersicum*).

PRESENTADA POR:

Marisol Sánchez Molina

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

De acuerdo al artículo 90 del reglamento para Alumnos de Licenciatura

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Presidente



Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Vocal



Dr. Pedro Aguilar Zarate
Vocal



Dra. Mariela Ramona Michel Michel
Vocal




MC. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024

Agradecimientos

Primero que nada, a **Dios**, por darme fuerza, sabiduría e inteligencia para continuar mi carrera a pesar de las dificultades que se presentaron a lo largo de la misma...

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi ALMA MATER, por formar académicamente mi desarrollo profesional y darme la oportunidad de cumplir mis sueños.

De manera especial agradezco a la **Dra. Xochitl Ruelas Chacón**, por su paciencia y su sabiduría para transmitirme su conocimiento en esta amplia área de la biotecnología alimentaria, también por inspirarme a ser mejor persona.

Al **Dr. Pedro Aguilar Zárate**, cuya dedicación y orientación fueron fundamentales en mi viaje hacia la comprensión y dominio de la técnica de microencapsulación.

A la **Dra. Sonia Noemi Ramírez Barrón**, por su gran apoyo y contribución durante mi formación y en la culminación de este trabajo.

A la **Dra. Mariela R. Michel Michel**, por su colaboración en el presente trabajo de investigación.

A mis docentes, que contribuyeron adecuadamente mi formación académica dentro de la universidad, para aplicar los conocimientos tanto dentro y fuera de esta.

A **mi familia**, que estuvo siempre presente en mi preparación académica, especialmente mi madre, quien me sostuvo pacientemente y amorosamente...

A mis maestros, por transmitirme su conocimiento

Al **M.C. Carlos Alberto García Agustince**, por su paciencia, su entrega y responsabilidad durante mi estancia en la carrera, su apoyo hizo que cumpliera mis metas fijadas.

Al **M.C. Alberto Hernández Rodríguez**, por ser mi asesor en el área estadística, responder mis dudas y apoyarme moralmente a lo largo de la carrera.

Al **Dr. Marco Adan Juárez Verdayez**, por ser mi tutor académico y estar siempre presente en las necesidades académicas que surgieron a lo largo de la carrera y resolver mis dudas de una forma paciente.

A mis amigos, en especial a **Ismael Cavazos y Adolfo Morales**, quien estuvieron presentes entre risas y esfuerzos a lo largo de mi formación académica, apoyándonos empáticamente con las dificultades escolares y de la vida cotidiana.

Dedicatoria

A mi **madre, María del Carmen Molina González**, quien estuvo siempre presente, acompañándome y aconsejándome a lo largo de mi vida académica. Por siempre creer en mí y hacer de mí la persona que soy.

A mi **padre, Juan Cecilio Sánchez Martínez**, quien me enseñó muchas cosas en tan poco tiempo. A pesar de ya no estar físicamente conmigo, agradezco los valores inculcados.

A mi **abuelo, Benjamín Molina Loera**, mi gran fortaleza de la vida, motivo por el cual entré a esta universidad. Por sus enseñanzas. Por ser tan paciente, decidido y audaz y sobre todo por siempre creer en el potencial que tenía y apoyarme en todos mis sueños a pesar que ya no esté físicamente conmigo, motivarme a ser mejor persona.

A mi **abuela, María Guadalupe González Loera**, por sus consejos, su carácter hizo de mí una persona disciplinada y fuerte.

A mi **perro Dante**, por acompañarme en mis desvelos durante la universidad y alegrar mis días con su tierna mirada y a mi cachorro "**Choco**", por ser el perrito rescatado que más esperaba que regresara a casa.

A mis **padrinos, José Guadalupe Martínez y María Guadalupe Eguía**, por ser mi inspiración que los sueños se cumplen y que hay que trabajar arduamente para poder obtenerlos.

A mi **profesora, la Dra. América Zamora Pedraza**, por inspirarme a ser mejor persona, para que pueda obtener la mejor versión de mí y hacer las cosas de la mejor manera.

A mi **profesor, el Lic. Francisco Canek Rangel Cortés**, por ser mi inspiración en la amplia ciencia de Biología y despertar en mí el interés por incursionar en esta rama.

A mi **profesor Martín Tejada Pérez**, por siempre ver en mí una persona que lucha por cumplir sus metas.

A mi gran **amigo Wayne Prindiville y Luna Parks**, quienes desde mi adolescencia han estado al pendiente de mi educación, motivándome a cumplir mis sueños.

A mi **pareja Fernando Miguel Barrios López**, por siempre acompañarme en las buenas y malas a lo largo de mi carrera y sacar de mí la mejor versión.

A mis **amigos de la universidad**, por estar presentes a lo largo de mi educación y compartir buenos momentos.

Créditos institucionales

Al Laboratorio Nacional CONAHCYT de Apoyo a la Evaluación de Productos Bióticos-LaNAEEPBi, unidad de Servicio Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Ciudad Valles.



ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE CUADROS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVO GENERAL	14
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
5.1. Orígenes del tomate.....	16
5.2. Cultivo de tomate	17
5.2.1. Clasificación taxonómica.....	17
5.2.2. Descripción botánica	17
5.2.3. Descripción genética	18
5.2.4. Principales usos.....	18
5.2.5. Principales tipos de tomate	19
5.2.6. Residuos generados por tomate.....	19
5.3. Economía circular.....	21
5.4. Producción a nivel mundial y nacional	21
5.5. Composición química.....	22
5.6. Antioxidantes	23
5.6.1. Carotenoides	23
5.6.1.1. Licopeno	24
5.7. Extracción de licopeno mediante solventes orgánicos	25
5.8. Extracción de licopeno vía enzimática	25
5.8.1. Enzimas utilizadas en la extracción de licopeno.....	26
5.8.1.1. Celulasas.....	26
5.8.1.2. Pectinasas.....	26
5.8.1.2.1. Tipos de pectinasas.....	27
5.8.1.2.2. Principales organismos productores de pectinasas	27
5.9. Limitaciones del uso de enzimas para procesos catalíticos industriales.....	27

5.10.	Inmovilización enzimática.....	27
5.11.	Efectos en la inmovilización enzimática.....	28
5.11.1.	Estabilidad enzimática	28
5.11.2.	Actividad enzimática	29
5.12.	Métodos de inmovilización	30
5.12.1.	Inmovilización por retención o unión física	30
5.12.1.1.	Inmovilización mediante microencapsulación.....	31
5.12.1.2.	Métodos de microencapsulación	31
5.12.1.2.1.	Extrusión	32
5.12.1.2.1.1.	Extrusión mecánica	32
5.13.	Materiales de inmovilización.....	34
5.13.1.	Biopolímeros como soporte de inmovilización enzimática	34
5.13.1.1.	Uso del alginato en la inmovilización	35
5.13.2.	Esferificación del alginato de sodio en presencia de calcio	36
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1.	Material vegetal	37
6.2.	Enzima y reactivos	37
6.3.	Procedimiento de preparación del alginato	38
6.4.	Procedimiento de inmovilización enzimática.....	39
6.5.	Procedimiento de extracción de licopeno vía enzimática	41
6.6.	Análisis estadístico.....	44
6.7.	Parámetros de inmovilización	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
7.1.	Resultados de parámetros de inmovilización.....	46
7.2.	Determinación de los parámetros de extracción de licopeno.....	47
7.3.	Liberación de licopeno residual	50
7.4.	Retención enzimática	52
8.	CONCLUSIONES.....	54
9.	RECOMENDACIONES	55
10.	LITERATURA CITADA	56
11.	ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles rutas de origen y domesticación del tomate en el siglo XVI.	16
Figura 2. Producción (ton/año) a nivel nacional de tomate rojo (jitomate).	22
Figura 3. Métodos de inmovilización. Tomado de Arroyo,1998.	30
Figura 4. Representación esquemática del encapsulador B-390.	33
Figura 5. Estructura del alginato.	36
Figura 6. Zona de unión del alginato de sodio en presencia de iones de calcio.	36
Figura 7. Tomates utilizados para el experimento.	37
Figura 8. Enzima pectinasa de <i>Aspergillus aculeatus</i>	38
Figura 9. Agitador magnético DLAB.	38
Figura 10. Botella de presión con la mezcla enzima-alginato.	39
Figura 11. Encapsulador BÜCHI B-390.	40
Figura 12. Procedimiento de encapsulación de la enzima.	40
Figura 13. Procedimiento de licuado de los tomates.	41
Figura 14. Montado de los reactores; tratamiento y control, sobre la placa de agitación.	41
Figura 15. Baño María y bomba de recirculación	42
Figura 16. Acomodo de los tubos de ensaye.	42
Figura 17. Vórtex para la agitación de las alícuotas con la mezcla reaccionante. .	43
Figura 18. Centrifuga DIAB.	43
Figura 19. Espectrofotómetro Genesys 10 UV para lectura de muestras.	44
Figura 20 A y B. Enzima. La imagen muestra las perlas que contienen la enzima encapsulada.	46
Figura 21. Eficiencia de inmovilización de enzima retenida en (mg/mL).	47
Figura 22. Liberación de licopeno por acción de la enzima pectinasa (A) Liberación a 50° C y (B) Liberación a 55° C.	48
Figura 23. Liberación de licopeno tras reutilización de los encapsulados.	50
Figura 23. Porcentaje de enzima retenida (T) en el soporte de alginato comparada con la enzima libre (C)	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del tomate <i>Solanum lycopersicum</i>	17
Cuadro 2. Principales tomates comercializadas en México.	19
Cuadro 3. Principales ingredientes extraídos de residuos agroindustriales.	20
Cuadro 4. Composición nutricional del tomate.	22
Cuadro 5. Principales fuentes de carotenoides en diferentes alimentos.	24
Cuadro 6. Principales enzimas utilizadas en la extracción de licopeno.....	26

RESUMEN

La microencapsulación para preservar la funcionalidad y acción de las enzimas en la extracción de componentes bioactivos es una alternativa eficiente para el uso continuo de la actividad enzimática. La adición de enzimas encapsuladas soluciona los problemas asociados con la adición directa, permitiendo una acción gradual y controlada bajo parámetros específicos, lo que optimiza el proceso y reduce los costos de adquisición de la enzima libre. El objetivo de esta investigación fue microencapsular la pectinasa de *Aspergillus aculeatus* utilizando el método de extrusión y establecer los parámetros de pH, temperatura y tiempo de reacción para la extracción de licopeno a partir del tomate. La extrusión se llevó a cabo con un encapsulador Büchi utilizando gel de alginato, ajustando el tamaño y la forma de las esferas con la enzima. Las esferas obtenidas se emplearon en un método de extracción enzimática no convencional, evaluando tres niveles de pH (4.5, 5.0 y 5.5), dos niveles de temperatura (50 y 55°C) y nueve tiempos de reacción (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 minutos). Las esferas contenían un 1.5% de pectinasa, con una actividad enzimática de 100 U/mL, y presentaron morfología esférica con un tamaño de 0.3 mm. Los parámetros óptimos para una extracción eficiente de licopeno (0.001190 mg/g de tejido) con la pectinasa microencapsulada fueron: pH 5.0, temperatura de 50°C y un tiempo de reacción de 60 minutos, en contraste con la extracción con enzima libre (0.0009 mg/g de tejido) bajo los mismos parámetros. Estos resultados demuestran que la extracción de licopeno con pectinasa microencapsulada en gel de alginato es viable para su uso en reactores encaquetados y sistemas de extracción continua en futuras investigaciones.

Palabras clave: pectinasa, extracción de licopeno, microencapsulación, componentes bioactivos, *Solanum lycopersicum*.

Correos electrónicos: Marisol Sánchez Molina, marisolsanchezm1214@gmail.com (tesista);

Dra. Xochitl Ruelas Chacón, xruelas@yahoo.com (Asesora principal)

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos: Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega), reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio), comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia, omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas, emplear ideas o razonamientos de un autor sin citarlo, aplicar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Marisol Sánchez Molina

1. INTRODUCCIÓN

El tomate, se convirtió en la gran hortaliza del siglo XX, tanto en el cultivo comercial como en los huertos familiares (Blancard, 2011). Se trata de la hortaliza más cultivable tanto para consumo nacional como para exportación ya que se produce en todos los estados del país, encabezados por Sinaloa, que aporta el 20 por ciento del volumen nacional, seguido de San Luis Potosí, Michoacán, Zacatecas y Jalisco (SADER, 2022).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), a nivel mundial se desperdicia aproximadamente una tercera parte de los alimentos generados para consumo humano (Galanakis, 2012). La cadena de producción y comercialización del tomate produce una gran cantidad de subproductos, que en gran mayoría no son aprovechados y, en consecuencia, la mayoría terminan en rellenos sanitarios municipales que, posteriormente, debido a sus lixiviados pasan a ser un problema ambiental. Una forma de aprovechar estos recursos es reutilizándolos para formar compuestos bioactivos que tienen múltiples beneficios en la salud. Estos representan la justificación del interés en extraer carotenoides de los subproductos del tomate (Domínguez et al., 2020).

El uso de enzimas es una de las aplicaciones que se les ha dado a los residuos agroindustriales. Estas suelen utilizarse en el pretratamiento de los residuos, en la extracción de compuestos e incluso en la modificación y síntesis de nuevas moléculas a partir de los compuestos bioactivos (Puri et al., 2012). Estos componentes alimenticios se han estudiado en los últimos años ya que han demostrado tener beneficios en la salud humana, sobre todo en la prevención de enfermedades crónicas. Las enzimas que tienen aplicación en la valorización de estos residuos son aquellas capaces de hidrolizar los enlaces químicos presentes en las membranas y paredes celulares, facilitando la extracción de las moléculas de interés, tales como los compuestos bioactivos (Pinelo et al., 2006).

El tomate es una de las principales fuentes de licopeno, un carotenoide con alto valor nutricional (Choudhari et al., 2007). En su estructura este fruto posee entre el 72 y 92% del licopeno, que se encuentra dentro de las células, asociado a la fracción insoluble en agua y la cáscara (Sharma et al., 1996) y es por ello que es factible la extracción de licopeno a partir de desechos agroindustriales de tomate para su uso potencial en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los carotenoides, como es el caso del licopeno, son insolubles en agua. Generalmente este pigmento se extrae mediante solventes orgánicos debido a que estos presentan alta solubilidad. Se sugieren mezclas de disolventes que contienen un componente polar y no polar como hexano- acetona, hexano-etanol o hexano-acetona-etanol como los mejores sistemas de disolventes para la extracción de carotenoides polares y no polares de hortalizas (Domínguez et al., 2020). Sin embargo, la extracción de licopeno mediada por solventes orgánicos puede presentar problemas tales como: bajos rendimientos de extracción, requiere tiempos prolongados, mala calidad y productos finales con trazas de disolventes orgánicos (Puri et al., 2012).

Actualmente, en la biotecnología, el uso de enzimas para la extracción de colorantes y compuestos bioactivos para la industria alimentaria ha sido una alternativa al problema de la revalorización de los residuos agroindustriales, permitiendo el desarrollo de la economía circular. Sin embargo, las enzimas tienden a ser inestables a los diferentes cambios de pH y temperatura, es por ello que, para resarcir este problema, surgió la tecnología de inmovilización de enzimas, como un campo emergente en la biotecnología, demostrando que mediante estas técnicas es capaz alargar su vida útil, mejorar la estabilidad y actividad enzimática (Arroyo, 1998).

Después de exponer lo anterior se planteó la siguiente hipótesis a probar:

2. HIPÓTESIS

La pectinasa inmovilizada en un soporte de alginato a una temperatura, pH y tiempo constantes, incrementan la estabilidad, duración y actividad enzimática en los parámetros de extracción de licopeno en tomate.

Y para poder aceptar o rechazar la hipótesis planteada se proponen los siguientes objetivos.

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer el procedimiento de inmovilización por microencapsulación de pectinasa en alginato y valorar los parámetros idóneos para la extracción de licopeno en tomate.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la concentración adecuada de alginato para la inmovilización de la pectinasa.
2. Evaluar los parámetros de reacción para la cinética de extracción del licopeno ayudado enzimática y químicamente.
3. Analizar la retención de la actividad enzimática durante reutilización de la enzima microencapsulada o inmovilizada.

4. JUSTIFICACIÓN

En la industria agroalimentaria existe una gran cantidad de residuos generados a lo largo de la cadena productiva debido al procesamiento de los materiales, los cuales pueden ser aprovechados como elementos energéticos, alimentos funcionales o en la elaboración de productos de valor agregado.

Los antioxidantes son fuente importante en la salud humana, ya que revierten las especies reactivas de oxígeno que propician el desarrollo de algunas enfermedades crónicas. El consumo de antioxidantes en la dieta favorece la buena salud, pues previene el envejecimiento celular. Los carotenos, como el licopeno, proveniente del tomate, son antioxidantes que favorecen en la prevención de enfermedades como el cáncer, diabetes o problemas cardiovasculares.

La extracción de licopeno se ha realizado de manera tradicional desde hace algunos años mediante solventes orgánicos. Sin embargo, el licopeno se almacena dentro del cromoplasto de la célula vegetal, por lo que su extracción mediante esta vía a menudo genera daños en la estructura del licopeno, degradándose, por lo que la extracción del caroteno no es eficaz. Debido a esto, en los últimos años se ha previsto el uso de enzimas provenientes de microorganismos para la extracción de componentes funcionales de las plantas, como es el caso del licopeno.

Una de las principales desventajas en el uso de enzimas es su susceptibilidad a cambios de temperatura y pH, debido a que tienen parámetros óptimos de reacción, lo que es inconveniente a nivel industrial sobre los métodos tradicionales de extracción de compuestos.

Una alternativa a lo anterior es la inmovilización de enzimas mediante diferentes tipos de soportes, lo que permite incrementar su estabilidad y actividad enzimática para reacciones a escala industrial, en este caso en la obtención de componentes funcionales que permitan ser utilizados en productos funcionales para el consumo.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Orígenes del tomate

Esta especie es originaria de la región andina, donde se encuentran sus ancestros en forma silvestre en partes de Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú, hasta la Región de Atacama en Chile, en ambas vertientes de la cordillera de Los Andes y en las Islas Galápagos (Sims, 1980).

Sin embargo, sobre Los Andes, aún no se ha encontrado evidencia de esta planta domesticada, a diferencia de otras solanáceas como pimiento, papa y pepino dulce (Rick, 1978; Sauer, 1993). Generalmente se consideran como centros de domesticación del tomate las áreas de Veracruz y Puebla en México. Desde allí aparentemente fue introducido a Europa por los españoles a comienzos del siglo XVI (Fig. 1) (Fornais, G., 2007).

El ancestro más probable del tomate moderno es la especie silvestre “tomate cherry” (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiformes*), el cual se encuentra en forma endémica a través de toda Sudamérica andina tropical y subtropical (Siemonsma Piluek, 1993).

La palabra tomate proviene del vocablo náhuatl “tomatl”, que fue introducido al lenguaje español en 1532 (Corominas, 1990).

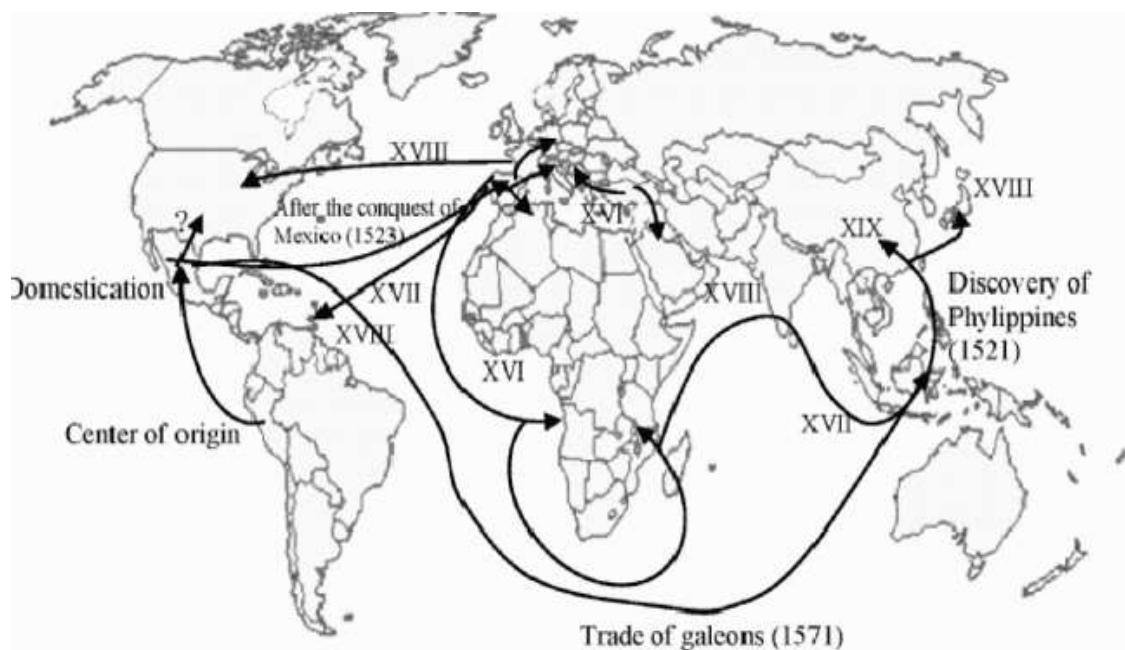


Figura 1. Posibles rutas de origen y domesticación del tomate en el siglo XVI. Tomado de Díez y Nuez, 2008.

5.2. Cultivo de tomate

El tomate es una de las hortalizas más consumidas en el mundo debido a su calidad nutricional y organoléptica y su excelente sabor (Erdem et al., 2015).

Esta hortaliza es una de las más importantes para el consumo humano, y genera cuantiosos ingresos, empleos y un alto valor nutritivo para la dieta. El tomate es la hortaliza que ocupa la mayor superficie sembrada en todo el mundo (SADER, 2016).

5.2.1. Clasificación taxonómica

El tomate es una hortaliza que comparte ancestros comunes con otros cultivos, entre ellos la papa. Su origen taxonómico es muy amplio, pero se resume en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del tomate *Solanum lycopersicum*

Reino	<i>Plantae</i> - Plants
Subreino	<i>Tracheobionta</i> - Vascular plants
División	<i>Magnoliophyta</i> - Flowering plants
Clase	Dicotyledons
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solaneaceae- Potato family
Subfamilia	Solanoideae
Genero	<i>Solanum L.</i> - Nightshade
Especie	<i>Solanum lycopersicum L.</i> - Garden tomato

Tomado de Singh et al., 2008.

5.2.2. Descripción botánica

El tomate *Lycopersicon esculentum Mill. (syn. Solanum lycopersicum)*., es una planta dicotiledónea, herbácea, arbustiva y perenne anual, que pertenece a la familia botánica Solanaceae.

Díez y Nuez (2008), realizan una descripción general botánica de la planta de tomate, en la que clasifican en cuanto a la morfología de la planta, que puede ser de tipo rastrero, semierecta o erecta, existiendo dos tipos de

plantas: determinadas, cuyo crecimiento es limitado, e indeterminadas con crecimiento ilimitado.

El sistema radicular presenta una raíz principal pivotante, la cual alcanza aproximadamente a 60 cm de profundidad, produce raíces adventicias y ramificaciones que pueden formar una masa densa con bastante volumen.

En la estructura de la planta de tomate se compone principalmente de un tallo erguido durante los primeros estados de desarrollo, pero retorcido debido al peso en el caso de plantas de crecimiento determinado; modificándose en el sistema indeterminado debido a la poda y sistemas de conducción.

Sus hojas son compuestas y cuentan de siete a once foliolos y poseen glándulas secretoras aromáticas.

La flor es perfecta, regular e hipógina, los sépalos, pétalos y estambres están insertos en el receptáculo por debajo del gineceo (ovario supero), tiene 5 o más sépalos e igual número de pétalos de color amarillo y dispuestos helicoidalmente a intervalos de 135°.

La semilla es de forma oval aplastada de color grisáceo, cubierta de vellosidades, de unos 3 a 5 mm de tamaño.

Dependiendo del tipo de tomate, existirán variaciones en cuanto a la estructura y tamaño de la planta.

5.2.3. Descripción genética

El tomate es un diploide típico de la sub-familia Solanaceae que tienen un número idéntico de cromosomas ($2n=2x=24$), flores regulares, semillas comprimidas y embrión curvado (Taylor, 1986). El genoma está compuesto de aproximadamente 950 Mb de ADN, del cual más del 75% es heterocromatina, en gran parte desprovisto de genes (Diez y Nuez, 2008).

5.2.4. Principales usos

El cultivo de tomate está orientado a la alimentación. Se puede consumir como producto fresco o procesado. Se utilizan en la producción de sopa, jugo, salsa, "ketchup", puré, pasta y polvo de tomate. De las semillas del tomate, recuperadas en las plantas de elaboración, se puede extraer un aceite comestible no saturado (Fornais, G., 2007).

Se considera que también tiene propiedades medicinales, ya que ayuda en casos de enfermedades hepáticas, quemaduras, obesidad, raquitismo, ayuda a combatir cáncer de mama, de esófago, de matriz, de colon, de estómago, de páncreas y próstata. También se utiliza para prevenir la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cataratas y asma (Procuraduría Federal del Consumidor [Profeco], 2020).

5.2.5. Principales tipos de tomate





Con la agricultura y la domesticación, el hombre ha desarrollado a lo largo de los años nuevas variedades de tomate para consumo.

El tomate es uno de los principales objetivos en los últimos años dentro del campo de la Biotecnología. La implementación de la tecnología del ADN recombinante, trajo consigo el primer alimento desarrollado a partir de la Ingeniería Genética; el tomate *flavr savr*, que atendía las necesidades de alargar la vida de anaquel de este producto. Sin embargo, fue retirado del mercado unos años después de su surgimiento debido a que no satisfacía las características organolépticas esperadas en este alimento.

En la actualidad, dentro de los principales tipos de tomate comercializados se encuentran: Beefsteak, saladette, americano, marmande, vemone, francés, pera, moneymaker, cocktail, cereza (cherry), muchamiel, pometa tardío, San Marzano, cocktail, ramillete, liso y de larga vida comercial (Díez & Nuez, 2008).

De las variedades anteriores, según la PROFECO, las principales variedades más consumidas en México se resumen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Principales tomates comercializadas en México.

Cherry (Cereza). Es pequeño y de piel delgada. Se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos. Tiene sabor dulce. Existen de color rojo y amarillo	
Saladette (Roma). Variedad italiana para conserva de tomate pelado, fruto pequeño bi o trilobular, forma de pera, tamaño homogéneo.	
Pera. Utilizado cada vez menos en la industria conservera para tomate pelado.	
Bola o Beef. Fruto de gran tamaño y baja consistencia.	

Tomado de PROFECO, 2020.

5.2.6. Residuos generados por tomate

Los residuos agroindustriales son un tipo de biomasa generada principalmente por el procesamiento de materiales orgánicos, que provienen del manejo de animales, cultivo de plantas y procesamiento de frutas y verduras (González et al., 2019).

En el mundo, según la FAO, se desperdicia la tercera parte de los alimentos que se producen. Las principales causas de las mermas alimenticias son a causa de la calidad del producto final.

Dichos residuos podrían tener aplicaciones, dentro de las cuales se encuentran: (I) pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos bioactivos e ingredientes alimenticios (fibras dietéticas, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas); (II) producción de enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos y biocombustibles; (III) producción de alimento para animales y (IV) producción de composta (Ayala-Zavala et al., 2011; Chandrasekaran et al., 2013; Federici et al., 2009; Galanakis, 2012), algunos ejemplos se ilustran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales ingredientes extraídos de residuos agroindustriales.

Origen del residuo	Ingrediente de interés	Origen del residuo	Ingrediente de interés
Cereales	Albúmina, globulina, hemicelulosa, fibras, insolubles, arabinoxilanos, beta-glucanos, glucosa, arabinosa, galactosa	Frutas y verduras	Hesperidina, limonero, pectina, fenoles, fibra, dietética, tartrato de calcio, beta-caroteno, licopeno, carotenoides, pectina
Raíces y tubérculos	Arabinoxilanos, fenoles	Productos cárnicos	Proteínas, hidrolizados de proteínas
Plantas oleaginosas	Fitoesteroles, albúmina, fenoles, pectina	Productos lácteos	Lactosa, beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina
Pescados y mariscos	Proteínas, lípidos, quitina, quitosano		

Tomado de Galanakis, 2012.

En el caso del tomate, una característica desfavorable que ha sido estudiada a lo largo de los años es que tiene una cáscara muy delgada, aunado a que es un alimento rico en agua y carbohidratos lo hace susceptible al ataque de microorganismos patógenos, principalmente hongos, deteriorando el producto final haciendo que su vida de anaquel sea más corta y no sea apto para su consumo.

En América Latina, apuntó la FAO, se desperdicia la mitad de frutas y hortalizas que se producen. Por ejemplo, señaló, en México se pierde entre 25 y 30 por ciento de jitomate y cuando cae el precio se desperdicia 50 por ciento de la producción, ya que 60 por ciento de la producción se exporta (Becerril & Ballinas, 2017).

En el proceso de producción del tomate se desperdicia una gran parte de la planta, según Díez y Nuez (2008) aseveran que teniendo en cuenta el destino de la producción las mermas y pérdidas de mercado que, dadas las características del producto, se situaría entre el 5 y 10% de la producción. Finalmente, las constantes de temperatura y manejo del producto son factores relevantes con la calidad del producto final. Los daños mecánicos que sufre el tomate en su transporte generan pequeñas fisuras en el fruto, haciéndolo no solo un producto no apetecible además favorece el ataque de organismos patógenos.

5.3. Economía circular

La revalorización de residuos agroindustriales forma parte de este término que ha surgido en los últimos años en pro del medio ambiente. La Economía Circular (EC) es un sistema de aprovechamiento de recursos donde se considera la reducción de los elementos: disminuir la producción al mínimo indispensable y cuando sea necesario hacer uso del producto, por lo que se deben reutilizar los elementos que, por sus propiedades, no pueden volver al medio ambiente (Procuraduría Federal del Consumidor [Profeco], 2021).

Es una alternativa que busca redefinir qué es el crecimiento, enfatizando los beneficios para toda la sociedad, genera oportunidades económicas y de negocios, además, proporciona beneficios ambientales y sociales.

5.4. Producción a nivel mundial y nacional

Su cultivo a nivel mundial se determina en un área de aproximadamente 3.9 millones de hectáreas, lo que da un rendimiento final de aproximadamente 141 millones de toneladas (Bravo-Zamora et al., 2020).

México es el principal proveedor a nivel mundial de tomate, con una participación en el mercado internacional del 25.11% de las exportaciones mundiales, cubriendo el 3.46% del PIB agrícola nacional y el 22.55% en la producción de hortalizas (SAGARPA, 2017).

En 2019, el estado de Sinaloa fue el principal productor de jitomate con 22.2% de la producción nacional total, seguido por San Luis Potosí, Michoacán, Zacatecas y Jalisco y en el contexto internacional, el jitomate mexicano se posicionó como el cuarto producto agroalimentario más exportado (Fig. 2) (Procuraduría Federal del Consumidor [Profeco], 2020).

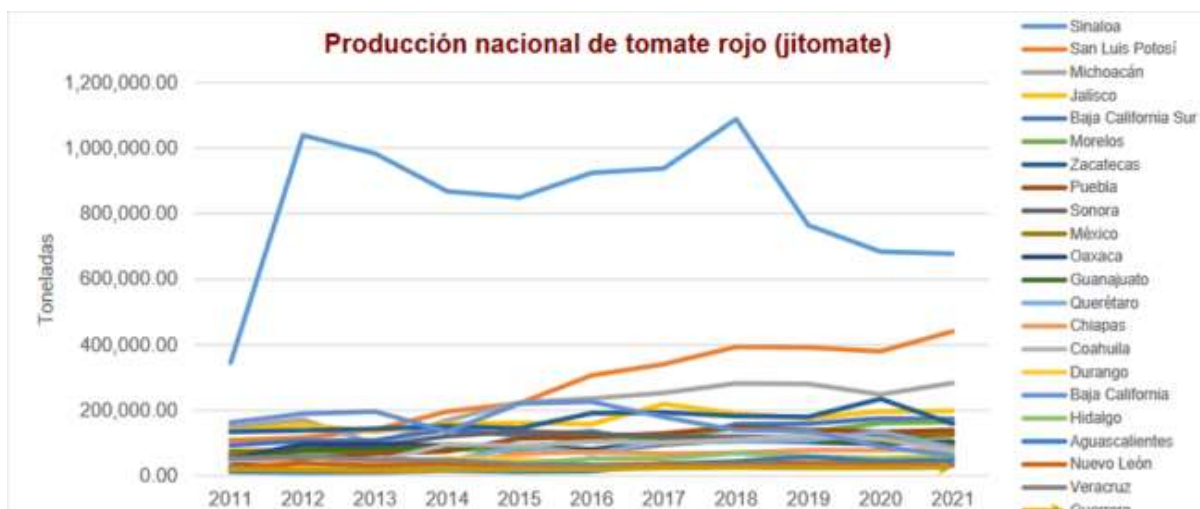


Figura 2. Producción (ton/año) a nivel nacional de tomate rojo (jitomate). Tomado de SADER, 2022.

5.5. Composición química

Según Espinosa (2018) el jitomate es un alimento poco energético. Aproximadamente 95% de su peso es agua, cerca de un 4% son hidratos de carbono, por ello se le considera una fruta-hortaliza ya que contiene mayor cantidad de azúcares simples que otras verduras, lo que le brinda un ligero sabor dulce. Y es fuente importante de ciertas sales minerales como potasio y magnesio, principalmente.

Las vitaminas que destacan son la B1, B2, B5, vitamina C y carotenoides como el licopeno; que tiene propiedades antioxidantes (cuadro 4).

Cuadro 4. Composición nutricional del tomate.

Content	/100 g of Red Tomato	Content	/100g of Red Tomato
Energy	18 K cal	Vit K	7.9 µg
Carbohydrate	3.9g	Mg	11 mg
Sugar	2.6 g	Mn	0.114 mg
Dietary Fiber	1.2 g	Fe	0.3 mg
Fat	0.2 g	Cu	0.19 mg
Protein	0.9 g	S	24 mg
Water	94.5 g	Cl	38 mg
Vit A	833 IU	Na	5 mg
Vit B1 (Thiamine)	0.037 mg	Ca	20 mg
Vit B3 (Niacin)	0.594 mg	P	24 mg
Vit B6	0.08 mg	K	237 mg
Vit C	14 mg	Lycopene	2537 mg
Vit E	0.54 mg	Oxalic acid	2 mg

Tomado de Singh et al., 2008, según Nutrient Data Laboratory, ARS, USDA.

5.6. Antioxidantes

En la actualidad, los productos nutracéuticos o funcionales han tenido un auge muy relevante a nivel mundial. Se busca que los alimentos tengan un beneficio a la salud, más allá de los que tienen a la dieta. Los antioxidantes son un grupo beneficioso en este tipo de alimentos ya que permiten frenar la oxidación de las células, eliminando los radicales libres causantes de muchas enfermedades. Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano. Impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas, ocasionadas en las reacciones metabólicas o producidas por los factores exógenos como las radiaciones ionizantes (Zamora & Diego, 2007).

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas de oxígeno sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Patthamakanokporn et al., 2008).

5.6.1. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por las plantas, algas y bacterias fotosintéticas, las principales fuentes de carotenoides se resumen en el cuadro 5. Estos son producto de la fotosíntesis y su actividad principal es la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS) cuyo papel es determinante en el desarrollo y mantenimiento del estrés oxidativo celular (Gámiz, 2018).

Químicamente, los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos (Carranco et al., 2011).

Los carotenoides, al ser antioxidantes, se ven afectados con la exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes y antioxidantes, presencia de sulfitos, etc. (Meléndez-Martínez et al., 2004).

Cuadro 5. Principales fuentes de carotenoides en diferentes alimentos.

Carotenoides mayoritarios	Fuente
α - y β - caroteno	Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)
Licopeno	Tomates (<i>Lycopersicum spp</i>)
Luteína/Zeaxantina	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), maíz (<i>Zea mays</i>), cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>), huevo de gallina
Violaxantina, β - criptoxantina, Luteína/zeaxantina	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)
Astraxantina	Salmón (<i>Salmo spp</i>), crustáceos, microalgas y levaduras
Cantaxantina	Crustáceos
Crocentina	Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)

Tomado de Carranco et al. 2011.

5.6.1.1. Licopeno

Dentro de las generalidades del tomate es que contiene una fuente importante de carotenoides con capacidad antioxidante, dentro de los cuales se encuentra el licopeno que se utiliza en la industria de los alimentos, como colorante, así como en la industria farmacéutica para prevención del cáncer y en la elaboración de cosméticos (Inserra, 2008).

El licopeno es un pigmento orgánico liposoluble, es el principal pigmento responsable de la característica coloración roja del tomate pues comprende aproximadamente del 80 al 90% de los pigmentos presentes (Waliszewski & Blasco, 2010). El licopeno, además de conferir el color rojo al tomate, también es responsable de la tonalidad rojiza de otras frutas y verduras, tales como la sandía, zanahoria, guayaba rosa, papaya y la toronja (Vitale et al., 2010).

Este carotenoide está compuesto químicamente por 40 átomos de carbono con 13 dobles enlaces; 11 conjugados (reactivos al oxígeno y radicales libres). (Ruelas, 2022).

El licopeno es rico en compuestos bioactivos; colorantes, suplementos, pigmentos y alimentos funcionales, estos últimos han tenido un auge muy grande en la industria de los alimentos en los últimos años debido a que tienen grupos de compuestos químicos que ejercen un efecto directo en la salud debido a que actúan directamente en la prevención o reducción de alguna enfermedad (Carranco et al., 2011).

Se tiene demostrado que el licopeno posee actividad antioxidante, debido a que bloquea la acción destructiva de moléculas que dañan las células, conocidas como radicales libres, de esta manera protege contra enfermedades

degenerativas, cáncer, problemas de infertilidad, diabetes, problemas cardiovasculares (Bailey, 2015).

5.7. Extracción de licopeno mediante solventes orgánicos

Desde el año de 1940 se han registrado en la literatura diversos métodos de extracción y cuantificación de licopeno (Bailey, 2015).

Dentro de los métodos de extracción tradicionales, no enzimáticos, se encuentran la microemulsión; utilizando saponinas y tensioactivos. Con fluidos supercríticos; con dióxido de carbono. Por solventes orgánicos, como lactato de etilo, hexano, acetato de etilo y etanol. Asistida por microondas, con acetato de etilo y asistida por ultrasonido, utilizando hexano, acetona o etanol (Tigcilema, 2020).

Sin embargo, la extracción de licopeno por medio de la utilización de solventes orgánicos es baja debido a la actividad del carotenoide; la compacidad del tejido, inhibe la penetración al cromoplasto, lugar donde se encuentra el licopeno, dando lugar a su degradación durante el proceso de extracción (Ruelas, 2022). En las últimas décadas, junto con la valorización de los residuos agroindustriales se ha aprovechado la utilización de técnicas biotecnológicas para la extracción de productos de alto valor agregado, mediante el uso de enzimas (Casas & Coral, 2014).

5.8. Extracción de licopeno vía enzimática

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos unidos covalentemente entre sí con función catalítica. Las enzimas tienen ventajas sobre los tratamientos químicos, ya que son catalizadores altamente específicos y trabajan en condiciones de reacción moderadas, lo cual se traduce en una menor generación de residuos y subproductos, así como en un menor consumo de energía. Por lo tanto, las enzimas pueden utilizarse en el pretratamiento de los residuos, la extracción de compuestos e incluso en la modificación y síntesis de nuevas moléculas a partir de los compuestos bioactivos (Casas & Coral, 2014).

El licopeno presente en el tomate se encuentra en un 72 a 79% en una fracción insoluble en agua y la cáscara (Sharma et al., 1996), por lo que asegura que la obtención a partir de desechos agroindustriales de tomate, sea una alternativa viable.

A diferencia de los solventes químicos, las enzimas penetran las células del material vegetal, lo que permiten la expulsión eficiente de carotenoides y sustancias fenólicas (Ruelas, 2022).

5.8.1. Enzimas utilizadas en la extracción de licopeno

Se han utilizado enzimas hidrolíticas, tales como las pectinasas e hidrolasas para la extracción del licopeno. Las celulasas se encargan de hidrolizar las fibras de celulosa, mientras que las pectinasas hidrolizan las cadenas del ácido galacturónico (Casas & Coral, 2014).

En el cuadro 6 se resumen las dos principales enzimas para la extracción de licopeno y la cantidad media de extracción por parte de tomate.

Cuadro 6. Principales enzimas utilizadas en la extracción de licopeno.

Enzima	Tomates enteros	Cáscaras de tomate	Desecho de pulpa	Residuos agroindustriales
Celulasas	132 ug/g	429 ug/g	119 ug/g	202 ug/g
Pectinasas	108 ug/g	1104 ug/g	190 ug/g	156 ug/g

Tomado de Choudhari, 2007.

5.8.1.1. Celulasas

Este tipo de enzimas pertenecen a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono o entre estos y una fracción que no sea un hidrato de carbono. Las glicosil hidrolasas han sido clasificadas en más de 100 familias, y cada una de estas (familia GH) contiene proteínas que están relacionadas por su secuencia, su estructura y, en consecuencia, por su mecanismo catalítico (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

5.8.1.2. Pectinasas

Entre los principales constituyentes de la pared celular de los vegetales se encuentran las sustancias pécticas, una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados, denominadas genéricamente pectinas.

Dichos polímeros se caracterizan por contener una alta proporción de residuos de ácido galacturónico y son, probablemente, los polisacáridos de pared de mayor complejidad estructural (Franchi et al., 2014).

Las pectinas son degradadas por enzimas pectinolíticas, pectinasas, que presentan gran diversidad, debida en parte a la compleja naturaleza del sustrato degradado. Estas enzimas rompen los polisacáridos complejos de tejidos de la planta en moléculas más simples como son los ácidos galacturónicos (Kashyap et al., 2001).

5.8.1.2.1. Tipos de pectinasas

Las pectinasas se clasifican en tres tipos principales: enzimas desesterificantes (pectinesterasas), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinasas (Chandomi, B., 2014).

5.8.1.2.2. Principales organismos productores de pectinasas

Son producidas por plantas y microorganismos entre los cuales se encuentran bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*, las levaduras *Saccharomyces* y *Rhodoturulla* y hongos del género *Aspergillus*, *Penicillum*, *Fusarium* y *Verticilium* (Núñez, A., 2021).

5.9. Limitaciones del uso de enzimas para procesos catalíticos industriales

Cuando las enzimas se aíslan de las células, se convierten en catalizadores solubles que suelen ser muy inestables. Por esta razón, la conversión de biocatalizadores solubles e inestables en heterogéneos y derivados enzimáticos estables son un punto clave en la ingeniería enzimática.

Desde un punto de vista práctico, la falta de estabilidad de la mayoría de las enzimas constituye una limitación crítica. Los biocatalizadores y reactores inmovilizados no pueden utilizarse durante largos períodos de tiempo, debido a que la condición experimental no puede ser forzada para solubilizar altas concentraciones de sustrato y productos debido a que los diseños de los sistemas de reacción sin disolventes son muy complejos, etc. (Guisán et al., 2020).

5.10. Inmovilización enzimática

Las enzimas son proteínas que se han utilizado desde la antigüedad para la elaboración de productos, principalmente, en la industria alimentaria; en la obtención de quesos, cerveza y vino. En la actualidad, dado a la ingeniería de proteínas, se han aplicado en la industria textil, biosensores, productos farmacéuticos, obtención de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales, entre otras (Homaei et al., 2013).

El primer problema de las enzimas es a nivel industrial está orientado a su estabilidad operativa a largo plazo, su vida útil y difícil recuperación, para ello,

una de las tecnologías que se ha propuesto en los últimos años ha sido la inmovilización de enzimas.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998).

La primera enzima inmovilizada fue la invertasa, en el año de 1916 la cual se sometió a absorción en un medio sólido. Posteriormente, fueron desarrollados otros métodos de absorción covalente para la Penicilina G acilasa, invertasa, lipasas, proteasas, entre otras. (Homaei et al., 2013).

Uno de los requisitos que deben cumplir las enzimas inmovilizadas es que sean biocatalizadores heterogéneos, que se separen fácilmente de los productos y reactivos una vez completada la reacción (Nguyen & Kim, 2017).

El material de soporte juega un papel crucial en el proceso de inmovilización, debido al efecto producido sobre las propiedades catalíticas de la enzima, estos pueden ser orgánicos, inorgánicos o híbridos (Zdarta et al., 2018).

5.11. Efectos en la inmovilización enzimática

Tras la inmovilización, la enzima sufre un cambio físico y químico, que dependerá del método de inmovilización utilizado. Los efectos que sufren mayores cambios son su estabilidad y a la actividad enzimática, debido a que se modifican sus condiciones habituales de trabajo. El objetivo de la inmovilización es mejorar dichas características.

5.11.1. Estabilidad enzimática

Una de las características biotecnológicas más importantes de una enzima es su estabilidad. Dado que el ambiente en los reactores químicos suele ser mucho más crítico que el *in vivo* (más alta temperatura, la ausencia de una protección medio ambiente, impurezas inactivadoras, superficies agresivas, etc.).

Las enzimas, al ser en su mayoría proteínas, poseen una estabilidad limitada, por lo que experimentan reacciones de desnaturalización durante su extracción, almacenamiento y aplicación en la industria (Iyer & Ananthanarayan, 2008, citado en Lizardi-Mendoza, 2014), por lo que la mayoría de las enzimas no son suficientemente estables en condiciones operativas (Klibanov, A. 1983).

El objetivo de inmovilizar una enzima es mejorar su comportamiento y con ello su estabilidad para con ello alargar su vida útil. Las enzimas inmovilizadas son un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el

proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) (Arroyo, 1998).

Singh et al., (2013) explican que la estabilidad de las enzimas inmovilizadas depende directamente de efectos relacionados con cambios conformacionales de la estructura proteica, sobre todo a nivel de estructura terciaria. Además, el hecho de que la interacción entre el sustrato y la enzima inmovilizada se lleve a cabo en un microambiente muy diferente al de la enzima libre, puede provocar efectos estabilizantes en los sistemas catalíticos (Brena y Batista-Viera, 2006).

5.11.2. Actividad enzimática

Debido a la inmovilización, pueden cambiar las condiciones de la enzima, lo que genera que se modifiquen sus propiedades, y esto puede afectar en la actividad enzimática. La enzima puede perder completamente su funcionalidad y esto puede ser debido a diversos factores, tales como: la unión impide el paso del sustrato al centro activo, el centro activo del soporte reaccione con la parte activa de la enzima, la inmovilización haga un cambio en el centro activo de la enzima y la inactive o que las condiciones de inmovilización desnaturalizan la propia enzima (Arroyo, 1998).

Sin embargo, también puede ocurrir que la pérdida no sea total, sino que haya una disminución o aumento de la actividad enzimática tras la inmovilización y pueden deberse a:

- Efectos disfuncionales/incrementales debido a la difusión de los sustratos hacia el centro activo. Son externos e internos, como el lugar de inmovilización de la enzima y como la geometría del material inmovilizante (Goldstein, L., 1976).
- Efecto electrostático entre el sustrato y el soporte. Pueden ser de atracción y de repulsión lo que facilita la unión y el acercamiento de las partículas, impedimentos estéricos o de tamaño de saturación (Homy & Crook, 1968).
- Efectos en el microentorno debido a que la enzima se encuentra en uno que no es el habitual para su funcionamiento. Sin embargo, ese es el objetivo de la inmovilización, adaptar la enzima a ese entorno y facilitar su correcta actividad enzimática. Las principales modificaciones suelen ser frente al pH y temperatura (Berezin, 1975).

5.12. Métodos de inmovilización

La inmovilización de enzimas se puede definir como el confinamiento de la enzima en un soporte, lo cual limita su movimiento, pero conserva su poder catalítico (Cabrial et al., 2018).

De acuerdo con Hartmeir, las principales clases de inmovilización de enzimas se resumen esquemáticamente en la figura 3, donde C=carrier o soporte, B=biocatalizador o enzima (Hartmeier, 1985).



Figura 3. Métodos de inmovilización. Tomado de Arroyo, 1998.

El uso de la inmovilización de enzimas es una alternativa que posee varias ventajas, dentro de las cuales se encuentran: permite aumentar la estabilidad enzimática, reutilización de la enzima para procesos catalíticos sucesivos; lo que reduce costos de producción y la facilidad de separación de la reacción sin necesidad de purificarla.

5.12.1. Inmovilización por retención o unión física

La inmovilización de enzimas por retención física (o también llamado atrapamiento físico) por el método de microencapsulación en un soporte sólido, es de las más utilizadas debido a que requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos (Arroyo, 1998), además que mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos (Klei & Shim, 2005).

La inmovilización por atrapamiento difiere de los otros tipos de inmovilización, como la adsorción, en que las moléculas de enzima están libres en solución, pero restringidas en movimiento por el “enrejado” formado por un gel.

Generalmente se utilizan polímeros orgánicos para formar dichos enrejados (Bickerstaff, 1997.)

Este método de inmovilización, al tener membranas semipermeables, permite el paso de sustrato y productos, pero no de enzima, ya que esta no se une al soporte, se queda atrapada en la red polimérica y por difusión se restringe el paso de enzima, reteniéndola dentro del soporte (Nguyen & Kim, 2017).

En este método, las enzimas se encuentran rodeadas por una membrana semipermeable, una ventaja adicional que señala Homaei, es que mediante la encapsulación se evita cualquier influencia negativa sobre la estructura de la enzima, ya que de esta manera se previene la desnaturalización (Homaei et al., 2013).

En este método, la enzima no tiene ningún tipo de interacción con el polímero, lo que la hace más estable, minimiza la lixiviación de la enzima y su desnaturalización (Nguyen & Kim, 2017).

5.12.1.1. Inmovilización mediante microencapsulación

Uno de los métodos de inmovilización por atrapamiento más utilizados es la microencapsulación, esta técnica consiste en rodear enzimas con membranas esféricas semipermeables, que den acceso del producto hacia el interior, pero no el de las enzimas al exterior (Castromonte et al., 2020, citado en Arroyo, 1998).

La microencapsulación se define como un proceso en el que pequeñas partículas o gotitas se rodean por un recubrimiento, o se incrustan en una matriz homogénea o heterogénea, para dar pequeñas cápsulas con muchas propiedades útiles. La microencapsulación puede proporcionar una barrera física entre el compuesto central y los demás componentes del producto (Gharsallaoui et al., 2007).

Un aspecto determinante para aplicar de manera exitosa la microencapsulación de enzimas es la elección adecuada del tamaño de poro del soporte. Si el tamaño de poro es el adecuado, tanto el sustrato como el producto podrán entrar y salir, respectivamente, a través de la cápsula semipermeable la cual seguirá reteniendo a la enzima por tener un mayor tamaño que los poros de la cápsula (Novick & Rozzell 2005).

5.12.1.2. Métodos de microencapsulación

La microencapsulación se puede conseguir mediante diversos métodos, entre los principales métodos de microencapsulación se encuentran: secado por aspersión, aspersión a bajas temperaturas, deshidratación por congelación,

atrapamiento en liposomas, extrusión, coacervación, co-cristalización, revestimiento en suspensión aérea, separación por suspensión rotativa, polimerización interfacial, gelificación iónica etc. (Gharsallaoui et al., 2007).

La selección de la técnica de encapsulación adecuada se ve determinada por las propiedades fisicoquímicas del material soporte y la aplicación final deseada con el objeto de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (Pal et al., 2009).

Cualquier método utilizado para la microencapsulación de enzimas da como resultado el atrapamiento de la enzima en la membrana polimérica. Esto está basado en la diferencia de tamaño de la enzima y sustrato o moléculas del producto. Sin embargo, es importante mencionar que la técnica de microencapsulación no es aplicada cuando las moléculas de sustrato y enzima tienen diámetros similares o bien, si el sustrato es demasiado grande.

El tamaño de la partícula que se obtenga como resultado final, dependerá de la técnica utilizada para su encapsulación; de ahí que se haga una separación con base en el tamaño de partícula.

Thies (2003) menciona que se puede considerar como microcápsula a aquellas partículas que tengan un diámetro entre 1-1000 μm , partículas menores a 1 μm se consideran como nanopartículas y aquellas que son mayores a 1000 μm se pueden definir como microgránulos o macrocápsulas (Thies, 2003).

5.12.1.2.1. Extrusión

La extrusión es una de las técnicas más utilizadas para producir cápsulas con polisacáridos como el alginato debido a su bajo costo y simplicidad (Zhang, Lin, Zhong, 2015). La extrusión consiste en producir pequeñas gotas del material encapsulante al forzar una solución a través de boquillas o pequeñas aberturas en dispositivos generadores de gotas. Cuanto menor es el diámetro interior de la boquilla o aberturas, más pequeñas son las cápsulas (De Vos et al., 2010).

A escala laboratorio la herramienta de goteo puede ser una pipeta, una jeringa, una boquilla de un atomizador, un cortador de chorro o disco de atomización (Nedovic et al., 2011).

5.12.1.2.1.1. Extrusión mecánica

La producción de gotas a gran escala puede lograrse con sistemas de boquillas múltiples, atomizador de disco giratorio o por técnicas de corte y propulsión a chorro. Una ventaja de la tecnología de extrusión es que, en la mayoría de los

casos, se logra un verdadero procedimiento de encapsulación en lugar de una simple inmovilización (De Vos et al., 2010).

Existen algunos equipos que tienen como objetivo encapsular poliméricamente sustancias químicas, biomoléculas, fármacos, fragancias, sabores, pigmentos, extractos, células y más al medio ambiente, en donde las perlas son producidas a través de un flujo de líquido laminar segmentado, que forma esferas de igual tamaño, por medio de una boquilla de dos flujos, donde forma partículas concéntricas con doble núcleo y cubiertas separadas, como es el caso del encapsulador B390 (Fig. 4) (BÜCHI Labortechnik AG, 2016).

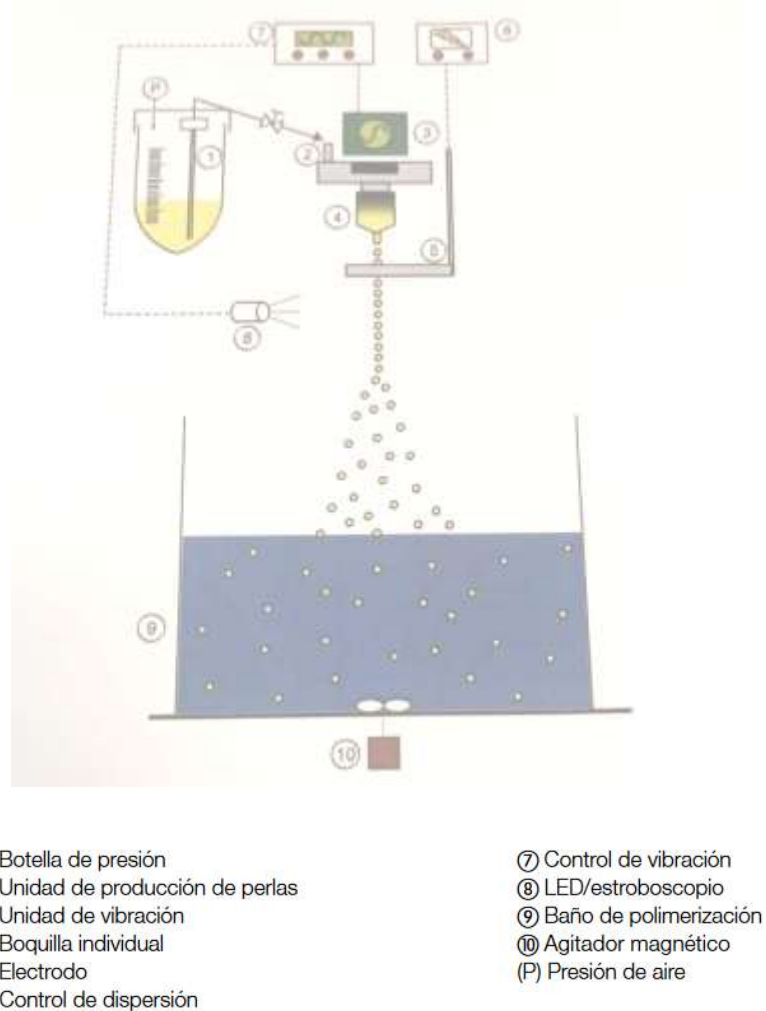


Figura 4. Representación esquemática del encapsulador B-390. Tomado de BÜCHI Labortechnik AG, 2016.

5.13. Materiales de inmovilización

Así como la microencapsulación puede llevarse a cabo por diversos métodos, también se encuentran diversos tipos de soportes para la llevar a cabo la inmovilización enzimática, el objetivo es que mediante soportes porosos que permitan el mayor paso de sustrato, pero con mayor pérdida de la enzima y el otro es con una microemulsión, que no dejan tanto el paso del sustrato, pero retienen más la enzima (Kuiper et al., 2008).

Una de las limitaciones más grandes de la inmovilización enzimática se encuentra el uso de un soporte correcto para el tipo de enzima, ya que puede aumentar la actividad del biocatalizador, siendo eficaz la unión de enzima con el soporte (Zdarta et al., 2018).

Las características de las matrices o soportes son de gran importancia en la determinación de la eficiencia del sistema de inmovilización de enzimas. Los soportes pueden clasificarse en base a su forma, tamaños, propiedades físicas y químicas, además de que pueden ser inorgánicos, orgánicos y polímeros sintéticos (Ariza León et al., 2013).

En el caso de soportes clásicos para inmovilización estos pueden ser de dos tipos; orgánicos e inorgánicos. De manera general, los inorgánicos poseen varias ventajas, dentro de las cuales se encuentra que tienen alta resistencia térmica y química, buenas propiedades mecánicas, buena absorción, debida a la gran área superficial y estructura porosa que permiten la unión enzima porque reduce la difusión (Zdarta et al., 2018). Dentro de los materiales orgánicos clásicos se encuentran de dos tipos; sintéticos o polímeros y renovables o también llamados biopolímeros.

En los últimos años se ha trabajado con nanopartículas magnéticas, como soportes nuevos de inmovilización. Este tipo nanopartículas inorgánicas han sido estudiadas, con el objeto de ser utilizadas en tratamientos terapéuticos en los campos biomédicos, debido principalmente propiedades físicas, químicas y biológicas, así como su fácil funcionalización superficial y su excelente biocompatibilidad (Vergara-Duque et al., 2020).

5.13.1. Biopolímeros como soporte de inmovilización enzimática

El uso de biopolímeros como lo son el colágeno, celulosa, queratina, carragenina, quitosano, quitina y alginato, para la inmovilización confiere algunas ventajas, como que son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos, relativamente baratos, permite la reutilización, entre otras (Zdarta et al., 2018).

Los biopolímeros poseen un conjunto único de propiedades, lo que va desde la biodegradabilidad del producto, biocompatibilidad y no toxicidad, hasta una

destacada afinidad por las proteínas, que las hacen adecuados soportes para la inmovilización enzimática (Krajewska, B. 2004).

La propiedad de biocompatibilidad es importante ya que minimiza su impacto negativo sobre la estructura y propiedades de las enzimas y, por tanto, las proteínas inmovilizadas conservan un alto nivel catalítico. Otra característica importante es la disponibilidad de grupos funcionales reactivos en su estructura, principalmente hidroxilo, restos de amina y carbonilo que permite la reacción directa entre la enzima y la matriz, facilitando la modificación de su superficie (Kurita, K., 2001).

Sin embargo, una de las principales características por la que estos soportes han tenido un gran auge en la inmovilización enzimática es que son materiales renovables y fáciles de obtener; en muchos casos son subproductos de diversas industrias, lo que los hace económicos y reducen los costes asociados al proceso de inmovilización (Peter, M., 1995).

5.13.1.1. Uso del alginato en la inmovilización

El alginato es un polisacárido aniónico derivado de la pared celular de las algas pardas o producido mediante cultivo microbiano. Está constituido, además, de sales de calcio, magnesio y sodio proveniente del ácido algínico y se ha utilizado ampliamente para la inmovilización en forma de perlas de alginato, geles de alginato-poliacrilamida y perlas de calcio-alginato. El enrejado de alginato con iones divalentes de Ca^{+2} y glutaraldehído han mostrado una gran estabilidad en la inmovilización de enzimas. (Flores-Maltos et al., 2011).

La inmovilización mediada por el polisacárido alginato proporciona un mayor nivel de actividad de enzimas como la quitinasa, una enzima que tiene grandes aplicaciones en biotecnología, principalmente para la producción de vacunas (Cheba et al., 2011). La matriz formada por la adición de alginato permite aumentar el grado de cooperación enzima-sustrato (Xu et al., 2006).

El alginato es un polímero del ácido β -D-manurónico y el ácido α -L-gulurónico, unidos por enlaces glucosídicos (1-4), agrupados en tres tipos de segmentos: D-manurónico (M), L-gulurónico (G) y un tercer segmento de diadas con ambos ácidos alternados (MM, GG, MG,). (GGG, MGG, MGM) (Smidsrod y Draget, 1996; Murillo y Hernández, 2007; Yabur et al., 2007 citado en Hernández et al., 2007) (Fig. 5).

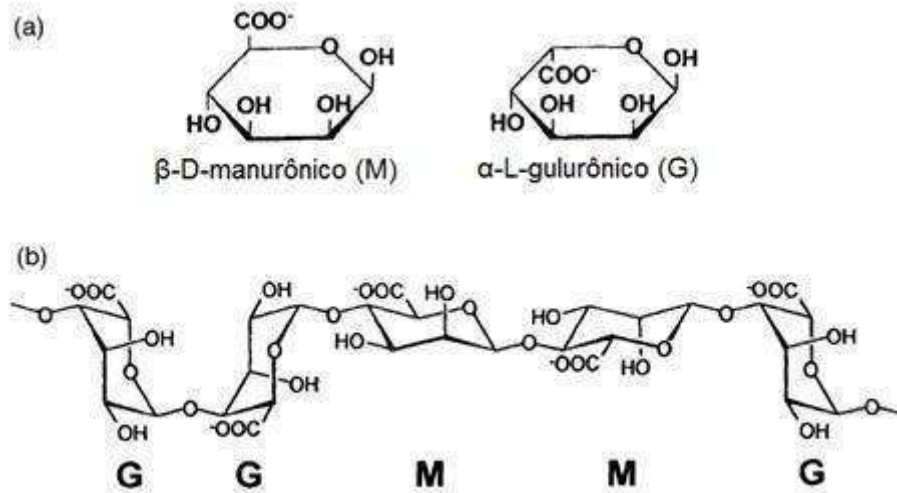


Figura 5. Estructura del alginato. Tomado De Almeida Lins et al., 2014.

5.13.2. Esferificación del alginato de sodio en presencia de calcio

La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre los grupos G de dos moléculas de alginato, formando una red tridimensional en cuyas cavidades se unen los iones calcio dando lugar al modelo de gelificación “caja de huevo”, además debe su carácter polianiónico, a los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena (Pasin et al., 2012) (Fig. 6).

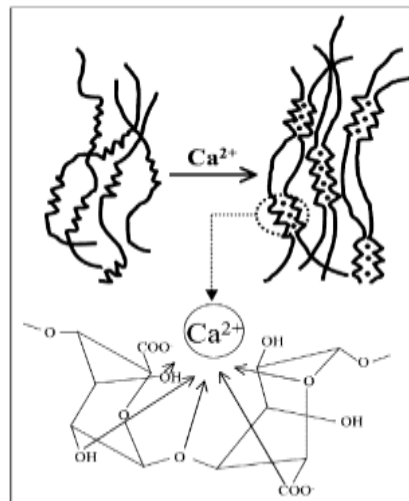


Figura 6. Zona de unión del alginato de sodio en presencia de iones de calcio. Tomado de Santacruz et al., 2005.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

Se adquirió tomate rojo de la variedad Saladette (*Solanum lycopersicum* 'Roma') de un supermercado de la ciudad de Saltillo Coahuila; las características del material vegetal fueron: homogeneidad en tamaño y forma, además un estado avanzado de maduración (Fig. 7).



Figura 7. Tomates utilizados para el experimento.

6.2. Enzima y reactivos

La enzima pectinasa (Fig. 8) se adquirió de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) como Pectinex Ultra SP-L, producida por la cepa *Aspergillus aculeatus* (3800 unidades/mL). La calidad analítica de acetona, hexano y acetato de sodio se adquirió de Jalmek Científica, S.A. de C.V., NL, México. El reactivo para licopeno de calidad analítica se adquirió de Roche Ltd., EE.UU.



Figura 8. Enzima pectinasa de *Aspergillus aculeatus*.

6.3. Procedimiento de preparación del alginato

El polímero de alginato de sodio 1.5 % se disolvió en 200 mL de agua destilada, y se mantuvo en agitación constante por 45 minutos, 65° C y a 3000 rpm en un agitador magnético (MS-H-S, DLAB, China) (Fig. 9).



Figura 9. Agitador magnético DLAB.

6.4. Procedimiento de inmovilización enzimática

Una vez que la temperatura de la solución descendió a 30° C se inmovilizaron 2.6 mL de enzima pectinasa proveniente de *Aspergillus aculeatus* en el alginato 1.5%. El polímero mezclado con la enzima se vertió sobre una botella de vidrio con tapón de rosca, resistente a la presión, con capacidad de 1000 mL (Fig. 10).



Figura 10. Botella de presión con la mezcla enzima-alginato.

Posteriormente, se conectó la botella de vidrio resistente a presión al encapsulador Büchi B-390 (BÜCHI, labortechnik AG 9230 Flawil, Switzerland) (Fig. 11), con las siguientes condiciones específicas: presión 1.4 bar, una frecuencia de 1000 Hz, y utilizando una boquilla de 0.3 mm.



Figura 11. Encapsulador BÜCHI B-390.

Una vez que la presión y frecuencia se encontraron dentro de las condiciones óptimas, se permitió el flujo de la mezcla polimérica dejando caer las partículas a la solución receptora; cloruro de calcio 2% (Fig. 12), las gotas pasan a través de un campo eléctrico entre la boquilla y el electrodo, produciendo una carga en la superficie, evitando que se adhieran unas con otras. Las perlas de alginato se dejaron reposar en la solución de cloruro de calcio por 40 minutos y posteriormente se almacenaron en buffer pH 5.0 en placas petri.



Figura 12. Procedimiento de encapsulación de la enzima.

6.5. Procedimiento de extracción de licopeno vía enzimática

Para la extracción y cuantificación de licopeno, se pesaron 40 g de tomate y se licuaron con 120 mL de buffer pH, 4.5, 5.0, y 5.5 (acetato de sodio) por 2 min en un procesador de alimentos (Nutribullet series 600watt NBR-084R, Nutribullet, LLC, Los Angeles, CA, USA) (Fig. 13).



Figura 13. Procedimiento de licuado de los tomates.

Para cada reactor de vidrio enchaquetado, las condiciones de reacción fueron; temperaturas a evaluar de 50° C y 55° C en tiempos de incubación de 0', 10', 20', 30', 40', 50', 60', 70' y 80' a 110 rpm en un agitador orbital (OS-20, Joan Lab, Zhejiang, China) (Fig. 14).



Figura 14. Montado de los reactores; tratamiento y control, sobre la placa de agitación.

A cada reactor se añadió 1g de pectinasa inmovilizada dentro de una bolsa de té; para facilitar su recuperación. Posteriormente se conectaron ambos reactores a una bomba de recirculación de agua a una temperatura constante de 50° y 55° C, bajo el baño María (BMF100925, ICB, China) (Fig. 15).



Figura 15. Baño María y bomba de recirculación

Iniciando en el tiempo cero (t_0) la cinética de reacción, cada 10 minutos se pipetearon alícuotas de 50 μ L durante un tiempo de reacción de 80 min. Cada alícuota de 50 μ L se agregó a tubos de ensayo (Fig. 16) que contenían 8 mL de hexano-acetona (2:3).



Figura 16. Acomodo de los tubos de ensaye.

Los tubos se agitaron a una velocidad de 600 rpm durante 5 min (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, USA) (Fig. 17).



Figura 16. Vórtex para la agitación de las alícuotas con la mezcla reaccionante.

Finalmente, cada muestra se vertió en tubos Nalgene para ser centrifugada a 4500 rpm por 5 min. (DIAB, DM0412S, China) (Fig. 18).



Figura 17. Centrífuga DIAB.

De la fase orgánica se tomó una alícuota de 1 mL y se agregó al espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation, WI, USA) (Fig. 19), cada celda contenía 1 mL de acetona (1:1) para realizar la cuantificación a una longitud de onda de 520 nm.



Figura 18. Espectrofotómetro Genesys 10 UV para lectura de muestras.

6.6. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3X3X2, y para las comparaciones de las medias se empleó el programa estadístico computacional Infostat versión 2018.

Se hizo la comparación utilizando la prueba de Fisher obteniéndose así la siguiente fórmula:

Fórmula: $pH \times T \times E$

Donde:

pH= pH mezcla reaccionante

T= temperatura

E= con enzima o sin enzima

En el proceso de análisis se compararon los datos de los cuales se obtuvieron los siguientes parámetros para analizar y se muestran a continuación:

Parámetro	Niveles	Valores
pH	3	4.5, 5.0, 5.5
T, °C	3	50, 55, 60
E	2	1 y 0

Siendo:

pH= pH de mezcla reaccionante, T=temperatura, E= con enzima o sin enzima

6.7. Parámetros de inmovilización

Una forma sencilla de encapsular líquidos y aceites hidrofóbicos es mediante la mezcla de estos con polímeros que actúan como soporte, en este caso el alginato, para posteriormente extruir la emulsión formada a través de la boquilla del encapsulador. Lo que resulta en la formación de gotas de alginato de sodio que incorporan el aceite, que posteriormente se solidifican en un gelificante baño de cloruro de calcio para formar las perlas (BÜCHI, 2013).

Mediante la realización de este método, se protegió la sustancia encapsulante; enzima pectinasa de *Aspergillus aculeatus*, de condiciones ambientales que pueden afectarla tales como cambios de pH, temperatura, entre otras, de manera que puede ayudar a prolongar su vida útil permitiendo su reutilización.

Para realizar la extrusión, se utilizó un equipo especial para la encapsulación de sustancias: encapsulador BÜCHI B-390, el cual cuenta con sistema de boquillas, bombeo a presión de aire y frecuencia ajustables. Mediante la extrusión, el enlace iónico de los grupos carboxilato del alginato de sodio con iones Ca^{2+} conducen a la formación de redes mecánicamente estables de gel de alginato (BÜCHI, 2013).

El procedimiento para la encapsulación se basó en el manual BÜCHI para el soporte de encapsulación: alginato de sodio. Para lo cual fue necesario calcular la cantidad a encapsular de la enzima líquida para su equivalencia a la actividad enzimática de la enzima libre (sin encapsular) a una concentración de 1% (Ruelas, 2022). Para ello, se consideró la actividad enzimática de la enzima pectinasa de *Aspergillus aculeatus* la cual cuenta con una actividad enzimática de 3,800 U/mL, para su disolución en un soporte de 100 mL de alginato de sodio, estandarizando que, en 100 mL de alginato de sodio se encontrará una actividad enzimática de 100 U/mL.

Para ello, fue necesario encapsular una cantidad de 2.6 mL de enzima pectinasa líquida en 100 mL de alginato de sodio a una concentración de 1.5% a una temperatura de 30° C.

Dadas las condiciones, los parámetros de proceso indicados en el manual BÜCHI, indican una frecuencia de 600 Hz y una presión de 500 mbar, sin embargo, dadas las pruebas, se realizaron algunos ajustes en los parámetros de proceso. Tales que las condiciones finales de encapsulación fueron de una presión igual a 1400 mbar, una frecuencia de 1000 Hz utilizando una boquilla específica de 0.3 mm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la presente investigación

7.1. Resultados de parámetros de inmovilización

Para el caso de la presente investigación, los parámetros de inmovilización evaluados arrojaron los siguientes resultados: se extruyeron 100 mL de solución con una concentración de 1.5%, obteniéndose microcápsulas de morfología esférica (ver en Fig. 20 A y B), y un tamaño promedio de 0.3 mm. La actividad enzimática registrada fue de 100 U/mL en un volumen de 100 mL, mientras que la retención de enzima alcanzó un valor de 2.91 mg/mL.

Los resultados generaron esferas de forma y tamaño uniformes con un tamaño de 0.3 mm, esto permite que la pectinasa tenga una mayor difusión de las perlas durante la inmovilización debido a que las perlas son blandas, inestables y frágiles en baja concentración de alginato de sodio (Quiroga et al., 2011). Entre mayor sea la concentración del soporte, el tamaño de los poros del soporte disminuye lo que puede provocar limitación del sustrato para penetrar en las perlas de alginato de sodio y alcanzar el sitio activo de la enzima atrapada (Kumar et al., 2009).

Por lo tanto, la uniformidad en el tamaño de partícula y la morfología esférica facilitaron la distribución homogénea de la enzima dentro del polímero de alginato, lo que a su vez mejoró el acceso del sustrato a los sitios activos de la enzima. Esta optimización no solo incremento la eficiencia del proceso enzimático, sino que también contribuyó a una disminución en la tasa de reacción, mejorando, en consecuencia, la extracción de licopeno.



Figura 19 A y B. Enzima. La imagen muestra las perlas que contienen la enzima encapsulada.

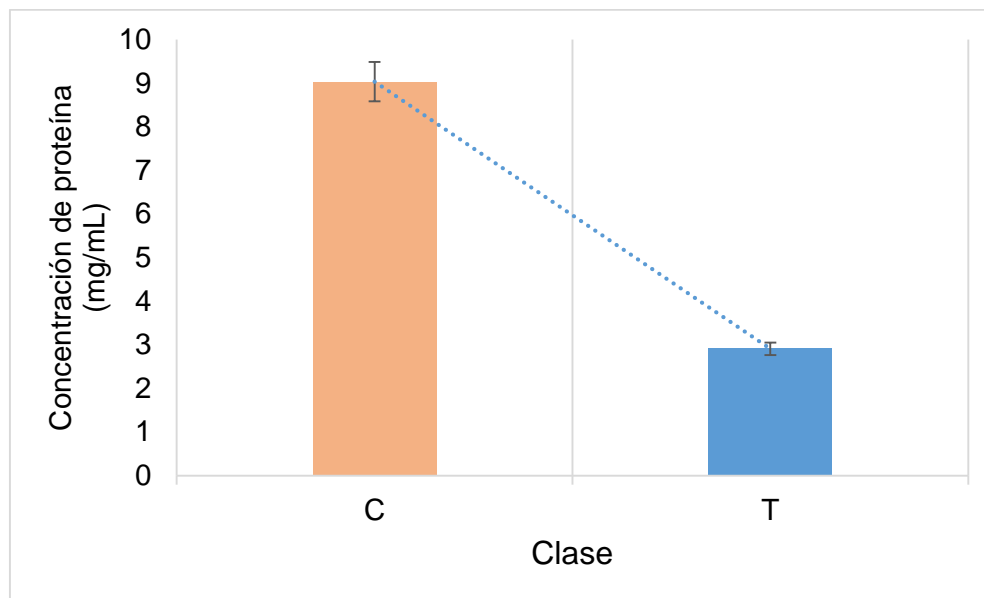


Figura 21. Eficiencia de inmovilización de enzima retenida en (mg/mL).

7.2. Determinación de los parámetros de extracción de licopeno

Descripción de los resultados a temperatura de 50° C y 55° C; con enzima inmovilizada; pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5; tiempos de 0', 10', 20', 30', 40', 50', 60', 70' y 80'.

En la fig. 22 A se representan los resultados de los parámetros de extracción de licopeno, a la temperatura de 50° C y diferentes valores de pH (4.5, 5.0 y 5.5) y en la B se representan los parámetros de extracción de licopeno bajo la temperatura de 55° C, con los mismos valores de pH (4.5, 5.0 y 5.5).

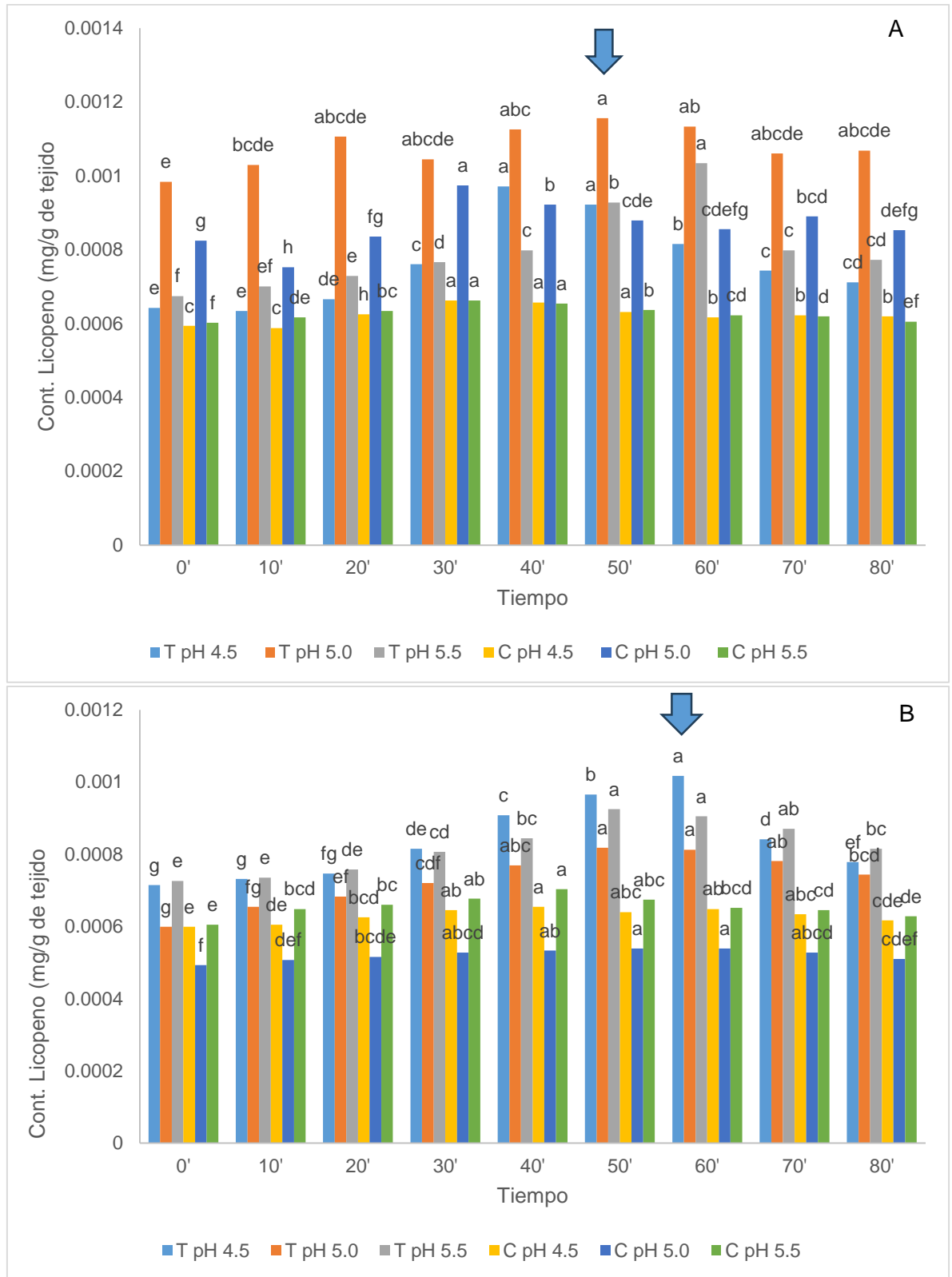


Figura 22. Liberación de licopeno por acción de la enzima pectinasa (A) Liberación a 50° C y (B) Liberación a 55° C.

Se investigó la influencia de tres valores de pH 4.5, 5.0 y 5.5 en la actividad catalítica de la enzima pectinasa de *Aspergillus aculeatus* para evaluar la efectividad de extracción de contenido de licopeno en función al tiempo. De acuerdo con la clasificación de Núñez, A. (2021), la pectinasa suele ser considerada como pectinasa ácida y suele utilizarse para la clarificación de zumos y vinos. La actividad enzimática se ve significativamente afectada por el pH debido a que el sustrato se conecta al sitio activo de la enzima y el proceso catalítico es a menudo sensible a la distribución de carga tanto en el entorno externo como en las moléculas de las enzimas (Sojitra et al., 2016). Los valores de pH óptimos para las pectinasas libres e inmovilizadas son de 5.5 y 5.0 (Mohammadi et al., 2019).

En el caso de la presente investigación, el parámetro de extracción más efectivo en cuanto al contenido de extracción de licopeno respecto al tiempo se encuentra bajo el tratamiento a pH 5.0, que respalda las investigaciones de Ahmed et al. (2016), sin embargo, existen otras investigaciones que aseveran que el pH de 4.5 es óptimo para la actividad enzimática máxima de la pectinasa extraída a partir de hongos del género *Aspergillus* (Pedrolli et al., 2007). Como se puede observar en la figura 22 A y B; el valor de pH de 4.5 tuvo eficacia de extracción de licopeno, sin embargo, se vio superada por el pH 5.0, localizándose ésta en un punto intermedio en cuanto a cantidad de extracción de licopeno con respecto a los tres tratamientos de pH, lo que sugiere que, para este caso, la extracción de licopeno vía enzimática a través de inmovilización en alginato de sodio, su pH óptimo es el valor de 5.0. Se reporta que esta enzima poligalacturonasa obtenida de *Aspergillus niger* es más activa a pH 5.0 y, de manera similar, Núñez, A. (2021) también declaró que el pH óptimo es para actividad enzimática de pectinasas provenientes de hongos del género *Aspergillus* es de 5.0, por lo que a medida que el pH incrementa, la actividad enzimática disminuirá. Esto se ve reflejado en los resultados con el tratamiento a 5.5, que demuestra que la eficacia en extracción de licopeno se ve afectada por el pH del medio.

En la presente investigación, el tratamiento a 50° C resultó más efectivo a través del tiempo para la eficiencia de extracción de contenido de licopeno mediante pectinasa inmovilizada. Según investigaciones realizadas por Ahmed et al. (2016), describe que 50° C es la temperatura óptima de la pectinasa purificada, mientras que la actividad enzimática se suprime a temperaturas superiores a 50°, resultados similares se observan en la presente investigación (Fig. 22 A y B) en la cual, entre mayor fue la temperatura, la termoestabilidad de la enzima se vio afectada, reflejándose en la eficiencia de extracción de licopeno, ya que a temperaturas de 55° C

(Fig. 22 B), el contenido extraído del carotenoide fue significativamente menor en comparación con la temperatura de 50° C.

Lo que puede deberse a que las temperaturas elevadas causan principalmente alteración en la conformación estructural de las moléculas de proteínas dirigiéndolas hacia la desnaturalización, y como consecuencia, el biocatalizador pierde su actividad. Otras investigaciones similares, en las que se utiliza como soporte perlas de alginato, se evaluó la estabilidad térmica del atrapamiento de la pectinasa en una temperatura de 60° C, y tuvo un efecto destructivo de la actividad enzimática (De Oliveira et al., 2018), lo que sugiere que temperaturas mayores a 55° C, se ve afectada la actividad enzimática en la capacidad de liberación de licopeno de tomate.

7.3. Liberación de licopeno residual

La reutilización de la enzima inmovilizada es muy importante, porque es una cualidad clave para la viabilidad financiera del bioproceso fijado en un sistema enzimático inmovilizado (Gómez et al., 2003). Una vez teniendo la influencia del tiempo, la temperatura y pH, se procedió a realizar un seguimiento de la liberación de licopeno mediante ciclos de reutilización sucesivos de la enzima (Fig. 23).

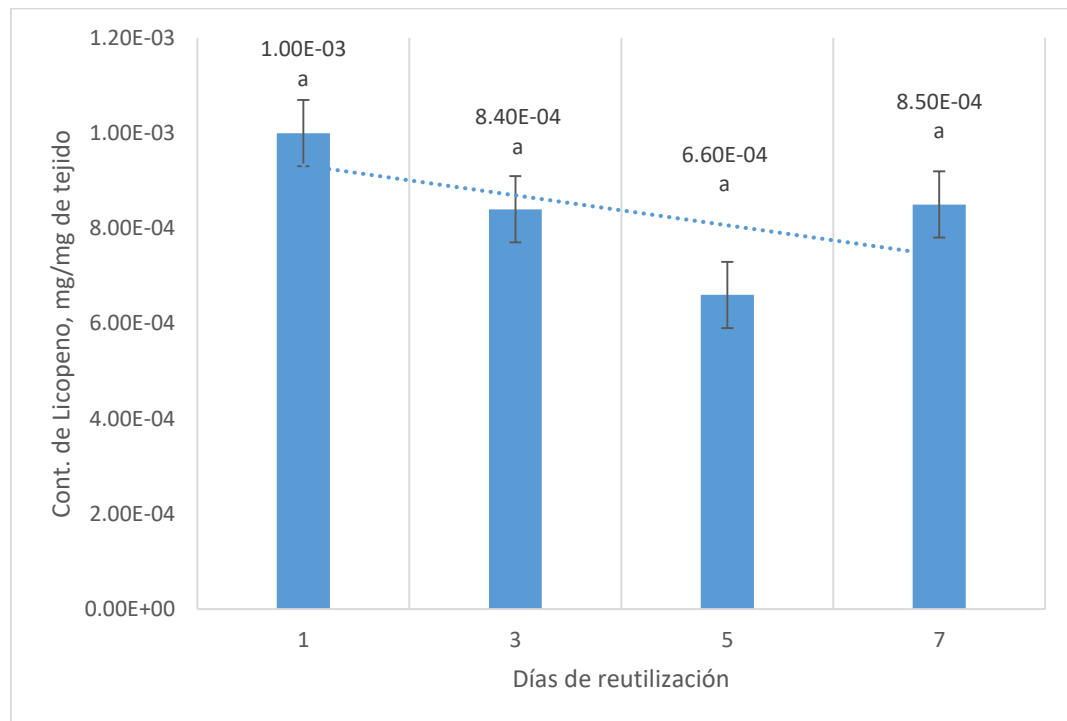


Figura 2320. Liberación de licopeno tras reutilización de los encapsulados.

Si se considera la liberación de licopeno inicial en el primer día de utilización de la enzima como el 100%, se obtiene que el decremento de la liberación de licopeno por medio de la enzima disminuyó un 22% para su eficiencia en la extracción para el tercer ciclo.

Después del tercer ciclo de reacción se observó una disminución significativa en la liberación del carotenoide. De acuerdo con Amin et al. (2017), la estabilidad operacional de enzimas exo-poligalacturonasas, inmovilizadas en soportes de alginato de sodio, se obtiene un decremento de hasta el 28% en el tercer ciclo, lo que puede deberse a factores asociados al lavado excesivo del soporte tras la reutilización, lo que provoca lixiviaciones y pérdida de la enzima.

Otro factor importante en la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada podría deberse a la conformacional (Amin et al., 2017). Otros estudios afirman que la actividad residual en pectinasas inmovilizadas es de hasta un 85% en soportes de nanopartículas magnéticas, lo cual incrementa los resultados a esta investigación, debido a que la matriz de alginato es susceptible a daños mecánicos y desactivación durante su reciclaje.

De acuerdo con De Freitas et al. (2006), después del primer ciclo de reacción, la actividad catalítica de la enzima pectinasa inmovilizada disminuyó cerca del 25%, lo que defiende los resultados presentados en la presente investigación, en la cual, para el segundo ciclo de reacción, se obtiene una disminución de solo el 14% de actividad de la enzima en la liberación de licopeno, que supera los resultados presentados hasta entonces. La estabilidad durante el almacenamiento es uno de los factores clave para cualquier enzima industrial, sin embargo, es deseable una enzima con excelente capacidad de almacenamiento sin pérdidas de su eficiencia biocatalítica (Romo-Sánchez et al., 2014).

Otras investigaciones aseveran que soportes de alginato permiten la reutilización de la pectinasa en reacciones discontinuas utilizando las mismas condiciones de reacción para todos los lotes. En este caso, la pectinasa inmovilizada retuvo más del 80% de actividad residual en su segundo ciclo, lo que es mayor a otras investigaciones orientadas al medio de inmovilización por atrapamiento en la membrana, lo cual, la estabilidad operativa de este experimento es mayor en comparación a lo informado anteriormente usando el mismo soporte para pectinasa bajo el tratamiento de inmovilización en las mismas condiciones después del tercer ciclo (Anwar et al., 2009).

7.4. Retención enzimática

Descripción de los resultados evaluados a través de la determinación de proteína en las muestras de microcápsulas con enzima y enzima libre mediante el método de Bradford (Fig. 24).

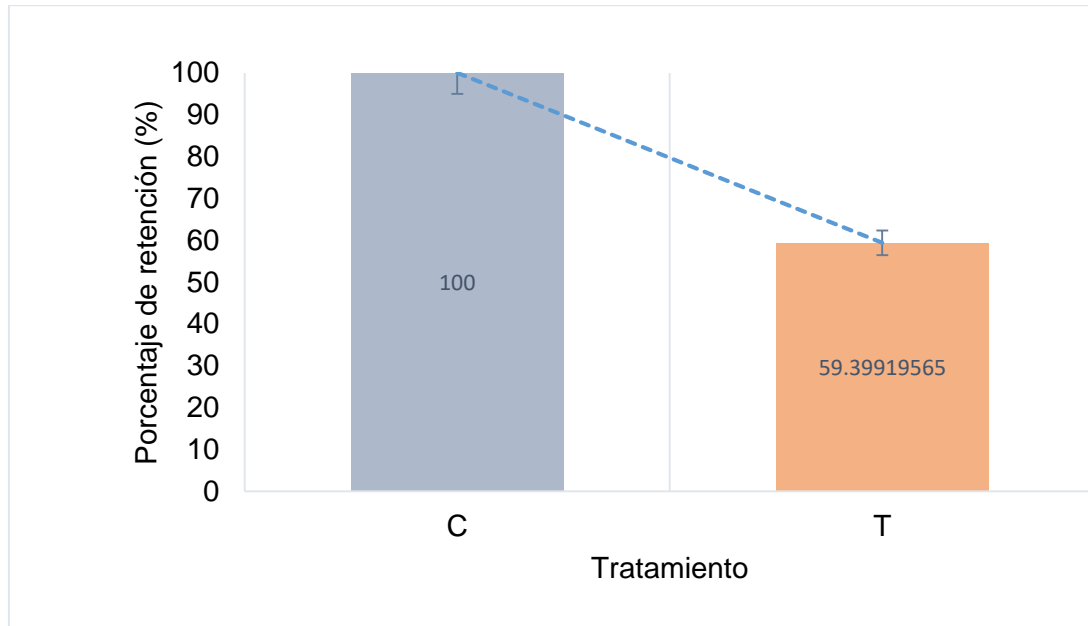


Figura 21. Porcentaje de enzima retenida (T) en el soporte de alginato comparada con la enzima libre (C)

Se realizó el método de Bradford, una técnica colorimétrica para la cuantificación de proteínas, con el fin de evaluar la retención enzimática de las perlas de alginato de sodio con enzima inmovilizada. En esta investigación, se analizaron las muestras microencapsuladas en comparación con la enzima libre, para determinar el porcentaje de retención, basado a los resultados de concentración de proteína, medidos en su absorbancia.

Los valores de enzima libre se expresan como control (C), mientras que las repeticiones de enzima inmovilizada se identifican como (T).

Para calcular la concentración de proteína en función de su absorbancia, se utilizó la fórmula:

$$y = 0.52x + 0.065$$

donde (x) representa la concentración de proteína en (mg/mL) y (y) como el valor de la absorbancia.

Los resultados de la fig. 24 mostraron valores porcentuales de actividad enzimática retenida próximos y cercanos al 60%, mayores a los resultados presentados previamente para la misma enzima mediante el método de entrecruzamiento, que reportan valores porcentuales cercanos al 40% para la actividad enzimática retenida (Mohammadi et al., 2019). Sin embargo, otras investigaciones reportan que, para la inmovilización de pectinasas en soportes de polímeros como alginato mediante encapsulación, se obtiene un valor porcentual de actividad enzimática retenida con valores que oscilan entre el 58% (Deng et al., 2019), mismos que respaldan los resultados obtenidos en la presente investigación.

8. CONCLUSIONES

Se determinó la concentración óptima de alginato para lograr la inmovilización o microencapsulación de la enzima comercial pectinasa de *Aspergillus aculeatus* en un polímero de alginato de sodio. Este proceso dio como resultado la formación de esferas uniformes y homogéneas, con un tamaño de partícula de 0.3 mm.

Para la cinética de extracción de licopeno la comparación entre el método convencional de extracción de licopeno (agitación y temperatura) y el método enzimático con pectinasa inmovilizada demostró la efectividad de la enzima inmovilizada para mejorar el rendimiento. Mientras que el método convencional logró 0.0006571 mg/g de licopeno, el método enzimático aumentó la extracción en un 5.52%, alcanzando 0.01190 mg/g. Este incremento resalta el potencial de las enzimas inmovilizadas no solo para optimizar la extracción de carotenoides como el licopeno, sino también para permitir su reutilización, beneficiando su aplicación industrial.

La enzima microencapsulada pudo ser reutilizada en cuatro ciclos de extracción de licopeno, disminuyendo de forma gradual en cada ciclo. Mantuvo una actividad residual superior al 85% después de tres reutilizaciones, superando los rendimientos observados en investigaciones previas.

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar de diferentes sustratos para la extracción de licopeno, además del tomate, para probar la versatilidad del método. Esto podría incluir otros frutos ricos en carotenoides o residuos agroindustriales de otras hortalizas.
- Explorar técnicas alternativas de inmovilización como: secado por aspersión, secado por enfriamiento, secado por congelamiento o coacervación. Estas técnicas pueden ofrecer una forma más eficiente de encapsular la enzima y facilitar su reutilización en la extracción de licopeno, optimizando el proceso de producción.
- Extracción enzimática directa de hongos del género *Aspergillus*. Esto implica la optimización de condiciones de cultivo para la extracción de la enzima, permitiendo evaluar su actividad en comparación con la enzima comercial y con ello, ofrecer una opción más sostenible y económica.
- Estandarización de parámetros de extracción de otros polímeros, biodegradables y compatibles, como el quitosano, carregenina o gomas en el proceso de microencapsulación de la enzima. Esto permitirá evaluar la eficacia de diferentes matrices en la conservación de la actividad enzimática y en la mejora de la liberación controlada de la enzima en el sustrato.
- Investigar la aplicación de enzimas, además de la pectinasa, que están involucradas en la extracción de licopeno, como celulasas, hemicelulasas o proteasas. La combinación de diferentes enzimas puede mejorar potencialmente la eficiencia en el proceso de extracción al facilitar la ruptura de la matriz extracelular del tomate y mejorar la liberación del carotenoide.

10. LITERATURA CITADA

- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal Of Radiation Research And Applied Sciences*, 9(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exopolygalacturonase. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 95, 974-984. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.086>
- Anwar, A., Qader, S. A. U., Raiz, A., Iqbal, S., & Azhar, A. (2009). Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*. [http://www.idosi.org/wasj/wasj7\(10\)/11.pdf](http://www.idosi.org/wasj/wasj7(10)/11.pdf)
- Ariza León, E., Castro Cely, A. L., & Gómez Cañon, D. (2013). Factibilidad del uso del almidón de achira como agente controlador de filtrado en lodos de perforación base agua. *Revista ION*, 26(1): 63-7.
- Arroyo, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 39(2), 23-39.
- Ayala-Zavala, J.F., et al. (2011) "Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives". *Food Research International* [en línea]. Vol. 44, no.7, pp. 1866–1874.
- Bailey, J. R. (2015). *Lycopene: Food Sources, Potential Role in Human Health and Antioxidant Effects*. Emerald Group Publishing Limited.
- Becerril, A., & Ballinas, V. (2017). La Jornada: En México se desperdician al año 20.4 millones de toneladas de alimentos. In *La Jornada*. <https://www.jornada.com.mx/2017/11/17/sociedad/043n1soc>.
- Berezin, LV.; Klivanov, A.M.; Martinek, K. (1975) Kinetic-thermodynamic aspects of catalysis by immobilized enzymes. *Russ. Chem. Rev.* 44: 17-47.
- Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. En: *Immobilization of Enzymes and Cells* (G.F. Bickerstaff, ed.) Pp. 1-11. Humana Press, Totowa
- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate. En *Enfermedades del tomate; indentificar, conocer, controlar* (1.ª ed.). Mundi-Prensa.

- Brena, B.M. y Batista-Viera, F. (2006). *Immobilization of Enzymes*. A literature survey. En: Immobilization of enzymes and cells. (J.M. Guisan ed.) pp. 15-30. Humana Press, Towota
- BÜCHI Labortechnik AG. (2016). *Encapsulator B-390/B-395* / *Buchi.com*. <https://www.buchi.com/es/productos/instrumentos/encapsulador-b-390-b-395>.
- BÜCHI (2013). Encapsulation of hydrophobic liquids within microbeads. (No. 133). <https://www.buchi.com/en/knowledge/applications/encapsulation-hydrophobic-liquids-within-microbeads>
- Cabral, H. A., Adame, J. J. D., Neria, G. C., Constantino, C. A. L., & Hernández, R. I. B. (2018). Inmovilización de enzimas. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 5(10).
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 61(3), 233-241.
- Casas-Godoy, L., Fábían, G., & Cvu. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *RDU-UNAM*, 15(12). <https://www.ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2278>.
- Chandomi, B. (2014). *Caracterización de los parámetros bioquímicos que maximicen la actividad enzimática de pectinasa de aspergillus aculeatus*. [Reporte de residencia inédita]. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
- Chandrasekaran, M. and Bahkali, A.H. “Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology - Review. *Saudi journal of biological sciences* [en línea]. 2013, Vol. 20, no. 2, pp. 105–20.
- Cheba, B. A., Zaghoul, T. I., EL-Mahdy, A. R., & EL-Massry, M. H. (2011). Enhanced production of *Bacillus* sp. R2 chitinase through cell immobilization. *ACT-Biotechnol. Res. Commun*, 1(8).
- CHOUDHARI, S.M. (1990) and Anantharayan, L. “Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues”. *Food Chemistry* [en línea]. 2007, Vol. 102, no. 1, pp. 77–81
- Corominas, J.. Breve Diccionario Etimológico de la Lengua Castellana. Editorial Gredos, Madrid. pp. 628
- De Almeida Lins, A. C., De Barros Cavalcanti, D. T., Azoubel, P. M., De Almeida Mélo, E., & Maciel, M. I. S. (2014). Effect of hydrocolloids on the physicochemical characteristics of yellow mombin structured fruit. *Food Science and Technology*, 34(3), 456–463. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6348>

- De Araújo Natalia, U., Ramírez, L. A. G., Villadiego, O. S. R., & Campuzano, O. I. M. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos Hoy*, 23(36), 112-126.
- De Freitas, P. M., Martin, N., Silva, D., Da Silva, R., & Gomes, E. (2006). Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus* sp N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp N12 on solid-state fermentation. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 37(3), 302-306. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822006000300019>
- Deng, Z., Wang, F., Zhou, B., Li, J., Li, B., & Liang, H. (2019). Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. *Food Hydrocolloids*, 89, 691-699. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.031>
- De Oliveira, R. L., Dias, J. L., Da Silva, O. S., & Porto, T. S. (2018). Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food And Bioproducts Processing*, 109, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.005>
- De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>.
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II: fabaceae, liliaceae, solanaceae, and umbelliferae* (pp. 249-323). New York, NY: Springer New York.
- Domínguez, R., Gullón, P., Pateiro, M., Munekata, P. E., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2020). Tomato as potential source of natural additives for meat industry. A review. *Antioxidants*, 9(1), 73. <https://doi.org/10.3390/antiox9010073>.
- Erdem, E.; Varinli, I. & Yildiz, M.E. 2015. *The level of consumers awareness and perceptions in consumption of Halal Certified Products*. *EJBM-Special Issue. Islamic Management and Business*, 7: 65-67.
- Espinosa, F. (2018, September 14). *El poder de... El tomate (o jitomate, como se le conoce en el centro de México) - El Poder del Consumidor*. *El Poder Del Consumidor*. <https://elpoderdelconsumidor.org/2018/08/el-poder-de-el-tomate-o-jitomate-como-se-le-conoce-en-el-centro-de-mexico/>
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N. and Mantzavinos, D. (2009) “Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters”. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [en línea]., Vol. 84, no. 6, pp. 895–900.

- Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M. E., Chaya, C., Galiana-Balaguer, L., ... & Nuez, F. (2004). Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *HortScience*, 39(2), 339-345.
- Flores-Maltos, A., Rodríguez-Durán, L. V., Renovato, J., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2011). Catalytical properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. *Enzyme research*, 2011.
- Fornaris, G. (2007). Conjunto tecnológico para la producción de tomate de ensalada. *Mayagüez: Universidad de Puerto Rico*.
- Franchi, M. L., De La Parra, D. F., Pose, G. N., & Cavalitto, S. F. (2014). Producción nacional de pectinasas de origen fúngico y su aplicación al procesamiento frutihortícola. *Senasa*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/112917>.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
- Gámiz, P. (2018). Antioxidantes, ¿qué son y para qué sirven? *Salud Y Corazón.*, 126. <https://fundaciondelcorazon.com/blog-impulso-vital/3250-antioxidantes-ique-son-y-para-que-sirven.html>
- Gómez, J., Deere, J., Goradia, D., Cooney, J., Magner, E., & Hodnett, B. K. (2003). Transesterification Catalyzed by Trypsin Supported on MCM-41. *Catalysis Letters*, 88(3/4), 183-186. <https://doi.org/10.1023/a:1024057605239>
- Goldstein, L. (1976) *Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems*. *Methods Enzymol.* 44: 397-443.
- González, A. F. R., Flórez-Montes, C., & López-Rodríguez, D. F. (2019). Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Revista Cubana De Química*, 31(1), 31–52. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-31.pdf>
- Guisán, J. M., López-Gallego, F., Bolívar, J. M., & Fernández-Lorente, G. (2020). The science of enzyme immobilization. In *Methods in molecular biology* (pp. 1–26). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_1
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Castaño, D. M. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana De Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

- Hartmeier, W., & Hartmeier, W. (1988). Methods of immobilization. *Immobilized Biocatalysts: An Introduction*, 22-50.
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Arvizu-Higuera, D. L., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J. I., & Muñoz-Ochoa, M. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(2), 155-168.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology*, 6, 185-205.
- Homby, W.E.; Lilley, M.D.; Crook, E.M. (1968) Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochem. J.* 107: 669-674.
- Inserra, P. (2008). Dietary intake of lycopene and risk of prostate cancer. *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention: The Columbus Concept*, 463-467.
- Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S. y R. Tewari (2001), "Applications of pectinases in the commercial sector: a review", *Bioresource Technology* Volume 77 (3), pp. 215-227.
- Klei, H., Sundstrom, D. W., & Shim, D. (2005). Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed.
- Klibanov, A. M. (1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219(4585), 722-727.
- Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme Microb. Technol.* , 35, 126–139
- Kumar, S., Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2009). Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal Of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 58(1-4), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.006>
- Kurita, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* 2001, 26, 1921–1971.
- Lizardi-Mendoza, J. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones utilization of chitin and chitosan based materials for protease immobilization: stabilization effects and applications. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62031166011.pdf>

- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *SciELO*, 54, 11. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011.
- Mohammadi, M., Heshmati, M. K., Sarabandi, K., Fathi, M., Lim, L., & Hamishehkar, H. (2019). Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 137, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.236>
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>.
- Novick, S.J. y Rozzell, J.D. (2005). *Immobilization of enzymes by covalent attachment*. En: *Microbial Enzymes and Biotransformations*, (J.L. Barredo ed.) Pp. 247-271. Humana Press, Totowa.
- Núñez, A. (2021). *Producción de pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilización en nanoestructuras core-shell de Fe₃O₄@SiO₂ para la clarificación de jugos* [Tesis de Maestría inédita]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pal, Kunal; Paulson, Allan T. and Rousseau, Dérick. 2009. *Biopolymers in controlled release delivery systems*. In *Modern biopolymer science. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. (pp. 519-557). London-Burlington-San Diego: Academic Press.
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of food composition and analysis*, 21(3), 241-248.
- Pedrolli, D. B., Gomes, E., Monti, R., & Carmona, E. C. (2007). Studies on Productivity and Characterization of Polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* Submerged Culture Using Citrus Pectin and Orange Waste. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 144(2), 191-200. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8059-1>
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Peter, M (1993). *Applications and environmental aspects of chitin and chitosan*. J. Macromol. Sci. 1995, 32, 629–640.

- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Procuraduría Federal del Consumidor [Profeco]. (2020, November 28). *Jitomate, versátil y nutritivo*. gob.mx. <https://www.gob.mx/profeco/articulos/jitomate-versatil-y-nutritivo?state=published>.
- Procuraduría Federal del Consumidor [Profeco]. (2021, August 23). *Economía circular*. gob.mx. <https://www.gob.mx/profeco/es/articulos/economia-circular?idiom=es>
- Quiroga, E., Illanes, C. O., Ochoa, N. A., & Barberis, S. (2011). Performance improvement of araujiain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochemistry*, 46(4), 1029-1034. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.012>.
- Rehman, H.U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S.A.U., Molinaro, A., Ansari, A., 2013. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chem.* 139, 1081–1086. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.069>
- Rick, C. M. (1980). Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely relates species of *Salanum*. *The Biology And Taxonomy Of The Solanaceae*.
- Romo-Sánchez, S., Camacho, C., Ramirez, H. L., & Arévalo-Villena, M. (2014). Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports. *Advances In Bioscience And Biotechnology*, 05(06), 517-526. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.56062>
- Rúelas-Chácon, X., Mejía-López, A., Moreno-Sánchez, O., Rodríguez-Gutiérrez, L., Aguilera-Carbó, A., Reboloso-Padilla, Ó. N., & Corona-Flores, J. (2022). Lycopene extraction from tomato waste assisted by cellulase and pectinase. In *Elsevier eBooks* (pp. 283–291). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89929-1.00033-0>.
- SADER. (2022, 22 marzo). *México, referente mundial en el cultivo y exportación de jitomate: Agricultura*. gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-referente-mundial-en-el-cultivo-y-exportacion-de-jitomate-agricultura>.
- SAGARPA (2017). *¿Tomate o jitomate?* gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/tomate-o-jitomate#:~:text=El%20Solanum%20lycopersicum%2C%20es%20el,indica%20rojo%20en%20lengua%20n%C3%A1huatl>.
- Santacruz, I., Nieto, M. I., & Moreno, R. (2005). Nuevas aplicaciones de los alginatos en el conformado cerámico. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, 44(1), 45–52. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/4248/1/alginatos.pdf>

- SHARMA, S.K. and Lemaguer, M. "Lycopene in tomatoes and tomato pulp fraction". Italian Journal of Food Science [en línea]. 1996, Vol. 8, pp. 107–113.
- Siemonsma, J. S., & Piluek, K. (1993). *Plant Resources of South-East Asia: Vegetables* (pp. 1199-1205). Pudoc.
- Sims, W. L. (1980). History of tomato production for industry around the world. In *Symposium on Production of Tomatoes for Processing 100* (pp. 25-26).
- Singh, M., Prasanna, H. C., Tiwari, S., Gujar, R. S., & Karkute, S. G. (2016). Biology of *Solanum lycopersicum* (tomato). *New Delhi: Ministry of Environment, Forest and Climate Change Government of India*.
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. y Lee, J.K. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1232-1277.
- Sojitra, U. V., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2016). A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 213, 296-305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.074>
- Taylor, I. B. (1986). Biosystematics of the tomato. In *The tomato crop: a scientific basis for improvement* (pp. 1-34). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Thies, C. (2003). *Microcapsules. Functional Foods. En C. Trugo, & M. Finglas (Eds.). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (3892-3903). Baltimore, Maryland: Academic Press.
- Tigcilema, C. V. (2020). Revisión de Literatura: Importancia del licopeno, métodos de extracción y propuesta para la adición de tomate en polvo en jamón Virginia.
- Vergara-Duque, D., Cifuentes-Yepes, L., Hincapie-Riaño, T., Clavijo-Acosta, F., Juez-Castillo, G., & Valencia-Vidal, B. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on the Morphology of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella braenderup*. *Journal of Nanotechnology*, 2020: 1-11. e9483428. <https://doi.org/10.1155/2020/9483428>
- Vitale, A. A., Bernatené, E. A., & Pomilio, A. B. (2010). Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44(2), 195–238. <https://biblat.unam.mx/es/revista/acta-bioquimica-clinica-latinoamericana/articulo/carotenoides-en-quimioprevencion-licopeno>
- Waliszewski, K. N., & Blasco, G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Publica De Mexico*, 52(3), 254–265. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342010000300010>
- Xu, S. W., Lu, Y., Li, J., Jiang, Z. Y., & Wu, H. (2006). Efficient conversion of CO₂ to methanol catalyzed by three dehydrogenases co-encapsulated in an alginate– silica

(ALG– SiO₂) hybrid gel. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(13), 4567-4573.

Zamora, S. V. C., & Diego, J. (2007). ANTIOXIDANTES: MICRONUTRIENTES EN LUCHA POR LA SALUD. *Revista Chilena De Nutrición*, 34(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182007000100002>

Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

Zhang, Y., Lin, J., Zhong. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, 9-15.

11. ANEXOS

Anexo 1. Compilación de medias de Fisher ($p > 0.05$) para los resultados de los tratamientos con enzima inmovilizada y el control (agitación y temperatura) a 50°C.

	T pH 4.5	T pH 5.0	T pH 5.5	C pH 4.5	C pH 5.0	C pH 5.5
0'	0.0006427	0.0009837	0.0006744	0.0005937	0.0008242	0.0006023
10'	0.000634	0.0010298	0.0007003	0.0005879	0.0007522	0.0006167
20'	0.0006657	0.0011066	0.0007291	0.0006254	0.0008357	0.000634
30'	0.0007608	0.0010451	0.0007666	0.0006628	0.0009741	0.0006628
40'	0.0009712	0.0011258	0.0007983	0.0006571	0.0009222	0.0006542
50'	0.0009222	0.0011566	0.000928	0.0006311	0.000879	0.0006369
60'	0.0008156	0.0011335	0.0010346	0.0006167	0.0008559	0.0006225
70'	0.0007435	0.0010605	0.0007983	0.0006225	0.0008905	0.0006196
80'	0.0007118	0.0010682	0.0007723	0.0006196	0.000853	0.0006052

Anexo 1. Compilación de medias de Fisher ($p > 0.05$) para los resultados de los tratamientos con enzima inmovilizada y el control (agitación y temperatura) a 55°C.

	T pH 4.5	T pH 5.0	T pH 5.5	C pH 4.5	C pH 5.0	C pH 5.5
0'	0.0007147	0.0005994	0.0007262	0.0005994	0.0004928	0.0006052
10'	0.000732	0.0006542	0.0007349	0.0006052	0.0005072	0.0006484
20'	0.0007464	0.000683	0.0007579	0.0006254	0.0005159	0.0006599
30'	0.0008156	0.0007205	0.0008069	0.0006455	0.0005274	0.0006772
40'	0.0009078	0.0007695	0.0008444	0.0006542	0.0005331	0.0007032
50'	0.0009654	0.0008184	0.0009251	0.0006398	0.0005389	0.0006744
60'	0.0010173	0.0008127	0.0009049	0.0006484	0.0005389	0.0006513
70'	0.0008415	0.000781	0.0008703	0.000634	0.0005274	0.0006455
80'	0.0007781	0.0007435	0.0008156	0.0006167	0.0005101	0.0006282

Anexo 2. Medias de Fisher ($p > 0.05$) para la cantidad de licopeno extraído durante los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada a lo largo de una semana.

Día	Medias	n	E.E.
1	1.0 E-03	18	1.5E-04
7	8.5E-04	18	1.5E-04
3	8.4E-04	18	1.5E-04
5	6.6E-04	18	1.5E-04

Anexo 3. Cuantificación de concentración de proteína retenida en esferas de alginato de sodio, mediante la técnica de Bradford.

Clase	Absorbancia	Concentración de proteína (mg/mL)	Promedio (mg/mL)	DesvEst
T1	0.233	3.221153846	2.91025641	0.71292312
T2	0.222	3.009615385		
T3	0.229	3.144230769		
T'1	0.208	2.740384615		
T'2	0.214	2.855769231		
T'3	0.195	2.490384615		
C1	0.578	9.855769231	9.03525641	0.27180545
C2	0.517	8.682692308		
C3	0.511	8.567307692		

Anexo 4. Porcentaje de proteína retenida en esferas de alginato de sodio, mediante la técnica de Bradford

Clase	Porcentaje de retención (%)	DesvEst
T1	59.68858131	3.199523101
T2	57.05996132	
T3	55.18590998	
T'1	64.01384083	
T'2	58.6073501	
T'3	61.83953033	
C	100	0
C2	100	
C	100	