



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y

AMBIENTALES

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR,

MODALIDAD PRESENCIAL

TEMA:

“ANÁLISIS DEL PROCESO CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE

FRUCTOSANO A SIROPE DE FRUCTOSA EN REACTORES FLUJO

CONTINUO Y BATCH UTILIZANDO COMO MEDIO DE SOPORTE

MATERIA ORGÁNICA”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniero

agroindustrial

Línea de investigación: Gestión, producción, productividad, innovación y desarrollo socio

económico

Autor: Josue Israel Godoy Montenegro

Director: Ing. José Manuel País Chanfrau PHD.

Ibarra-2023



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	1004178206	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	Godoy Montenegro Josue Israel	
DIRECCIÓN:		Ibarra	
EMAIL:		jigodoym@utn.edu.ec	
TELÉFONO FIJO:	062651668	TELÉFONO MÓVIL:	0979272846

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Análisis del proceso conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores flujo continuo y <i>Batch</i> utilizando como medio de soporte materia orgánica
AUTOR (ES):	Godoy Montenegro Josue Israel
FECHA: DD/MM/AAAA	02/05/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial
ASESOR /DIRECTOR:	PhD. José Manuel País Chanfrau

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los dos días del mes de mayo de 2023

EL AUTOR:

(Firma).....
Nombre: Josue Israel Godoy Montenegro

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 26 de abril del 2023

PhD. José País

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para fines legales pertinentes.



PhD. José País

C.C. 0959747320

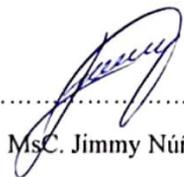
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “ ANÁLISIS DEL PROCESO CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE FRUCTOSANO A SIROPE DE FRUCTOSA EN REACTORES FLUJO CONTINUO Y BATCH UTILIZANDO COMO MEDIO DE SOPORTE MATERIA ORGÁNICA” elaborado por Josue Israel Godoy Montenegro, previo a la obtención de título de ingeniero agroindustrial, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte



PhD. José País

C.C. 0959747320



MsC. Jimmy Núñez

C.C. 1756606339



MsC. Juan Carlos De la Vega

C.C. 1002958856

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico en primer lugar a Dios por darme fuerza, valentía e inspirarme para alcanzar un objetivo más en mi vida.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificio para permitirme llegar hasta aquí, al convertirme en la persona que soy, por estar siempre presentes, acompañándome, brindándome apoyo moral l que han hecho que culmine esta etapa con éxito.

A familia y amigos que siempre creyeron en que podría hacerlo, por la motivación para que cada día pueda llegar más lejos en mi vida.

Josué Godoy

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida, por guiarme y ser mi fortaleza en cada paso de mi vida.

A mis padres Jorge y Doris que con su amor, paciencia y esfuerzo me han acompañado en todo este proceso y me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía para afrontar los obstáculos que me presente la vida.

A mi director PHD José País y el MSc. Marco Lara por su valiosa guía, enseñanzas y su paciencia durante todo este trabajo de investigación, a mis asesores por su apoyo y dedicación.

A mi familia, amigos y amigas por su apoyo incondicional, durante todo este proceso educativo, por estar conmigo en todo momento, por sus consejos y palabras de aliento que me hicieron de mí una mejor persona.

Josue Godoy

RESUMEN

La limitada información en cuanto a la cinética y modelamiento de tecnología de producción de sirope de fructosa por vía enzimática muestra que el proceso investigativo sigue en desarrollo, lo que permite aportar con nuevos conocimientos sobre la reacción de hidrólisis en los reactores como *Batch* (lote) y continuo. El objetivo es determinar la efectividad del proceso de conversión enzimática del fructosano a sirope de fructosa con un medio de soporte orgánico (alginato de sodio y *Luffa cylindrica*) en los reactores. Para lo cual se implementó un modelo compuesto central para cada reactor teniendo como factores temperatura, pH y flujo en el caso del reactor continuo, que permiten conocer los parámetros favorables para cada reactor con sus diferentes soportes. En caso de la tecnología continua, el punto idóneo se logró a condiciones de 42 °C, un pH de 4.7 y flujo de 0.23 ml/min, con producción de 3.80 mg/h, para la tecnología discontinua se alcanzó 2.32 mg/h a 37 °C y pH 3.6, mediante el modelo estadístico ANOVA brindado por el programa Design Expert, se determinó coeficientes de determinación mayores a 0.94, que da fiabilidad de los experimentos. La gráfica cinética de flujo continuo se mantuvo sin mayores fluctuaciones de velocidad y conversión, además que el edulcorante obtenido contiene productos potables en menor cantidad que fructosa y que son susceptibles de separación. Finalmente, se determina que la *Luffa cylindrica* al ser una fibra biodegradable y de manejo sencillo, es recomendable para la incorporación en la tecnología continua.

Keywords: Alginato de sodio, *Luffa cylindrica*, reactor *Batch* (lote), reactor flujo continuo

ABSTRACT

The limited information of kinetics and modelling of technology for the production of fructose syrup by enzymatic shows that the research process is still in development, which allows to contribute with new knowledge about hydrolysis reaction in reactors such as *Batch* and continuous flow. The objective is to determine the efficiency of the enzymatic conversion process from fructosan to fructose syrup organic support medium (sodium alginate and *Luffa cylindrica*) in the reactors. A central compound model was implemented for each reactor with factors temperature, pH and flow in the case of the continuous reactor, which allow to know the favorable parameters for each reactor. In the case of continuous technology, the ideal point was achieved at conditions of 42 °C, pH 4.7 and flow of 0.23 ml/min, with a production of 3.80 mg/h, for discontinuous technology 2.32 mg/h was acquired at 37 °C and pH 3.6, with the use of statistical model ANOVA provide by the program Design Expert, it determinates the coefficients of determination were greater than 0.94, which exposes reliability of the experiments. The kinetics graph of continuous flow kept without significant fluctuation in speed and conversion, in addition the sweeter obtained contain edible compounds in least amount than fructose and these are susceptible to separation. Finally, *Luffa cylindrica* was determined for incorporation into continuous technology for being a biodegradable fiber and easy handling.

Keywords: *Batch* reactor, continuous flow reactor, sodium alginate, *Luffa cylindrica*,

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN	17
PROBLEMA.....	17
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
HIPÓTESIS.....	19
CAPÍTULO I	20
MARCO TEÓRICO.....	20
1.1. FRUCTOSANOS.....	20
1.1.1. FUENTES DE OBTENCIÓN	21
1.1.2. APLICACIONES TECNOLÓGICAS	22
1.2. INULINA.....	22
1.2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA INULINA Y DERIVADOS. 23	23
1.2.2. FUENTES DE INULINA	24
1.2.3. APLICACIONES DE LA INULINA.....	25
1.3. FRUCTOSA.....	26
1.3.1. USOS DE LA FRUCTOSA	27
1.4. ENZIMAS.....	28
1.4.1. INULINASA	29
1.4.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA INULINA	29
1.5. REACTOR.....	30
1.5.1. REACTOR TIPO BATCH (LOTE).....	30

1.5.2. REACTOR DE LECHO EMPACADO	32
1.6. MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO “ <i>LUFFA CYLINDRICA</i> ”	33
1.7. MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO “ALGINATO DE SODIO”	34
1.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	35
CAPÍTULO II.....	37
METODOLOGÍA.....	37
2.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	37
2.2. MATERIALES Y EQUIPOS	37
2.2.1. INSTRUMENTOS	38
2.2.2. EQUIPOS.....	38
2.2.3. MATERIALES E INSUMOS	38
2.3. MÉTODOS	39
2.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE SOLUCIONES DE FRUCTOSANO (INULINA) MEDIANTE ESPECTOFOTOMETRÍA A PARTIR DE UN BLANCO COMERCIAL ANALÍTICO.....	39
2.3.2. IDENTIFICACIÓN DEL MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO, MEDIANTE PROCESOS FISICOQUÍMICOS.....	40
2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCTIVIDAD DE FRUCTOSA EN LOS REACTORES PROPUESTOS.....	41
2.4. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA.....	46
2.4.1. DIAGRAMA DEL PROCESO A REALIZAR	46
2.4.2. REACTOR DE FLUJO CONTINUO Y ENCAPSULACIÓN DE ENZIMA CON ALGINATO DE SODIO	48

2.4.3. REACTOR BATCH Y INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA EN LUFFA CILYNDRICA MEDIANTE ENLACE COVALENTE.....	50
CAPÍTULO III.....	51
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
3.1. ESTANDARIZACIÓN DE SOLUCIONES DE FRUCTOSANO (INULINA) MEDIANTE ESPECTOFOTOMETRÍA A PARTIR DE UN BLANCO COMERCIAL ANALÍTICO	51
3.2. IDENTIFICACIÓN DEL MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO, MEDIANTE PROCESOS FISICOQUÍMICOS	53
3.2.1. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DEL SUSTRATO DE INULINA A SIROPE DE FRUCTOSA EN EL REACTOR DE FLUJO CONTINUO.....	53
3.2.2. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DEL SUSTRATO DE INULINA A SIROPE DE FRUCTOSA EN EL REACTOR BATCH.....	61
3.2.3. EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LOS REACTORES PROPUESTOS	68
3.3. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCTIVIDAD DE FRUCTOSA EN LOS REACTORES PROPUESTOS	70
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES.....	75
REFERENCIAS.....	76
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características fisicoquímicas de la inulina, inulina de “alto desempeño” (HP) y oligofruktosa	24
Tabla 2 Fuentes potenciales de inulina de origen vegetal	25
Tabla 3 Propiedades de la inulina y derivados.....	26
Tabla 4 Aplicaciones de alginato para microencapsulación de probióticos agregados a alimentos	35
Tabla 5 Ubicación y datos meteorológicos del lugar de experimentación	37
Tabla 6 Procedimiento seguido para la cuantificación de inulina como azúcares reductores	39
Tabla 7 Ejemplo Diluciones para curva patrón de Glucosa.....	43
Tabla 8 MSR utilizado para reactor Batch como medio de soporte Alginato de sodio.....	45
Tabla 9 MSR utilizado para reactor continuo como medio de soporte Luffa Cylindrica	45
Tabla 10 Estandarización de solución de fructosano para hidrólisis enzimática.....	52
Tabla 11 Resultados de concentración y productividad en función de los factores propuestos en el reactor de flujo continuo	55
Tabla 12 Análisis de varianza ANOVA para el modelo cuadrático reducido Reactor Flujo continuo	57
Tabla 13 ANOVA para el modelo de la concentración de fructosa para la optimización de las condiciones en el reactor de flujo continuo	58
Tabla 14 Resultados de concentración y productividad en función de los factores propuestos en el reactor Batch	62

Tabla 15 Análisis de varianza ANOVA para el modelo cuadrático reducido reactor Batch.....	63
Tabla 16 ANOVA para el modelo de la concentración de fructosa para la optimización de las condiciones en el reactor Batch	64
Tabla 17 Productividad final del reactor Batch (suma de ciclos)	67
Tabla 18 Costos Reactivos y Equipamiento Tecnología Continua.....	69
Tabla 19 Costos Reactivos y Equipamiento Tecnología Batch	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Principales Tipos de Fructosanos</i>	20
Figura 2 Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal (β -D- fructopiranosil) (B)	23
Figura 3 Fórmula esquelética molécula química de fructosa	27
Figura 4 Galería de enzimas	28
Figura 5 Tipos de Reactores	30
Figura 6 Reactor Tipo Batch.....	32
Figura 7 Reactor de lecho Empacado	33
Figura 8 Fibra natural “ Luffa cylindrica”	34
Figura 9 Alginato de Sodio	34
Figura 10 Esquema para la construcción de un modelo enzimático diseño y desempeño	36
Figura 11 Método AOAC 997.08	40
Figura 12 Formación de las perlas de alginato	40
Figura 13 Reactor con uso de Luffa cylindrica.....	41
Figura 14 Método DNS.....	42
Figura 15 Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS	42
Figura 16 Sistema de Cadena representación MSR.....	44
Figura 17 Ejemplo de RSM usando Design Expert 11	44

Figura 18 Diagrama del proceso.....	46
Figura 19 Elaboración de solución de alginato 2% m/v	48
Figura 20 Formación de esferificaciones y encapsulación de la enzima.....	49
Figura 21 a) Medición de esferas en mm; b) Vista de esfera en microscopio lente x4; c) Reactor de lecho empacado con encapsulaciones	49
Figura 22 Activación del medio de soporte orgánico (Luffa cilíndrica)	50
Figura 23 Reactor Batch con enzima inmovilizada en el medio orgánico	50
Figura 24 Dilución de inulina Sigma a 1 g/L.....	51
Figura 25 Cuantificación solución de inulina	52
Figura 26 a) Box Plot T vs Productividad; b) Box Plot pH vs Productividad	53
Figura 27 Box Plot Flujo vs Productividad Reactor Flujo Continuo.....	54
Figura 28 Perdida de volumen en el reactor a Temperaturas mayores a 50°C	56
Figura 29 Valores predichos vs reales del Reactor de Flujo continuo.....	58
Figura 30 Gráfica de contornos para la variable productividad en el reactor de Flujo continuo. 59	
Figura 31 Diseño de superficie respuesta correspondiente a la productividad en el reactor de flujo continuo.....	60
Figura 32 Diseño superficie Respuesta (Flujo y Temperatura)	60
Figura 33 a) Box Plot T vs Productividad; b) Box Plot pH vs Productividad; Reactor Batch	61
Figura 34 Valores predichos vs reales del Reactor Batch	64
Figura 35 Gráfica de contornos para la variable productividad en el reactor Batch	65

Figura 36 Diseño de superficie de respuesta correspondiente a la productividad en el reactor Batch	66
Figura 37 <i>Curva de reutilización de inulinasa inmovilizada en Luffa cylindrica comparación tratamiento</i>	68
Figura 38 Cinética del reactor de flujo continuo	71
Figura 39 Curva Patrón de Inulina para cuantificación por medio de espectrofotómetro UV-VIS con longitud de onda 715 nm.....	82
Figura 40 Curva Patrón de Fructosa para cuantificación por medio de espectrofotómetro UV-VIS con longitud de onda 540 nm.....	83
Figura 41 Gráfica de productividad vs ciclos del Reactor Batch por cada Tratamiento	84
Figura 42 Gráfica de eficiencia vs ciclos del Reactor Batch por cada tratamiento	85
Figura 43 Cuantificación de Fructosa.....	92
Figura 44 Proceso de estandarización de solución de inulina	92

INTRODUCCIÓN

PROBLEMA

La implementación de enzimas como agentes catalizadores están presentes en diversas áreas de la industria, por lo que se evalúa el comportamiento y el desarrollo de estas a través de la cinética o modelamiento enzimático (Olkiewicz et al., 2020). A pesar de que existen diferentes métodos para conocer la interacción de los factores con los medios de soporte en los diferentes reactores en donde se efectúan el uso de biocatalizadores, el campo bioquímico que estas abarcan es extenso, lo que manifiesta una limitada información de datos referentes a la cinética, que representen a un reactor en específico con factores y soportes orgánicos únicos.

Mientras más complejo sea el sistema y las variables a controlar, la obtención de datos y el modelamiento requerirá mayor control, por lo que se vuelve complicado de realizar, ya que el número de parámetros aumenta (Olkiewicz et al., 2020). Tratar de controlar un sistema muy complejo requerirá mayor inversión de tiempo y recursos, por lo que el desarrollo del modelamiento a ser realizado durará más, y esto implica a la par que los modelamientos presentes en artículos son en su mayoría a escala de laboratorio.

La existencia de artículos sobre el modelamiento de la cinética enzimática para la producción de sirope de fructosa es limitada, y en esta no se encuentra una comparación entre los modelos de cinética de reactores como lecho empacado con un medio de soporte orgánico con inmovilización de enzima mediante encapsulación frente a un reactor *Batch* implementando una inmovilización con brazo espaciador químico en *Luffa cylindrica*, por lo que se requiere una investigación aun mayor que permita fundamentar los valores que se obtengan.

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas el consumo de azúcares naturales y bajos en calorías como la fructosa han aumentado, la producción de edulcorantes saludables como alternativa a la sacarosa ha recibido un interés considerable. Hay diferentes procesos para la obtención de los azúcares, se parte principalmente de fructosanos mediante un proceso de hidrólisis que permite descomponerlos en compuestos más simples. Singh et al. (2018) mencionan que con la ayuda de un biocatalizador o enzima el proceso puede realizarse, el proceso químico también es una opción sin embargo este método puede contener adulterantes en el sirope de fructosa que impida el consumo, por lo que el enfoque enzimático es el más viable.

El modelado cinético es una poderosa herramienta para la ingeniería de reacciones bioquímicas, sirve para el análisis, predicción y optimización de un proceso enzimático, además junto con la simulación ayudan a comprender cómo se comporta un sistema en condiciones específicas (Olkiewicz et al., 2020). Conocer el comportamiento enzimático permite identificar el impacto que tienen los factores en la productividad, además comprender la importancia del tiempo de agotamiento que tiene la enzima en el reactor y el periodo de tiempo que se tiene para la producción del edulcorante, todo en conjunto brinda una evaluación del sistema que brinda no solo un mejor entendimiento, a la par contribuye para poder realizar un escalado del equipo.

La presente investigación es una continuidad de un proceso de investigación que tiene como predecesores a Montalvo (2020) y Ayala (2020), que realizaron procesos similares para la obtención de sirope de fructosa, el conocimiento recolectado permite la viabilidad del trabajo, ya que como se menciona anteriormente el reto primordial es la falta de información para sustentar la comparación de reactores. A pesar que la línea de investigación es similar, el enfoque no, lo que permite aportar con nuevo conocimiento sobre el modelamiento de la cinética enzimática.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la efectividad del proceso de conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa con un medio de soporte orgánico en un reactor tipo *Batch* y de lecho empacado.

OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Estandarizar las soluciones de fructosano (inulina) mediante espectrofotometría a partir de un blanco comercial analítico.
- Evaluar los soportes orgánicos (luffa y alginato de sodio), como medios de retención enzimática, mediante procesos fisicoquímicos.
- Establecer la cinética de productividad de fructosa en los reactores propuestos.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA (H_0)

H₀: La naturaleza del medio orgánico presente en los reactores y las condiciones de reacción (pH y temperatura) no afectan significativamente en la conversión enzimática.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_a)

H_a: La naturaleza del medio orgánico y las condiciones de reacción (pH y temperatura) presente en los reactores afecta en la conversión enzimática.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

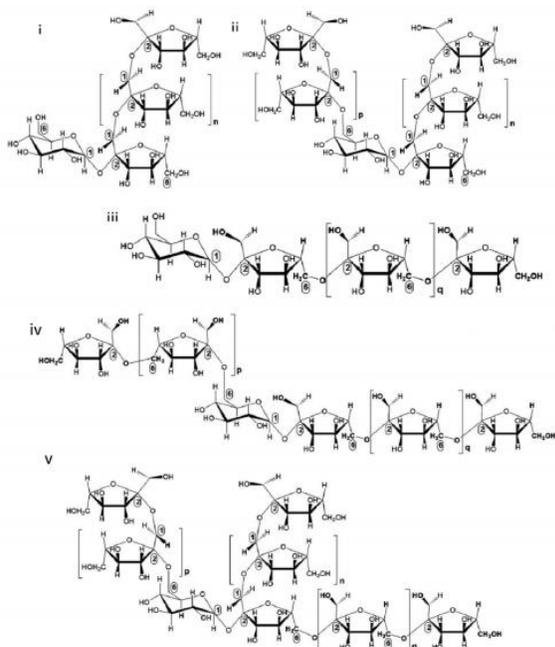
1.1. FRUCTOSANOS

Los fructosanos son carbohidratos no reductores formados de unidades fructosil presentando generalmente en su estructura, una molécula de glucosa terminal. Dicha estructura puede ser lineal o ramificada y en menor grado, cíclica (Urías-Silvas & López, 2004). Son moléculas sintetizadas por plantas y bacterias. Su estructura varía dependiendo de su origen. En diversas variedades de plantas, son carbohidratos de reserva en partes específicas de éstas.

Los fructosanos se definen como prebióticos ya que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas para el organismo y como se menciona en Sosa-Herrera y Delgado-Reyes (2017) los fructosanos son un grupo de oligosacáridos y fructooligosacárido presentes en la naturaleza los cuales se encuentran acumulados en cantidades de miligramos.

Figura 1

Principales Tipos de Fructosanos



Tomado de: Sosa-Herrera & Delgado-Reyes (2017)

En la Figura 1 tenemos la estructura de los tipos como se manifiesta en Sosa-Herrera y Delgado-Reyes (2017) los fructanos están constituidos por unidades de fructofuranosil unidas por enlaces β identificando: (i) Inulina, (ii) Levana, (iii) Graminados los cuales son una mezcla de fructanos, (iv) neo-inulina y (v) neo-levana.

1.1.1. FUENTES DE OBTENCIÓN

Como se mencionan en párrafos anteriores los fructosanos existen en una gran variedad de plantas, incluyendo la achicoria, ajo, cebolla, espárragos y algunas especies de bacterias. Los fructosanos comúnmente se acumulan donde el suministro de sacarosa excede la demanda, como se menciona en García (2006) se pueden acumular hasta constituir un 35 % del peso seco en el tejido de las hojas de los pastos, y hasta un 50 % del peso seco en los tejidos de la base del tallo y un 60 % del peso seco en tubérculos de la patata.

El mismo autor menciona que estos compuestos están presentes en abundante cantidad en la zona de crecimiento de las hojas y pastos, con rápida actividad de división y elongación, estos fructosanos son de bajo grado de polimerización, entre estas especies se encuentra las inulinas y en otros tejidos se pueden ver levanos. Durante el ciclo diario, las hojas maduras acumulan fructosanos durante el día y los mueven durante la noche para mantener el proceso de traslocación de las hojas.

De acuerdo con Sosa-Herrera y Delgado-Reyes (2017) la obtención de harina de tubérculos de alcachofa de Jerusalén o productos similares que contienen inulina y pueden emplearse directamente o ser la materia prima para la obtención de fructosa u oligosacáridos. A pesar de existir gran cantidad de estudios con respecto a las plantas almacenadoras de fructosanos, no existe un común denominador que especifique la condición ambiental, factor externo o tipo de agobio para inducir el metabolismo y acumulación de estas moléculas.

Para complementar el párrafo anterior García (2006) menciona que el metabolismo debería ser visto como un mecanismo de adaptación de un determinado número de especies para lograr sobrevivir bajo determinadas condiciones ambientales. Debe ser recalado que aquellas plantas que acumulan fructosanos, frecuentemente comparten sus hábitats con especies que no acumulan fructosanos.

1.1.2. APLICACIONES TECNOLÓGICAS

Es importante tener en cuenta que las aplicaciones tecnológicas de los fructosanos dependen directamente de sus características estructurales, las cuales a su vez están asociadas con la fuente de su origen.

De acuerdo con García (2006):

Los fructanos de cadena corta tienen un sabor dulce suave, y al no ser degradados pueden ser usados como edulcorantes naturales y los de cadena más larga tienen propiedades espesantes, formando emulsiones que presentan un comportamiento similar a las grasas, pero con un sabor neutro, por lo que en ciertas situaciones pueden ser utilizadas en alimentos de bajas calorías. Actualmente se están empleando como ingredientes en la fabricación de helados y yogur.

También dentro del contexto médico existe mucho interés en los fructanos dado que no producen caries al ser utilizados como edulcorantes. Hay un creciente interés en el uso potencial de la inulina y sus derivados como matrices de liberación controlada (Sosa-Herrera & Delgado-Reyes, 2017). El interés en la inulina y otros fructosanos se basa, en principio, en su utilización como materia prima en la producción de jarabe fructosado.

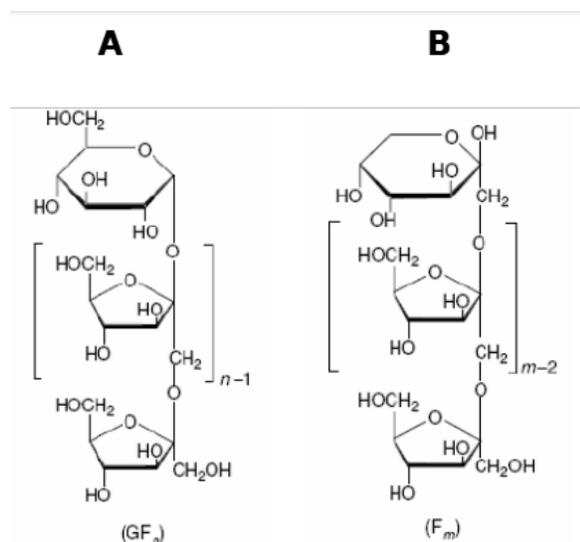
1.2. INULINA

La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36.000 especies de plantas, es no digerible y está presente en muchos vegetales, frutas y cereales (Madrigal & Sangronis, 2007). En la misma cita se considera que la inulina químicamente se ha definido como un material polidisperso de hidrato de carbono que está compuesto de cadenas de 25 a 30 moléculas de fructosa unidas por enlaces β (1-2) glucosídicos y terminada con una molécula de sacarosa.

Los fructanos tipo inulina (FTI) para ser clasificados como tal deben presentar enlaces glicosídicos β (2-1) fructosil-fructosa; estos polímeros de fructosa, en su forma β -D furanosa, pueden contener entre 2 y 10^6 unidades monosacáridas (Armas Ramos et al., 2019). Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina, la oligofructosa y los fructooligosacáridos.

Figura 2

Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal (β -D-fructopiranosil) (B)



Tomado de: Madrigal & Sangronis (2007)

Las cadenas de fructosa tienen la particularidad de terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace α -(1,2) (residuo -D-glucopiranosil), como en la sacarosa, pero también el monómero terminal de la cadena puede corresponder a un residuo de β -D-fructopiranosil (Madrigal & Sangronis, 2007).

1.2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA INULINA Y DERIVADOS

De acuerdo con Madrigal y Sangronis (2007):

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal. A nivel industrial, la inulina se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual, pero oligofructosa además de su presentación en polvo se consigue como jarabe viscoso (75% de materia seca), ambos incoloros.

Tabla 1

Características fisicoquímicas de la inulina, inulina de “alto desempeño” (HP) y oligofruktosa

Características	Inulina	Inulina HP	Oligofruktosa
Estructura Química	GF _n (2=n=60)	GF _n (10=n=60)	GF _n +F _n (2=n=7)
GP	12	25	4
Materia seca (g/100g)	95	95	95
Pureza (g/100g)	92	99.5	95
Azúcares (g/100g)	8	0.5	5
pH	5-7	5-7	5-7
Cenizas (g/100g)	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Metales pesados (g/100g secos)	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Apariencia	Polvo Blanco	Polvo Blanco	Polvo Blanco o jarabe viscoso
Sabor	Neutral	Neutral	Moderadamente dulce
Dulzor % (vs. Sacarosa= 100%)	10	Ninguno	35
Solubilidad en agua a 25°C (g/L)	120	25	> 750
Viscosidad en agua (5% p/p sol. acuosa) a 10 °C (mPa.S)	1.6	2.4	<1.0
Funcionalidad en alimentos	Sustituto de grasas	Sustituto de grasas	Sustituto de azúcar
Sinergismo	Con agentes gelificantes	Con agentes gelificantes	Con edulcorantes intensos

Tomado de: Madrigal & Sangronis (2007)

En Madrigal y Sangronis (2007) se menciona que la inulina nativa, a diferencia de la inulina HP o de alta pureza, contiene azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), lo que le confiere cierto dulzor (10% del dulzor de la sacarosa). La inulina HP presenta menor solubilidad que la inulina nativa, debido a la casi total ausencia de azúcares libres (0,5 % de materia seca).

1.2.2. FUENTES DE INULINA

La inulina se puede encontrar en plantas fanerógamas dicotiledóneas, otras familias como las *Liliaceae* como el ajo y la cebolla; *Compositae* como la achicoria, *Agavaceae* como agave; y *Cactaceae* como la tuna y el nopal (Escobar, 2017). En el apartado de fuentes de los fructosanos que se habló anteriormente se mencionan en general donde se encuentran en general, sin embargo, en esta nueva cita se especifica ahora uno de estos tipos la inulina además a continuación en la Tabla 2 se muestra el contenido que hay en diferentes plantas.

Tabla 2*Fuentes potenciales de inulina de origen vegetal*

Fuente	Contenido de Inulina (%)
Ajo	18.00
Espárragos	10-15
Salsifi	15-20
Alcachofa	14-16
Tuna	7.38
Tubérculos de Dalia	15-20
Achicoria	15-20
Jicama (yacón)	20.00
Bardana	11.26
Agave tequilana Weber azul	22.97

Tomado de: Escobar (2017)**1.2.3. APLICACIONES DE LA INULINA**

Las aplicaciones científicas y tecnológicas de la inulina derivan de sus propiedades físicas y químicas, son ampliamente dependientes del grado de polimerización promedio (GPP)(Escobar, 2017). En esta misma cita se puntúa que el dulzor de la oligofructosa es ideal para edulcorantes bajos en calorías, la inulina con más de 10 unidades de fructosa se emplea como estabilizador de preparaciones, sustituto de grasa en embutidos, postres lácticos y cremas. Además, por su capacidad de formar gel ha llevado a su utilización en derivados cárnicos.

La inulina de cadena larga forma geles de partículas, similares a los que son formados por algunos almidones (Sosa-Herrera & Delgado-Reyes, 2017). Respecto al punto mencionado el mismo autor destaca que la disolución presenta partículas de gel con características parecidas a las de las grasas, por encima del 50% en concentración éstas mantienen una textura similar a la grasa y se convierten en geles más firmes.

De acuerdo con Armas Ramos et al. (2019) el uso de los fructanos tipo inulina en un estudio de obesidad donde existió el consumo de este durante tres meses por mujeres obesas, dio como resultado la reducción de la masa grasa, los niveles séricos de lipopolisacáridos (LPS) y metabolitos como el hipurato, el lactato y la fosfatidilcolina, como aclaratoria el mismo autor confirma que la reducción de los niveles de LPS circulantes debido al establecimiento de una

microbiota intestinal saludable es un factor clave importante para el desarrollo de una baja inflamación asociada con la obesidad y las enfermedades metabólicas

De acuerdo con García (2006):

Una dieta rica en fructosanos puede traer consigo mejoras en las condiciones intestinales y en la salud en general, como son el crecimiento de lacto bacilos, la reducción del pH fecal que facilita la absorción de nutrientes, la reducción de metabolitos tóxicos, y la reducción de triglicéridos y colesterol, entre otros. (pág.10)

Tabla 3

Propiedades de la inulina y derivados

Aplicación	Funcionalidad
Productos Lácteos	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, emulsificantes, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Postres congelados	Textura, depresión en el punto de congelación, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado, sustituto de grasas
Productos horneados	Disminución de aw, sustituto de azúcar
Cereales de desayuno	Crujencia, capacidad de expansión
Preparación con frutas (no ácidas)	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, estabilidad de emulsión, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Aderezos de ensaladas	Cuerpo y palatabilidad, sustituto de grasa
Productos Cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasa
Chocolate	Sustituto de azúcares, humectante

Tomado de: Madrigal & Sangronis (2007)

1.3. FRUCTOSA

Es un azúcar simple con fórmula química $C_6H_{12}O_6$, similar a la de la glucosa; ambas se reducen fácilmente a sorbitol tanto in vitro como in vivo; la fructosa difiere por la presencia de un grupo ceto unido al carbono 2 de la molécula, en tanto la glucosa presenta un grupo aldehído en el

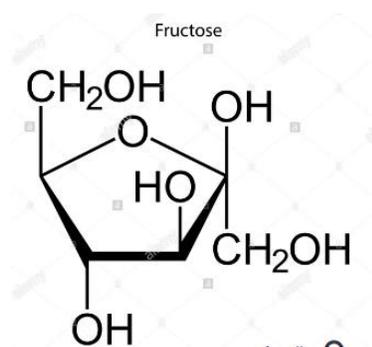
carbono 1 (Pérez Cruz et al., 2007). De acuerdo con Riveros et al. (2014) la fructosa es un monosacárido presente en forma natural en frutas, verduras, miel y en forma agregada en alimentos etiquetados como de dieta, bebidas y néctares.

Riveros et al. (2014) mencionan:

La fructosa a pesar de tener una nomenclatura similar a la glucosa presenta diferencias en su metabolismo, por ejemplo, se absorbe más lentamente que la glucosa, aunque es captada y metabolizada de manera más rápida por el hígado, su efecto estimulante sobre la liberación de insulina es inferior al de la glucosa y su captación es independiente de ésta.

Figura 3

Fórmula esquelética molécula química de fructosa



Tomado de: Grebeshkov (2021)

1.3.1. USOS DE LA FRUCTOSA

La fructosa se utiliza como edulcorante en alimentos preparados, o se vende granulada para uso de los consumidores, a quienes erróneamente se les ha hecho creer que, por no requerir de insulina para ser metabolizada, se puede utilizar sin restricción alguna (Esquivel Solís et al., 2009). El mismo autor menciona que la principal fuente de fructosa a nivel de la industria de alimentos es el jarabe o sirope de maíz alto en fructosa, que se adiciona en gran cantidad de alimentos como cereales de desayuno, postres, repostería, helados, confites, jugos, bebidas azucaradas y refrescos gaseosos

En la actualidad, la fructosa ha reemplazado a la sacarosa en muchos alimentos y bebidas por su poder edulcorante, bajo costo, propiedades funcionales y estabilidad del producto (Pérez Cruz et al., 2007). Se menciona también que antes de los avances tecnológicos era económicamente poco

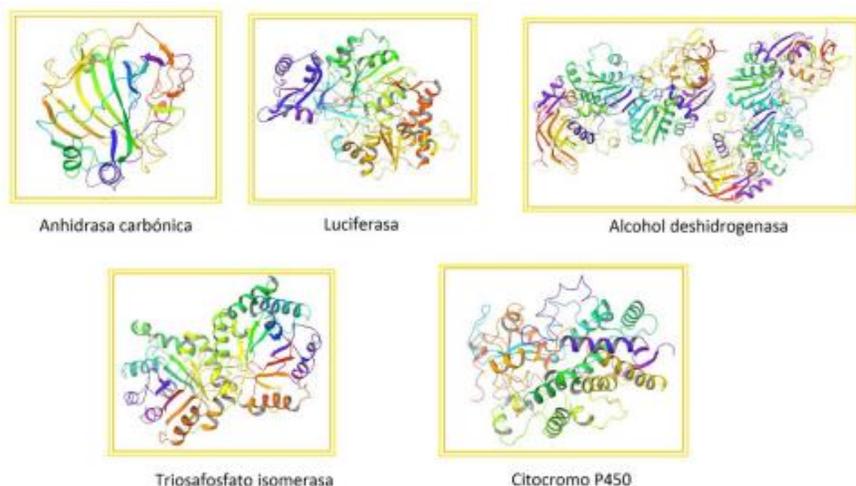
factible su producción, y no es hasta 1967 cuando se comienzan a introducir diversos productos derivados de la sacarosa de las remolachas, almidón de arroz, trigo, tapioca, papa y principalmente del maíz, que se añaden a los alimentos y bebidas como jarabe de miel de alta fructuosa.

1.4. ENZIMAS

De acuerdo con Ramírez Ramírez y Ayala Aceves (2014) las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. Se menciona también la misma referencia dice que como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis.

Figura 4

Galería de enzimas



Tomado de: Ramírez Ramírez & Ayala Aceves (2014)

Las enzimas además de ser catalizadores muy potentes, estas poseen una especificidad notable, ya que generalmente catalizan la conversión de un solo tipo de moléculas de un sustrato en moléculas de producto (Robinson, 2015). El mismo autor menciona que un ejemplo de esa característica es la fosfatasa alcalina que puede eliminar un grupo fosfato de una variedad de sustratos.

1.4.1. INULINASA

La inulinasa es una β -fructofuranosidasa que actúan sobre los enlaces β (2 \rightarrow 1) de la inulina produciendo en su mayoría fructosa, y glucosa (Mendoza Sandoval, 2017). De acuerdo con Castillo Calderón & Chamy Maggi (2010) caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1.5 a 2 veces la sacarosa.

Las enzimas inulinasas se pueden dividir en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas catalizan la remoción de unidades de fructosa desde el inicio hasta el final de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa (Castillo Calderón & Chamy Maggi, 2010). Continuando con la cita anterior el autor explica que la inulinasa puede ser obtenida a partir de especies vegetales y de muchos microorganismos, siendo los últimos capaces de producir suficiente enzima para aplicaciones industriales, como hongos como *Aspergillus sp*, levaduras como *Kluyveromyces sp* y algunas bacterias, aunque las levaduras son las más efectivas.

1.4.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA INULINA

Castillo Calderón & Chamy Maggi (2010) describen los procesos de hidrólisis enzimática para eso se inmovilizan células *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa en una matriz de gelatina de poro abierto tratado con glutaraldehído, manteniéndose una actividad residual mayor al 90 %, con un pH de 6.0 en un reactor por lotes y se alimenta con inulina, en el reactor la hidrólisis fue del 93 % alcanzándose una concentración de fructosa de 42 g/l al término de 3 horas. Cuando se operó el reactor continuo con 65.7 g/l de células inmovilizadas se obtuvo un aproximado del 100 % de hidrólisis. Lo que se quiere explicar es que este proceso es el desdoble de la inulina a fructosa con la ayuda de un m/o que produce inulinasa que es un factor clave para lograr obtener la mayor cantidad del edulcorante.

1.5. REACTOR

De acuerdo con Ibáñez (2019):

Un Reactor es un equipo que ha sido diseñado para que en su interior se produzca una o varias reacciones químicas de forma segura y con el menor coste posible. Cada reactor químico estará diseñado en función de los procesos o reacciones químicas que se espera producir en su interior, así pues, el reactor puede constar de diferentes elementos, por motivos químicos o de seguridad y los materiales del reactor y sus componentes también serán elegidos en función de las reacciones que se producirán y las propiedades químicas de sus reactivos como por ejemplo puede ser la corrosión. (pág.3)

Figura 5
Tipos de Reactores



Tomado de: Ibáñez (2019)

Continuando con la cita anterior menciona que existen diversos tipos de reactores y con diversos materiales de construcción como pueden ser de acero inoxidable, cerámicos o esmaltados, o de vidrio, además el elemento principal del reactor es el recipiente hermético donde se producen las reacciones, este recipiente cuenta con líneas de entrada y salida para las sustancias y está gobernado por un algoritmo de control.

1.5.1. REACTOR TIPO BATCH (LOTE)

Son recipientes con agitación en el cual se cargan los reactivos y se descargan una vez la reacción ha finalizado. Se caracterizan por no trabajar en condiciones estacionarias. Tanto la temperatura como las composiciones varían constantemente (Ibáñez, 2019). Además, el autor menciona que su principal ventaja es la flexibilidad, por ello, debido a la necesidad de las industrias a producir una amplia variedad de productos, es el tipo de reactor más utilizado en la industria, ya que ofrecen mayor facilidad para adaptarse a diferentes producciones.

Los reactores *Batch* de acuerdo Coronel Aguilar (2014), se emplean para operaciones a pequeña escala, para experimentar con procesos nuevos a escala de laboratorio, para fabricar productos costosos o de difícil elaboración su construcción tiene un grado de complejidad menor en comparación con los otros tipos de reactores. Otro punto clave que es mencionado por Ibáñez (2019) suelen ser utilizados para la fabricación de reacciones de mayor complejidad y en especial para reacciones exotérmicas o de 2 fases (gas-liquido), se suelen utilizar operaciones de semi-continuidad en las cuales se carga un primer reactivo y se dosifica lentamente el resto de los reactivos para disponer de un mayor control.

1.5.1.1. Ecuación Para Desarrollar un Reactor Tipo *Batch*

De acuerdo con Coronel Aguilar (2014) es necesario primero realizar un balance de materiales, para esto hay que tomar en cuenta que en un reactor tipo *Batch* al ser un intermitente, este no tiene entradas, ni salidas; en este tipo de reactor los reactivos se cargan, y se espera hasta que la reacción termine durante cierto periodo de tiempo.

El autor menciona que se necesita conocer dos términos y sus fórmulas el primero es “Velocidad de consumo o pérdida de un reactivo al reaccionar dentro del volumen del reactor” que se expresa como $(-r_A)V$ donde $-r_A$ es la velocidad de reacción de la especie A y V es el volumen donde ocurre la reacción.

El segundo término es “Velocidad de acumulación del reactivo dentro del volumen del reactor” este se expresa:

$$\frac{dN_A}{dt} = \frac{d[N_{A0}(1 - X_A)]}{dt} = N_{A0} \frac{dX_A}{dt} \quad (1)$$

Siendo N_{A0} , las moles de la especie A iniciales; X_A la conversión de A; t el tiempo de residencia. Juntando los términos en una ecuación Coronel Aguilar (2014) presenta la siguiente igualdad:

$$(-r_A)V = N_{A0} \frac{dX_A}{dt} \quad (2)$$

La expresión final que se obtiene luego integrar es:

$$t = N_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{(-r_A)V} \quad (3)$$

Figura 6
Reactor Tipo Batch



Tomado de: Bioingeniería (2021)

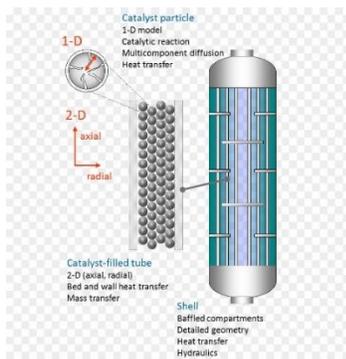
1.5.2. REACTOR DE LECHO EMPACADO

Un lecho fluidizado o lecho empacado de acuerdo con Iborra et al. (2013) es un lecho de partículas sólidas en suspensión por efecto del flujo ascendente de uno o más fluidos. Dependiendo del tipo de fluido se pueden distinguir los siguientes lechos fluidizados: Gas-Sólido catalítico y no catalítico Líquido-Sólido catalítico y no catalítico Gas-Líquido-Sólido.

Entre otras definiciones Urzúa (2008) menciona que un reactor de lecho empacado consiste en un reactor generalmente cilíndrico, cuyo interior se encuentra relleno con material de empaque. El empaque puede ser dispuesto al azar al interior del reactor o siguiendo un arreglo geoméricamente estructurado, además el autor tiene en cuenta de que hay diferentes rellenos cada uno con sus respectivas ventajas y engloba todos los aspectos de costos, disponibilidad de superficie, caída de presión, peso y resistencia a la corrosión.

El propósito principal de esta clase de reactores es mejorar el contacto entre las fases participantes del proceso. La fabricación y operación de este tipo de reactores es de bajo costo, y su uso se extiende a numerosas operaciones, tales como reacciones químicas, procesos de destilación, o limpieza de fluidos (Urzúa, 2008) .

Figura 7
Reactor de lecho Empacado



Tomado de: Freepng (2021)

1.6. MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO “*LUFFA CYLINDRICA*”

De acuerdo con Navarrete et al. (2009)

El estropajo, también conocido como *Luffa cylindrica*, es una enredadera de la familia de las cucurbitáceas. Es una planta sensible a la salinidad y no es conveniente cultivarla cerca del mar, requiere suelos bien drenados, ricos en materia orgánica y con abundante nitrógeno, y fósforo, su cultivo prefiere temperaturas elevadas, pero es igualmente adaptable a climas templados donde varía la calidad y características de la fibra, así como también su elasticidad y resistencia. (pág.13)

Castillo Ruiz et al. (2016) mencionan que el uso de la Luffa se implementa como filtros para la limpieza del agua, por lo que este material orgánico tiene un amplio campo de utilidades, tanto en el uso de reactores biológicos como en filtros percoladores o biológicos.

Adicionalmente Navarrete et al. (2009) mencionan que la fibra de Luffa tiene otras utilidades, entre ellos se pueden citar: suelas para zapatillas, rellenos para las industrias mobiliarias y textiles, base para cierta variedad de papel, filtros para piscinas.

Figura 8

Fibra natural “Luffa cylindrica”



Tomado de: Navarrete et al. (2009)

1.7. MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO “ALGINATO DE SODIO”

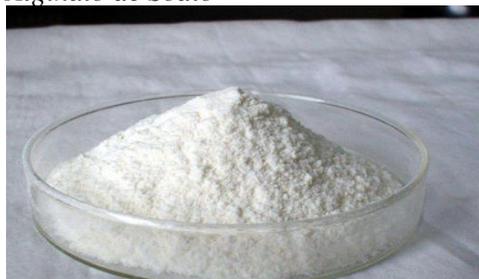
Los alginatos son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas marinas. Comprenden hasta el 40 % de su peso seco, Son los componentes estructurales de la pared celular de las algas, cuya función principal es dar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua (Romero et al., 2013).

De acuerdo con Hernández-Carmona et al. (2012)

Los alginatos se utilizan ampliamente en la industria para darle consistencia y un aspecto adecuado a productos lácteos y productos enlatados; la textura es mejorada y la humedad es retenida con alginatos en productos de pastelería, como las mezclas para pasteles y los merengues. En alimentos congelados las propiedades de los alginatos aseguran la textura suave y el descongelamiento uniforme. La estabilización de la espuma de la cerveza es una de las funciones más usuales de los alginatos.

Figura 9

Alginato de Sodio



Tomado de: Gao (2021)

Hernández-Carmona et al. (2012) mencionan que este compuesto tiene un uso en la inmovilización de organismos beneficiosos para el tratamiento de aguas, residuales y como promotores del crecimiento de plantas, al igual que inmovilización de levaduras. Entre otras propiedades según Romero et al. (2013) los alginatos de sodio, potasio, calcio y amonio, ácido algínico y el alginato de propilenglicol, son aditivos alimenticios reconocidos como inocuos y seguros.

Tabla 4

Aplicaciones de alginato para microencapsulación de probióticos agregados a alimentos

Bacterias	Matríz	Aplicación en alimentos
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Alginato	Leche, queso feta
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bificum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Alginato	Queso kasar y blanco
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Alginato	Yogurt
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Alginato/pectina/ quitosano	Leche fermentada
<i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Alginato	Helados
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Alginato	Postres Congelados
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	Yogur

Tomando de: Romero et al. (2013)

1.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA

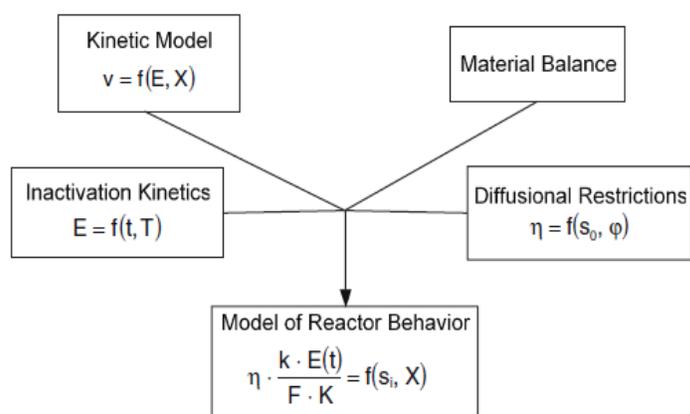
La cinética enzimática hace referencia al análisis cuantitativo de todos los factores que determinan el potencial catalítico de una enzima (Bommarius & Riebel-Bommarius, 2004). Los autores mencionan que se debe tener en cuenta valores de pH y temperatura, como factores importantes para el proceso enzimático, sin embargo, depende mucho del reactor en que se aplique por lo que sí es uno de flujo continuo otro factor importante a destacar sería el flujo con el que pasa la solución de sustrato. Illanes (2008) menciona que la velocidad de reacción se refiere siempre a la reacción inicial donde se expresa el potencial catalítico máximo de la enzima y los diversos factores que lo afectan, dando así la cuantificación de los efectos sobre el potencial catalítico máximo.

La importancia del estudio de la cinética enzimática, se enfoca en una perspectiva fundamental científica que permite la formulación de modelos moleculares para la actividad de la enzima, y

razones tecnológicas, con el fin de evaluar el modelo cinético del diseño y el rendimiento del reactor (Illanes, 2008). En la cita anterior se menciona también que existen diferentes requerimientos para analizar el rendimiento del reactor entre ellos están: 1) expresión cinética de la reacción catalizada; 2) un balance de materia sobre el proceso; 3) expresión cinética de la inactivación de enzimas en el funcionamiento del reactor; 4) eventuales restricciones de la transferencia de masa.

Figura 10

Esquema para la construcción de un modelo enzimático diseño y desempeño



Tomado de: Illanes (2008).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El desarrollo de la experimentación se realizó en la ciudad de Ibarra, en los diferentes laboratorios que se encuentran a disposición de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte , en la siguiente Tabla 5 se detalla los laboratorios y la ubicación del experimento.

Tabla 5
Ubicación y datos meteorológicos del lugar de experimentación

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Altitud	2225 m.s.n.m
Humedad Relativa Promedio	62%
Temperatura media	17 °C
Pluviosidad	503-1000 mm. Año
Sitio 1	Antiguo Hospital “San Vicente de Paul” – Laboratorios de Análisis Físico-Químicos FICAYA
Sitio 2	Laboratorio de análisis microbiológico FICAYA

Tomado de: Wikipedia (2021)

2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Para el desarrollo de este trabajo se requirió diferentes materiales, instrumentos, equipos e insumos que estuvieron presentes en los procesos que se realizaron para cumplir los objetivos.

2.2.1. INSTRUMENTOS

- Probeta (Vol. 50 ml); (Ap.=±1 ml)
- Micropipeta (Vol. 100-1000 µl); (Ap.=±0.5 µl)
- Vasos de precipitación (Vol. 500 ml); (Ap.= ±100 ml)
- Tubos de ensayo (Vol. 20 ml); (Ap.= no calibrado)
- Frascos de vidrio (Vol. 500 ml); (Ap.= ±50 ml)
- Erlenmeyer (Vol. 500 ml); (Ap.= ±50 ml)
- Pipeta (Vol. 5 ml); (Ap.= ±0.05 ml)
- Pipeta (Vol. 1 ml); (Ap.= ±0.01 ml)
- Cubetas para espectrofotómetro

2.2.2. EQUIPOS

- Balanza analítica (Ap.=±0.01 g)
- Termómetro de mercurio (Ap.=±°C); Ran=[-20 a +100] °C
- Autoclave (Marca: PHCBI)
- Espectrofotómetro (Marca: Jenway)
- Estufa (Marca: BIOBASE)
- Agitador magnético (Ran:[100 rpm-2200 rpm])

2.2.3. MATERIALES E INSUMOS

- Inulina comercial (Marca: SIGMA)
- Luffa (*luffa cylindrica*)
- Inulinasa (Marca: SIGMA)
- Alginato de sodio [C₆H₇O₆Na]
- Etanol [C₂H₅OH]; (C % 70% a 90 %)
- Papel empaque
- Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)
- Cloruro de calcio [CaCl₂]; (C % 10%)
- Ácido Cítrico [C₆H₈O₇]; (C: 0.2 M)

2.3. MÉTODOS

Se detallará a continuación diferentes métodos para cumplir con los objetivos planteados en este documento.

2.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE SOLUCIONES DE FRUCTOSANO (INULINA) MEDIANTE ESPECTOFOTOMETRÍA A PARTIR DE UN BLANCO COMERCIAL ANALÍTICO

La estandarización se realizó a través del método AOAC 997.08 publicado en 1996 y 1997 como se menciona en Fuertes (2014) que se basa en un cromatografía de intercambio iónico para medición de fructanos en alimentos. Con la ayuda del espectrofotómetro se medirá el nivel de absorbanza a 715 nm y se realiza una curva patrón de inulina.

Tabla 6

Procedimiento seguido para la cuantificación de inulina como azúcares reductores

Muestra	Repeticiones		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Extracto crudo	1 ml	1 ml	1 ml
Reactivo A	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reactivo B	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Todos los tubos con las soluciones ya añadidas fueron puestos en agua a temperatura de ebullición por 15 minutos			
Luego se enfriaron en agua por 10 minutos			
Reactivo C	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a leer su absorbanza a 715 nm.			

Tomado de: Pinango (2019)

En Pinango (2019) la descripción de los reactivos pertenecientes a la Tabla 6 son:

- Reactivo A: Solución de cianuro de potasio KCN (9.2 mM), carbonato de sodio Na₂CO₃ (45 mM), bicarbonato de sodio NaHCO₃ (109 mM).
- Reactivo B: Solución de ferricianuro de potasio K₃Fe(CN)₆ (1.5 mM).
- Reactivo C: Solución de sulfato férrico amoniacal (FeNH₄(SO₄))₂ (10.6 mM), ácido sulfúrico H₂SO₄ (50 mM).
- Estándar de inulina de chicoria marca Sigma: 1 mg/ml

Figura 11*Método AOAC 997.08*

Tomado de: Montalvo (2020)

2.3.2. IDENTIFICACIÓN DEL MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO, MEDIANTE PROCESOS FÍSICOQUÍMICOS.

Lo que se detallará son los diferentes procesos que se implementaron para la inmovilización enzimática en los medios que se proponen a continuación.

2.3.2.1. Inmovilización enzimática mediante alginato de sodio

Para la preparación del primer medio que se utiliza el alginato de sodio al 2% m/v para encapsulación de la enzima inulinasa, de acuerdo con el artículo científico de Lara Fiallos et al. (2021), se debe diluir la enzima en agua destilada de proporción 1:1, se vierte la solución de alginato de sodio a 120 rpm para homogenización, la mezcla resultante se debe dejar gotear en una solución de cloruro de calcio al 10% , con la ayuda de una pipeta de 3 mL, se deja reposar 30 min y se lava las perlas resultantes para eliminar algún rastro del cloruro de calcio. Además se utiliza una temperatura de 35 °C a un pH de 9,6 esto se menciona en el mismo documento.

Figura 12*Formación de las perlas de alginato*

Tomado de: Ayala (2020)

2.3.2.2. Inmovilización enzimática mediante *Luffa cylindrica*

Para la obtención de la Inmovilización enzimática con *Luffa cylindrica* se hará por unión covalente, para la preparación de la luffa se requiere algunos pasos mencionados en Saeed y Iqbal (2013) se debe cortar *L. cylindrica* en mitades longitudinales en discos rectangulares de 18x20 mm y 2-3mm de espesor, se remoja en agua hirviendo durante 30 min, se lava con agua corriente y se coloca en agua destilada 24 horas, se cambia de 3 a 4 veces, se deja secar y finalmente una vez finalizado el secado se esteriliza en autoclave (120 °C; 1,06 kg/cm²;20 min).

En Montalvo (2020) se realiza un proceso similar con similitud en los factores de esterilizado, además se utiliza ácido cítrico a 0.2 M con relación 1:50 como brazo espaciador para finalmente tener una luffa activa para la encapsulación enzimática y posteriormente implementarla en el reactor.

Figura 13

Reactor con uso de *Luffa cylindrica*



Tomado de: Montalvo (2020)

2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCTIVIDAD DE FRUCTOSA EN LOS REACTORES PROPUESTOS.

Se aplicó el método de Miller o método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), para esto se debe realizar una dilución de acuerdo con Díaz (2020) que fue tomado de Miller (1959) para el proceso se disolvieron 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado más 0,5 g de DNS, y se afora a 50 ml con agua destilada, es necesario guardar en un frasco ámbar a temperatura de 4 °C. Se requiere realizar una curva de calibración de la fructosa para la referencia en los procesos de conversión enzimática o hidrólisis de esta, se utilizará el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Para construir la curva de calibración se utilizan disoluciones que contienen concentraciones conocidas de analito, llamadas disoluciones patrón o estándar (Dosal & Villanueva, 2008). El mismo apartado los autores mencionan que los estándares o disoluciones patrón para construir la recta de calibrado deben ser preparadas en forma independiente, a partir de una o varias soluciones madre; el número de puntos a escoger dependerá del uso que se dé a la curva de calibración.

Figura 14

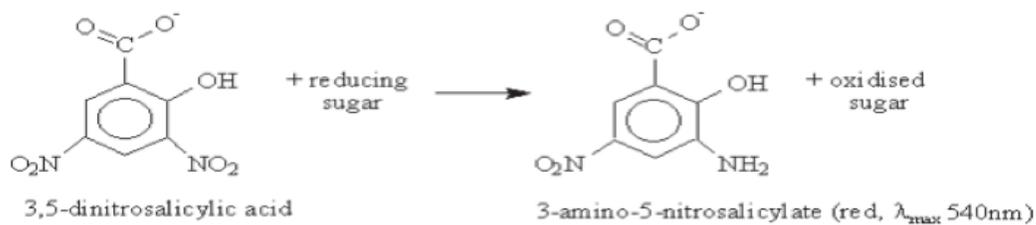
Método DNS



Tomado de: Montalvo (2020)

Figura 15

Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS



Tomado de: Carrillo (2016)

De acuerdo con Carrillo (2016) en el modelo de curva de calibración lineal, la pendiente vendrá dada por la ecuación matemática:

$$y = mx + b \quad (4)$$

Donde “m” es la pendiente, “x” la concentración e “y” la señal de respuesta.

La sensibilidad de calibración es la pendiente de la curva de calibrado. Por tanto, en una curva de calibrado lineal la sensibilidad es siempre la misma y no va a depender de la concentración, ya que para que se cumpla $y = mx + b$, las concentraciones deben tener una incertidumbre (Carrillo, 2016).

Tabla 7

Ejemplo Diluciones para curva patrón de Glucosa

Tubo	Volumen de la solución de glucosa de 1 g/L (ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Concentración de glucosa de la muestra (g/L)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	0.2
3	0.2	0.8	0.4
4	0.3	0.7	0.6
5	0.4	0.6	0.8
6	0.5	0.5	1.0
7	0.6	0.4	1.2
8	0.7	0.3	1.4
9	0.8	0.2	1.6
10	0.9	0.1	1.8
11	1.0	0.0	2.0

Tomado de: Carrillo (2016)

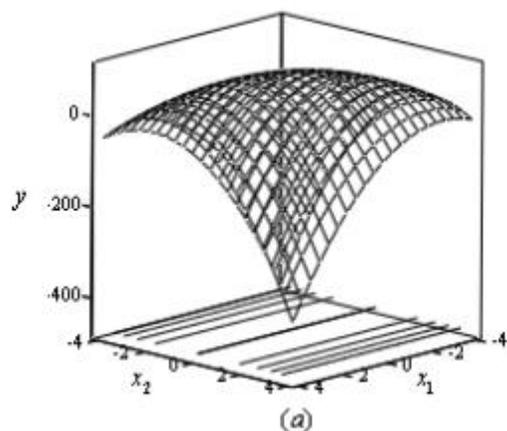
2.3.3.1. Diseño experimental- Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La naturaleza secuencial de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), inicia cuando existe una característica de interés a ser medida y continúa con la generación de ideas para determinar el conjunto de factores o variables controlables significativas que determinan su comportamiento (Nóchez & Ventura, 2009). En el mismo documento se especifica que el propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

La ecuación resultante tiene relación con la productividad teniendo como factores principalmente el pH, temperatura y flujo, lo que dará como resultado una ecuación polinómica de diferente orden de acuerdo con el ajuste de mejora, pero que tendrá una expresión similar a:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \dots \quad (5)$$

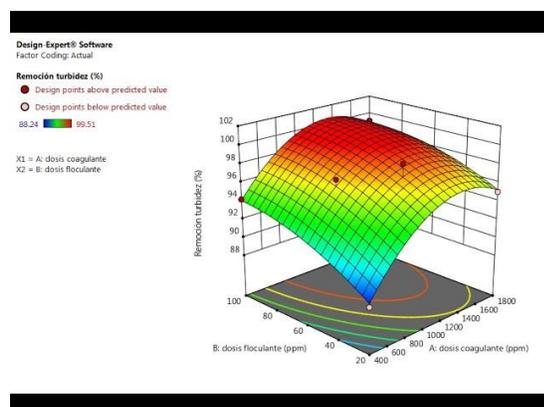
Figura 16
Sistema de Cadena representación MSR



Tomado de: Nóchez & Ventura (2009)

Se implementó el programa Design Expert 13.0 para evaluar los diseños experimentales, una breve definición la presenta Anderson (2018) Design Expert está diseñado para quienes no son estadísticos y necesitan ejecutar el diseño de experimentos solo ocasionalmente. La interfaz intuitiva proporciona una navegación fácil para construir y analizar diseños. Sigue siendo el único paquete de software de diseño de experimentos que determina la causa y efectuar relaciones con la máxima eficacia .

Figura 17
Ejemplo de RSM usando Design Expert 11



Tomado de: Multiverso (2019)

Se reprodujo el diseño experimental de Ayala (2020) y Montalvo (2020) que se puede observar en la Tabla 8 y 9, se examinara la influencia que tiene en la productividad, al cambiar el medio de

soporte, es necesario el uso de estos diseños ya que se logrará que el análisis y los resultados a obtener sean fiables para una correcta comparación con los estudios realizados con anterioridad.

Tabla 8

MSR utilizado para reactor Batch como medio de soporte Alginato de sodio

Tratamiento	Valores codificados		Valores reales	
	[T] °C	[pH]	[T] °C	[pH]
R1	0	0	42	3.4
R2	0	-1	42	2.9
R3	1	0	47	3.4
R4	0	0	42	3.4
R5	-1	0	37	3.4
R6	0	0	42	3.4
R7	1	-1	47	2.9
R8	1	1	47	3.9
R9	0	0	42	3.4
R10	-1	1	37	3.9
R11	-1	-1	37	2.9
R12	0	1	42	3.9

Tomado de: Lara Fiallos et al. (2021)

Tabla 9

MSR utilizado para reactor continuo como medio de soporte Luffa Cylindrica

Tratamiento	Variables Codificadas			Variables reales		
	Factor A	Factor B	Factor C	Temperatura(°C)	pH	Flujo(ml/min)
1	-1.00	1.00	1.00	45.00	5.00	0.20
2	1.00	1.00	-1.00	55.00	5.00	0.10
3	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15
4	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15
5	1.00	-1.00	1.00	55.00	4.00	0.20
6	-1.00	-1.00	-1.00	45.00	4.00	0.10
7	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15
8	-1.00	-1.00	1.00	45.00	4.00	0.20
9	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15
10	1.00	1.00	1.00	55.00	5.00	0.20
11	1.00	-1.00	-1.00	55.00	4.00	0.10
12	-1.00	1.00	-1.00	45.00	5.00	0.10
13	0.00	0.00	1.68	50.00	4.50	0.23
14	-1.68	0.00	0.00	41.59	4.50	0.15
15	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15
16	0.00	0.00	-1.68	50.00	4.50	0.07
17	1.68	0.00	0.00	58.41	4.50	0.15
18	0.00	-1.68	0.00	50.00	3.66	0.15
19	0.00	1.68	0.00	50.00	5.34	0.15
20	0.00	0.00	0.00	50.00	4.50	0.15

Tomado de: Montalvo (2020)

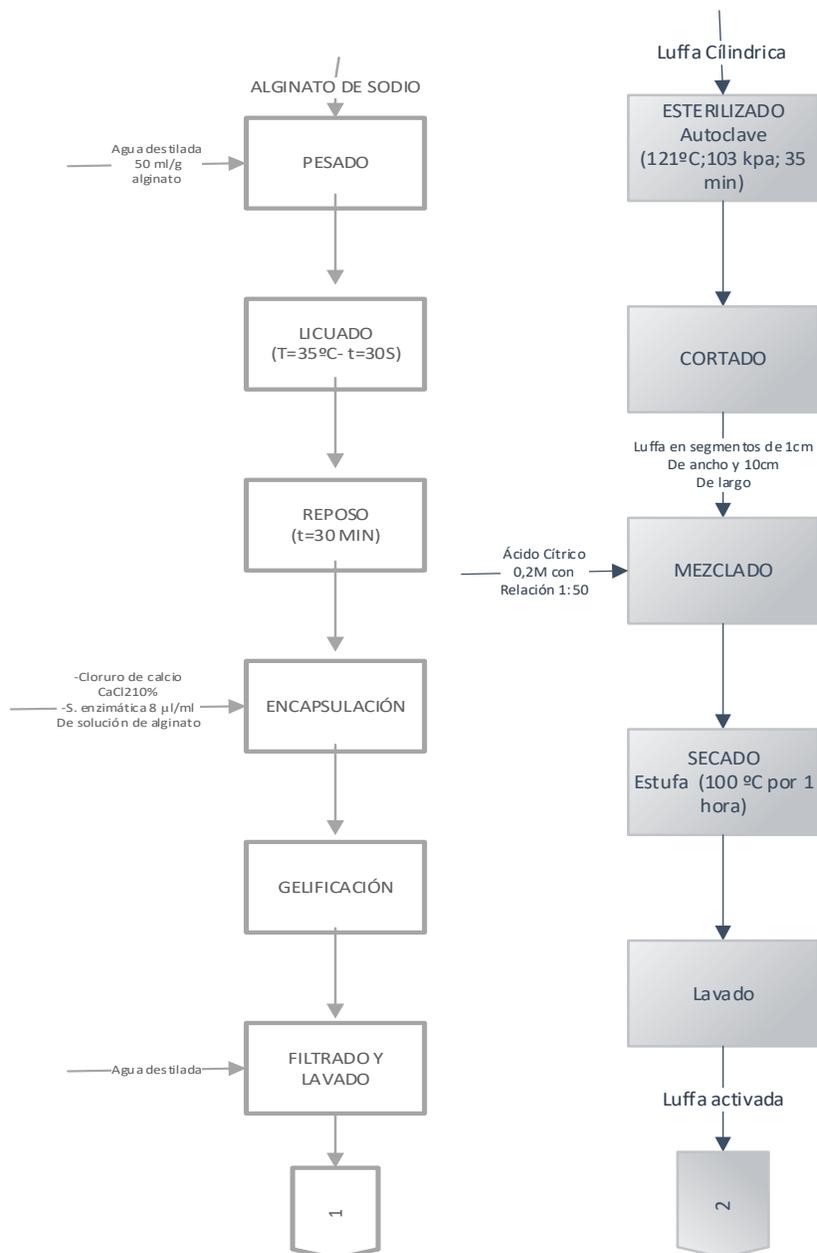
2.4. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

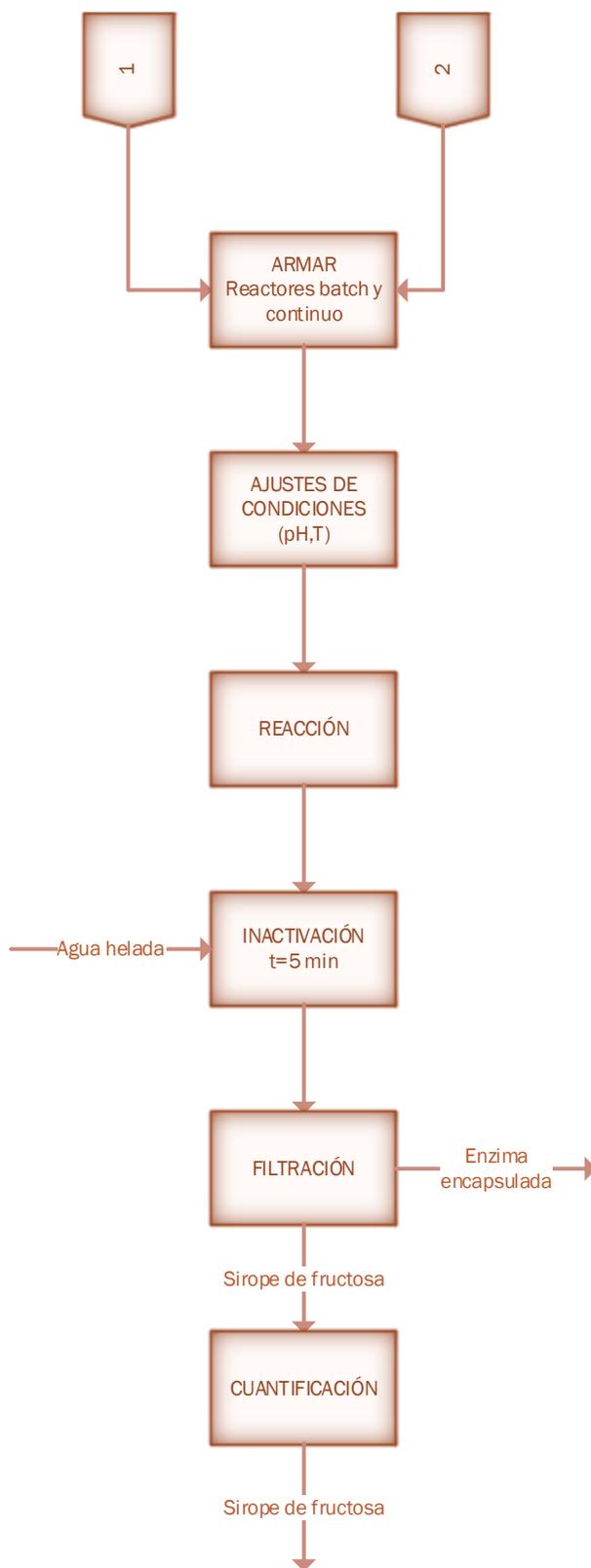
Se presenta un diagrama del proceso que se realizó para una comprensión general de las actividades a realizadas.

2.4.1. DIAGRAMA DEL PROCESO A REALIZAR

Figura 18

Diagrama del proceso





2.4.2. REACTOR DE FLUJO CONTINUO Y ENCAPSULACIÓN DE ENZIMA CON ALGINATO DE SODIO

Se encapsuló la enzima inulinasa de *Aspergillus niger* Marca Signma Aldrich, partiendo de una solución de enzima y agua destilada relación 1:1, del cual se utilizaron 100 μ l por cada 12.5 ml de solución de alginato de sodio preparado con anterioridad (Ayala, 2020). De acuerdo con el autor mencionado con anterioridad se comprobó que la concentración ideal para realizar las esferificaciones es del 2% m/v, por lo que se partió de esta investigación para la realización de la encapsulación de la enzima, se utilizó 1.5 gramos de alginato de sodio y 75 ml de agua destilada.

Figura 19

Elaboración de solución de alginato 2% m/v



Se agregó 600 μ l de la dilución de enzima y se homogenizó con la ayuda de una licuadora de inmersión, y se dejó reposar en refrigeración 30 minutos y con la ayuda de una pipeta plástica Pasteur de 3 ml, y mediante goteo en una solución de Cloruro de calcio al 10% se formaron las esferificaciones donde permanecieron por otra media hora más, luego con un colador metálico se sacan de la solución para ser lavadas con abundante agua destilada.

Figura 20

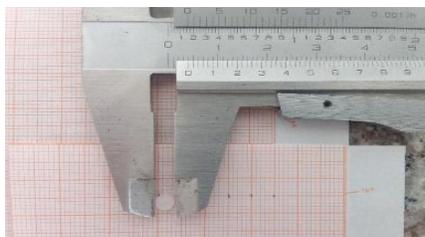
Formación de esferificaciones y encapsulación de la enzima



Se coloca las esferas dentro del reactor, previamente se debe realizar un tapón con gaza estéril en la parte inferior, para que no haya paso de las esferas a la entrada del reactor, las esferas tienen dimensiones de entre 2 a 3 mm y en el volumen del reactor se incorporan 600 esferas que lo llenan por completo.

Figura 21

a) Medición de esferas en mm; b) Vista de esfera en microscopio lente x4; c) Reactor de lecho empacado con encapsulaciones



a)



b)



c)

2.4.3. REACTOR BATCH Y INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA EN LUFFA CILYNDRICA MEDIANTE ENLACE COVALENTE

Para la inmovilización de la enzima, se debe realizar previamente una esterilización al medio orgánico, a condiciones de autoclave (121 °C, 103 kPa, 35 min), para posteriormente ser cortada en fragmentos de 1 cm de ancho y 10 cm de largo, los cuales serán sumergidos en una solución de ácido cítrico 0.2 M, en la proporción 1:50 (m/v), la cual se agitará durante 30 minutos con la ayuda de una placa magnética, se lava el exceso de ácido cítrico con agua destilada y se deja secar en la estufa a 100 °C por 60 minutos.

Figura 22

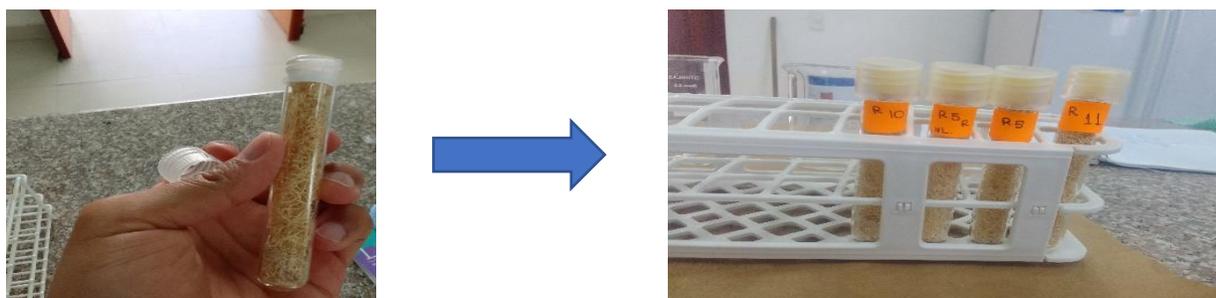
Activación del medio de soporte orgánico (Luffa cilíndrica)



El proceso que se menciona antes es tomado de Montalvo (2020), en su trabajo se detallan las condiciones requeridas para activar la estructura vegetal y la función de brazo espaciador para ser utilizada en la inmovilización de la enzima inulinasa. Adicionalmente se diluyó 250 µl de enzima con 750 µl de agua destilada y se agregó al tubo de ensayo de 15 ml con medio de soporte orgánico ya activado, lo que deja listo el reactor Batch para el proceso de hidrolisis.

Figura 23

Reactor Batch con enzima inmovilizada en el medio orgánico



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

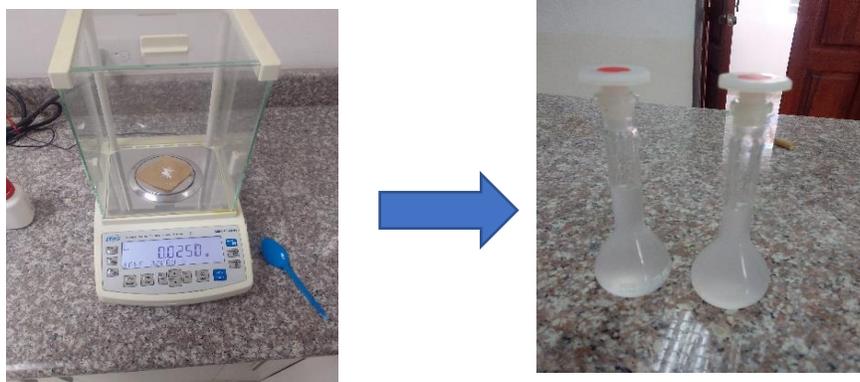
En el presente capítulo se presenta de forma detallada los resultados obtenidos en la investigación para el cumplimiento de los objetivos planteados, los datos presentados han sido obtenidos en su mayoría por el programa estadístico *Desing Expert* versión 13.

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE SOLUCIONES DE FRUCTOSANO (INULINA) MEDIANTE ESPECTOFOTOMETRÍA A PARTIR DE UN BLANCO COMERCIAL ANALÍTICO

La solución concentrada de inulina requerida para cada tratamiento era de 1 g/L la cual ha sido utilizada en Montalvo (2020) y Ayala (2020) para evaluar la producción de sirope de fructosa en los reactores mencionados en estos trabajos. Para la obtención de esta concentración, se utilizó 0.025 g de inulina Sigma, el sustrato se agregó a un balón aforado de 25 ml el cual se completó con agua destilada para obtener la solución deseada.

Figura 24

Dilución de inulina Sigma a 1 g/L



Para la cuantificación de inulina se utiliza el método AOAC 997.08 detallado en el capítulo de metodología, para lo cual se necesitó de una curva patrón la cual se puede apreciar en el Anexo I, con el objetivo de conocer la concentración de la solución con la que se trabaja en los reactores.

Figura 25
Cuantificación solución de inulina



Como se aprecia en la Tabla 10, se realizó tres muestras con el proceso que se menciona para llegar a la concentración deseada de inulina, y se comparó los grados Brix, pH y concentración en g/L, lo cual ayuda a conocer que en promedio entra 1.079 g/L en cada corrida del reactor, además se compara el DNS con una muestra de agua destilada lo cual no hubo presencia de fructosa en las muestras, por lo tanto se parte con una concentración de 0.000 mg/L. En cuanto al pH se tiene un promedio de 6.72 inicial antes de ser ajustado a los diferentes tratamientos, para lo cual se usó una solución de ácido cítrico 0.05 M.

Tabla 10
Estandarización de solución de fructosano para hidrolisis enzimática

Método	Muestra	° Brix	pH	Absorbancia	Concentración g/L
AOAC 997.08	1	0.200	6.76	0.837	0.900
AOAC 997.08	2	0.200	6.71	1.235	1.315
AOAC 997.08	3	0.200	6.70	0.953	1.021
	Promedio		6.72		1.079
DNS		0.200	6.70	0.000	0.000

3.2. IDENTIFICACIÓN DEL MEDIO DE SOPORTE ORGÁNICO, MEDIANTE PROCESOS FISICOQUÍMICOS

Para la caracterización de los medios de soporte, se realizó la encapsulación de la enzima inulinasa en diferentes soportes orgánicos (Alginato de sodio y *Luffa cylindrica*), con la ayuda de los equipos del Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos de la Universidad Técnica del Norte.

3.2.1. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DEL SUSTRATO DE INULINA A SIROPE DE FRUCTOSA EN EL REACTOR DE FLUJO CONTINUO

El uso de la enzima inulinasa para convertir mediante tratamiento hidrolítico la inulina en fructosa en un solo paso muestra que se han obtenido rendimientos de hasta el 95% (Milek, 2022). En las Figuras 26 y 27 se puede observar como cada factor afecta en la producción de sirope de fructosa, se aprecia que a temperatura de 45 °C existe la mayor cantidad de datos de productividad, así como en el pH 5, en donde se puede apreciar una variación significativa es en el flujo ya que a medida que aumenta, la productividad también lo hace, y el flujo de 0.2 ml/min contiene un considerable conjunto de valores altos de productividad a comparación de los otros.

Figura 26

a) Box Plot T vs Productividad; b) Box Plot pH vs Productividad

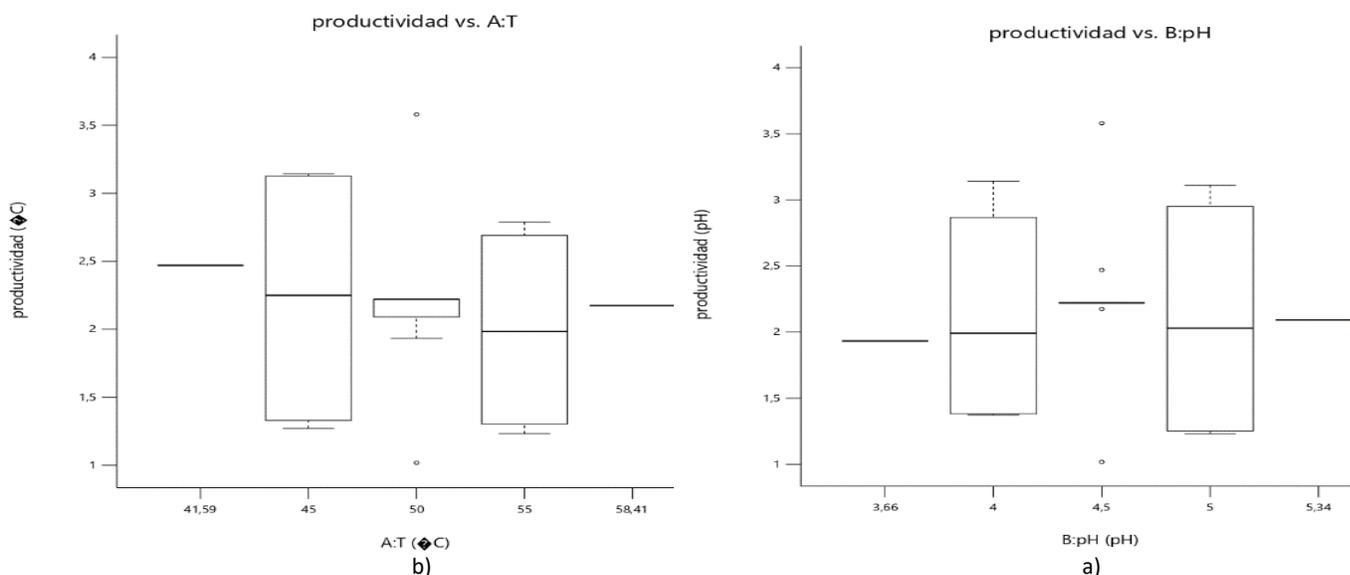
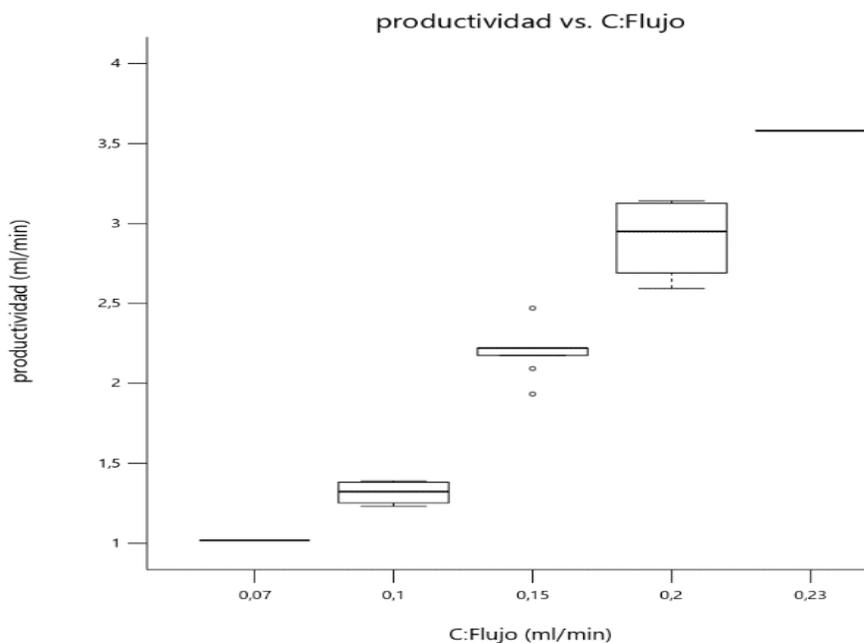


Figura 27
Box Plot Flujo vs Productividad Reactor Flujo Continuo



Mediante el método DNS detallado en el capítulo anterior se logró la cuantificación de fructosa al ser medidas las muestras a una longitud de onda de 540 nm, obteniendo una curva patrón que se detalla en el Anexo II, que permitió conseguir los resultados del reactor de flujo continuo que se manifiestan en la Tabla 11.

El experimento evaluó el procedimiento dentro del rango de temperatura de 39.85 °C a 64.85 °C que es el óptimo para la activación de la enzima (Miłek, 2022). Se puede observar que la productividad decrece a medida que el flujo va bajando, por lo que los tratamientos con alta productividad se encuentran en el flujo de 0.2 ml/min, con una temperatura de 45 °C, y un pH en el rango de 4 a 5, entre estos valores no existen una diferencia significativa, pero destacan entre los otros resultados por ser más altos.

Tabla 11

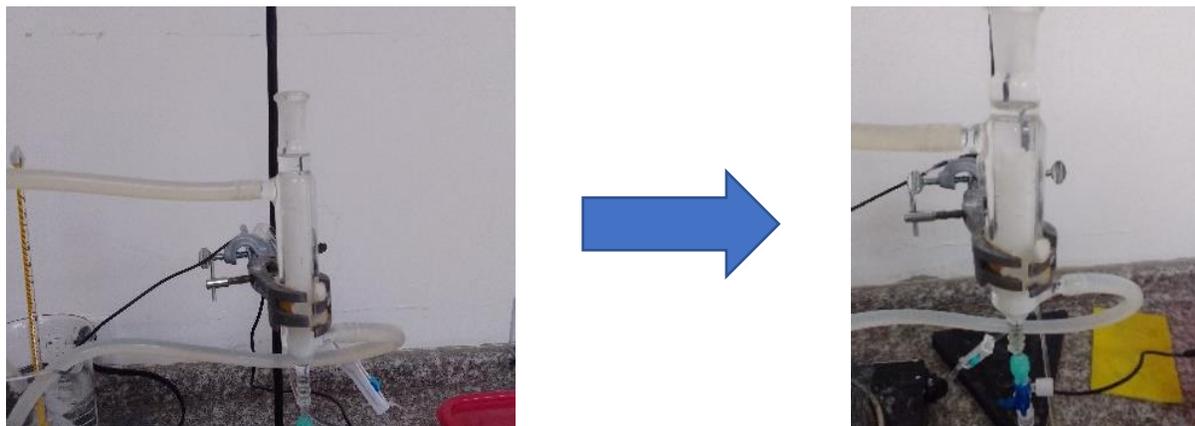
Resultados de concentración y productividad en función de los factores propuestos en el reactor de flujo continuo

Tratamiento	[T] °C	[pH]	[Flujo] ml/min	[Concentración de fructosa] g/L	[Productividad] mg/h
1	45.00	5.00	0.20	0.26	3.11
2	55.00	5.00	0.10	0.21	1.23
3	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22
4	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22
5	55.00	4.00	0.20	0.22	2.59
6	45.00	4.00	0.10	0.23	1.39
7	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22
8	45.00	4.00	0.20	0.26	3.14
9	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22
10	55.00	5.00	0.20	0.23	2.79
11	55.00	4.00	0.10	0.23	1.37
12	45.00	5.00	0.10	0.21	1.27
13	50.00	4.50	0.23	0.26	3.58
14	41.59	4.50	0.15	0.27	2.47
15	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22
16	50.00	4.50	0.07	0.24	1.02
17	58.41	4.50	0.15	0.24	2.18
18	50.00	3.66	0.15	0.21	1.93
19	50.00	5.34	0.15	0.24	2.09
20	50.00	4.50	0.15	0.25	2.22

En el estudio de Ayala (2020) la temperatura de 50 °C o menos, favorecía al medio de soporte orgánico, además que el pH 4 fue el dato óptimo presentado para el reactor *Batch*. En el caso del reactor de flujo continuo con las condiciones que se mencionan previamente, el comportamiento es similar ya que el soporte orgánico tiene las mismas características, y en el experimento realizado se puede apreciar una pérdida en el volumen de las esferas a temperatura mayores a los 50 °C, evidenciándolo de forma visual ya que se forma un espacio en el reactor a medida que el tiempo de la hidrólisis avanza, así como se observa en la Figura 28.

Figura 28

Perdida de volumen en el reactor a Temperaturas mayores a 50 °C



3.2.1.1. Análisis de varianza (ANOVA) de la variable de respuesta Productividad para la optimización de las condiciones de conversión enzimática.

Mediante el ajuste y validación del modelo de los tratamientos para este reactor, se busca conocer el punto óptimo que maximice la productividad de fructosa, con el objetivo de encontrar el punto favorable de la superficie de respuesta.

Los modelos presentados a continuación, son los resultantes para estimar la productividad de fructosa durante la conversión enzimática, estos fueron:

- Modelo en términos de factores codificados para la variable productividad:

$$PR = -0.1741 * A + 0.0213 * B + 1.28 * C - 0.2745 * AC + 0.1425 * BC - 0.2726 * B^2 + 2.24 \quad (6)$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

A= Variable codificada para Temperatura (°C)

B= Variable codificada para pH (-)

C= Variable codificada para Flujo (ml/min)

- Modelo en términos de factores reales para la variable productividad

$$PR = 0.040375 * T + 3.18493 * pH + 26.81610 * Flujo - 0.408 * T * Flujo + 2.12 * pH * Flujo - 0.386395 * pH^2 - 8.67914 \quad (7)$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

T= Variable codificada para Temperatura (°C)

pH= Variable codificada para pH (-)

Flujo= Variable codificada para Flujo (ml/min)

Como se presenta en la Tabla 12, el coeficiente de determinación (R^2) el cual tiene un valor de 0.99, lo que declara una gran fiabilidad del modelo, tanto el ajustado, como el predicho tienen valores de 0.98 y 0.97 respectivamente, es decir una diferencia inferior a 0.2. El coeficiente de variación es de 3.16 %, esto indica una buena precisión y confiabilidad de los experimentos realizados.

Tabla 12

Análisis de varianza ANOVA para el modelo cuadrático reducido Reactor Flujo continuo

	Media	R^2	R^2 ajustado	R^2 predicho	Coefficiente de variación (%)	Precisión adecuada	
	0.07	2.17	0.99	0.98	0.97	3.16	62.69

En la Tabla 13, se muestra el modelo ANOVA de segundo orden en donde, el termino del efecto de la temperatura (A), pH (B) y flujo (C), el termino del efecto cuadrático del pH (B^2) y la interacción entre Temperatura y Flujo (AC), al igual que pH y Flujo (BC), del modelo fue significativo ya que tienen un valor-p de < 0.0001 o < 0.0500 . Por otro lado, el análisis de varianza muestra que el Valor-F del modelo es de 307.60 lo que manifiesta significancia, además el valor de precisión adecuada es de 62.69, por lo que este modelo se puede usar para navegar por el espacio del diseño.

Tabla 13

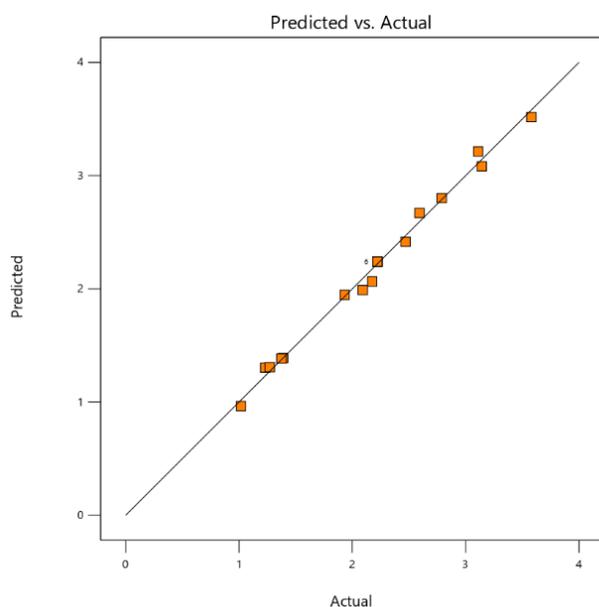
ANOVA para el modelo de la concentración de fructosa para la optimización de las condiciones en el reactor de flujo continuo

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Modelo	8.74	6	1.46	307.60	< 0.0001
A-T	0.1481	1	0.1481	31.26	< 0.0001
B-pH	0.0022	1	0.0022	0.4637	0.5079
C-Flujo	8.35	1	8.35	1762.78	< 0.0001
AC	0.0832	1	0.0832	17.57	0.0011
BC	0.0225	1	0.0225	4.74	0.0484
B ²	0.1365	1	0.1365	28.80	0.0001
Residual	0.0616	13	0.0047		
Ajustado	0.0616	8	0.0077		
Error Puro	0.0000	5	0.0000		
Total	8.80	19			

Se puede observar en la Figura 29, los valores predichos por el programa Design Expert Versión 13.0 y los valores reales obtenidos en el experimento, por lo que al obtener el coeficiente de determinación es de 0.99 en el análisis ANOVA, se aprecia que las dispersiones son mínimas.

Figura 29

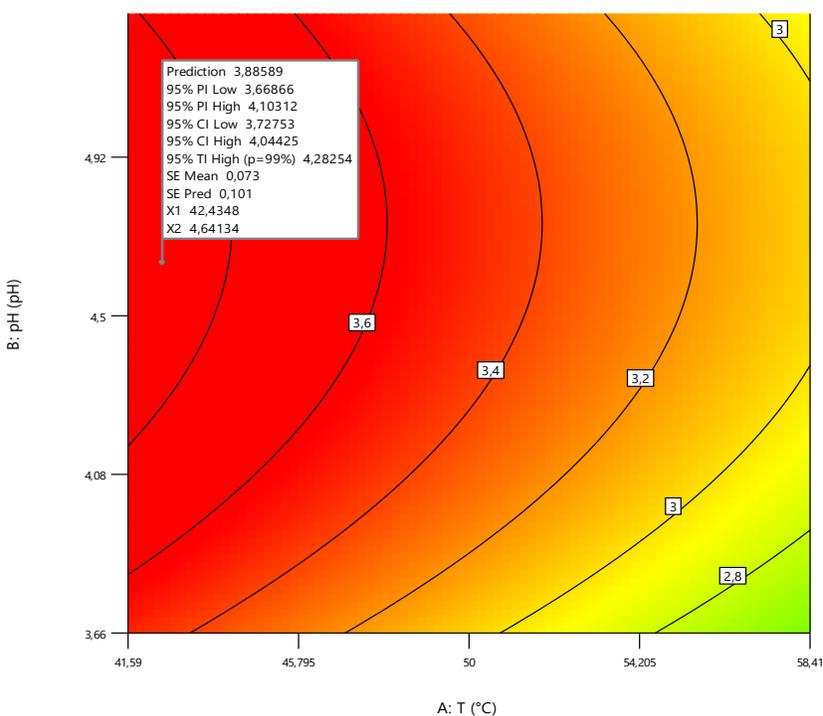
Valores predichos vs reales del Reactor de Flujo continuo



Como se puede apreciar en la gráfica de contornos (Figura 30), las zonas muestran los diferentes puntos de productividad desde en escala ascendente, el área azul representa los puntos de menor valor, en el que destaca 1.02 mg/h a una temperatura de 50 °C, 4.5 pH y 0.07 ml/min, en la zona verde están los del flujo de 0.15 ml/min que tienen productividades que oscilan entre 2.09 mg/h a 2.22 mg/h, finalmente entre las zonas amarilla y roja están presente valores con mayor productividad que en su mayoría son flujos de 0.2 ml/min, destacando el de mayor productividad 3.58 mg/h en condiciones de 50 °C, 4.5 pH y 0.23 ml/min.

Figura 30

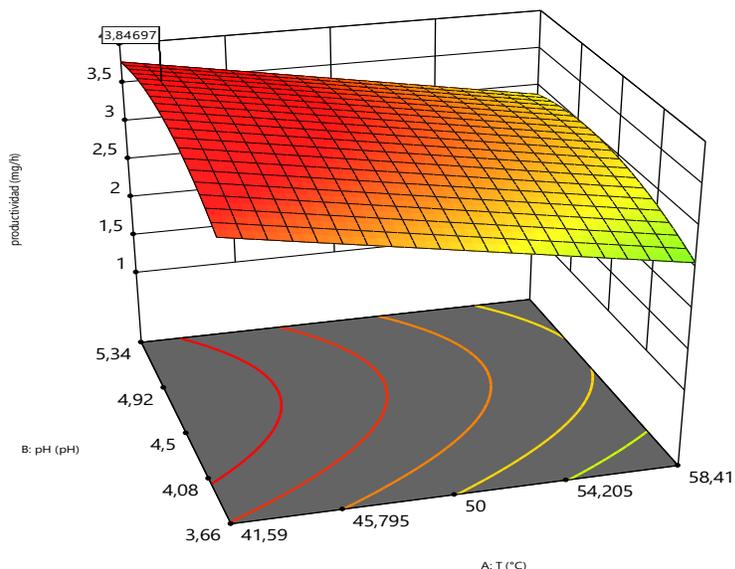
Gráfica de contornos para la variable productividad en el reactor de Flujo continuo



En la Figura 31, se muestra la gráfica del análisis de superficie de respuesta correspondiente a la productividad en la conversión a fructosa, se puede observar los parámetros de temperatura, pH y flujo, para la optimización de la productividad (42 °C, 4.7 pH, 0.23 ml/min), el cual luego de realizar la experimentación dio un valor de concentración de 0.28 g/L y una productividad de 3.80 mg/h.

Figura 31

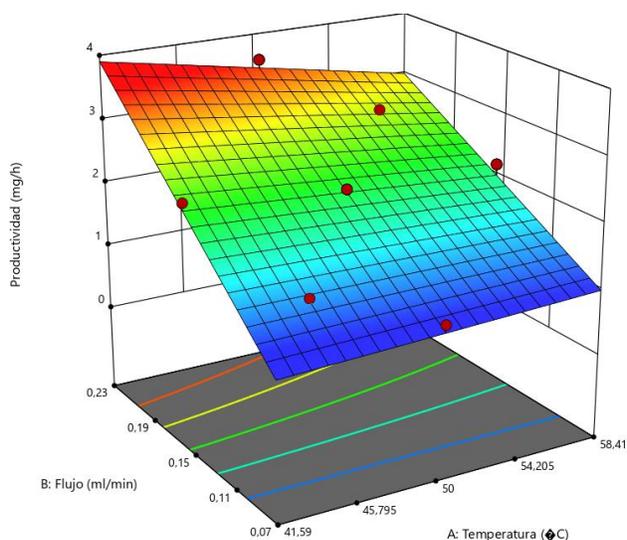
Diseño de superficie respuesta correspondiente a la productividad en el reactor de flujo continuo



La Figura 32 es una representación de la interacción que tiene el flujo con la temperatura, debió a que estos dos factores son los que tienen impacto significativo en la variable respuesta, así como se observó en el modelo ANOVA, se aprecia que en la escala a los 41 °C aproximadamente y un flujo de 0.23 ml/min es la zona de mayor productividad contrastando con la gráfica anterior en que el punto de optimización se ubica dentro de ese espacio.

Figura 32

Diseño superficie Respuesta (Flujo y Temperatura)

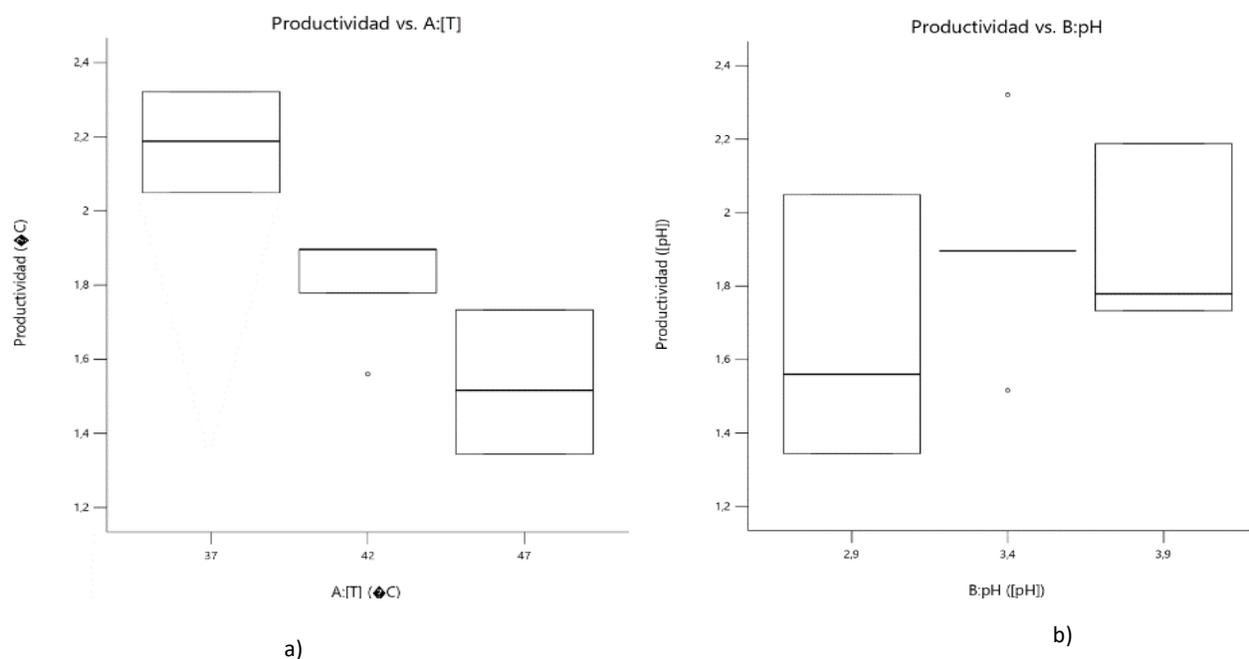


3.2.2. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DEL SUSTRATO DE INULINA A SIROPE DE FRUCTOSA EN EL REACTOR BATCH

En la Figura 33, se puede apreciar como los factores tanto temperatura como pH afectan en la productividad de fructosa, en cada Box Plot se analiza individualmente las variables independientes con la respuesta y se aprecia que la mayor productividad está en la temperatura de 37 °C, en cuanto al pH el punto de más alto de productividad está en pH 3.4, sin embargo, en primera instancia en la gráfica no se observa diferencia significativa en relación a este factor.

Figura 33

a) Box Plot T vs Productividad; b) Box Plot pH vs Productividad; Reactor Batch



Se utilizó el mismo procedimiento de DNS que se realizó en el reactor de flujo continuo, al medir las muestras a una longitud de onda de 540 nm, y compararlas con la misma curva patrón detallada en el Anexo II, la cual permitió obtener los resultados que se detallan en la Tabla 14. El experimento se evaluó dentro del rango de temperatura óptimo para la activación de la enzima, la mayor productividad fue de 2.32 mg/h (37 °C, 3.4 pH), se observa que a temperatura de 37 °C existe mayor productividad, pero el cambio de pH en el rango 2.9-3.9 influye en la conversión enzimática.

Tabla 14

Resultados de concentración y productividad en función de los factores propuestos en el reactor Batch

Tratamiento	[T] °C	[pH]	[Concentración de fructosa] g/L	[Productividad] mg/h
R1	42	3.4	0.23	1.90
R2	42	2.9	0.19	1.56
R3	47	3.4	0.18	1.52
R4	42	3.4	0.23	1.90
R5	37	3.4	0.28	2.32
R6	42	3.4	0.23	1.90
R7	47	2.9	0.16	1.34
R8	47	3.9	0.21	1.73
R9	42	3.4	0.23	1.90
R10	37	3.9	0.26	2.19
R11	37	2.9	0.25	2.05
R12	42	3.9	0.21	1.78

3.2.2.1. Análisis de varianza (ANOVA) de la variable de respuesta Productividad para la optimización de las condiciones de conversión enzimática.

Los modelos que se presentan a continuación son el resultado de la fase experimental y que estiman la productividad de fructosa durante la hidrólisis enzimática del reactor *Batch*.

- Modelo en términos de factores codificados para la variable productividad:

$$PR = -0.3275 * A + 0.1245 * B + 0.0908 * A^2 - 0.1583 * B^2 + 1.87 \quad (8)$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

A= Variable codificada para Temperatura (°C)

B= Variable codificada para pH (-)

- Modelo en términos de factores reales para la variable productividad

$$PR = -0.370420 * T + 4.55340 * pH + 0.003630 * T^2 - 0.633 * pH^2 + 2.86349 \quad (9)$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

T= Variable codificada para Temperatura (°C)

pH= Variable codificada para pH (-)

En la Tabla 15, se muestra el coeficiente de determinación (R^2) con un valor de 0.95, lo que declara una fiabilidad del modelo, tanto el R^2 predicho, como el ajustado tienen valores de 0.92 y 0.77, es decir una diferencia inferior a 0.2. El valor de precisión es de 18.00 es una señal adecuada, por lo que el modelo se puede usar para navegar por el espacio de diseño.

Tabla 15

Análisis de varianza ANOVA para el modelo cuadrático reducido reactor Batch

Desviación estándar	Media	R^2	R^2 ajustado	R^2 predicho	Coefficiente de variación (%)	Precisión adecuada
0.08	1.84	0.95	0.92	0.77	4.39	18.00

Como se muestra en la Tabla 16, el modelo ANOVA de segundo orden en donde, término del efecto de la temperatura (A), pH (B), y el término del efecto cuadrático del pH (B^2) son significativos ya que tienen un valor-p < 0.0500. Por otro lado, el valor-F del modelo es de 31.00 lo que implica un modelo significativo.

Tabla 16

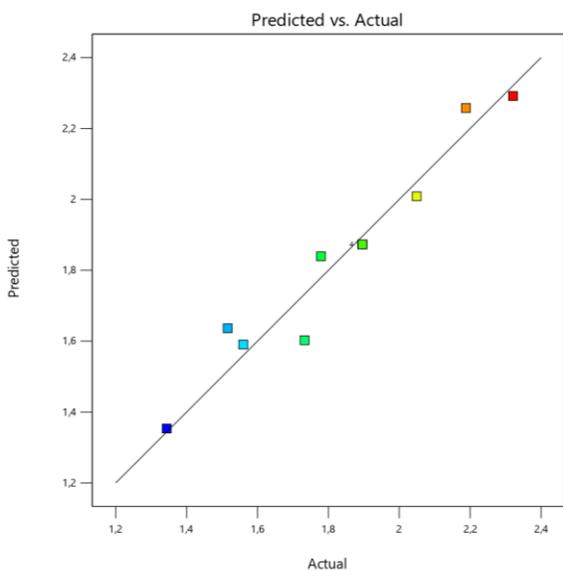
ANOVA para el modelo de la concentración de fructosa para la optimización de las condiciones en el reactor Batch

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Modelo	0.8077	4	0.2019	31.00	0.0002
A-T	0.6435	1	0.6435	98.80	< 0.0001
B-pH	0.0930	1	0.0930	14.28	0.0069
A ²	0.0220	1	0.0220	3.37	0.1090
B ²	0.0668	1	0.0668	10.25	0.0150
Residual	0.0456	7	0.0065		
Ajustado	0.0456	4	0.0114		
Error Puro	0.0000	3	0.0000		
Total	0.8532	11			

En la Figura 34, se presenta la gráfica de valores predichos vs reales elaborado por Design Expert Versión 13.0, se observa dispersiones mínimas ya que el coeficiente determinación es de 0.95 en el análisis ANOVA.

Figura 34

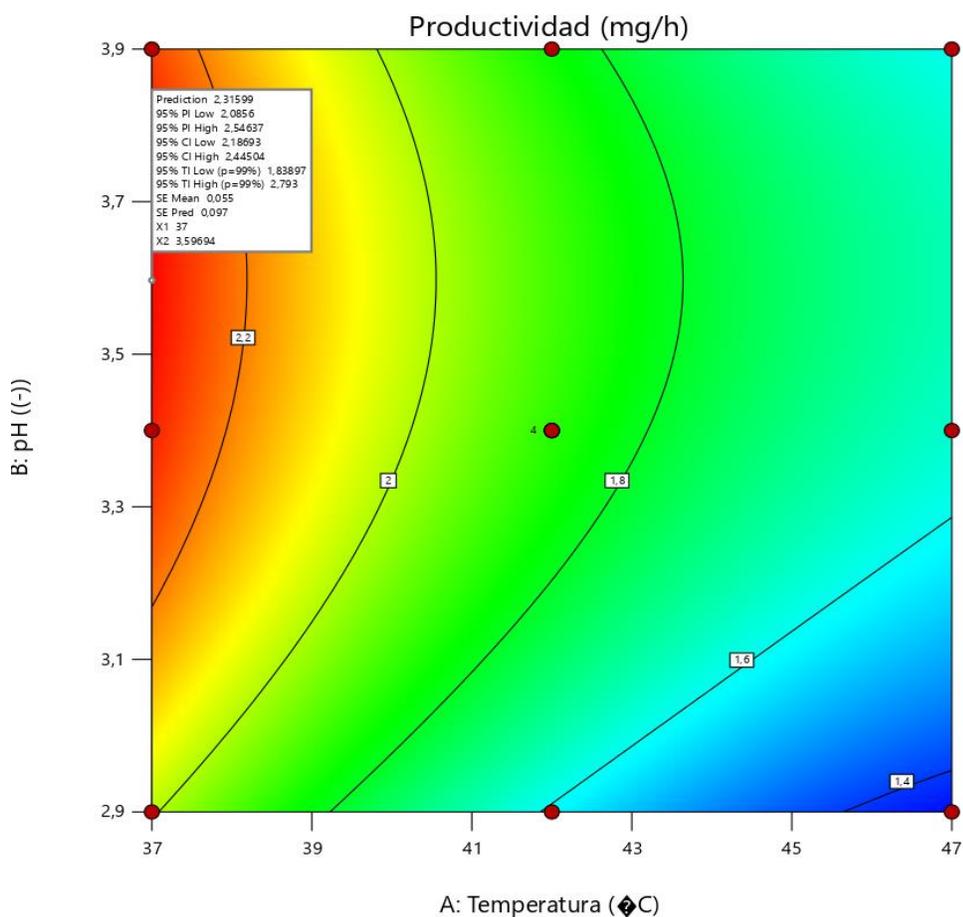
Valores predichos vs reales del Reactor Batch



En la ilustración (Figura 35) se muestran los puntos correspondientes a la productividad del reactor *Batch*, siendo la gama de color azul los puntos que indican menor productividad siendo este 1.34 mg/h a 47 °C y 2.9 pH. Entre las zonas amarillas y verde tenemos productividades entre 1.52 mg/h a 1.90 mg/h con temperaturas entre 42 °C y 47 °C con el rango de pH de 2.9 a 3.9. Finalmente, entre la zona naranja y roja se encuentran los valores de mayor productividad destacando 2.32 mg/h a 37 °C y 3.4 pH.

Figura 35

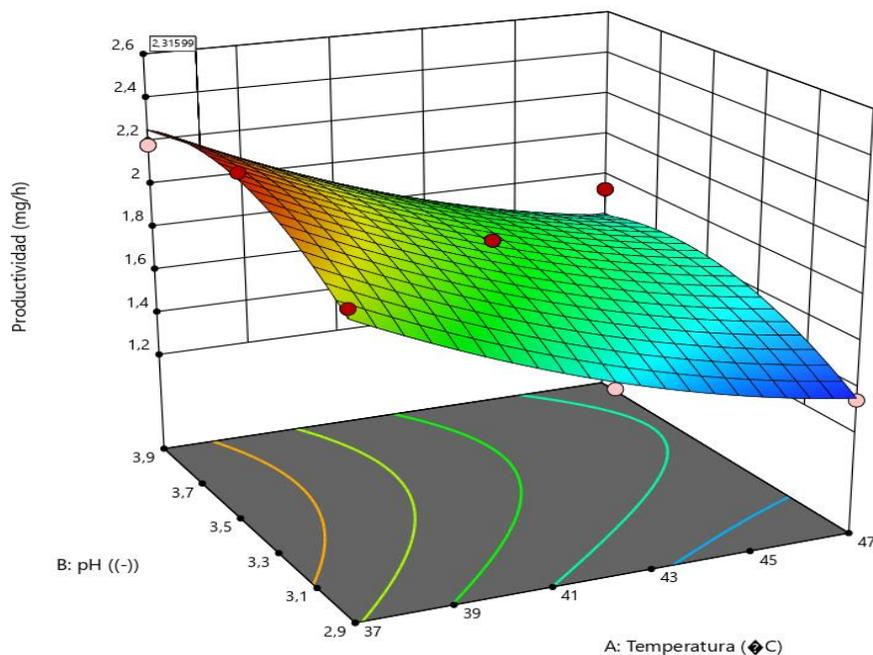
Gráfica de contornos para la variable productividad en el reactor *Batch*



La Figura 36 muestra la gráfica del análisis de superficie de respuesta correspondiente a la productividad de fructosa alcanzada en el reactor *Batch*, se puede observar los parámetros influyentes para la optimización de las condiciones del reactor.

Figura 36

Diseño de superficie de respuesta correspondiente a la productividad en el reactor *Batch*



Como se ha podido apreciar en el análisis del reactor *Batch*, el rango de pH para este experimento ha sido de 2.9 a 3.9, el cual no es común para realizar el proceso de hidrólisis enzimática, de acuerdo con Saikia et al. (2021) para la producción de sirope alto en fructosa existen diferentes valores para cada parámetro en el caso del tiempo (0.5-4 h), la concentración de inulina (1-10%), temperatura (40-80) y pH (4.0-9.0). Sin embargo, se han probado otras condiciones para la hidrólisis enzimática principalmente en la actividad de la enzima como lo mencionan Huang et al. (2021) se evaluó en pH (4-10) y temperaturas (30-70 °C) para endo-inulinasa, por lo que los escenarios de 37 °C a 47 °C en el experimento son válidos.

Kilimci et al. (2021) indican la actividad e inmovilización de la enzima inulina en sistemas tampón de pH 3.0-5.0, dando como resultado que la adsorción máxima de inulinasa fue en pH 3.0. Este estudio sirve como antecedente del uso de pH inferiores a 4.00 que están fuera del rango común de estudio, por lo que las condiciones en el experimento para este factor son aceptables, ya que si es posible la hidrólisis enzimática en el rango de pH 2.9 a 3.9.

La Figura 35, como se mostró anteriormente representa valores predichos por el programa para la optimización de la productividad, sin embargo, el punto sugerido es 2.32 mg/h a temperatura de

37° C y pH de 3.6, en comparación con el tratamiento de mayor productividad de 2.32 mg/h a 3.4 con temperatura 37 °C, no es una diferencia significativa, y poseen condiciones similares.

3.2.2.2. Reutilización del catalizador inmovilizado en *Luffa cylindrica* para la hidrólisis de inulina

Para tener una mejor eficiencia en la producción de sirope de fructosa y al mismo tiempo minimizar costo del proceso se requiere que la enzima sea reutilizada, por lo que los métodos de inmovilización permiten que sea fácil la separación con el sustrato para usarlas por varias ocasiones. Por lo que se evaluó en cada tratamiento el número de ciclos en el que la enzima se mantenía activa, cada ciclo con las mismas condiciones de tiempo 90 minutos.

Como se observa en el Anexo III, en la gráfica que representa el comportamiento de la productividad durante los ciclos pertenecientes por cada tratamiento, se aprecia que los tratamientos con de menores ciclos tienen una temperatura de 47 °C y no influye el pH ya que son diferentes para cada uno. Por otro lado, se alcanzó hasta 7 ciclos de producción en temperaturas de 37 °C y 42 °C, luego de la suma de los resultados en cada tratamiento presentes en los ciclos que se observa en la Tabla 17, el tratamiento con 7.91 mg/h representa a las condiciones de 37 °C y pH 3.90, en el mismo Anexo se manifiesta la eficiencia por ciclo en cada tratamiento por lo que para las condiciones antes mencionadas en el ciclo 7 tiene una eficiencia aun del 29.39 %.

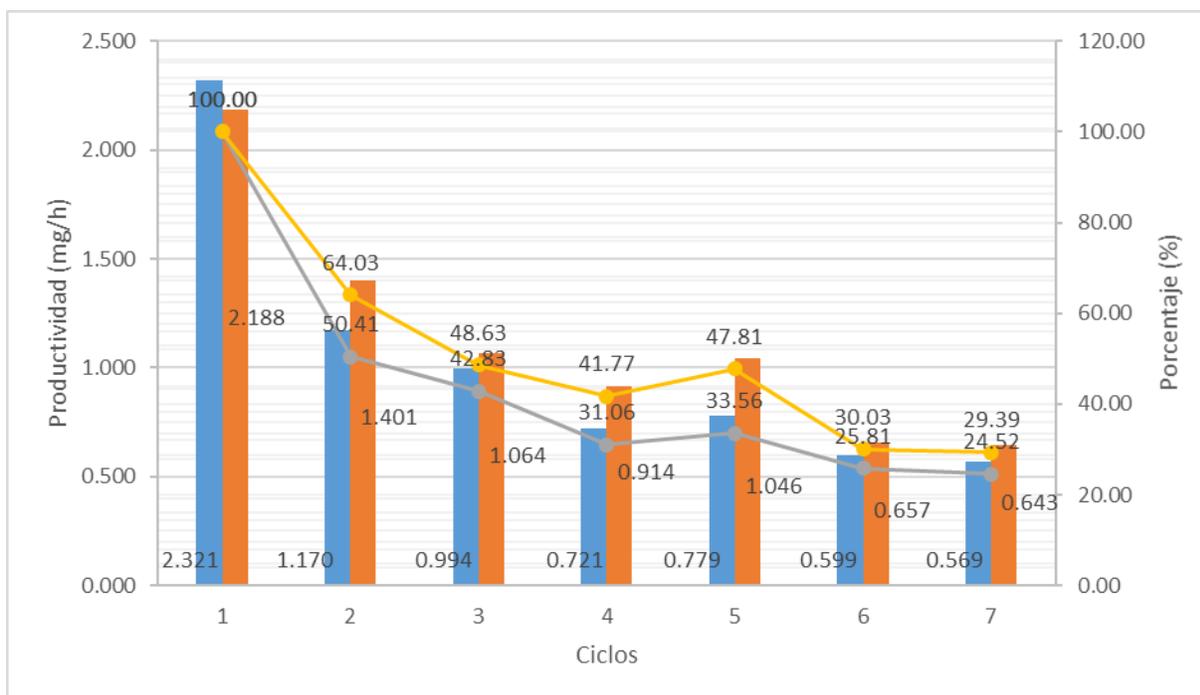
Tabla 17
Productividad final del reactor Batch (suma de reciclos)

Tratamiento	Productividad total mg/L
R1	5.68
R2	3.25
R3	2.55
R4	5.68
R5	7.15
R6	5.68
R7	2.03
R8	3.13
R9	5.68
R10	7.91
R11	4.02
R12	7.59

En la Figura 37, se observa la comparación entre dos tratamientos, el de mayor productividad luego de realizar los ciclos (37 °C, 3.90 pH), y el tratamiento calculado en el modelo de superficie respuesta (37 °C, 3.40 pH), la eficiencia en el último ciclo de acuerdo con el Anexo III fue de 29.39 % y 24.52% respectivamente, y en cuanto a la productividad total 7.91 mg/h (37 °C, 3.90 pH) y 7.15 mg/h (37 °C, 3.40 pH), lo que muestra que en el primer punto hay un incremento ya que se sumó los resultados de los reciclos, y la eficiencia puede deberse al pH ya que es el factor que difiere entre los sistemas.

Figura 37

*Curva de reutilización de inulinasa inmovilizada en *Luffa cylindrica* comparación tratamiento*



3.2.3. EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LOS REACTORES PROPUESTOS

La evaluación económica para el área industrial, se debe tener en cuenta los costos que están directa e indirectamente relacionados con la producción del producto resultante, en el caso de reactores, serían los medios orgánicos y equipos (Abejón et al., 2015). Para el análisis económico del experimento se toma como principales insumos los reactivos, los medios de soporte orgánico para la inmovilización, y las adecuaciones a los reactores, además se separó los reactores en tecnología *Batch* y tecnología continua, para un mejor análisis de todos los materiales e insumos utilizados para el correcto funcionamiento y producción de sirope de fructosa.

Como se puede apreciar en la Tabla 18, la tecnología continua hace referencia al reactor de flujo continuo con alginato de sodio como medio de soporte orgánico para inmovilización de la enzima inulinasa, se tomó en cuenta tanto los reactivos, insumos, y equipos para el proceso de hidrolisis de la inulina.

Tabla 18

Costos Reactivos y Equipamiento Tecnología Continua

Reactivos/insumos/Equipos	Unidades	Unidad de medida	Precio \$ USD
Alginato de sodio	100	gramos	24.00
agua destilada	2	galones	8.00
Pipetas Pasteur plásticas 3 ml	3	unidades	0.90
Inulinasa-Sigma	50	ml	222.00
Inulina sigma	10	gramos	64.02
Ácido cítrico	1	kg	3.50
Bombas	2	5V	13.50
Mangueras	100	cm	1.00
Licuada de inmersión	1	Unidad	25.00
Ensamble de bombas + compra de envases y adaptadores			30.00
Construcción del reactor			50.00
Total general			441.92

Los precios de la tabla anterior se obtuvieron de las proformas y la experiencia de modelar el reactor de flujo continuo, además de la búsqueda en fuentes o tiendas web como la página oficial (Merck) de venta de productos SIGMA-ALDRICH, por lo que el análisis económico tiene significancia en el proceso de investigación.

La Tabla 19 por otro lado presenta la tecnología *Batch* que hace referencia al reactor del mismo nombre pero con *Luffa cylindrica* como medio de soporte orgánico, los precios tienen las mismas referencias que la tecnología continua, como dato adicional, el precio del equipo del reactor es tomado de la página web de RAYPA.

Como se aprecia en las tablas el reactor de flujo continuo es el que económicamente tiene mayor viabilidad por su precio, sin embargo, una posible dificultad en este reactor es el tiempo que se demora en realizar el armado del mismo y la realización de la inmovilización de la enzima.

Tabla 19

Costos Reactivos y Equipamiento Tecnología Batch

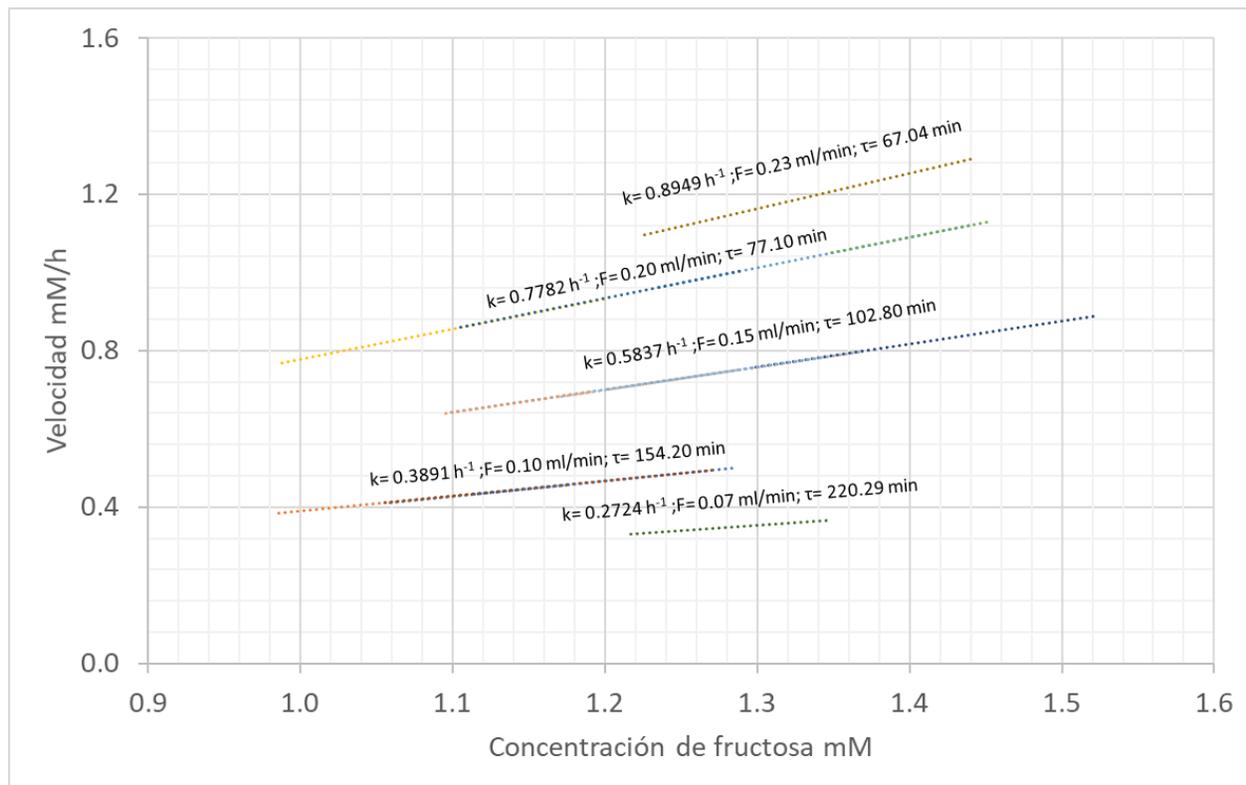
Reactivos/insumos/Equipos	Unidades	Unidad de medida	Precio \$ USD
Luffa cylindrica	1	Unidad	3.50
Agua destilada	8	Galones	31.20
Tubos de ensayo 15 ml	12	Unidades	14.40
Inulinasa-Sigma	50	ml	222.00
Inulina sigma	10	gramos	64.02
Ácido cítrico	1	kg	3.50
Baño maría Flic Film	1	Equipo	270.00
Total general			608.62

En los estudios de Montalvo (2020) y Ayala (2020) de los cuales se partieron para el desarrollo de la presente investigación, no se realizaron análisis económicos de cada reactor, pero si se el análisis de la productividad y la efectividad del medio de soporte orgánico, ya que los valores económicos no tendrían una variedad significativa ya que son procesos idénticos, por lo que una comparación entre las cuatro versiones de reactores que se modelaron es posible. Mediante la experimentación, el soporte orgánico que tiene mayores beneficios para el proceso de hidrólisis es la *Luffa cylindrica* debido a su fácil manipulación y preparación; esto es corroborado con investigaciones previas que obtuvieron resultados de productividad 7.83 mg/h (Montalvo, 2020).

3.3. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCTIVIDAD DE FRUCTOSA EN LOS REACTORES PROPUESTOS

Como se menciona en Illanes (2008), la cinética muestra cómo se comporta el reactor a las condiciones que se requiere medir la producción, y como estas afectan en el resultado final y la eficiencia que tiene en la transformación del sustrato. En el caso de la investigación se observa como los factores como temperatura, pH, flujo y tiempo de residencia afectan en el análisis del reactor de flujo continuo, para lo cual se realizó una gráfica donde se aprecian las concentraciones de fructosa de cada tratamiento (mM) y la velocidad de la reacción (mM/h).

Figura 38
Cinética del reactor de flujo continuo

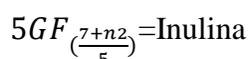
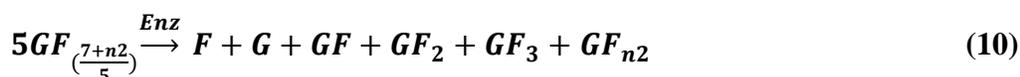


Como se observó en el apartado anterior en cuanto a producción de fructosa los valores más representativos se encontraba en los flujos de 0.20 y 0.23 ml/min, sin embargo con respecto a la concentración de fructosa se puede apreciar que los valores en este rango son similares y tienen un valor alto, pero en las condiciones en un flujo de 0.15 ml/min, 41.59 °C y pH de 4.5 la concentración de fructosa es mayor a la de los otros puntos. Lo que favorece a la búsqueda del punto óptimo a la temperatura de 42 °C, 4.7 pH en un flujo de 0.23, al resultado entre el punto óptimo y el punto mencionado anteriormente tiene concentraciones de fructosa similares, 0.28 g/L o 1.53 mM y 0.27 g/L o 1.52 mM.

Se realizó un balance de materia, el cual se puede observar en el anexo VI, el problema presentado fue la falta del peso molecular de la inulina, Mensink et al. (2015) mencionan que los grados de polimerización influyen en las características de los diferentes pesos moleculares de estas, y en muchos casos se hace distinción entre inulinas porque no se toma en cuenta este factor. Un dato

adicional que se menciona en el trabajo es que para la inulina de marca SIGMA se muestra un grado de polimerización de 25 y un rango de peso molecular entre 4620-6200 g/mol, sin embargo, en las especificaciones del producto utilizado no son concisos con este dato daban valores que podrían ser mayores o iguales a 20 por lo que se tomó este valor para el balance de las moles.

Se tomo 3 puntos en los que se obtuvo mayor concentración de fructosa equivalente T13: 1.43 mM, 0.23 ml/min, 50 °C, pH 4.5; T14: 1.52 mM; 0.15 ml/min, 41.59 °C, pH 4.5 y el punto óptimo: 1.53 mM, 0.23 ml/min, 42 °C, pH 4.7, y se realizaron una operación básica para determinar la efectividad de transformación que se aprecia en el Anexo VI, dando como resultado 38.13%, 40.61% y 40.72% respectivamente, sin embargo, este dato sería valido si solo fuera fructosa, pero el edulcorante resultante es una mezcla que entre los compuestos puede existir: fructosa, glucosa, sacarosa, kestosa, nistosa y moléculas de inulina más pequeñas, que daría nacimiento a la siguiente ecuación:



F= Fructosa

G= Glucosa

GF= Sacarosa

GF_2 = Kestosa

GF_3 = Nistosa

GF_{n2} = Inulinas reducidas

El producto resultante es un edulcorante, con compuestos que tienen un gran valor en la nutrición humana, esto genera una oportunidad para la purificación de los compuestos para poder ser aprovechados de mejor manera o también utilizar esta azúcar para consumo y realizar un concentrado para observar las características como un producto final que tenga valor agregado.

Como se recalcó la inulina puede tener un peso molecular variable dependiendo de las cadenas que posea por lo que existe una posibilidad de variación al no tener el dato preciso, Chikkerur et al. (2020) mencionan que al estar conformadas por SC-FOS (Cadenas cortas de fructo-oligosacridos), es posible la variación del peso y además que dependiendo de la efectividad del método de extracción de raíces de achicoria también afectara al resultado. Por otro lado, el tipo método de cuantificación de fructosa también afecta, ya que el método de espectrofotometría de diferentes compuestos se puede medir a la misma longitud de onda, y en el estudio antes mencionado se utiliza cromatografía (HPLC) para tener un valor fiable.

Para el reactor *Batch* no se realizó a cinética debido a que en Ayala (2020) detalla que para cada experimentación se tomo 90 min ya que se demostraba que la conversión era del 74% y pasado esta tiempo la actividad catalítica disminuye considerablemente, por lo que se realizó la gráfica de eficiencia por cada tratamiento para ver cómo se comporta la enzima en cada reciclo (Anexo III).

CONCLUSIONES

- Se determinó que la *Luffa cylindrica* constituye el soporte orgánico con mayores ventajas para ser empleado en el reactor de flujo continuo, debido a que su manejo es más sencillo, es una fibra biodegradable y se obtienen mayores valores de productividad.
- El reactor de flujo continuo muestra mayor productividad de fructosa alcanzado valores de hasta 3.8 mg/h, en comparación al reactor *Batch* (lote) que logra conversiones de 2.32 mg/h, lo que hace que el primer reactor sea el más idóneo para el proceso de hidrólisis, ya que posee mejores características de funcionamiento, debido a que el sustrato no se somete a una operación de difusión en las perlas del alginato lo que hace que el proceso de conversión catalítica sea menos eficiente.
- Mediante la gráfica cinética se observó que la reacción de hidrólisis se mantiene sin mayores fluctuaciones de velocidad y conversión en todo el proceso, resultando en un edulcorante con compuestos potables en menor escala que la fructosa susceptible a separación.
- La hipótesis alternativa es aceptada ya que los factores en estudio (pH, temperatura y flujo) tiene una correlación significativa entre ellas, lo que afecta en proceso de hidrólisis enzimática de la inulina para la producción de sirope de fructosa.

RECOMENDACIONES

- Es necesario la realización de investigaciones que se enfoquen en la purificación de los compuestos que se encuentran presentes en el edulcorante final, ya que estos tienen un gran valor calórico y nutricional.
- Realizar una cuantificación inicial y final del fructosano, para conocer el valor real de concentración del edulcorante. Como tentativa se podría usar otro método como HPLC para la cuantificación de fructosa en el caso de ser posible, porque este brinda un valor específico de la fructosa y de los diferentes compuestos.
- Efectuar la experimentación de flujos mayores al rango establecido en el reactor continuo para conocer el punto máximo de producción de sirope de fructosa.

REFERENCIAS

- Abejón, R., Belleville, M. P., & Sanchez-Marcano, J. (2015). Design, economic evaluation and optimization of enzymatic membrane reactors for antibiotics degradation in wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 156, 183–199. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.072>
- Anderson, M. (2018). *DESIGN-EXPERT® VERSION 11 SOFTWARE NOW AVAILABLE [Documento web]*. <https://cdnm.statease.com/pubs/press/Statease%20DX11%20Release.pdf>
- Armas Ramos, R. A., Martínez García, D., Pérez Cruz, E. R., Armas Ramos, R. A., Martínez García, D., & Pérez Cruz, E. R. (2019). Fructanos tipo inulina: efecto en la microbiotaintestinal, la obesidad y la saciedad. *Gaceta Médica Espirituana*, 21(2), 134–145. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1608-89212019000200134&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ayala, T. (2020). “*Obtención de sirope fructosa a partir de tuna blanca opuntia ficus-indica por el método de inmovilización enzimática de inulinasa*” [Título Profesional]. Universidad Técnica del Norte.
- Bioingeniería (Dirección). (2021). *Reactor tipo Batch [Figura]*. <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion/2-1-reactor-tipo-batch>
- Bommarius, A. S., & Riebel-Bommarius, B. R. (2004). Biocatalysis: Fundamentals and Applications. In *Enzyme Reaction Engineering* (WILEY-VCH, pp. 91–131). https://books.google.com.ec/books?id=cGUJ-hoSpXEC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Carrillo, U. (2016). *Realización de curvas de calibración para proteínas y azúcares [Documento Web]*.

<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbmV0aWN1cGlpZ3xneDpiYTM4NWMxZWQxMWQxZGY>

- Castillo Calderón, A., & Chamy Maggi, R. (2010). Producción de inulina por levaduras de *Kluyveromyces marxianus* Inulinase production by yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 1(3–4), 235–245.
- Castillo Ruiz, S. Y., Rubiano Castro, D. C., & Rodríguez Miranda, J. P. (2016). Análisis comparativo de modelos cinéticos para filtro biológico sin recirculación con medio de soporte en *Luffa Cylindrica* para el tratamiento de aguas residuales combinadas. *Revista Logos, Ciencia & Tecnología*, 7(3), 77–85. <https://doi.org/10.22335/rict.v10i1.398>
- Chikkerur, J., Samanta, A. K., Kolte, A. P., Dhali, A., & Roy, S. (2020). Production of Short Chain Fructo-oligosaccharides from Inulin of Chicory Root Using Fungal Endoinulinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(2), 695–715. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03215-7>
- Coronel Aguilar, J. C. (2014). Diseño y construcción de un reactor tipo batch para el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Internacional SEK. *Universidad Internacional SEK*, 39(1).
- Díaz, Y. (2020). *Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en medios de cultivos modificados para el crecimiento in vitro del hongo colletotrichum sp fitopatógeno del ñame (Dioscorea alata) EN MONTERÍA-CÓRDOBA [Título profesional]*. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3172/DiazCausilYacelisMaria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dosal, M., & Villanueva, M. (2008). INTRODUCCIÔN A LA METROLOGÎA QUÎMICA CURVAS DE CALIBRACIÔN EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Escobar, F. (2017). *OBTENCIÓN DE CRISTALES DE INULINA A PARTIR DE CUATRO VARIETADES DE PLANTAS DE CULTIVO NO TRADICIONAL DEL ECUADOR [Título Profesional]*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17438/1/CD-7937.pdf>

- Esquivel Solís, V., Gómez Salas, G., & Gómez Salas, G. (2009). Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense*, 49(4), 1058–1066. <https://doi.org/10.51481/amc.v49i4.461>
- Freepng (Dirección). (2021). *Química de reactores de lecho Empacado Trickle-bed [Figura]*. <https://www.freepng.es/png-4vymdt/>
- Fuertes, M. E. (2014). Extracción y cuantificación de inulina a partir del ajo [Título Profesional]. In *Implementation Science* (Vol. 39, Issue 1). UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Gao, C. (2021). *Sodium Alginate [Figura]*. https://es.made-in-china.com/co_qddoeast/product_Sodium-Alginate-Food-Grade-Food-Additive-for-Frozen-Food_engiisshy.html
- García, M. (2006). *Determinación y caracterización de fructanos provenientes de henequén (Agave fourcroydes Lem.)* [Tesis de maestría, Centro de Investigación científica de Yucatán.]. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/616>
- Grebeshkov, M. (2021). *Fórmula esquelética molécula química de fructosa [Figura]*. <https://www.alamy.es/formula-esqueletica-molecula-quimica-de-fructosa-image243496418.html>
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Arvizu-Higuera, Reyes-Tisnado R, Murillo-Álvarez, J. I., & Ochoa, M.-. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México Technological Advance for Alginate Production in Mexico. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XIII(2), 155–168.
- Huang, Y., Li, L., Chi, Y., Sha, Y., Wang, R., Xu, Z., Xu, X., Li, S., Gao, Z., & Xu, H. (2021). Fusion and secretory expression of an exo-inulinase and a d-allulose 3-epimerase to produce d-allulose syrup from inulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 693–702. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10682>
- Ibáñez, S. (2019). *Sistemas de control “on line” de reactores químicos batch [Documento web]*. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/185196/Memoria.pdf?sequence=7&isAllowed=y>

- Iborra, M., Tejero, J., & Cunill. Fidel. (2013). *Reactores Multifásico [Documento web]*. <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/33262/1/APUNTES%20RM.pdf>
- Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis: Principles and applications. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Kilimci, U., Evli, S., Öndeş, B., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2021). Inulinase Immobilized Lectin Affinity Magnetic Nanoparticles for Inulin Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1415–1426. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03476-7>
- Lara Fiallos, M., Ayala Chamorro, T., González Suárez, E., & Pérez Martínez, A. (2021). Obtención De Sirope De Fructosa Por Encapsulación Enzimática De Inulinasa En Alginato De Sodio. *Centro Azúcar*, 48(1), 117–126.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales TT - Inulin and derivatives as key ingredients in functional foods. *Arch. Latinoam. Nutr*, 57(4), 387–396.
- Mendoza Sandoval, R. M. (2017). Hidrólisis química y enzimática de un extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) para la obtención de fructosa. In *Repositorio Institucional - Universidad Agraria La Molina*.
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, 134, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>
- Milek, J. (2022). Application of the new method to determine the activation energies and optimum temperatures of inulin hydrolysis by exo-inulinases *Aspergillus niger*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(2), 1371–1377. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-10495-3>
- Montalvo, D. (2020). “Evaluación del proceso de encapsulación por unión química enzimática de inulinasa para la conversión de sustratos de inulina a sirope de fructosa a partir de tuna blanca *Opuntia ficus-indica*” [Título Profesional]. Universidad Técnica del Norte.

- Multiverso. (2019). *Ejemplo de superficie respuesta(rsm) con diseño central compuesto usando design expert 11 - parte 1 [Figura].* . <https://www.youtube.com/watch?v=sae9nDGjiZI>
- Navarrete, L. F., Martínez, D., & Duarte, E. (2009). Caracterización preliminar del estropajo "Luffa cylindrica" como posible materia prima para construcción. *Avances Investigación En Ingeniería, 11*.
- Nóchez, J., & Ventura, A. (2009). "Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), conceptos y aplicación para obtener el valor óptimo en un experimento" [Título Profesional] [UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/12512/1/19200894.pdf>
- Olkiewicz, M., Tylkowski, B., Montornés, J. M., Garcia-Valls, R., & Gulaczyk, I. (2020). Modelling of enzyme kinetics: cellulose enzymatic hydrolysis case. *Physical Sciences Reviews, 7*(8), 901–921. <https://doi.org/10.1515/psr-2020-0039>
- Pérez Cruz, E., Elizabeth Serralde Zúñiga, A., & Meléndez Mier, G. (2007). Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. *Medigraphic. Com Revista de Endocrinología y Nutrición Abril-Junio, 15*(2), 67–74.
- Pinango, R. (2019). *EXTRACCIÓN DE INULINA DE DOS VARIETADES DE TUNA Opuntia ficus-indica COLOR ROJA Y BLANCA DEL VALLE DEL CHOTA POR LIXIVIACIÓN* [Título Profesional] [Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/9160/1/03%20EIA%20478%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>
- Ramírez Ramírez, J., & Ayala Aceves, M. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria Universidad Autonoma de Mexico, 15*(12), 1–13.
- Riveros, M. J., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. In *Nutricion Hospitalaria. 29*(3) 491-499. <https://doi.org/10.3305/NH.2014.29.3.7178>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications The nature and classification of enzymes. *Essays Biochem, 59*, 1–41.

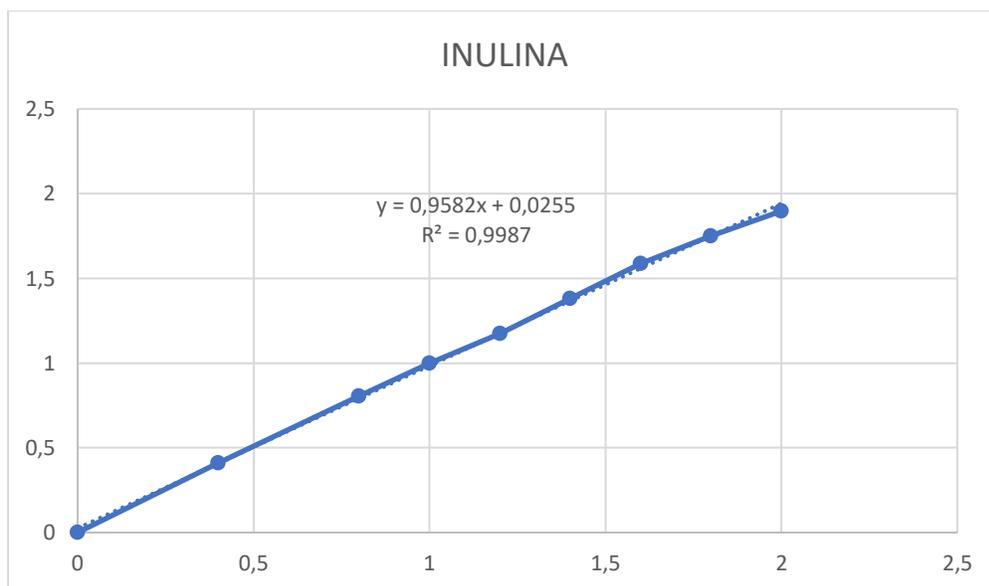
- Romero, G. C. A., Malo, a L., & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 1*, 87–96.
- Saeed, A., & Iqbal, M. (2013). Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. *Biotechnology Progress, 29*(3), 573–600. <https://doi.org/10.1002/btpr.1702>
- Saikia, K., Radhakrishnan, H., Rathankumar, A. K., Senthil Kumar, S. G., Kalita, S., George, J., Subramanian, S., & Kumar, V. V. (2021). Development of a sustainable route for the production of high-fructose syrup from the polyfructan inulin. *IET Nanobiotechnology, 15*(2), 149–156. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12031>
- Singh, R. S., Chauhan, K., Pandey, A., & Larroche, C. (2018). Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. *Bioresource Technology, 260*, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.127>
- Sosa-Herrera, M. G., & Delgado-Reyes, V. A. (2017). Propiedades funcionales y aplicaciones tecnológicas de fructanos. In *Propiedades Funcionales de hoy*. <https://doi.org/10.3926/oms.357>
- Urías-Silvas, J., & López, M. (2004). Efecto prebiótico de los fructanos de agave. *1er Encuentro Participación de La Mujer En La Ciencia*.
- Urzúa, P. (2008). *MODELO FÍSICO PREDICTIVO DE LA FLUIDODINÁMICA DE LECHO [Título Profesional] [UNIVERSIDAD DE CHILE]*. https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/103052/urzua_pg.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Wikipedia. (2021). *Ibarra (Ecuador) [Sitio web]*. [https://es.wikipedia.org/wiki/Ibarra_\(Ecuador\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Ibarra_(Ecuador))

ANEXOS

ANEXO I

Figura 39

Curva Patrón de Inulina para cuantificación por medio de espectrofotómetro UV-VIS con longitud de onda 715 nm

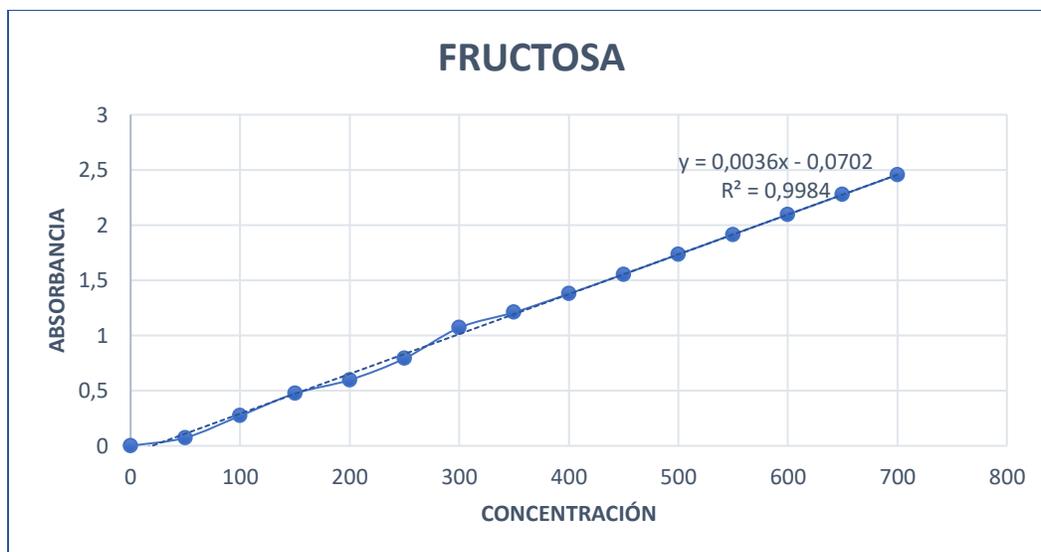


Tomado de: Piñango (2020)

ANEXO II

Figura 40

Curva Patrón de Fructosa para cuantificación por medio de espectrofotómetro UV-VIS con longitud de onda 540 nm



Tomado de: Montalvo (2020)

Anexo III

Figura 41

Gráfica de productividad vs ciclos del Reactor Batch por cada Tratamiento

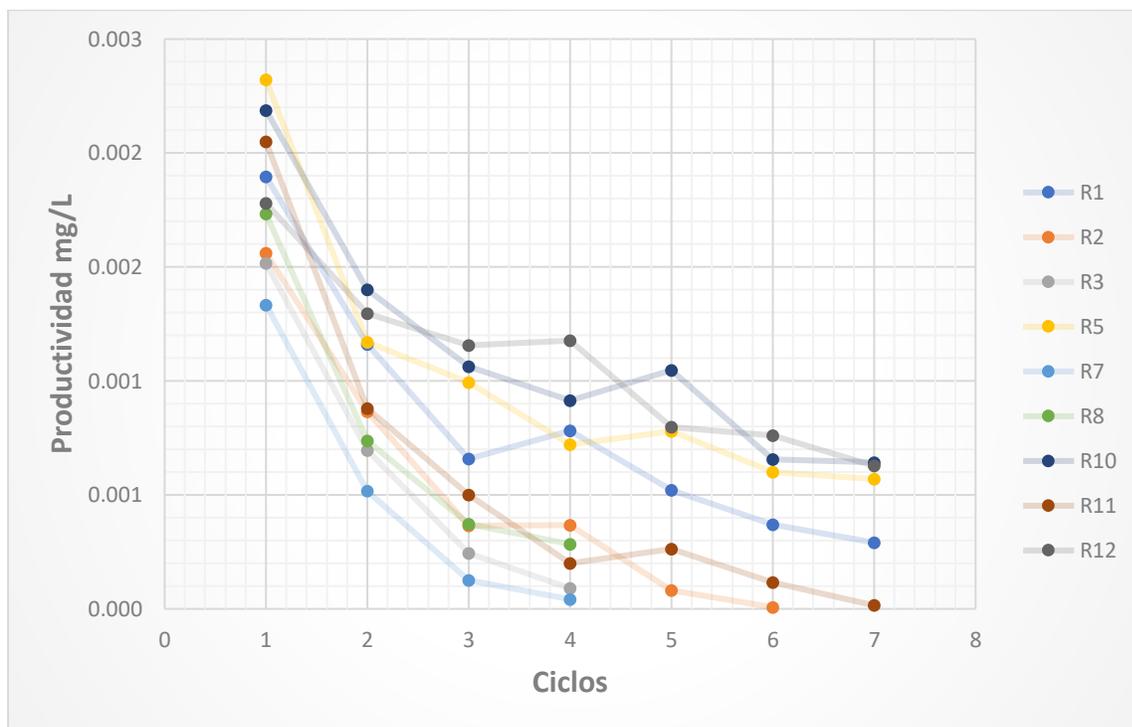
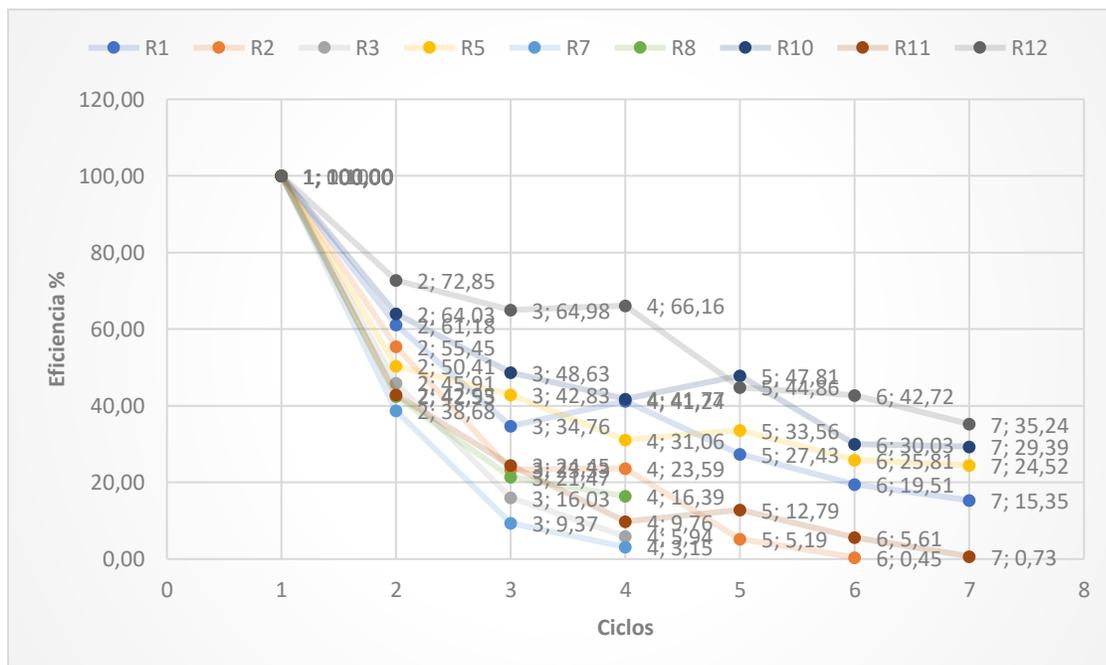


Figura 42

Gráfica de eficiencia vs ciclos del Reactor Batch por cada tratamiento



Anexo IV

Ficha técnica de le enzima inulinasa

SIGMA-ALDRICH®*sigma-aldrich.com*

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com**Product Specification**

Product Name:
Inulinase from *Aspergillus niger* - aqueous glycerol solution

Product Number: **I6285**
CAS Number: 9025-67-6

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Density	1.10 - 1.30 g/ml
Note	-----
Novozym is a registered trademark of Novozymes Corp.	
Activity	≥ 200
Enzymatic; INU/G; Inulinase Units	
Specification: PRD.0.ZQ5.1000060631	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Anexo V

Ficha técnica de inulina

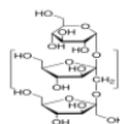


3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Inulin from chicory

Product Number: **I2255**
 CAS Number: 9005-80-5
 MDL: MFCD00131407



TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear to Hazy
100 mg/mL, H ₂ O	
Water (by Karl Fischer)	≤ 15 %
Free Glucose	≤ 0.05 %
by enzymatic assay	
Free Fructose	≤ 0.05 %
by enzymatic assay	
Ratio	Conforms
Fructose:Glucose	
(≥ 20:1)	

Specification: PRD.2.ZQ5.10000036356

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Anexo VI

Ecuaciones para igualación de moles



GF_{20} = moles de Inulina

nF = moles de fructosa

GF_{n-1} = moles de inulina sin hidrolizar

$$MW_{GF_{20}} = 180.16 \frac{g}{mol} glucosa * 1 + 20 * 180.16 \frac{g}{mol} fructosa - 20 * 18.04 \frac{g}{mol} H_2O$$

$$MW_{GF_{20}} = 3422.52 \frac{g}{mol} inulina$$

$MW_{GF_{20}}$ = Peso molecular inulina

Se toma en cuenta la relación de la ficha técnica de la inulina que por cada 20 moléculas de fructosa, existe 1 de glucosa, además que teóricamente se transforman moléculas de agua por cada molécula de fructosa, por lo que n será tomada como 20, existiría las fracciones molares siguientes:

$$\left(\frac{1}{21}\right) = \text{moles glucosa}$$

$$\left(\frac{20}{21}\right) = \text{moles Fructosa}$$

Se procede a calcular las moles de inulina a la entrada del reactor, sabiendo que existe una concentración promedio de inulina de 1.079 g/L en una solución de 0.025 L:

$$[CI] = \frac{1.079 \frac{g}{L} inulina}{3422.52 \frac{g}{mol} inulina}$$

$$[CI] = 0.315 \times 10^{-3} \frac{mol}{L}$$

$[CI]$ = concentración de inulina

$$mI = 0.315 \times 10^{-3} \frac{mol}{L} * 0.025L$$

$$mI = 7.875 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

mI = moles de inulina

Con las fracciones molares se calculará las moles de cada compuesto a la entrada del reactor continuo:

$$mG = \left(\frac{1}{21}\right) * mI$$

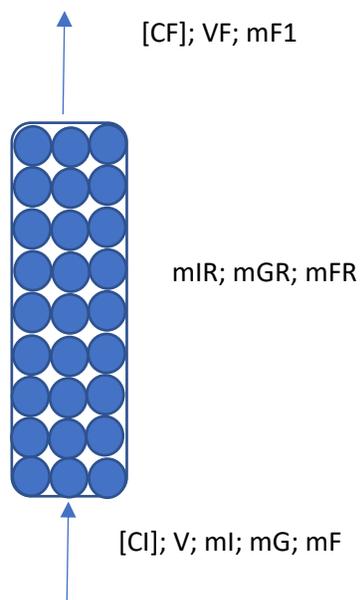
$$mG = 3.75 \times 10^{-7} \text{ moles}$$

$$mF = \left(\frac{20}{21}\right) * mI$$

$$mF = 7.5 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

mG = moles de glucosa a la entrada del reactor

mF = moles de fructosa a la entrada del reactor



- Tratamiento T13

Concentración de fructosa fue de 1.43 mM se requiere calcular las moles de fructosa de esta concentración, teniendo en cuenta que se tomo 0.002 L de muestra:

$$mF_1 = 1.43 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 0.002L$$

$$mF_1 = 2.86 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

mF_1 = moles de fructosa

$$mFR = 7.5 \times 10^{-6} \text{ moles} - 2.86 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

$$mFR = 4.64 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

mFR = fructosa en el reactor

Se suma la moles de fructosa del reactor con las moles de glucosa del reactor para obtener las moles de inulina residual:

$$mIR = mFR + mGF$$

$$mIR = 4.64 \times 10^{-6} \text{ moles} + 3.75 \times 10^{-7} \text{ moles}$$

$$mIR = 5.015 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

mIR = moles inulina residual

$mGF = mG$ moles de glucosa

- Igualdad

$$GF_{20} = mG + mF$$

$$mG + mF = mIR + mF_1$$

$$3.75 \times 10^{-7} \text{ moles} + 7.5 \times 10^{-6} \text{ moles} = 5.015 \times 10^{-6} \text{ moles} + 2.86 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

$$7.875 \times 10^{-6} \text{ moles} = 7.875 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

- Eficiencia con tratamiento T13

$$E = \frac{mF_1}{mF} \times 100$$

$$E = \frac{2.86 \times 10^{-6} \text{ moles}}{7.5 \times 10^{-6} \text{ moles}} \times 100$$

$$E = 38.13\%$$

- Eficiencia en punto óptimo concentración 1.527 mM

$$mF_1 = 1.527 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 0.002\text{L}$$

$$mF_1 = 3.054 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

$$E = \frac{mF_1}{mF} \times 100$$

$$E = \frac{3.054 \times 10^{-6} \text{ moles}}{7.5 \times 10^{-6} \text{ moles}} \times 100$$

$$E = 40.72\%$$

- Eficiencia en T14 concentración 1.523 mM

$$mF_1 = 1.523 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 0.002\text{L}$$

$$mF_1 = 3.046 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

$$E = \frac{mF_1}{mF} \times 100$$

$$E = \frac{3.046 \times 10^{-6} \text{ moles}}{7.5 \times 10^{-6} \text{ moles}} \times 100$$

$$E = 40.61\%$$

Anexo VII

Figura 43
Cuantificación de Fructosa



Figura 44
Proceso de estandarización de solución de inulina

