



**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:**

**“ESTUDIO DE ESCALADO DE HIDRÓLISIS DE INULINA EN UN  
REACTOR CONTINUO DE LECHO EMPACADO CON ENZIMAS  
INMOVILIZADAS.”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniero  
agroindustrial**

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

**Autor: Jorge Fernando Miranda Arcos**

**Director: Ing. Marco Vinicio Lara Fiallos PhD.**

**Ibarra-2023**



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

**I. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Supervisión, 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:	1004633523		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Miranda Arcos Jorge Fernando		
DIRECCIÓN:	Ibarra		
EMAIL:	jfmirandaa@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-----	TELF. MOVIL:	0981187912

DATOS DE LA OBRA			
TÍTULO:	Estudio de escalado de hidrolisis de inulina en un reactor continuo de lecho empacado con enzimas inmovilizadas		
AUTOR (ES):	Miranda Arcos Jorge Fernando		
FECHA:	18/10/2023		
SOLO TRABAJOS DE GRADO			
CARRERA/PROGRAMA:	X	GRADO	POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial		
DIRECTOR:	Ing. Marco Vinicio Lara Fiallos PhD.		

**2. CONSTANCIAS**

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se 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 diez y ocho días del mes de octubre de 2023

**EL AUTOR**

(Firma).....  
Nombre: Jorge Fernando Miranda Arcos

## CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR


Ibarra, 18 de Octubre de 2023

Ing. Marco Lara PhD.

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 los fines legales pertinentes.





Ing. Marco Lara PhD.  
C.C.: 1717227761

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular "ESTUDIO DE ESCALADO DE HIDROLISIS DE INULINA EN UN REACTOR CONTINUO DE LECHO EMPACADO CON ENZIMAS INMOVILIZADAS" elaborado por Jorge Fernando Miranda Arcos, previo a la obtención del título de ingeniero en agroindustrias, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(1)   
.....  
Ing. Marco Lara PhD  
C.C.: 1717227761

  
.....  
Ing. José País PhD  
C.C.: 0959747320

  
.....  
Ing. Jimmy Núñez MSc.  
C.C.: 1756606339

## **DEDICATORIA**

En toda mi vida siempre estará presente una frase que vino de una persona muy importante para mí y que siempre será mi inspiración “Si ellos pueden, yo también puedo”.

Este logro se lo dedico a mis padres Jorge y Sandra por darme todo su amor, cariño y dedicación desde el primer día, ustedes son los únicos que nunca dudaron de mis capacidades, sin importar todos los inconvenientes que surgieron en el camino logré demostrarles que si se pudo. También se lo dedico a mis hermanos Andrés y Sofía, a pesar de la distancia quiero poder ser un ejemplo a seguir para ustedes y demostrar que por más que las cosas parezcan imposibles con un poco de esfuerzo, todo es posible para nosotros.

A toda mi familia, que siempre supieron estar para mí con un consejo cuando lo necesitaba y apoyo en los momentos más difíciles de este largo camino. Sin ustedes nada de esto pudo ser posible.

A mis amigos y amigas que hicieron de esta etapa, una de las mejores de mi vida, nunca los olvidaré y espero celebrar más triunfos con ustedes. Por último, a esa persona (M.M) que por varias situaciones del destino ya no está aquí para celebrar este bonito momento a mi lado, pero fue una parte importante en este camino y espero nuestros caminos vuelvan a cruzarse.

**“Nando”**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por permitirme culminar una bonita etapa en mi vida, por ser mi fuerza y aliento en cada momento difícil.

A la Universidad Técnica del Norte por brindarme los elementos necesarios para convertirme en un gran profesional y poder dejar en alto su nombre.

A mis padres Jorge y Sandra que siempre estuvieron apoyándome, brindándome su cariño, paciencia y cuidados, ya que sin ellos esta nueva meta en mi vida nunca pudo haber sido posible, gracias por brindarme las enseñanzas para poder convertirme en un hombre de bien y del cual se sientan orgullosos.

A mis asesores por sus consejos y dedicación, así como a mi director Ing. Marco Lara PhD por su valiosa guía, conocimientos, enseñanzas y su paciencia durante todo este trabajo, al cual con mucho cariño no solamente puedo llamar colega, sino también un gran amigo.

A mi familia, amigos y amigas por su apoyo incondicional durante todo este proceso, aportando con su pequeño granito de arena para lograr esta meta.

**Jorge Miranda**

## RESUMEN

La inulina es un carbohidrato que se encuentra como reserva energética en varias especies del reino vegetal, la cual por medio de una reacción de hidrólisis produce un glúcido más sencillo como es la fructosa. Para replicar dicha reacción el presente estudio consistió en el uso de un biorreactor de flujo continuo con lecho empacado, empleando como material de soporte para el catalizador luffa cilíndrica. Los procesos químicos ejecutados permitieron atrapar a la inulinasa de manera estable para determinar la cinética de reacción, con un estricto control de los parámetros operacionales que fueron pH (4,6), temperatura (49 °C) y flujo (3, 5, 7, 11 ml/min), permitiendo establecer los tiempos de residencia para la reacción de hidrólisis (35, 60, 75, 95 min); el factor determinante para el análisis del escalado (relación geométrica 1:2) incluye al volumen y tiempo de la reacción, sabiendo en sí cual fue la conversión exacta del proceso (52.86, 82.10, 114.40, 161.27 mg/h). La presente investigación aporta con el entendimiento de uso de reactores catalíticos en transformación de productos de alto valor agregado enfatizando el campo del escalado en las reacciones químicas enzimáticas.

**Palabras Clave:** Inulina/Hidrólisis/Lecho empacado/ Luffa/Fructosa/ Escalado.

## ABSTRACT

Inulin is a carbohydrate found as an energy reserve in various species of the plant kingdom, which through a hydrolysis reaction produces a simpler carbohydrate such as fructose. To replicate this reaction, the present study consisted in the use of a continuous flow bioreactor with a packed bed, using cylindrical luffa as support material for the catalyst. The chemical processes carried out allowed the inulinase to be trapped in a stable manner to determine the reaction kinetics, with a strict control of the operational parameters that were pH (4.6), temperature (49 °C) and flow (3, 5, 7 , 11 ml/min), allowing to establish the residence times for the hydrolysis reaction (35, 60, 75, 95 min); the determining factor for the analysis of the scaling (geometric relation 1:2) includes the volume and time of the reaction, knowing in itself what was the exact conversion of the process (52.86, 82.10, 114.40, 161.27 mg/h). This research contributes with the understanding of the use of catalytic reactors in the transformation of high added value products, emphasizing the field of scaling in enzymatic chemical reactions.

**Keywords:** Inulin/Hydrolysis/Packed bedding/ Luffa/Fructose/ Scaled.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	13
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos.....	17
CAPITULO I.....	18
1.1. Inulina .....	18
1.1.1. Características Físicoquímicas de la Inulina .....	19
1.1.2. Obtención de Inulina a Nivel Industrial .....	20
1.1.3. Usos .....	21
1.2. Fructosa.....	23
1.3. Inulinasa.....	24
1.3.1. Variedades .....	25
1.3.2. Microorganismos Productores de Inulinasa .....	25
1.4. Enzima .....	27
1.4.1. Mecanismo de Acción Enzimático.....	27
1.4.2. Energía de Activación .....	28
1.4.3. Cinética Enzimática.....	29
1.5. Inmovilización Enzimática .....	31
1.6. Retención Medios Físicos (Encapsulación).....	32
1.7. Alginato como Medio de Retención .....	33
1.8. Reactor de Flujo Continuo .....	33
<b>1.8.1. Escalado de Reactores .....</b>	<b>35</b>
CAPITULO II.....	36
METODOLOGÍA.....	36
2.1. Caracterización del Área de Estudio.....	36
2.1.1 Ubicación.....	36
2.2. Localización del Experimento .....	36

2.2.1. Características	
Climatológicas.....	36
2.3. Materiales y Equipos .....	37
2.3.1. Reactivos de Laboratorio e Insumos .....	37
2.3.2. Equipos de Laboratorio .....	37
2.3.3. Materiales .....	37
2.4. Métodos .....	38
2.4.1. Modelado de Resultados de Estudios Significativos de Hidrólisis de Inulina, para Determinar la Constante Cinética a Escala de Laboratorio en un Reactor de Lecho Empacado. ....	38
2.4.3. Evaluación de los reactores propuestos de acuerdo a cada criterio de escalado estudiado:.....	46
2.4.4. Factores en Estudio.....	47
III. CAPÍTULO III .....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
3.1. Modelación de resultados de estudios significativos de hidrólisis de inulina, para determinar la constante cinética a escala de laboratorio en un reactor de lecho empacado. ....	50
3.2. Evaluación de criterios de escalado, a través de análisis matemático. ....	52
3.3. Evaluación de los reactores propuestos de acuerdo a cada criterio de escalado estudiado.....	55
V. BIBLIOGRAFÍA .....	65
VI. ANEXOS.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura básica de la inulina .....	20
<b>Figura 2:</b> Estructura química de la fructosa .....	26
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de acción enzimático .....	30
<b>Figura 4:</b> Velocidad de reacción enzimática .....	32
<b>Figura 5:</b> Reactor RFCTA .....	35
<b>Figura 6:</b> Modelo cinético de Michaelis-Menten .....	41
<b>Figura 7:</b> Cinética Enzimática modelo Michaelis-Menten.....	41
<b>Figura 8:</b> Reactor de flujo pistón o reactor FR.....	63
<b>Figura 9:</b> Variables a tomar en cuenta en el diseño de un reactor PFR .....	63
<b>Figura 10:</b> Reactor con uso de Luffa cylindrica .....	47
<b>Figura 11:</b> Método DNS .....	48
<b>Figura 12:</b> Diagrama del Proceso .....	51
<b>Figura 13:</b> Cinética del reactor de flujo continuo.....	52
<b>Figura 14:</b> Boceto del Bioreactor .....	54
<b>Figura 15:</b> Bioreactor Pequeño vs Grande .....	56
<b>Figura 16:</b> Estandarización del Proceso .....	56
<b>Figura 17:</b> Extracción de Muestras.....	57
<b>Figura 18:</b> Bioreactor en Funcionamiento.....	59
<b>Figura 19:</b> Datos predichos vs reales.....	62
<b>Figura 20:</b> Gráfica de contorno .....	63
<b>Figura 21:</b> Diseño de superficie respuesta.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características fisicoquímicas de la inulina .....	22
<b>Tabla 2:</b> Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales .....	23
<b>Tabla 3:</b> Propiedades funcionales de la inulina y derivados .....	24
<b>Tabla 4:</b> Datos Geográficos de Ibarra.....	38
<b>Tabla 5:</b> Características climatológicas .....	38
<b>Tabla 6:</b> Medidas Bioreactor Pequeño .....	55
<b>Tabla 7:</b> Medidas Bioreactor Grande .....	55
<b>Tabla 8:</b> Resultados de concentración y productividad.....	58
<b>Tabla 9:</b> Anova de la productividad .....	61
<b>Tabla 10:</b> Anova del modelo lineal .....	61

# INTRODUCCIÓN

## PROBLEMA

Para Durán, Córdón & Rodríguez (2013) la industria de alimentos tiene un aumento progresivo del uso de edulcorantes; el nivel calórico que se presenta se asocia a varias enfermedades como: obesidad, diabetes entre otros Swithers (2013).

En los últimos años, se ha incrementado el uso de la fructosa como edulcorante, en donde la producción se hace de forma industrial, utilizando catalizadores y enzimas, se puede tener como ejemplo la hidrolización del maíz en fructosa Serna-Saldivar (2016). El problema que se genera en la producción de fructosa a partir de esta gramínea es su extracción con niveles altos de toxicidad en sus residuos, causando contaminación ambiental. Al ser un proceso de extracción de fácil desarrollo se han dejado de lado otros tipos de métodos de obtención tales como los de tipo enzimático, los cuales aprovechan en su mayoría materias primas y desechos producidos por la agroindustria alimentaria.

Durante mucho tiempo se ha tratado de enfocar el uso de enzimas en procesos agroindustriales en reciclos, es decir la posibilidad de usarla por repetidas ocasiones hasta que se agote la capacidad de acción de la misma. La reutilización de enzimas en el proceso de conversión proporciona importantes ventajas a la industria como disminuir costos y ser amigable con el medio ambiente.

La hidrólisis de inulina utilizando medios de extracción enzimáticos es uno de los procesos más amigables con el medio ambiente por la posibilidad de reutilización y fácil purificación de productos, pero a su vez dicho proceso tiene la desventaja de ser muy lento causando pérdidas económicas.

El desconocimiento de los puntos críticos de la reacción de hidrólisis de inulina a fructosa por medio de encapsulación de inulinasa, es uno de los limitantes a la hora de obtener la cinética de conversión con el uso de reactores, busca obtener el mayor rendimiento de la enzima para abaratar costos y obtener mayores ganancias. Una de las incógnitas es el tiempo de residencia que ocurre dentro del reactor a la hora de efectuar la reacción, ya que se desconoce el comportamiento de hidrólisis en tiempos prolongados de reacción al trabajar con diferentes medios de soporte.

## JUSTIFICACIÓN

En Pinango (2019) se muestra la tabla de arancel nacional de importaciones (COMEX), en donde se indica que la inulina ingresa al país con una tarifa arancelaria del 20% por cada kilogramo. Dicho costo de importación produce el alza en los productos que contengan inulina, sin tener en cuenta que existen fuentes de obtención más baratas que están siendo desaprovechadas, tal es el caso del uso de procesos enzimáticos para la extracción de inulina por medio de hidrólisis con la ayuda de reactores, hasta su posterior transformación en fructosa.

Investigaciones efectuadas en la zona 1 de Ecuador, específicamente en Carchi e Imbabura manifiestan el aprovechamiento de desechos producidos por la agroindustria tales como la tuna (*Opuntia ficus-indica*) y el ajo (*Allium sativum*), a los cuales después de realizar un pre y post tratamiento se logró la extracción de inulina mediante hidrólisis.

Se puede emplear un método de hidrólisis que se fundamenta en la inmovilización enzimática en distintos materiales de soporte. Esta técnica muestra ser una opción prometedora para la obtención de fructosa, al permitir la mejora de los procesos biocatalíticos en la industria. Además, facilita la producción de biocatalizadores estables y eficientes, posibilitando la reutilización y una sencilla purificación de los productos, en contraste con las enzimas libres presentes en el medio de reacción Giraldo y Díaz (2013).

El presente proyecto se basa en el uso de reactores como es el caso del lecho empacado el cual posibilita la obtención de datos referentes a las reacciones enzimáticas, mediante la acción de diferentes métodos de soporte como puede ser encapsulación por medio de alginato o también el uso de luffa que permiten la retención de la enzima necesaria para el proceso en este caso inulinasa dentro del biorreactor para obtener la

cinética de hidrólisis de la inulina hasta convertirse en fructosa, proceso estudiado con la finalidad de buscar puntos críticos de reacción para mejorar el desempeño y tener un mayor aprovechamiento en beneficio de la industria como a su vez el aporte a la matriz productiva.



## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

Analizar el proceso de escalado en la hidrólisis de inulina en un reactor continuo de lecho empacado con enzimas inmovilizadas.

### ***Objetivos específicos***

- Modelar los resultados de estudios significativos de hidrólisis de inulina, para la determinación de la constante cinética a escala de laboratorio en un reactor de lecho empacado.
- Evaluar criterios de escalado, a través de análisis matemático.
- Evaluar los reactores propuestos de acuerdo a cada criterio de escalado estudiado.

## **HIPOTESIS:**

### ***Hipótesis alternativa (Hi)***

**Hi:** El criterio de escalado influye en la cinética de la hidrólisis de inulina.

### ***Hipótesis nula (Ho)***

**HO:** El criterio de escalado no influye en la cinética de la hidrólisis de inulina.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

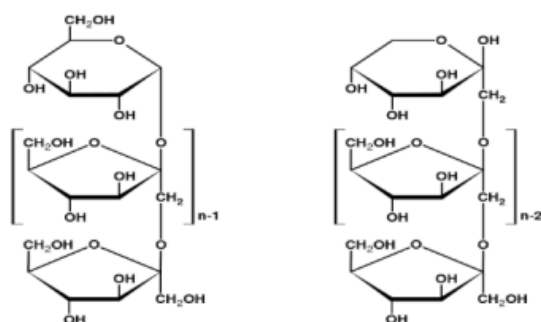
### 1.1. Inulina

La inulina es una sustancia de gran tamaño molecular que se compone de 30 unidades de fructosa, con una unidad de glucosa en el extremo. Es un carbohidrato que actúa como reserva de energía y se encuentra en diversas plantas, principalmente en los rizomas de las dalias y en las alcachofas, las cuales son fuentes de producción industrial de este compuesto. Beyer & Wolfgang (1987)

La inulina es un prebiótico derivado de la fructosa, que no puede ser digerido, no tiene sabor y aporta pocas calorías. Se utiliza en la elaboración de diversos alimentos para brindarles cuerpo, textura, consistencia, viscosidad y humedad. Además, proporciona una sensación en la boca similar a la grasa. Ha demostrado ser exitosa en la sustitución de grasas en postres helados, aderezos, rellenos y productos lácteos, y también se utiliza para agregar fibra a los alimentos (Brunel, 2015) p. 1.

#### Figura 1.

*Estructura básica de la inulina*



Tomado de: (Hernández, Amador, & Botero, 2010)

### ***1.1.1. Características Físicoquímicas de la Inulina***

Debido a su estructura química, los fructanos no pueden ser descompuestos por las enzimas digestivas tanto en humanos como en animales. En consecuencia, permanecen sin cambios en la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son completamente descompuestos y fermentados por bacterias presentes en la parte inferior del tracto gastrointestinal, específicamente en el intestino grueso y el colón. Por esta razón, estos compuestos se clasifican como fibra dietética. Es importante destacar que los fructanos tienen un bajo contenido calórico (1,5 kcal/g), en comparación con los carbohidratos digeribles (4 kcal/g).

En el ámbito industrial, la inulina se presenta en dos formas: como un polvo blanco inodoro y con sabor neutro, y también como un jarabe viscoso (con un 75% de contenido de materia seca), ambas presentaciones carecen de color. La inulina en su forma natural contiene azúcares libres como glucosa, fructosa y sacarosa, lo que le otorga cierto nivel de dulzura (equivalente al 10% de la dulzura de la sacarosa). Por otro lado, la inulina de alta pureza (High Performance) o HP presenta una menor solubilidad que la inulina natural debido a su casi completa ausencia de azúcares libres (constituyendo solo un 0,5% de la materia seca). (Hernández , Amador , & Botero, 2010)

La oligofructosa, cuando se encuentra en solución acuosa al 5% (p/p) y a una temperatura de 10°C, exhibe una baja viscosidad en comparación con otros fructanos. Esta característica es fundamental para la formación de geles y su utilización como sustituto de grasas en alimentos. Además, la inulina tiene la capacidad de mejorar la estabilidad de emulsiones y espumas, lo que la convierte en un estabilizante utilizado en diversos productos alimenticios como helados, salsas, untables y postres cremosos (Madrigal & Sangronis , 2007)

**Tabla 1.**

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

<b>Características</b>	<b>Inulina</b>	<b>Inulina HP (high performance)</b>	<b>Oligofruktosa</b>
Estructura química (*)	GF <sub>n</sub> (2 = n = 60)	GF <sub>n</sub> (10 = n = 60)	GF <sub>n</sub> + F <sub>n</sub> (2 = n = 7)
GP <sub>prom</sub>	12	25	4
Materiaseca (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	125	> 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

(\*) G: unidades de glucosa, F: unidades de fructosa y oligofruktosa

Tomado de: (Madrigal &amp; Sangronis , 2007)

**1.1.2. Obtención de Inulina a Nivel Industrial**

La producción industrial de inulina se enfoca principalmente en la industria alimentaria. Entre las especies vegetales que son reconocidas por su alta concentración de inulina se encuentran aquellas pertenecientes a las familias Liliaceae (como el ajo, la cebolla y los espárragos) y Compositae (como la achicoria, la patata o tupinambo y el yacón). Específicamente, la patata (*Helianthus tuberosus*) y la achicoria (*Cichorium intybus*) son ampliamente utilizadas a nivel industrial para la extracción de inulina.

En su forma nativa, la inulina posee azúcares libres como glucosa, fructosa y sacarosa, lo que le otorga cierto grado de dulzura. Por otro lado, la inulina de alta pureza (HP) o de alta calidad presenta una pureza superior, con una casi total ausencia de azúcares libres. (Hernández , Amador , & Botero, 2010)

**Tabla 2.**

Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales

<b>Especie vegetal</b>	<b>Inulina (g/100g base seca)</b>
Pataca ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	89
Achicoria ( <i>Cichorium intybus</i> )	79
Raíz de Dalia ( <i>Dahlia spp.</i> )	59
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> L)	48
Ajoporro ( <i>Allium porrum</i> L.)	37
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	29
Yacón( <i>Smallanthus sonchifolius</i> )	27
Tuna ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	9
Espárrago ( <i>Asparragus officinalis</i> L.)	4
Cambur ( <i>Musa cavendishii</i> )	2
Centeno ( <i>Secale cereale</i> )	1

**Tomado de:** (Madrigal & Sangronis , 2007)

### 1.1.3. Usos

La inulina es una valiosa materia prima para la producción de fructosa, y su extracción se realiza mediante el uso de agua caliente. Para obtener fructosa a partir de la inulina, se puede realizar una hidrólisis química mediante la adición de ácidos fuertes a un pH de 1-2 y temperaturas de 80-100 °C. Sin embargo, la fructosa es sensible a valores ácidos de pH, lo que resulta en la formación de un producto oscuro bajo estas condiciones de reacción. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática se presenta como una alternativa importante, evitando los problemas de coloración y ofreciendo una forma más adecuada para obtener fructosa a partir de la inulina. (Dergal , 2006 )

La inulina tiene un sabor dulce muy leve y su consistencia especial, así como su baja solubilidad relativa en agua, la convierten en un sustituto destacado para la elaboración de diversos postres. Se utiliza como un excelente agente para enriquecer en fibra, reemplazar la materia grasa y como suplemento en productos que requieren una mayor cantidad de fibras alimentarias. (Seminario , Valderrama , & Manrique , 2003 ),

La inulina presenta propiedades similares a las del almidón, mientras que la oligofructosa se asemeja más a la sacarosa. La inulina tiene el beneficio de mejorar la aceptabilidad de los yogures elaborados con leche descremada, ya que le aporta mayor cremosidad. Además, actúa como agente espesante, retenedor y estabilizante. La capacidad de formar gel es especialmente relevante cuando se utiliza como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos donde las propiedades funcionales que aportan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores. (Madrigal & Sangronis , 2007).

**Tabla 3.**

Propiedades funcionales de la inulina y derivados

<b>Aplicación</b>	<b>Funcionalidad</b>
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 $a_w$ , sustituto de azúcares
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 grasas
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasas
Chocolate	Sustituto de azúcares, humectante

**Tomado de:** (Madrigal & Sangronis , 2007)

## 1.2. Fructosa

Según Velasco (2016), menciona que la fructosa es conocida como "el azúcar que posee la fruta" debido a que es el tipo de azúcar predominante en las frutas. También es el azúcar principal presente en la miel. Gracias a su elevado poder edulcorante, superior al de la sacarosa, pero con un metabolismo más lento que la glucosa, la fructosa se utiliza ampliamente en productos dirigidos a personas con diabetes. Sin embargo, es importante educar a los consumidores sobre el hecho de que, aunque un alimento se declare como "sin azúcar", esto se refiere principalmente a la sacarosa, y que la fructosa que se utiliza como sustituto sigue aportando la misma cantidad de calorías.

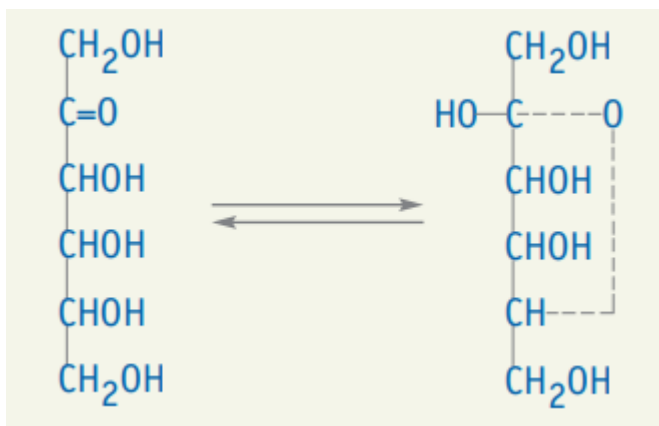
En los últimos años, ha habido un notable aumento en el consumo de fructosa, especialmente en forma de jarabe de maíz alto en fructosa, debido a su capacidad edulcorante potente. Varios estudios han establecido una conexión entre el consumo elevado de esta sustancia y diversas alteraciones metabólicas, como el desarrollo de hígado graso no alcohólico y la malabsorción de fructosa, entre otras afecciones. Esta revisión tiene como objetivo proporcionar una actualización sobre los efectos de la ingesta elevada de fructosa en el hígado e intestino, principalmente relacionada con el consumo de alimentos procesados que contienen fructosa añadida. (Riveros, 2014).

La fructosa es un componente esencial en la industria alimentaria debido a su versatilidad y amplio uso en diversos procesos de producción alimentaria. Se utiliza en la fabricación de bebidas, frutas confitadas, productos de repostería y como edulcorante en una amplia gama de productos alimenticios. Su dulzor característico, combinado con su capacidad para realzar sabores y texturas, la convierten en un ingrediente muy valorado en la industria. Además, la fructosa tiene propiedades de conservación que pueden ayudar a conservar los alimentos. En resumen, la fructosa desempeña un papel fundamental en

la industria alimentaria debido a su versatilidad y contribución a la calidad y sabor de los productos alimenticios.

**Figura 2.**

*Estructura química de la fructosa*



Tomado de: (Castillo P. , 2003)

### 1.3. Inulinasa

La inulinasa es una enzima que se destaca por su capacidad para hidrolizar y romper los enlaces presentes en la inulina, lo que permite su transformación en fructosa prácticamente pura. Esta enzima es ampliamente utilizada en la industria alimentaria, donde la fructosa resultante se utiliza como un edulcorante dietético. La fructosa obtenida a partir de la inulina tiene un poder edulcorante de aproximadamente 1.5 a 2 veces mayor que el de la sacarosa, lo que la hace una opción popular para la reducción de calorías en productos alimenticios. Castillo & Charmy (2010).

Con el pasar del tiempo, ha existido un creciente interés en las inulinasas (también conocidas como 2,1-β-D fructan frutanohidrolasas) debido a su amplio rango de aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica. Estas enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas y tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos presentes en la inulina, un polímero compuesto por fructosa. La acción de la



inulinasa sobre la inulina resulta en la producción de fructosa, siendo este su producto principal. Además, durante la hidrólisis, se generan entre un 5% y un 6% de moléculas de glucosa que se encuentran en los extremos de la cadena química de la inulina.

Las inulasas son producidas por diversos microorganismos, incluyendo hongos filamentosos como *Aspergillus sp.*, levaduras como *Kluyveromyces sp.* y varias bacterias. Estas enzimas son objeto de estudio e investigación debido a sus potenciales aplicaciones en la industria, tanto en la producción de fructosa como en otros procesos relacionados con la degradación de inulina y la modificación de sus propiedades. (Saavedra , Gaona , Patron , Castillo, & Contreras , 2007).

### **1.3.1. Variedades**

Según Alfa Editores (2017) las inulasas se dividen en dos tipos de enzimas: endoinulinasa o exoinulinasa.

- Exo-inulinasa: Su función es la de catalizar la hidrólisis de las fructosas en las regiones terminales, generando fructosa como resultado de la reacción.
- Endo-inulinasa: Estas enzimas son responsables de romper los enlaces internos que se encuentran en la molécula, lo que resulta en la formación de inuloooligosacáridos. Estos últimos son oligómeros con variados grados de polimerización y una cantidad diversa de residuos de fructosa como producto final de la reacción.

### **1.3.2. Microorganismos Productores de Inulinasa**

La evaluación de la producción de una enzima mediante fermentación microbiana se basa en varios parámetros de rendimiento. Estos incluyen la actividad por mililitro de

caldo de cultivo o por miligramo de inulinasa. Estos parámetros ayudan a determinar la cantidad de enzima producida en relación con el volumen o la masa de cultivo utilizado.

Además de los rendimientos, las propiedades de la enzima también son evaluadas durante la producción. Estas propiedades pueden variar según el tipo de microorganismo utilizado, el método de fermentación empleado, el medio en que se cultivó y la forma de incubación.

El tipo de microorganismo empleado es crucial, ya que diferentes especies microbianas pueden producir enzimas con características y propiedades distintas. El modo de fermentación, ya sea en cultivo en lote, continuo o en alimentación, también puede influir en la producción de la enzima.

El medio de cultivo y las condiciones de incubación, como la temperatura, pH, tiempo de fermentación, entre otros factores, son importantes. Por lo tanto, la evaluación de la producción de una enzima por fermentación microbiana implica tener en cuenta tanto los rendimientos obtenidos como las propiedades específicas de la enzima, considerando los factores relacionados con el microorganismo, el proceso de fermentación y las condiciones de cultivo utilizadas. (Castillo & Chamy , 2010)

Es cierto que muchas cepas de levaduras, bacterias y mohos tienen la capacidad productora de inulinasas, y se ha logrado cultivar con éxito y extraer, concentrar y purificar la enzima a partir de ellos. Entre los microorganismos más utilizados para su producción se encuentran los mohos (*Aspergillus sp.*) y las levaduras (*Kluyveromyces marxianus*). En particular, se ha observado que las cepas de levaduras suelen producir mayores cantidades de inulinasa en comparación con las cepas de hongos y bacterias.

Esto puede deberse a diferencias en la capacidad metabólica y la regulación genética de estos microorganismos.

Sin embargo, es importante destacar que la producción de inulinasas puede variar entre diferentes cepas y especies de microorganismos, y que la selección de la cepa adecuada depende de varios factores, como la eficiencia de producción, la actividad enzimática, la estabilidad y la viabilidad en condiciones de fermentación.

En general, el cultivo y la utilización de microorganismos productores de inulinasas proporcionan una fuente valiosa de esta enzima, que puede ser utilizada en diversas aplicaciones en la industria alimentaria y otras áreas relacionadas. (Castillo & Chamy , 2010).

#### **1.4. Enzima**

Las enzimas son proteínas compuestas por cadenas de aminoácidos unidos covalentemente, y su función principal es catalizar una amplia gama de reacciones químicas en los organismos vivos. La capacidad de las enzimas para llevar a cabo su función catalítica depende de su estructura tridimensional, que se mantiene durante la transformación del sustrato y la liberación del producto en el sitio activo. Después de completar la reacción, la enzima vuelve a su forma original y está lista para participar en nuevos ciclos de catálisis. Este proceso es similar al funcionamiento de otros catalizadores, por lo tanto, las enzimas son catalizadores eficaces y amigables con el ambiente, los avances en la ciencia han permitido utilizarlas en la industria. (Ramírez, 2014)

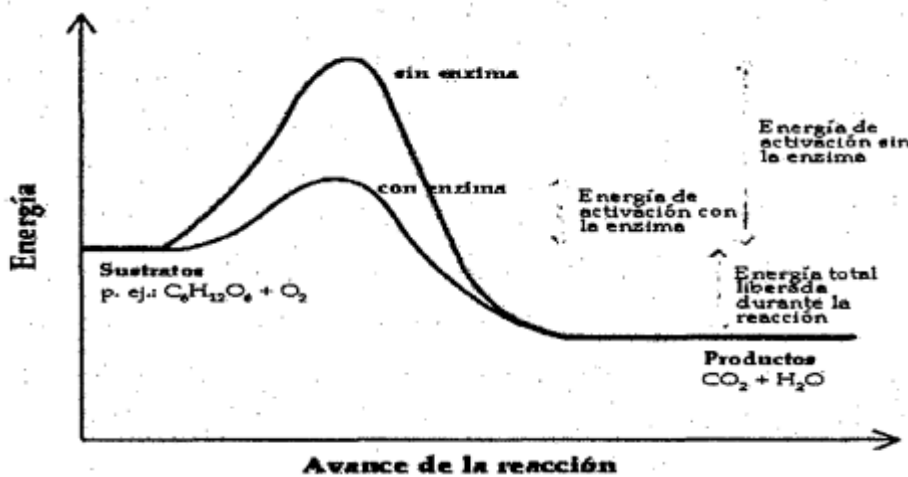
##### ***1.4.1. Mecanismo de Acción Enzimático***

En Diestra & Margarito (2015), podemos observar que su papel principal no consiste en llevar a cabo una reacción por sí misma, sino en modificar la velocidad de la

reacción. La velocidad de una reacción consiste en la cantidad de producto que se forma en un período determinado de tiempo. Esta modificación se produce debido a la reducción de la energía de activación ( $E_a$ ). En una reacción química, la  $E_a$  representa la energía necesaria para convertir los reactivos en especies en estado de transición, que son moléculas inestables con una energía libre mayor que los reactivos y los productos.

**Figura 3.**

*Mecanismo de acción enzimático*



Tomado de: (Gacesa & Hubble, 1990)

### 1.4.2. Energía de Activación

La energía de activación se refiere a la energía que un sistema necesita para que inicie un proceso específico. Es común utilizar este término para describir la energía mínima requerida para que ocurra una determinada reacción. Existe una barrera, conocida como Energía de Activación, que limita la reacción. Solo las moléculas con suficiente energía pueden reaccionar y formar el producto. Para acelerar la velocidad de la reacción, es necesario aumentar la energía de toda la población de moléculas. Esto se puede lograr mediante el calentamiento de la mezcla o adicionando un catalizador.

La energía de activación disminuye con la ayuda de catalizadores al permitir que una mayor cantidad de moléculas interactúe en cualquier momento dado. Esto puede lograr el catalizador al formar un compuesto intermedio no estable con el sustrato, que se descompone velozmente para formar el producto. De esta manera, se proporciona una ruta para que la reacción supere la barrera de energía de activación. (Doran , 1998).

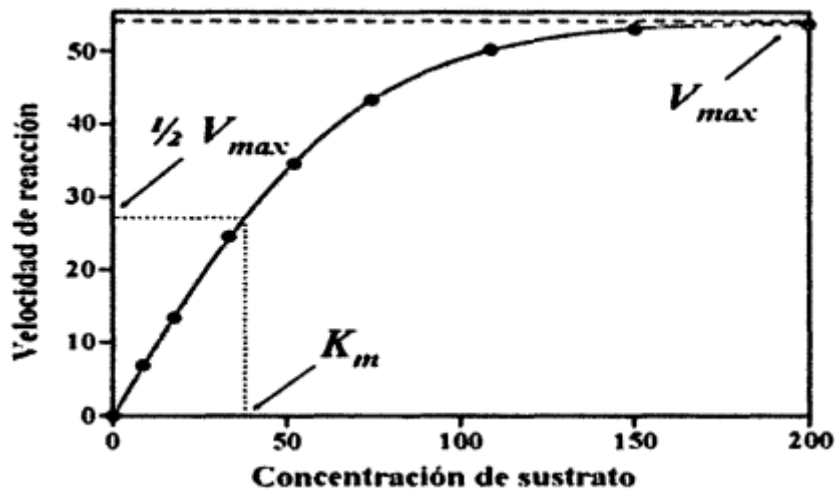
### ***1.4.3. Cinética Enzimática***

La velocidad de las reacciones químicas que son aceleradas por las enzimas es analizada por la cinética enzimática. Al estudiar la cinética de una enzima, podemos obtener información detallada sobre su mecanismo de acción catalítica, su función en el metabolismo, cómo se regula su actividad dentro de la célula, y cómo puede ser afectada negativamente por fármacos o toxinas, o potenciada por otras moléculas. (Valero , 1998).

El conocimiento obtenido sobre la estructura de las enzimas ha sido de gran utilidad para comprender y analizar los datos cinéticos. La estructura enzimática puede proporcionar pistas sobre la forma en que el sustrato y el producto se unen cuando sucede la catálisis, los cambios conformacionales que ocurren durante esta reacción e incluso el papel específico de ciertos aminoácidos en el mecanismo catalítico. Existen enzimas que experimentan cambios significativos en su conformación durante la reacción, por lo que resulta crucial conocer la estructura molecular de la enzima tanto en presencia como en ausencia del sustrato unido. Para ello, se suelen utilizar análogos que se unen a la enzima, pero no permiten que la reacción se lleve a cabo, lo que mantiene a la enzima en una conformación similar a la del sustrato unido. (Valero , 1998).

Figura 4.

Velocidad de reacción enzimática



Tomado de: (Gacesa & Hubble, 1990)

Los mecanismos enzimáticos se pueden clasificar en mecanismos de un solo sustrato o mecanismos de múltiples sustratos. En el caso de enzimas que se unen a un sustrato, como por ejemplo la triosa fosfato isomerasa, los estudios cinéticos se centran en determinar la afinidad con la que el sustrato se une a la enzima y la velocidad a la que se convierte en producto. Por otro lado, al investigar una enzima que se une a varios sustratos, como la dihidrofolato reductasa, la cinética enzimática también puede revelar el orden en el que los sustratos se unen a la enzima y el orden en el que se liberan los productos. (Cunnigham & Lopez , 1994).

Estas características cinéticas fundamentales de una enzima son el nivel máximo de saturación alcanzado y el tiempo requerido para alcanzar la saturación con un sustrato específico. El entendimiento de estas propiedades nos permite formular hipótesis sobre el comportamiento de una enzima en un entorno dado y su respuesta ante cambios de condiciones. Los principios generales de la cinética química pueden aplicarse a las reacciones catalizadas por enzimas, asumiendo una concentración constante de enzima.

La Figura 4 ilustra cómo cambia la velocidad de la reacción catalizada por la enzima en función de la concentración del sustrato. Se nota claramente que a concentraciones bajas del sustrato, la velocidad de formación del producto es proporcional a la concentración del sustrato. A medida que se aumenta la concentración de sustrato se aprecia una pérdida de la proporcionalidad, en esta zona la reacción es de orden mixto y finalmente, a altas concentraciones, la velocidad de la reacción es independiente de esta (Cunnigham & Lopez , 1994).

### **1.5. Inmovilización Enzimática**

Una enzima inmovilizada se refiere a aquella que se encuentra retenida en un espacio específico, conservando su capacidad catalítica y permitiendo su reutilización continua. Se han creado diversas técnicas para lograr la inmovilización de enzimas, lo que ha facilitado su aplicación en diversos campos, como la producción de alimentos, la industria farmacéutica, la biomedicina y su uso como biosensores en métodos analíticos. (Cedillo, 2014).

La inmovilización implica retener la biomolécula en un soporte físico, preservando la capacidad catalítica y permitiendo el flujo de productos y sustratos. Las enzimas pueden ser inmovilizadas en sustratos sintéticos o naturales mediante métodos químicos, como la formación de enlaces covalentes con el sustrato, o mediante métodos físicos, como fuerzas electrostáticas o membranas. Además, existe la opción de encapsular mecánicamente las enzimas, mediante la adición de agentes que forman una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada. (Ochoa, 2011).

Hay una gran diversidad de opciones para utilizar como soportes en la inmovilización de enzimas. Se han utilizado compuestos tanto naturales como sintéticos, orgánicos e inorgánicos, que varían en forma, porosidad, tamaño y densidad. Estos soportes pueden

presentarse en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros o, especialmente, esferas, siendo estas últimas las más populares. Es importante que los soportes seleccionados proporcionen la permeabilidad y el área superficial adecuada para facilitar las reacciones biotransformadoras del sistema. (Díaz, 2012).

### **1.6. Retención Medios físicos (Encapsulación)**

En Parra (2010) encontramos que los métodos de encapsulación se pueden dividir en dos categorías principales: procesos químicos y procesos mecánicos. Los procesos químicos abarcan técnicas como coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento por liposomas e inclusión molecular. En contraste, los procesos mecánicos incluyen técnicas como secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento y extrusión.

La técnica de encapsulación se originó en las décadas de 1930 y 1940 cuando la empresa National Cash Register desarrolló un método para aplicar un tinte comercial utilizando gelatina como agente encapsulante. A partir de la década de 1950, la microencapsulación comenzó a utilizarse en investigaciones sobre recubrimientos sensibles a la presión para la producción de papel carbonado. En la actualidad, es posible encapsular una amplia variedad de sustancias en partículas sólidas en forma de polvo, o incluso microencapsularlas en emulsiones estructuradas.



## 1.7. Alginato como medio de retención

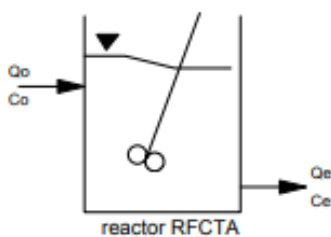
El alginato, un polímero derivado de algas, se emplea como agente encapsulante debido a sus cualidades no tóxicas, biocompatibles y su habilidad para solubilizarse mediante la captura de iones de calcio. Un ejemplo de su aplicación es el alginato de calcio, ampliamente utilizado para la inmovilización de bacterias ácido-lácticas (BAL). Este uso se justifica por su facilidad de manipulación, su naturaleza no tóxica y su bajo coste. Estudios han demostrado que los cultivos inmovilizados en alginato de calcio brindan una mayor protección, ya que se ha observado un aumento en la supervivencia de las bacterias bajo diferentes condiciones de prueba en comparación con las bacterias en estado no encapsulado. (Parra , 2010).

## 1.8. Reactor de Flujo Continuo

Según Fall (2004), el reactor de flujo continuo en tanque agitado (RFCTA) es un sistema que funciona en modo continuo y bajo condiciones estacionarias, lo que implica que las propiedades del sistema se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Los reactivos o sustratos son introducidos de manera continua en el reactor y permanecen allí durante un tiempo específico. Los productos de la reacción son eliminados del sistema con una concentración uniforme y equivalente a la concentración presente dentro del reactor. En resumen, en un reactor RFCTA, la concentración de los componentes en el sistema es igual a la concentración del efluente.

**Figura 5.**

*Reactor RFCTA*



Tomado de: (Fall, 2004)

Tanto la concentración de reactivo (o sustrato) como la tasa de reacción son uniformes dentro del sistema ( $C_e$ ,  $r$  salida), lo que significa que:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dm}{dt} = 0 \\ Q_0 = Q_e = Q \\ r = cte \rightarrow \int r dV = r_{sañida} \cdot V \end{array} \right.$$

El balance de materia del RFCTA viene dado por:

$$0 = C_0 Q - C_e Q + r_{salida} \cdot V \rightarrow V = \frac{Q(C_0 - C)}{-r_{salida}}$$

La ecuación de diseño permite calcular el volumen del reactor RFCTA que se requiere, para llevar la reacción de  $C_0$  (inicial) a  $C$ . Una vez que el caudal a tratar es conocido, se puede también expresar este volumen en término del tiempo de residencia  $\tau$ , como:

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

$\tau$ , el tiempo de residencia hidráulica, representa el tiempo promedio que cada elemento del volumen alimentado en el reactor permanece en el sistema antes de alcanzar la salida. El tiempo de residencia es una variable importante para la calidad del efluente en el reactor.

### ***1.8.1. Escalado de Reactores***

Según Gonzáles (2000) El escalado es el proceso de llevar a cabo de manera rentable una unidad a escala comercial, basándose, al menos en parte, en los resultados de investigaciones previas realizadas a una escala más pequeña. Un proceso de escalado exitoso puede implicar un enfoque paso a paso fundamentado en la experiencia, donde el tamaño del reactor se incrementa gradualmente para comprender detalladamente cómo afecta el cambio de escala a la velocidad y el rendimiento de la reacción. Este procedimiento puede ser largo y costoso, por lo cual se han desarrollado diversos métodos semiempíricos alternativos para abordar esta situación y reducir los desafíos asociados al escalado.

Algunos de los enfoques empleados abarcan el uso del Principio de Semejanza, la modelización matemática y la utilización de modelos a gran escala (mockups). En muchos casos, los resultados más óptimos se obtienen mediante la combinación de estos métodos. No obstante, todos estos enfoques demandan datos cinéticos y termodinámicos fundamentales, los cuales pueden obtenerse de la literatura si están disponibles o a través de experimentación directa.

El principio de semejanza es esencial para el proceso de escalado, tanto en ámbitos físicos como químicos, y se refiere a las relaciones entre sistemas de diferentes tamaños. Este principio, originalmente enunciado por Newton, inicialmente se aplicó a sistemas compuestos por partículas sólidas en movimiento y luego se extendió a sistemas fluidos, donde ha demostrado ser particularmente útil. Según el principio de semejanza, la configuración espacial y temporal de un sistema físico se determina mediante relaciones internas de magnitud del propio sistema, sin depender del tamaño del sistema o las unidades de medida utilizadas para dichas magnitudes.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Caracterización del área de estudio

##### 2.1.1 Ubicación

En la *tabla 4* se encuentra la ubicación del área de estudio.

**Tabla 4.**

Datos Geográficos de Ibarra

Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Parroquia:	El sagrario
Lugar:	Laboratorio de Análisis Físico-Químicos- Antiguo Hospital “San Vicente de Paul”

Tomado de: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra

#### 2.2. Localización del experimento

La fase experimental de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Físico-Químicos, que se encuentra en las instalaciones del Antiguo Hospital "San Vicente de Paul", perteneciente a la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA). Este laboratorio se ubica en la intersección de la avenida Juan Montalvo y Juan de Velasco, en Ibarra - Imbabura, CP 100110, Ecuador.

##### 2.2.1. Características climatológicas

En la *tabla 5* se describen las características climatológicas.

**Tabla 5:**

*Características climatológicas*

Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Ubicación:	0°17'30" y 0°22'30" de latitud norte y sur 78°05'00" y 78°09'00" de longitud este y oeste.

Altitud:	2225 m.s.n.m.
Clima:	Se caracteriza por un clima templado seco con una temperatura promedio de 18°C
Precipitación:	623mm/año

---

Tomado de: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra

## 2.3. Materiales y equipos

### 2.3.1. Reactivos de Laboratorio e Insumos

- Inulina comercial (**Anexo I**) (Marca: SIGMA)
- Luffa (*luffa cylindrica*)
- Inulinasa (**Anexo II**) (Marca: SIGMA)
- Etanol [C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH]; (C % 70% a 90 %)
- Papel empaque
- Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)
- Ácido Cítrico [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>]; (C: 0.2 M)

### 2.3.2. Equipos de Laboratorio

- Balanza analítica (Ap.=±0.01g)
- 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])

### 2.3.3. Materiales

- Probeta (Vol. 50ml); (Ap.=±1ml)
- Micropipeta (Vol. 100-1000µl); (Ap.=±0.5µl)
- Vasos de precipitación (Vol. 500ml); (Ap.= ±100ml)
- Tubos de ensayo (Vol. 20ml); (Ap.= nocalibrado)

- Frascos de vidrio (Vol. 500ml); (Ap.= ±50ml)
- Erlenmeyer (Vol. 500ml); (Ap.= ±50ml)
- Pipeta (Vol. 5ml); (Ap.= ±0.05ml)
- Pipeta (Vol. 1ml); (Ap.= ±0.01ml)
- Cubetas para espectrofotómetro

## 2.4. Métodos

### *2.4.1. Modelado de resultados de estudios significativos de hidrólisis de inulina, para la determinación la constante cinética a escala de laboratorio en un reactor de lecho empacado.*

Los estudios significativos tomados en cuenta para lo obtención de las constantes fueron investigaciones previas realizadas en la Universidad Técnica del Norte acerca de la evaluación del proceso de encapsulación por unión química enzimática de inulina a sirope de fructosa a partir de tuna blanca (Montalvo , 2020) y análisis del proceso conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores flujo continuo y por lote (batch) utilizando como medio de soporte materia orgánica (Godoy, 2023).

Dichos estudios proporcionaron datos acerca de los puntos óptimos en los cuales las reacciones dieron una mayor producción y en ciertos casos se tuvo que reproducir los experimentos utilizando los datos anteriormente mencionados.

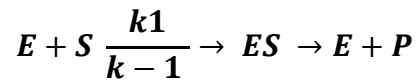
Para la obtención de la cinética de la reacción, se utilizó los fundamentos de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 2) posterior a la obtención de datos experimentales, los cuales también son evidenciados en gráficas del modelado.

El modelo cinético de Michaelis-Menten es una ecuación de velocidad empleada para describir el comportamiento cinético de las enzimas. Esta ecuación ofrece una explicación sobre la relación entre la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción enzimática y

la concentración inicial del sustrato ([S]). De acuerdo con Michaelis y Menten, las reacciones catalizadas por enzimas ocurren en dos etapas: primero, se forma un complejo entre la enzima y el sustrato, y posteriormente, este complejo se convierte en producto.

**Figura 6.**

*Modelo cinético de Michaelis-Menten*

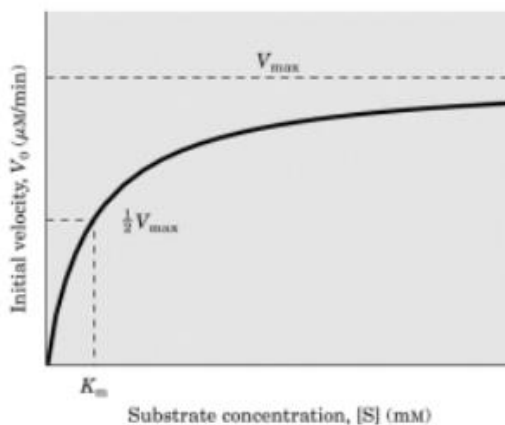


$$V_O = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ec 1.})$$

Tomado de: (Cortés , Pérez , & Jimenez , 2016)

**Figura 7.**

*Cinética Enzimática modelo Michaelis-Menten*



Tomado de: (Cortés , Pérez , & Jimenez , 2016)

$$V = \frac{V_{max}[S]}{k_m + [S]} \quad (\text{Ec 2.})$$

V= Velocidad de reacción

Vmáx= Velocidad máxima de reacción

S= Concentración del sustrato

Km= Constante de Michaelis-Menten

El diagrama de Lineweaver-Burk es la representación gráfica de los parámetros cinéticos de una enzima, observada en la (Ecuación 3), a partir de medidas de parámetros experimentales de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima de reacción.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Ec 3})$$

V= Velocidad de reacción

V<sub>máx</sub>= Velocidad máxima de reacción

S= Concentración del sustrato

K<sub>m</sub>= Constante de Michaelis-Menten

Con la finalidad de establecer la influencia de la variación de velocidad de reacción, se incluirá una función que contemple una variable respuesta con un tiempo constante, la cual permita maximizar la velocidad de reacción y minimizar el K<sub>m</sub>.

$$V = f(V_{max}, k_m)$$

$$V_{\text{Óptima}} = (V_{max}, k_m)$$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{k_m + [S]}$$

V= Velocidad de reacción enzimática

V<sub>máx</sub>= Velocidad máxima de reacción

S= Concentración del sustrato

K<sub>m</sub>= Constante de Michaelis- Menten



Se distinguen tres fases en Cinética Enzimática:

- Orden Cero: Cuando es alta la concentración de sustrato, un valor constante en la velocidad de la reacción y se vuelve independiente de la concentración de sustrato.
- De Primer Orden: Cuando es baja la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción muestra una relación lineal directamente proporcional con la concentración del sustrato.
- Cinética Mixta: Para concentraciones de sustrato intermedias la velocidad del proceso deja de ser lineal (Cortés , Pérez , & Jimenez , 2016).

#### ***2.4.2. Evaluación de criterios de escalado, a través de análisis matemático.***

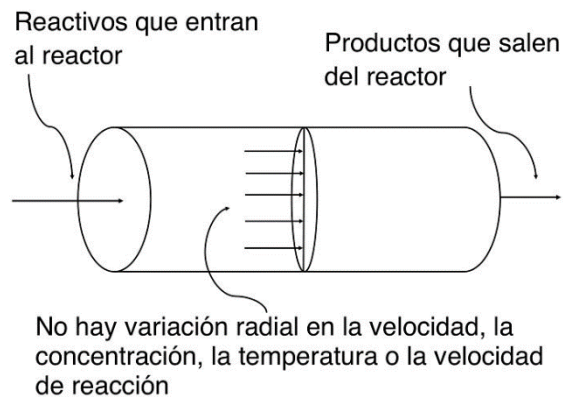
##### **2.4.2.1. Diseño del Reactor**

Según IQR Ingeniería Química (2020) los reactores de flujo pistón, también conocidos como reactores PFR (Plug Flow Reactor), son reactores químicos homogéneos que operan en estado estacionario, lo que significa que sus propiedades se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Estos reactores se utilizan para realizar reacciones químicas en fase líquida o fase gaseosa. A diferencia de otros tipos de reactores, en los reactores de flujo pistón no se mezclan axialmente las corrientes presentes en el reactor, lo que forma parte del proceso.

Usualmente, un reactor de flujo pistón consta de un tubo vacío, aunque también puede contener catalizadores en forma de empaque para acelerar o retrasar las reacciones que ocurren dentro del mismo. Los perfiles de temperatura y concentración se expresan en función de la posición del fluido dentro del reactor. Los reactivos ingresan al reactor y fluyen a lo largo de él en dirección axial. Conforme avanzan, los reactivos son consumidos y su conversión aumenta a medida que recorren la longitud del reactor. El funcionamiento de este tipo de reactor se puede observar en la figura 8:

**Figura 8.**

*Reactor de flujo pistón o reactor PFR*



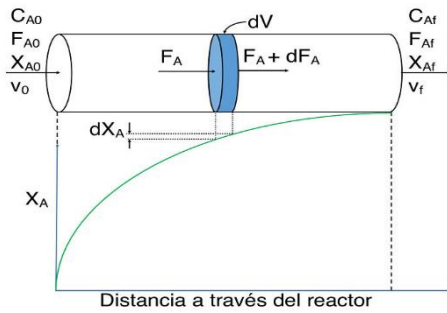
Tomado de: (*IQR Ingeniería Química* , 2020)

Para obtener una ecuación que represente la composición de los reactivos en función de la distancia dentro del reactor, fue necesario analizar la variación de la concentración de los reactivos a lo largo del tiempo.

Previo a esto, se realizaron ciertas suposiciones, como la perfecta mezcla del fluido en dirección radial y la disminución de la concentración de los reactivos a medida que fluyen a lo largo del reactor. Además, se consideró que no hay acumulación dentro del reactor. Con todas estas consideraciones en cuenta, El reactor fue considerado como un sistema con flujo continuo de entrada y salida para llevar a cabo un balance de masa, tal como se muestra en la Figura 9:

**Figura 9.**

*Variables a tomar en cuenta en el diseño de un reactor PFR*



Tomado de: (IQR Ingeniería Química, 2020)

Al realizar el balance de masa, se llegó a la siguiente expresión:

$$\frac{dm}{dt} = m_{entra} - m_{sale} + \text{agotamiento de reactivos}$$

El primer término representa la acumulación de masa, al no haberla, se hace cero, quedando la expresión de la siguiente manera:

$$m_{entra} = m_{sale} + \text{agotamiento de reactivos}$$

Sustituyendo términos:

$$m_{entra} = F_A$$

$$m_{sale} = F_A + dF_A$$

$$\text{agotamiento de reactivos} = -(F_A)dV$$

Reagrupando y simplificando, llegamos a la siguiente ecuación de diseño para un reactor de flujo pistón:

$$FA_0 dX_A = (-r_A) dV$$

Al igual que en un reactor CSTR, el tiempo espacial para un reactor PFR viene definido por:

$$\tau = \frac{V}{V_0}$$

Donde:

V: Volumen del reactor tubular.

v<sub>0</sub>: Flujo volumétrico a la entrada del reactor.

El tiempo de residencia puede ser calculado utilizando la siguiente expresión:

$$dV = v dt$$

#### 2.4.2.2. Método de Soporte Enzimático

El método de retención enzimático utilizado fue: atrapamiento de la enzima con ayuda de luffa (Montalvo, 2020), método descrito a continuación.

#### Inmovilización enzimática mediante *Luffa Cylindrica*

Para realizar la inmovilización enzimática utilizando *Luffa cylindrica*, se empleará el método de unión covalente. El proceso de preparación de la luffa implica diversos pasos, que se detallan en el siguiente procedimiento: Saeed & Iqbal (2013)

Para realizar la inmovilización enzimática con *Luffa cylindrica*, se deben seguir los siguientes pasos: primero, se corta *L. Cylindrica* por la mitad en discos rectangulares de 18x20 mm y con un espesor de 2-3 mm. Luego, estos discos se sumergen en agua hirviendo durante 30 minutos y se enjuagan con agua corriente. A continuación, se

colocan en agua destilada durante 24 horas, cambiando el agua de 3 a 4 veces. Después de este proceso de remojo, se dejan secar y una vez que estén completamente secos, se esterilizan en autoclave a una temperatura de 120°C, una presión de 1,06 kg/cm<sup>2</sup> y durante 20 minutos.

En Montalvo (2020) se lleva a cabo un procedimiento similar para los factores de esterilización y, además, se emplea ácido cítrico a una concentración de 0.2 M en una proporción de 1:50 como brazo espaciador. Esto resulta en la obtención de una luffa activa lista para la encapsulación enzimática, para ser posteriormente implementada en el reactor.

**Figura 10.**

*Reactor con uso de Luffa cylindrica*



**Tomado de:** Autor

**2.4.2.3. Manejo Específico del Experimento**

En el presente trabajo se utilizó datos obtenidos de investigaciones previas realizadas en la Universidad Técnica del Norte, acerca de la evaluación del proceso de encapsulación por unión química enzimática de inulina a sirope de fructosa a partir de tuna blanca (Montalvo , 2020) y análisis del proceso conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores flujo continuo y batch utilizando como medio de soporte materia orgánica (Godoy, 2023).

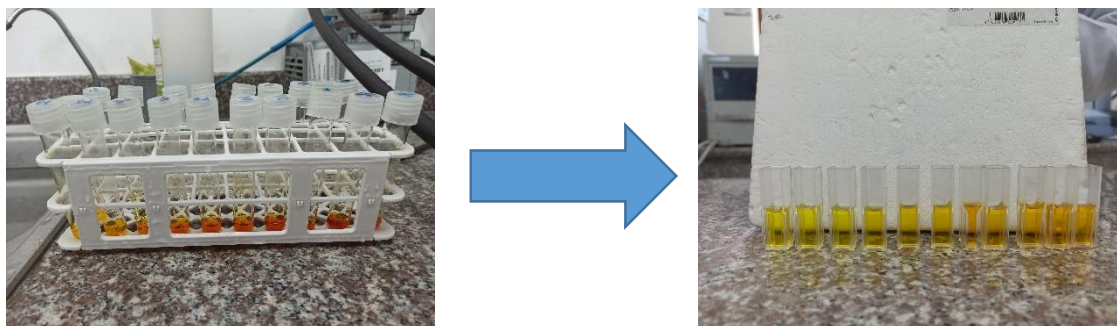
### ***2.4.3. Evaluación de los reactores propuestos de acuerdo a cada criterio de escalado estudiado:***

Para la productividad del experimento se aplicó el método de Miller o método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), para esto se realizó una dilución de acuerdo con Díaz (2020) 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 aforó a 50 ml con agua destilada, es necesario guardar en un frasco ámbar a temperatura de 4 °C. Fue necesario elaborar una curva de calibración de la fructosa para servir como referencia en los procesos de conversión enzimática o hidrólisis de esta. Se utilizó el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm para llevar a cabo dicha calibración.

La construcción de la curva de calibración se llevó a cabo utilizando soluciones que contienen concentraciones conocidas del analito, las cuales se denominan soluciones patrón o estándar. (Dorsal & Villanueva , 2008). En el mismo apartado, el autor indica que los estándares o soluciones patrón empleados para construir la curva de calibración deben ser preparados individualmente, utilizando una o varias soluciones madre. El número de puntos seleccionados para la curva de calibración dependerá del propósito específico para el cual se utilice dicha curva.

**Figura 11.**

*Método DNS*



Tomado de: Autor

#### 2.4.4. Factores en estudio

Los factores que se estudiaron fueron el pH, temperatura, tiempo de residencia y medio de soporte, determinando la mejor combinación para obtener un tiempo de reacción más rápido.

Los factores de pH, temperatura y medio de soporte se tomaron de investigaciones anteriores realizadas en la Universidad Técnica del Norte (Montalvo, 2020) y (Godoy, 2023). En cuanto al tiempo de residencia los datos fueron tomados mediante un proceso de escalado geométrico con la finalidad de amplificar el tamaño de un reactor tres veces más al de uno común (González, 2000).

#### Valores Constantes:

- Temperatura de 49.5 °C – 4.6 pH (Montalvo,2020)

#### Factor A: Tiempo de residencia

NIVEL	Tiempo (min)
A1:	35
A2:	60
A3:	75
A4:	95

#### Factor B: Medio de soporte

NIVEL	Medio de soporte
B1:	Luffa

#### 2.4.4.1. Tratamientos de Estudio

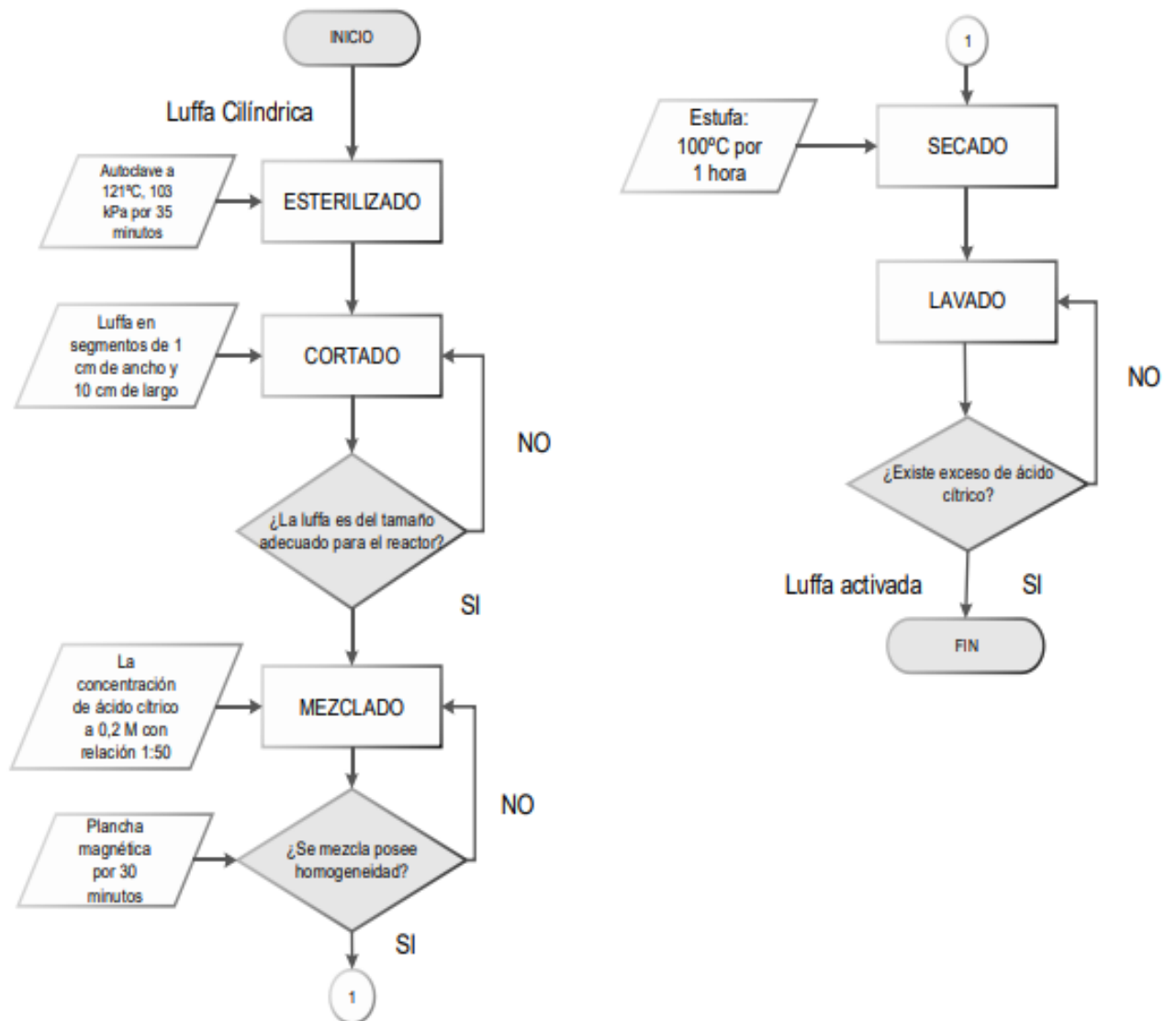
N°	Simbología	Experimentos
1	T1	A1B1
2	T2	A2B1
3	T3	A3B1
4	T4	A4B1



#### 2.4.4.4. Diagrama de Activación de Luffa Cilíndrica

Figura 12

Diagrama del Proceso



Tomado de: Autor

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

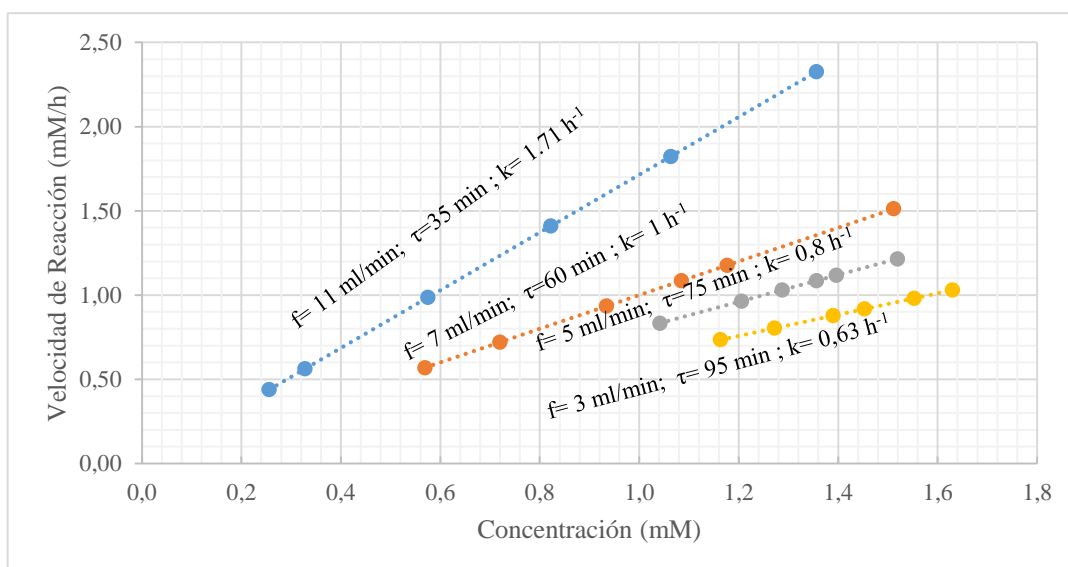
En este capítulo se exponen los resultados de la investigación, los cuales se obtuvieron mayoritariamente utilizando el programa estadístico Design Expert versión 13, para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados.

#### 3.1. Modelado de resultados de estudios significativos de hidrólisis de inulina, para la determinación de la constante cinética a escala de laboratorio en un reactor de lecho empacado.

Según (Illanes, 2008) la cinética revela la manera en que el reactor responde a las condiciones necesarias para medir la producción, y cómo estas condiciones impactan en el resultado final y en la eficiencia de la transformación del sustrato. En esta investigación, se examinan varios factores, tales como la temperatura, el pH, el flujo y el tiempo de residencia, los cuales tienen un impacto significativo en el estudio del reactor de flujo continuo. Para representar estos efectos, se presentan gráficas que muestran las concentraciones de fructosa en cada tratamiento (Mm) y la velocidad de reacción (Mm).

#### Figura 13

Cinética del reactor de Flujo continuo



Al igual que la temperatura y pH fueron valores claves dentro de la experimentación, también se pudo conocer que el tiempo de residencia tiene mucho que ver con la velocidad de reacción. En la Figura 13 se puede apreciar, los valores más representativos en cuanto a producción de fructosa se encuentran en los flujos de 3 ml/min (0,29 g/L o 1,63 mM) y 5 ml/min (0,27 g/L o 1,52 mM), sin embargo los valores en este rango tienen un valor alto y son similares, cabe destacar que los valores de producción que manejan los flujos de 7 ml/min (0,27 g/L o 1,51 mM) y 11 ml/min (0,24 g/L o 1,36 mM) también son representativos en cuanto a productividad, con la única diferencia que el agotamiento enzimático presente en los mismos es alto por la cantidad de líquido que pasa por el lecho empacado en un corto tiempo, causando así que la reacción de hidrólisis de inulina sea espontánea y efectiva. Se puede utilizar cada flujo a conveniencia, dependiendo la concentración y rapidez con la que se desea obtener la solución de fructosa, pero siempre teniendo en cuenta el agotamiento de la enzima que produce cada uno.

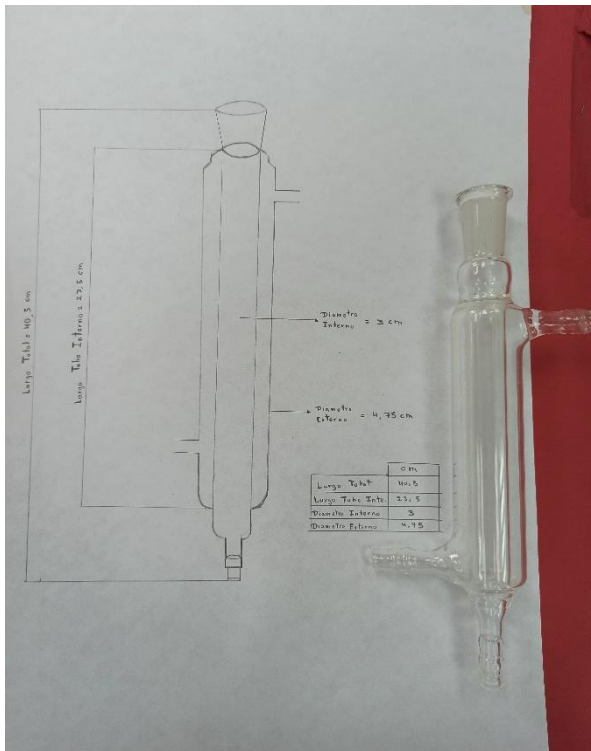
Todos los datos mencionados anteriormente se compararon con la cinética obtenida en la investigación de Godoy (2023) donde manejó un reactor de flujo continuo con lecho empacado, con similares valores de productividad como los obtenidos en el presente trabajo. Y también a partir del punto óptimo con más alta productividad de Montalvo (2020), con un pH de 4,6 en la solución de inulina que fue hidrolizada dentro del lecho empacado y una temperatura de la camisa de calentamiento del reactor de 49 °C, tratando de que esta última sea constante para que no exista una variación significativa de la temperatura y a su vez verse afectada la reacción de hidrólisis de la inulina a fructosa dentro del reactor. (**Anexo VI**)

### 3.2. Evaluación de criterios de escalado, a través de análisis matemático.

González (2000) manifiesta que, el escalado es el proceso de implementar y operar de manera rentable una unidad a escala comercial, utilizando como base, al menos en parte, los resultados de investigaciones realizadas a una escala más pequeña. Un proceso de escalado exitoso puede implicar un enfoque paso a paso, basado en la experiencia, en el cual el tamaño del reactor se incrementa gradualmente para comprender detalladamente cómo afecta el cambio de escala a la velocidad y rendimiento de la reacción.

**Figura 14**

Boceto del Biorreactor



Tomado de: Autor

Mediante los datos proporcionados en las investigaciones de Montalvo (2020) y Godoy (2023), se obtuvo un punto de partida para el diseño del nuevo bioreactor de lecho empacado con flujo continuo, mismos que son especificados en la Tabla 6.

**Tabla 6**

Medidas Biorreactor Pequeño

Medidas Biorreactor Pequeño (cm)	
Altura	18,35
Circunferencia Externa	2,61
Diámetro Interno	1,36
Diámetro Externo	2,15
Cilindro Interno Largo	10,62
Radio	0,68
Volumen	125 ml

Tomado de: Autor

La escala inicial a ser utilizada para la elaboración del nuevo reactor pretendía ser una relación geométrica de 1:3, por motivos de manufactura y diseño se decidió bajar la relación a 1:2, lo cual indicó que los factores a escalar serían duplicados para la construcción del nuevo diseño, mismos que son especificados en la Tabla 7.

**Tabla 7**

Medidas Biorreactor Grande

Medidas Biorreactor Grande (cm)	
Altura	40,55
Circunferencia Externa	5,77
Diámetro Interno	3,01
Diámetro Externo	4,75
Cilindro Interno Largo	23,47
Radio	1,50
Volumen	415 ml

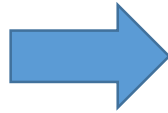
Tomado de: Autor

Luego de la fabricación del reactor se empezó con la estandarización del proceso para la hidrólisis de la inulina a fructosa, mismo que fue tomado de Montalvo (2020). Cuando llevamos una actividad de pequeña a gran escala existirá presencia de inconvenientes, tal fue el caso de la esterilización y activación del método de retención enzimático, así como en el llenado del reactor con el lecho empacado (luffa), problemas que no se manifestaron en el uso del reactor a menor escala, mismos que fueron resueltos

para el uso del equipo a mayor graduación. Todo esto fue realizado con el fin de evitar pérdidas económicas, ya que el uso de insumos y reactivos a nivel industrial afecta en el costo beneficio de estos reactores. (Anexo VII)

**Figura 15**

Biorreactor Pequeño vs Grande



Tomado de: Autor

**Figura 16**

Estandarización del Proceso



Tomado de: Autor

### 3.3. Evaluación de los reactores propuestos de acuerdo a cada criterio de escalado estudiado

El criterio de escalado que tuvo más énfasis en esta investigación, fue el tiempo de residencia en el cual se desarrolló la reacción de hidrolisis de inulina a fructosa con la ayuda del reactor. Según Gutiérrez (2016) nos explica que el tiempo de residencia es el tiempo que permanece un elemento de fluido en un reactor continuo; la distribución de tiempos de residencia debe conocerse para el correcto diseño del reactor, en otras palabras, también puede definirse como el tiempo en que un líquido o sustancia tarda en pasar de un punto A hasta un punto B mientras en este se produce la reacción que se desea.

#### Figura 17

Extracción de muestras del proceso



Tomado de: Autor

Con la ayuda del método DNS utilizado en Montalvo (2020), mediante el uso del espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm se desarrolló una curva patrón de fructosa (**Anexo III**) la cual fue utilizada para la cuantificación de las muestras obtenidas en el experimento, manifestando en la Tabla 8 los resultados del reactor de flujo continuo con lecho empacado.

**Tabla 8**

Resultados de concentración y productividad del proceso

Tiempo de Muestra (min)	Flujo (ml/min)	Concentración (mg/L)	Tiempo de residencia (h)	Productividad (mg/h)
5	11	244,35	0,58	161,27
10	11	191,57	0,58	126,44
15	11	148,13	0,58	97,77
20	11	103,61	0,58	68,38
25	11	59,08	0,58	38,99
30	11	46,05	0,58	30,39
5	7	272,37	1	114,40
10	7	211,99	1	89,04
15	7	195,48	1	82,10
20	7	168,33	1	70,70
25	7	129,67	1	54,46
30	7	102,52	1	43,06
5	5	273,68	1,25	82,10
15	5	251,52	1,25	75,46
25	5	244,35	1,25	73,31
35	5	231,97	1,25	69,59
45	5	217,20	1,25	65,16
55	5	187,66	1,25	56,30
5	3	293,66	1,58	52,86
15	3	279,76	1,58	50,36
25	3	261,73	1,58	47,11
35	3	250,43	1,58	45,08
45	3	229,15	1,58	41,25
55	3	209,60	1,58	37,73

Tomado de: Autor

La fase experimental se evaluó utilizando los parámetros de puntos óptimos obtenidos en Montalvo (2020), los cuales indicaron una solución de inulina con un pH de 4,6, temperatura de calentamiento durante todo el proceso de 49 °C, todo lo anteriormente mencionado en un tiempo de residencia de 1 hora (0,2 ml/min), siendo así la combinación de todos estos factores los mejores resultados de la reacción. Con este punto de partida se replicó el experimento a una escala mayor modificando el flujo de entrada de la solución para que existan cambios en el tiempo de residencia, siendo los nuevos flujos utilizados 3 (1,58 h), 5 (1,25 h), 7 (1 h) y 11 (0,58 h) ml/min. (**Anexo IV y V**)



Se pudo determinar que no existió una diferencia significativa para los valores de productividad entre los 3 y 5 ml/min , como a su vez entre 7 y 11 (ml/min) ya que la variación de los flujos es mínima y por ende la reacción fue parecida, pero en lo que sí se logró determinar una variación a tomar en cuentas es al momento de comparar la productividad entre 3 ml/min y 11 ml/min, ya que a menor flujo se pudo obtener una solución más concentrada de fructosa, dando como resultado que el agotamiento enzimático está ligado a la cantidad de flujo y velocidad con la que este pase por el método de retención que contiene a la enzima (inulinasa), en este caso como fue la luffa cilíndrica.

### **Figura 18**

Biorreactor en Funcionamiento



Tomado de: Autor

Para corroborar que los datos obtenidos en la fase experimental de esta investigación son fiables, se utilizó el programa estadístico Desing Expert 13, el cual es un programa de análisis estadístico avanzado.

El siguiente modelo, desarrollado a partir de la fase experimental, estima la productividad de fructosa durante la hidrólisis enzimática en un reactor de flujo continuo con lecho empacado.

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

$$PR = -856,56 * A - 795,59 * B - 140,33 * AB + 52,76 \quad (\text{Ec 4})$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

A= Variable codificada para Flujo (ml/min)

B= Variable codificada para Tiempo de Residencia (min)

AB= Interacción entre ambas variables

- Modelo para la variable productividad en términos de factores reales

$$PR = -138,36165 * A - 1100,03922 * B - 70,16422 * AB + 2739,78031 \quad (\text{Ec 5})$$

Donde:

PR= Productividad expresada en mg/h

A= Variable codificada para Flujo (ml/min)

B= Variable codificada para Tiempo de Residencia (min)

AB= Interacción entre ambas variables

En la Tabla 9 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los factores (Flujo y Tiempo de residencia) y variable respuesta (Productividad), datos obtenidos de la experimentación en esta investigación, el análisis de varianza de la variable respuesta nos permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para obtener el mejor rendimiento en la reacción. El análisis de varianza para la productividad de fructosa nos indica que el valor -p del modelo es significativo debido a que posee un valor-p < 0.05

**Tabla 9**

ANOVA de la productividad del modelo

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F-value</b>	<b>p-value</b>	
Modelo	27326.05	3	9108.68	166.50	< 0.0001	significativo
A-Flujo	897.15	1	897.15	16.40	0.0037	
B-Tiempo de Residencia	768.39	1	768.39	14.05	0.0056	
AB	803.44	1	803.44	14.69	0.0050	
Residual	437.65	8	54.71			
Total	27763.70	11				

Tomado de: Autor

En el análisis de varianza muestra que el Valor-F del Modelo es de 254,20 por lo tanto es significativo, y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es de 0.9842 lo cual indica que los datos obtenidos son fiables, pero el ( $R^2$ ) predicho es 0.9645 y se encuentra de acuerdo con el ( $R^2$ ) ajustado de 0.9783; es decir, la diferencia es inferior a 0.2.

En la Tabla 10 podemos observar el coeficiente de variación existente en los datos de la experimentación, el cual posee un valor de  $CV=3,70\%$ , el cual al ser menor a  $10\%$  nos indica que hay confiabilidad y una buena precisión en los experimentos.

**Tabla 10**

Análisis de varianza ANOVA para el modelo lineal

<b>Término</b>	<b>Respuesta</b>
Desviación Estándar	7,40
Media	200,16
$R^2$	0,9842
$R^2$ ajustado	0,9783
$R^2$ predicha	0,9645

Coefficiente de Variación (%)      3,70

Precisión Adecuada              28,5515

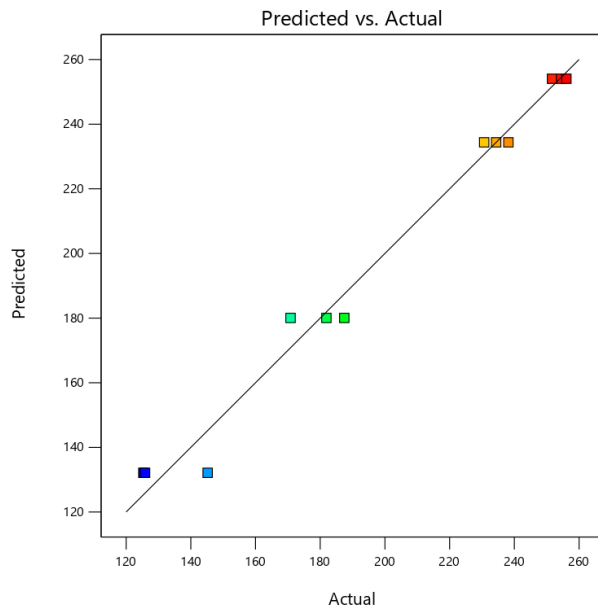
---

Tomado de: Autor

En la Figura 19 se puede apreciar los valores predichos por el programa y los valores reales obtenidos en la experimentación, por lo que al tener un coeficiente de determinación de 0,9842 nos indica que la dispersión existente es mínima.

**Figura 19**

Valores predichos vs reales



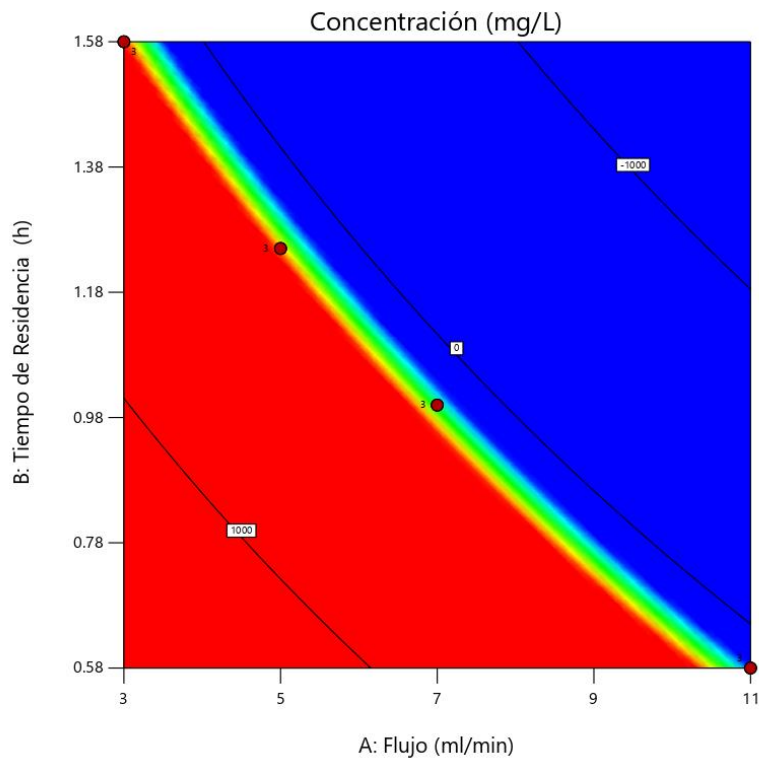
Tomado de: Autor

En la Figura 20 se puede apreciar la gráfica de contorno, la cual nos indica los diferentes puntos de productividad, siendo el área azul los de menor valor, teniendo a 52,86 mg/h correspondiente al flujo de 3 ml/min (tiempo de residencia = 1,58 h) como el resultado con más baja productividad del experimento, en cambio sí nos referimos al punto con mayor productividad, sería 161,27 mg/h referente a 11 ml/min (tiempo de residencia = 0,58 h) ocupando el área de color rojo de la gráfica. A pesar de la alta

productividad existente en los flujos mayores, siempre se debe destacar el agotamiento enzimático y que el experimento manejó constantes descritas en capítulos anteriores.

### Figura 20

Gráfica de contorno para la productividad del proceso



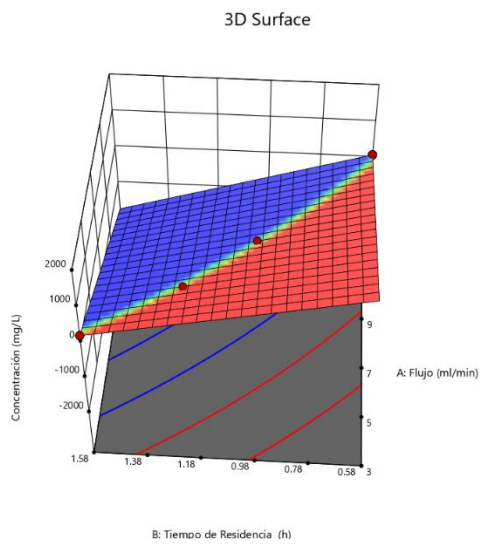
Tomado de: Autor

La Figura 21 indica la gráfica del análisis de superficie respuesta correspondiente a la productividad en la conversión de fructosa, en la que se puede observar que se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

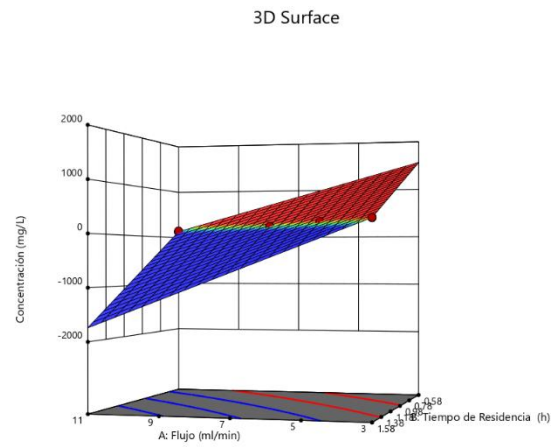
## Figura 21

Diseño de superficie respuesta correspondiente a la productividad

a) Modelo superficie respuesta con vista superior



b) Modelo superficie respuesta con vista horizontal



Tomado de: Autor

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSIONES**

- La gráfica de estudio cinético muestra continuidad en cuanto a la velocidad de reacción y conversión en la mayor parte del proceso de hidrólisis de inulina, lo que permitió determinar la constante cinética que se produce a diferentes flujos y evaluar las diferentes condiciones para el escalado del reactor.
  
- Se logró determinar que la relación geométrica de 1:2 utilizada en el escalado, permite la mejora del proceso en cuanto a velocidad de reacción y productividad final de fructosa alcanzando valores que duplican al reactor original o base, lo que permite aumentar la versatilidad del proceso y obtener los modelos matemáticos en el reactor.
  
- Se determinó que la hipótesis alternativa es aceptada, ya que los criterios de escalado del biorreactor influyen directamente en la cinética de hidrólisis de inulina a fructosa, al tener valores mayores de productividad en comparación del reactor base y el reactor modificado, esto permite establecer que la tecnología es escalable para alcanzar producciones aún mayores a las obtenidas en la presente investigación.

## RECOMENDACIONES

- Estandarizar el armado del reactor, antes del proceso de hidrólisis de inulina a fructuosa, debido a los altos costos en reactivos e insumos.
- Implementar un controlador de temperatura para la camisa de calentamiento del reactor.
- Implementar una línea de vapor en el proceso de esterilizado de la luffa para poder realizarlo dentro del mismo equipo, facilitando la manipulación y ahorrando tiempo en cada llenado del reactor.
- Realizar estudios en cuantificación de los tipos de glúcidos encontrados dentro de la solución para su posterior separación.



## V. BIBLIOGRAFÍA

- Alfa Editores . (20 de Enero de 2017). *Estudian potencial de enzima inulinasa y su termoestabilidad*. Obtenido de Alfa-Editores : <https://www.alfa-editores.com.mx/estudian-potencial-de-enzima-inulinasa-y-su-termoestabilidad/>
- Álvarez , R., Ruano, A., Calle , M., & Lara , M. (2015). Extracción y determinación de inulina del ajo común autóctono (*Allium sativum*). *Revista Cubana de Química*, Vol. 27, No. 2, 131-146.
- Asma , S., & Iqbal, M. (18 de Abril de 2013). *Loofa (Luffa cylindrica) sponge: review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications*. Obtenido de *Biotechnology progress*, 29(3), 573–600. : <https://doi.org/10.1002/btpr.1702>
- Aviles , H., Dorantes , J., Calva, G., Lucho , C., & Beltrán , R. (2018). Inmovilización de enzimas. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, Vol. 5, No. 10, 7-8.
- Aziz , G., Zainab , W., & Al-Sa'ady, A. (2015). Extraction, Partial Purification and Characterization of Inulinase Produced from *Aspergillus niger* AN20 by Solid State Fermentation. *Iraqi Journal of Biotechnology*, Vol. 14, No. 2, 111-122.
- Beyer, H., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de química orgánica* . Barcelona-Bogota-Buenos Aires-Caracas-México: Reverté.
- Brunel , J. (14 de Julio de 2015). *¿Para que sirve la Inulina?:FoodNewsLatam*. Obtenido de <https://www.foodnewslatam.com/inocuidad/54-ingredientes/3343-%C2%BFpara-que-sirve-la-inulina.html>
- Castaños, E. (17 de 08 de 2015). *BLOG DE ENRIQUE CASTAÑOS DEDICADO A LA ENSEÑANZA Y LA DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA*. Obtenido de BLOG DE ENRIQUE CASTAÑOS DEDICADO A LA ENSEÑANZA Y LA

DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA:

<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/17/cromatografia-en-capafina/>

Castillo, A., & Chamy, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 235-245.

Castillo, P. (2003). El consumo de fructosa: Un riesgo para la salud y la economía. *Ciencia*, 8. Obtenido de Ciencia: [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/54\\_2/consumo\\_fructuosa.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/54_2/consumo_fructuosa.pdf)

Cedillo, L. R. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas. *Acta química mexicana*.

Cortés, A., Pérez, L., & Jiménez, R. (30 de Mayo de 2016). *ENZINETIC UPIIG*. Obtenido de UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA CAMPUS GUANAJUATO: <https://sites.google.com/site/enzineticipiig/michaelis-menten>

Cunningham, R., & Lopez, G. (1994). *Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas*, Santiago de Compostela, Universidad. España.

Dergal, S. B. (2006). *Química de los alimentos Cuarta edición*. México: PEARSON EDUCACIÓN.

Díaz, M. (2012). *UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA*. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA: <http://bdigital.unal.edu.co/9242/1/8110002.2012..pdf>

Diestra, J., & Margarito, L. (2015). *MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA INULINASA DE kluyveromyces marxianus FERMENTADO EN EXTRACTO DE YACÓN (Polymnia sanchifolia)*. Obtenido

de MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA INULINASA DE *kluveromices marxianus* FERMENTADO EN EXTRACTO DE YACÓN (*Polymnia sanchifolia*): <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/1962/27284.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Doran , P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. España : Editorial Acribia S.A.

Dorsal, M., & Villanueva , M. (2008). *CURVAS DE CALIBRACIÓN EN LOS MÉTODOS ANÁLITICOS* . Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION\\_23498.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf)

Dubois, M. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars. *Division of Biochemistry, University of Minnesota*, 356.

Durán , S., Cordon, K., & Rodriguez , M. (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Rev. chil. nutr. vol.40 no.3*, 309-314.

Fall, C. (2004). *INTRODUCCIÓN A LA CINÉTICA DE LOS PROCESOS Y ANÁLISIS DE LOS REACTORES*.

Gacesa , P., & Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. . Zaragoza, España: Editorial escriba S.A. .

Godoy, J. (2023). *Análisis del proceso de conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores de flujo continuo y batch utilizando como medio de soporte materia orgánica*. Obtenido de Análisis del proceso de conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores de flujo continuo y batch utilizando como medio de soporte materia orgánica.

- Gomez , G., & Díaz , M. (2013). Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada. *Producción + Limpia*, Vol. 8, No. 2, 51-59.
- González, R. (2000). *PRINCIPIOS BÁSICOS DE ESCALADO*. Obtenido de <http://monografias.umcc.cu/monos/2001/MONOGRAFIA10.htm>
- Gutiérrez, F. (2016). *MODELO DE FLUJO EN UN REACTOR PILOTO TIPO TANQUE AGITADO*. Obtenido de [http://ocw.upm.es/pluginfile.php/1262/mod\\_label/intro/practica3.pdf](http://ocw.upm.es/pluginfile.php/1262/mod_label/intro/practica3.pdf)
- Hernández , E., Amador , C., & Botero, J. F. (2010). *Ingeniería de Tequilas* . Bogotá .
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Obtenido de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- IQR Ingeniería Química . (27 de noviembre de 2020). *Reactores de flujo pistón* . Obtenido de <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/11/reactores-de-flujo-piston.html>
- Lara , M., Ayala , T., Gonzales , E., & Pérez , A. (2020). OBTENCIÓN DE SIROPE DE FRUCTOSA POR ENCAPSULACIÓN ENZIMÁTICA DE INULINASA EN ALGINATO DE SODIO. *Centro Azúcar* , 117-126.
- Lara , M., Ortega , V., Pérez , A., País , J., Nuñez , J., & González , E. (2019). Evaluación de pH, temperatura y concentración de alginato en el proceso de gelificación iónica del zumo natural de frutas. *CentroAzúcar*, Vol. 46, No. Edición Especial, 55-60.
- Madrigal, L., & Sangronis , E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 387-396.

- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Vol. 31, No. 3, 426-428.
- Montalvo , D. (2020). *evaluación del proceso de encapsulación por unión química enzimática de inulina a sirope de fructosa a partir de tuna blanca*. Obtenido de evaluación del proceso de encapsulación por unión química enzimática de inulina a sirope de fructosa a partir de tuna blanca.
- Myers , R., Montgomery, D., & Anderson-Cook, C. (2016). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Wiley, 856 .
- Nakamura , T., Ogata , Y., Shitara , A., Nakamura , A., & Ohta , K. (1995). Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 80, No. 2, 164-169 .
- Ochoa, R. (2011). Inmovilización de células y enzimas . *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* .
- Parra , R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Fac. Nac. Agron. Medellín*, 5669-5684.
- Pinango , R. (2019). *EXTRACCIÓN DE INULINA DE DOS VARIEDADES DE TUNA Opuntia ficusindica COLOR ROJA Y BLANCA DEL VALLE DEL CHOTA POR LIXIVIACIÓN*. Ibarra : UTN.
- Ramírez, J. (2014). ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? *Digital Universitaria*.
- Riveros, M. J. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud. *Scielo*.
- Saavedra , M., Gaona , J., Patron , O., Castillo, M., & Contreras , J. (2007). PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA ENZIMA INULINASA DE *Aspergillus*

kawachii ENFERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.*

Saldivar-Serna , S. (2016). Food Science Maize: Foods from Maize. *Encyclopedia of Food Grains, Second Edition ed., Monterrey: Elsevier Academic Press, 1-12.*

Seminario , J., Valderrama , M., & Manrique , I. (2003 ). *El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio .* Lima .

Sistema Nacional Descentralizado de Planificación Participativa . (2017). *Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 Toda una Vida.* Obtenido de Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 Toda una Vida: <https://observatorioplanificacion.cepal.org/es/planes/plan-nacional-de-desarrollo-2017-2021-toda-una-vida-de-ecuador>

Swithers, S. (2013). Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab*, 431-441.


Valero , F. (1998). *Módulo de Enzimas, Ingeniería Bioquímica, Departamento de Ingeniería Química.* Barcelona .

Velasco , J. (23 de Febrero de 2016). *Glucosa y Fructosa .* Obtenido de Glucosa y Fructosa : [http://www.academia.edu/22561760/Glucosa\\_and\\_Fructosa](http://www.academia.edu/22561760/Glucosa_and_Fructosa)

# ANEXOS

## Anexo I

### Ficha técnica Inulina

 [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

**FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD** Versión: 6.0  
de acuerdo al Reglamento (CE) No. 1907/2006 Fecha de revisión: 13.03.2019  
Fecha de impresión: 06.12.2021  
GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

---

**SECCIÓN 1. Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa**

**1.1 Identificadores del producto**

Nombre del producto : **Inulin, from chicory**

Referencia : 12255  
Marca : Sigma  
REACH No. : Un número de registro no está disponible para esta sustancia, ya que la sustancia o sus usos están exentos del registro, el tonelaje anual no requiere registro o dicho registro está previsto para una fecha posterior  
No. CAS : 9005-80-5

**1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados**

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

**1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad**

Compañía : Sigma-Aldrich Inc.  
3050 SPRUCE ST  
ST. LOUIS MO 63103  
UNITED STATES

Teléfono : +1 314 771-5765  
Fax : +1 800 325-5052

**1.4 Teléfono de emergencia**

Teléfono de Urgencia : 800-424-9300 CHEMTREC (USA) +1-703-527-3887 CHEMTREC (International) 24 Hours/day; 7 Days/week

---

**SECCIÓN 2. Identificación de los peligros**

**2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla**


No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008

**2.2 Elementos de la etiqueta**

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008

**2.3 Otros Peligros** - ninguno(a)

Sigma-12255 Página 1 de 7

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada 

## Anexo II

### Ficha Técnica Inulinasa

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto: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.ZQ5.10000060631	

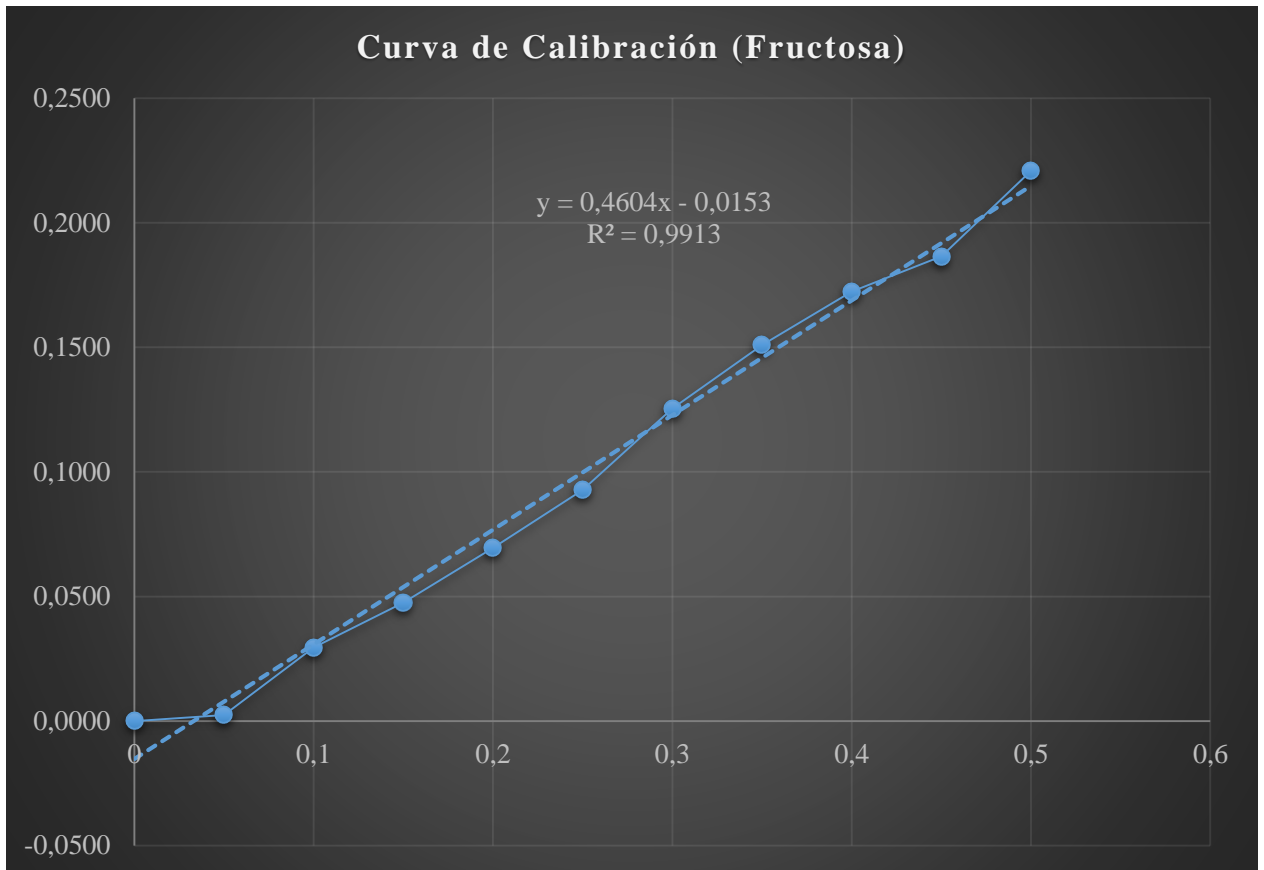
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical 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.

1 of 1



### Anexo III

Curva Patrón de Fructosa para cuantificación por medio de espectrofotómetro



## Anexo IV

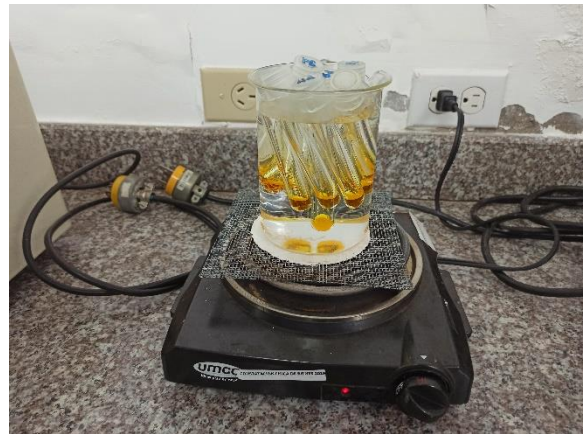
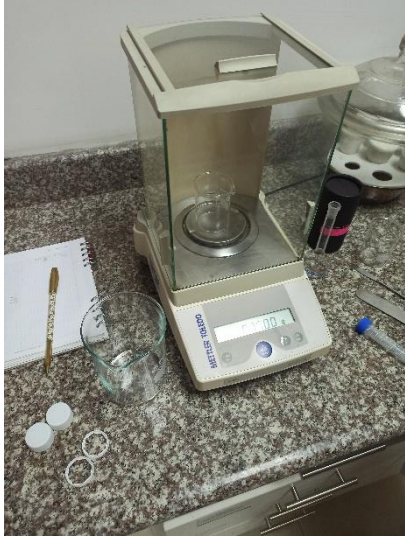
Proceso completo de la experimentación





## Anexo V

### Metodología DNS



## Anexo VI

Datos para la obtención de la cinética de la reacción

Tiempo de Muestra (min)	Flujo (ml/min)	Concentración (mg/L)	Tiempo de residencia (h)	Productividad (mg/h)	Concentración (mM)	U=C/TR (mM/h)	Pendiente
5	11	244,35	0,58	161,27	1,356	2,33	1,71
10	11	191,57	0,58	126,44	1,063	1,82	1,71
15	11	148,13	0,58	97,77	0,822	1,41	1,71
20	11	103,61	0,58	68,38	0,575	0,99	1,71
25	11	59,08	0,58	38,99	0,328	0,56	1,71
30	11	46,05	0,58	30,39	0,256	0,44	1,71
5	7	272,37	1	114,40	1,512	1,51	1
10	7	211,99	1	89,04	1,177	1,18	1
15	7	195,48	1	82,10	1,085	1,09	1
20	7	168,33	1	70,70	0,934	0,93	1
25	7	129,67	1	54,46	0,720	0,72	1
30	7	102,52	1	43,06	0,569	0,57	1
5	5	273,68	1,25	82,10	1,519	1,22	0,8
15	5	251,52	1,25	75,46	1,396	1,12	0,8
25	5	244,35	1,25	73,31	1,356	1,09	0,8
35	5	231,97	1,25	69,59	1,288	1,03	0,8
45	5	217,20	1,25	65,16	1,206	0,96	0,8
55	5	187,66	1,25	56,30	1,042	0,83	0,8
5	3	293,66	1,58	52,86	1,630	1,03	0,63
15	3	279,76	1,58	50,36	1,553	0,98	0,63
25	3	261,73	1,58	47,11	1,453	0,92	0,63
35	3	250,43	1,58	45,08	1,390	0,88	0,63
45	3	229,15	1,58	41,25	1,272	0,80	0,63
55	3	209,60	1,58	37,73	1,163	0,73	0,63

## Anexo VII

Costos del equipo

<b>Reactivos/insumos/Equipos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Precio \$ USD</b>
Luffa Cylindrica	1	Unidad	2,60
Agua destilada	2	galones	8,00
Inulinasa	1	kg	130,00
Inulina sigma	10	gramos	64,02
Ácido cítrico	1	kg	3,50
Bombas	2	5V	33,50
Mangueras	100	cm	1,00
Ensamble de bombas			30,00
Construcción del reactor			60,00
Total general			332,62