



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**

**AMBIENTALES**

**CARRERA AGROINDUSTRIA**

**TEMA:**

**“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE RETENCIÓN PARA SOPORTE DE  
CATALIZADORES EN BIORREACTORES QUÍMICOS DE LECHO  
EMPACADO”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención de Ingeniero Agroindustrial**

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

**Autor:** Cedeño Pinargote Sheriff Johan

**Director:** Dr.C. Marco Vinicio Lara Fiallos PhD

Ibarra – Ecuador 2025



**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:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	0803936251		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Cedeño Pinargote Sheriff Johan		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Doctor Luis Gonzales y Gomez Jurado		
<b>EMAIL:</b>	<a href="mailto:sjcedenop@utn.edu.ec">sjcedenop@utn.edu.ec</a>		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	x	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0988014028

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	Evaluación de medios de retención para soporte de catalizadores en biorreactores químicos de lecho empacado
<b>AUTORA:</b>	Cedeño Pinargote Sheriff Johan
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	06/06/2025
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniero Agroindustrial
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Dr.C Marco Vinicio Lara Fiallos PhD

## CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo sin violar derechos de autor te 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 6 días del mes junio de 2025

EL AUTOR

Firma 

Nombre Cedeño Pinargote Sheriff Johan

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN  
CURRICULAR**

Ibarra, 15 de mayo de 2025

Dr.C Marco Lara Fiallos 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.



*(f)* .....

*Dr.C Marco Lara Fiallos PhD*

*C.C.: 1717227761*

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración

Curricular “Evaluación de medios de retención para soporte de catalizadores en biorreactores químicos de lecho empacado” elaborado por Cedeño Pinargote Sheriff Johan, previo a la obtención del título del Ingeniero en Agroindustrias, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:



*f)*.....

*Dr.C Marco Lara Fiallos PhD*

*C.C.: 1717227761*



*f)*.....

*Dr.C José Manuel País Chanfrau PhD*

*C.C.: 0959747320*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida por guiarme por brindarme la fuerza y la fortaleza en cada paso de mi vida.

A mis padres Silver y Dolores mis hermanos que con su amor paciencia y esfuerzo me ha acompañado en todo este proceso y que han permitido llegar hoy a terminar mi proceso de universidad para lograr ser un ingeniero también agradecerle por el ejemplo de fuerza valentía y por afrontar todo lo que ha pasado en nuestra vida y a pesar de eso sí más adelante.

A mi director el Dr.C. Marco Lara por enseñarme y tenerme paciencia en todo este proceso largo y también enseñarme a investigar un poco más por todo el apoyo y la dedicación que puso en mí y la fe.

A mi familia a mis amigos que también por el apoyo incondicional durante todo este proceso educativo y también agradecerle a los Ingenieros Godoy y Miranda por también enseñarme este proceso para finalizar mi trabajo de grado a todas las personas que han estado ayudándome en este proceso y que me hicieron una mejor persona y también a poder terminar este proyecto

## **DEDICATORIA**

Este logro se lo dedico a Dios y mis padres Silver y Dolores por darme todo su amor cariño dedicación y entrega desde el primer día que ingresé a estudiar aquí igual ustedes son los únicos que nunca dudaron de mis capacidades sin importar todos los inconvenientes que surgieron en este camino y poder demostrarle que lo logré con mucho esfuerzo fue bastante tiempo, pero se logró.

También se lo dedico a mis hermanos y anhelo ser un ejemplo para ustedes y demostrar que con esfuerzo no importa el tiempo sino lograr el objetivo.

A toda mi familia que supieron darme un consejo y estar también ahí diciendo que siga adelante porque sin ayuda de esto no había sido posible a mis amigos que hicieron de esta etapa una de las mejores de mi vida los mejores recuerdos que tendré en mi mente nunca los voy a olvidar.

## Resumen

Este estudio aborda la evaluación de medios de retención en biorreactores de lecho empacado, centrado en la mejora de la actividad catalítica y la estabilidad del catalizador. Los biorreactores químicos de lecho empacado se usan ampliamente en la industria agroindustrial debido a su eficiencia en la bioconversión de sustancias. Esta investigación propone el uso de kefirán y alginato, conocidos por su capacidad para formar geles que mejoran la retención y estabilidad de enzimas en biorreactores. A través de experimentos, se buscó optimizar la mezcla entre kefirán y alginato para lograr las mejores propiedades mecánicas y de retención.

La metodología incluye la obtención de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche, la creación de soluciones de kefirán en diferentes concentraciones (1%, 2%, y 3%), y la aplicación de estas soluciones a esferas de alginato que contienen la enzima inulinasa. Se realizan pruebas fisicoquímicas (pH, textura, y difusividad) a las esferas recubiertas. La productividad se determina mediante la cuantificación de fructosa utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

La investigación utiliza un diseño experimental basado en un estudio previo que optimizó las condiciones del reactor (50°C, pH 4.5, y 0.23 ml/min). Se plantea un modelamiento utilizando Design Expert para evaluar el efecto de la concentración de kefirán (0-3%) y el tiempo de corrida del reactor (0.4-1.2 horas) sobre la productividad. El objetivo final es establecer los valores óptimos de concentración de kefirán y tiempo para maximizar la productividad, generando una ecuación polinómica que relacione estos factores con la productividad.

**Palabras clave:** Biorreactor, Actividad catalítica, Kefirán, Alginato y Estabilidad de enzima

## **Abstract**

This study addresses the evaluation of retention media in packed bed bioreactors, focusing on the improvement of catalytic activity and catalyst stability. Packed bed chemical bioreactors are widely used in the agro-industrial industry due to their efficiency in the bioconversion of substances. This research proposes the use of kefirán and alginate, known for their ability to form gels that improve the retention and stability of enzymes in bioreactors. Through experiments, we sought to optimize the mixture between kefirán and alginate to achieve the best mechanical and retention properties.

The methodology includes obtaining kefirán from milk kefir granules, creating kefirán solutions at different concentrations (1%, 2%, and 3%), and applying these solutions to alginate spheres containing the enzyme inulinase. Physicochemical tests (pH, texture, and diffusivity) are carried out on the coated spheres. Productivity is determined by quantification of fructose using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method.

The research uses an experimental design based on a previous study that optimized the reactor conditions (50°C, pH 4.5, and 0.23 ml/min). Modeling is proposed using Design Expert to evaluate the effect of kefirán concentration (0-3%) and reactor run time (0.4-1.2 hours) on productivity. The final objective is to establish the optimal values of kefirán concentration and time to maximize productivity, generating a polynomial equation that relates these factors to productivity.

**Keys words:** Bioreactor, Catalytic activity, Kefirán, Alginate and Enzyme stability

## **LISTA DE SIGLAS**

**RMSE.** Desviación estándar de los valores residuales

**R<sup>2</sup>.** Coeficiente de determinación

**IA.** Inteligencia Artificial.

**INEN.** Servicio Ecuatoriano de Normalización

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Problema de investigación. ....	17
1.2. Antecedentes. ....	18
1.3. Justificación .....	19
1.4. Objetivos .....	21
1.4.1. Objetivo general .....	21
1.4.2. Objetivos específicos.....	21
1.5. Hipótesis. ....	21
CAPÍTULO II.....	22
MARCO TEÓRICO .....	22
2.1. Encapsulación .....	22
2.2. Introducción a la Encapsulación con Alginato .....	22
2.3. Propiedades del Alginato .....	22
2.3.1. Composición Química.....	22
2.3.2. Formación de Gel.....	22
2.3.3. Biocompatibilidad y biodegradabilidad .....	23
2.4. Métodos de encapsulación con alginato .....	23
2.4.1. Extrusión .....	23

2.4.2.	Emulsión.....	23
2.4.3.	Secado por aspersion (Spray-Drying) .....	23
2.5.	Alginato de sodio como soporte para inmovilización.....	24
2.6.	Proceso de gelificación iónica .....	24
2.7.	Kefirán como soporte para inmovilización.....	25
2.7.1.	Propiedades del Kefirán .....	25
2.8.	Inulina .....	26
2.8.1.	Estructura de la inulina.....	26
2.8.2.	Beneficios de la inulina .....	27
2.8.3.	Inulinasa .....	27
2.9.	Inmovilización de enzimas .....	28
2.10.	Atrapamiento .....	29
2.11.	Biorreactores de lecho empacado.....	30
CAPÍTULO III .....		31
METODOLOGÍA .....		31
3.1.	Tipo de investigación.....	31
3.2.	Ubicación del lugar. ....	31
3.3.	Adquisición de insumos .....	31
3.4.	Obtención de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche .....	32
3.4.1.	Procedimiento aplicado para la obtención de kefirán .....	33

3.5.	Identificación de las características fisicoquímicas del alginato y kefirán	35
3.5.1.	Proceso para la obtención de datos de pH de la solución.....	35
3.5.2.	Determinación de textura .....	35
3.5.3.	Determinación de difusividad .....	36
3.6.	Diseño de la solución de recubrimiento de kefirán, mediante evaluación de productividad a diferentes concentraciones, para encontrar las mejores propiedades mecánicas. ....	36
3.6.1.	Cuantificación de sirope de fructosa en el reactor .....	37
3.6.2.	Evaluación de la productividad a diferentes concentraciones de kefirán .....	38
3.6.3.	Factores para el modelamiento.....	38
CAPÍTULO IV .....		40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		40
4.1.	Obtención de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche. ....	40
4.1.1.	Preparación de solución de kéfir a diferentes concentraciones.....	40
4.2.	Identificación de las características fisicoquímicas del alginato y kefirán	42
4.2.1.	Medición de pH en las diluciones de kefirán y alginato de sodio .....	42
4.2.2.	Prueba de textura de las esferas de alginato .....	42
4.2.3.	Prueba de difusión de las esferas de alginato .....	43

4.3. Diseño de la solución de recubrimiento de kefirán, mediante evaluación de productividad a diferentes concentraciones, para encontrar las mejores propiedades mecánicas. ....	44
4.3.1. Evaluación del modelamiento mediante la productividad .....	45
4.3.2. Análisis estadístico del modelamiento mediante Design Expert .....	46
CAPITULO V .....	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	52
5.1. Conclusiones .....	52
5.2. Recomendaciones .....	53
REFERENCIAS .....	54
ANEXOS.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas .....	28
<b>Tabla 2</b> Concentraciones de kefirán .....	33
<b>Tabla 3</b> Parámetros para modelamiento del reactor de flujo continuo .....	39
<b>Tabla 4</b> Formulación de soluciones de kefirán.....	41
<b>Tabla 5</b> Dureza de las esferas de alginato .....	42
<b>Tabla 6</b> Resultados de concentración y productividad en función de los factores propuestos en el reactor de flujo continuo .....	45
<b>Tabla 7</b> Análisis del modelo aplicado .....	48
<b>Tabla 8</b> ANOVA para el modelamiento planteado .....	49
<b>Tabla 9</b> Resultados Secado de gránulos de Kéfir .....	59
<b>Tabla 10</b> Costos del equipo .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura del alginato, enlaces de hidrógeno y los sitios de unión de calcio .....	24
<b>Figura 2</b> Formación de alginato de calcio .....	25
<b>Figura 3</b> Estructura química de la inulina .....	27
<b>Figura 4</b> Inmovilización de enzimas por retención física y química .....	29
<b>Figura 5</b> Equipo para inmovilización de un líquido con alginato .....	29

<b>Figura 6</b> Diagrama proceso simplificado para realizar películas de kefirán .....	32
<b>Figura 7</b> Diagrama de Flujo del proceso de obtención de Kefirán y diluciones .....	33
<b>Figura 8</b> Medición de textura de las esferas de alginato .....	36
<b>Figura 9</b> Método DNS .....	37
<b>Figura 10</b> Disolución de Kefirán 2% sin saturación .....	41
<b>Figura 11</b> Esferas sin baño de kefirán .....	43
<b>Figura 12</b> Esferas sometidas a baño de kefirán al 2% m/v .....	44
<b>Figura 13</b> Box Plot Kefirán vs Productividad .....	46
<b>Figura 14</b> Gráfico de Barras InfoStat .....	47
<b>Figura 15</b> Valores predichos vs reales de productividad del modelamiento planteado .....	49
<b>Figura 16</b> Diseño de superficie respuesta correspondiente la modelamiento planteado .....	50
<b>Figura 17</b> Comportamiento del reactor a los tratamientos .....	51
<b>Figura 18</b> Curva patrón de Fructosa .....	60

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Problema de investigación.

La eficacia y especificidad de los procesos catalíticos en biorreactores químicos con lecho empacado dependen en gran medida de cómo se diseñan y seleccionan los medios de retención para sostener los catalizadores. Sin embargo, aún existen importantes desafíos en la evaluación completa de estos medios de retención y su impacto en la actividad catalítica, la estabilidad del catalizador y la transferencia de masa y calor (Corbella, 2005).

Por tanto, durante un tiempo prolongado se ha aplicado enzimas en sistemas agroindustriales mediante ciclos de reutilización, es decir, emplearlas múltiples veces hasta agotar su actividad catalítica. Esta estrategia ofrece ventajas relevantes como la optimización de recursos, la disminución de costos y una mayor sostenibilidad ambiental en los procesos de transformación.

Así mismo, el uso de métodos enzimáticos para la hidrólisis de inulina se considera una opción ecológica por su capacidad de reutilización y la facilidad en la separación de productos, no obstante, su principal desventaja radica en su baja velocidad del proceso, lo que conlleva a impactos económicos negativos por la prolongación de los tiempos de producción (Miranda Arcos, 2023).

Por lo cual, la falta de comprensión sobre los parámetros determinantes en la hidrólisis de inulina a fructosa, utilizando inulinasa encapsulada, representa un desafío significativo para la determinación de la cinética de conversión en reactores. El objetivo principal es maximizar la eficiencia enzimática para reducir costos operativos y mejorar la rentabilidad. La incertidumbre principal se relaciona con el tiempo de residencia dentro del reactor durante la

reacción, especialmente cuando se trabaja con diversos medios de soporte, ya que el comportamiento de la hidrólisis en períodos prolongados aún no se comprende completamente.

## **1.2. Antecedentes.**

Los biorreactores químicos de lecho empacado son sistemas ampliamente utilizados en la industria para llevar a cabo reacciones bioquímicas y catalíticas en condiciones controladas. Estos biorreactores requieren de soportes de las reacciones deseadas (Jaibiba et al., 2020).

Estudios previos han investigado las propiedades funcionales y nutricionales del kefir, como la composición química del kefirán, el polisacárido característico presente en el kéfir. Estos antecedentes proporcionan una comprensión sólida de las características únicas del polisacárido que hacen que sean candidatos ideales para la encapsulación.

Entonces, la encapsulación de compuestos bioactivos y microorganismos ha recibido considerable atención, especialmente en los sectores alimentario y sanitario. Investigaciones anteriores han demostrado los beneficios de la encapsulación en términos de protección, liberación controlada y estabilidad de los compuestos encapsulados.

En ese sentido, se han llevado a cabo investigaciones para aislar y caracterizar los microorganismos presentes en el kefir, incluyendo bacterias lácticas, levaduras y otros microorganismos probióticos. Estos estudios han proporcionado información crucial sobre las cepas microbianas que pueden ser utilizadas en la encapsulación y sus efectos beneficiosos para la salud (Francke y Acosta, 2020).

Se han desarrollado diversas técnicas de encapsulación, como la microencapsulación por atomización, la gelificación iónica y la coacervación, que podrían adaptarse al uso de gránulos de kefir como medio de encapsulación. Estas tecnologías han sido objeto de

investigación para optimizar la eficiencia de encapsulación, la viabilidad de los microorganismos y la liberación controlada de los compuestos encapsulado (Carrera Acosta, 2019).

Investigaciones han revelado la estructura química única del alginato, un polisacárido aniónico compuesto principalmente de unidades de ácido gulurónico y ácido manurónico, estudios de espectroscopía y microscopía han proporcionado información detallada sobre la estructura molecular y la morfología del alginato, lo que ha contribuido a comprender sus propiedades físicas y químicas. Donde, han demostrado la capacidad del alginato, para formar geles en presencia de iones calcio, lo que lo hace útil como agente gelificante y espesante en la industria alimentaria (Ortiz et al., 2021).

También han explorado el uso del alginato en la encapsulación de células para aplicaciones en terapia celular y regeneración de tejidos. Asimismo, la evaluación de medios de retención para soporte de catalizadores en biorreactores químicos de lecho empacado implica varios criterios importantes. Entre estos criterios se encuentran la capacidad de retención de biomasa, la porosidad del material, la resistencia mecánica y la compatibilidad con el medio de cultivo (Calvo, 2007).

### **1.3. Justificación**

La optimización de procesos catalíticos es crucial en el ámbito químico, donde los biorreactores químicos de lecho empacado desempeñan un papel vital en la producción eficiente de productos químicos y biocombustibles. La correcta selección de los medios de retención para soportar catalizadores en estos biorreactores es esencial para asegurar una alta actividad catalítica, estabilidad del catalizador y eficacia del proceso.

Sin embargo, existe una falta de comprensión en la evaluación de estos medios de retención y su impacto en el rendimiento global del biorreactor. El desconocimiento de los factores determinantes en su elección y diseño puede resultar en una subutilización de catalizadores, menor selectividad de productos y mayores costos operativos.

Por ende, esta investigación pretende cerrar la falta de conocimiento mediante el estudio de métodos efectivos para evaluar los medios de retención utilizados en biorreactores químicos de lecho empacado. Al entender mejor cómo diferentes combinaciones y propiedades de medios de retención afectan la actividad catalítica, la estabilidad del catalizador y procesos de transferencia de masa y calor permitirán diseñar biorreactores más eficientes y económicos.

El alginato forma geles a temperatura ambiente mediante interacciones iónicas con cationes divalentes, principalmente calcio, que se unen a las unidades de gulurónico en la molécula. Estos geles son térmicamente irreversibles y pueden calentarse sin perder su forma. A su vez, se utiliza ampliamente como espesante, estabilizante de emulsiones, gelificante, inhibidores de sinéresis, para mejorar la textura y palatabilidad en alimentos y productos farmacéuticos.

Puede formar geles en soluciones acuosas debido a las interacciones entre las cadenas de polisacárido. La viscosidad y la capacidad de gelificación del kefirán pueden verse afectadas por factores como la concentración de kefirán, la temperatura y el pH. Por otro lado, el alginato muestra una resistencia a la tracción moderada, especialmente en geles formados con cationes divalentes como el calcio. Es menos elástico que el kefirán y puede tener una mayor resistencia al desgarro debido a su estructura más rígida (Thomson et al., 2021).

Por tal motivo, se ha estudiado su potencial como agente gelificante y estabilizante en alimentos, así como sus posibles efectos beneficiosos para la salud debido a sus propiedades

prebióticas y probióticas. La resistencia a la tracción del kefirán tiende a ser baja en comparación con otros polisacáridos debido a su estructura más flexible. Además, exhibe elasticidad y resistencia al desgarro moderadas.

#### **1.4. Objetivos**

##### ***1.4.1. Objetivo general***

- Evaluar diferentes medios de retención para soporte de catalizadores en biorreactores químicos de lecho empacado.

##### ***1.4.2. Objetivos específicos***

- Obtener el kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche.
- Identificar las características fisicoquímicas del alginato y kefirán.
- Diseñar la solución de recubrimiento del kefirán, evaluando la productividad a diferentes concentraciones, para encontrar las mejores propiedades mecánicas.

#### **1.5. Hipótesis.**

¿El baño en la solución de kefirán favorece el proceso catalítico y de encapsulación de fructosa dentro de un biorreactor?

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### **2.1. Encapsulación**

La encapsulación con alginato es una técnica ampliamente utilizada en biotecnología, medicina, y la industria alimentaria para proteger, inmovilizar y liberar de manera controlada diversos compuestos activos (Parra y Adolfo, 2019).

#### **2.2. Introducción a la Encapsulación con Alginato**

La encapsulación es un proceso mediante el cual los materiales activos se encapsulan en una matriz para protegerlos de factores ambientales y liberar su contenido de forma controlada. El alginato, un polisacárido natural derivado de las algas marrones, es un material muy utilizado para este propósito debido a sus propiedades biocompatibles y capacidad de formar geles suaves pero robustos (Sandoval, 2017).

#### **2.3. Propiedades del Alginato**

##### **2.3.1. *Composición Química***

Asimismo, Sandoval (2017) menciona que el alginato está compuesto por bloques de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G), organizados en diferentes secuencias (MM, GG, MG). La proporción y secuencia de estos bloques afectan las propiedades del gel, como su rigidez y porosidad.

##### **2.3.2. *Formación de Gel***

El alginato se gelifica en presencia de cationes divalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La interacción de estos iones con los bloques G del alginato forma un reticulado de gel estable conocido como "egg-box model". Este proceso es rápido y ocurre a temperatura ambiente, lo que es ideal para encapsular sustancias sensibles al calor (Aldana y Rodríguez, 2018).

### **2.3.3. *Biocompatibilidad y biodegradabilidad***

El alginato es un material biocompatible y biodegradable, lo que garantiza su seguridad e aplicaciones médicas y alimentarias. Además, su degradación controlada facilita la liberación prolongada de compuestos encapsulados (Ortiz et al., 2021).

## **2.4. Métodos de encapsulación con alginato**

Existen diversos métodos de encapsulación con alginato los cuales se detallan en los siguientes apartados.

### **2.4.1. *Extrusión***

Ortiz et al., (2021) indican que la extrusión es un método frecuente para encapsular con alginato. Este proceso genera gotas de solución de alginato que se introducen en cloruro de calcio, donde gelifican rápidamente formando microesferas.

### **2.4.2. *Emulsión***

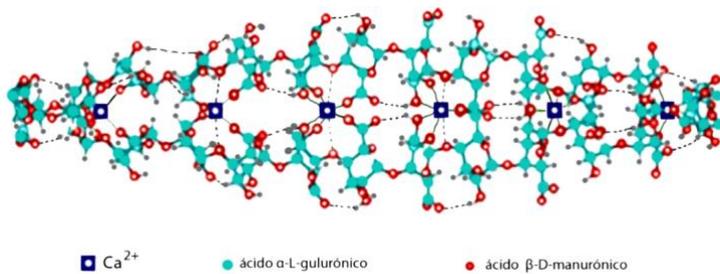
En este método, una emulsión de la fase acuosa (con alginato) en una fase oleosa se induce a la gelificación mediante la adición de cationes divalentes. Este método es útil para encapsular materiales hidrofóbicos o para formar cápsulas con estructuras más complejas (Sandoval, 2017).

### **2.4.3. *Secado por aspersión (Spray-Drying)***

El secado por atomización implica la atomización de una solución de alginato que contiene el material activo en una corriente de aire caliente, lo que resulta en la formación de microesferas secas. Este método es adecuado para producir partículas secas y estables (Parra y Adolfo, 2019).

## 2.5. Alginato de sodio como soporte para inmovilización

El alginato es un polisacárido extraído de algas pardas, constituyendo cerca del 40% del peso seco. Su estructura esta formada por unidades de ácidos  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y  $\beta$ -D-manurónico (M) (Ayarza, 2014). La figura presenta la estructura química del alginato. Estos polisacáridos se extraen principalmente de tres especies distintas de algas marrones: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* (Romero et al., 2013).



**Figura 1** Estructura del alginato, enlaces de hidrógeno y los sitios de unión de calcio  
*Nota:* se muestra la estructura del alginato, información recopilada de (Reddy y Reddy, 2010)

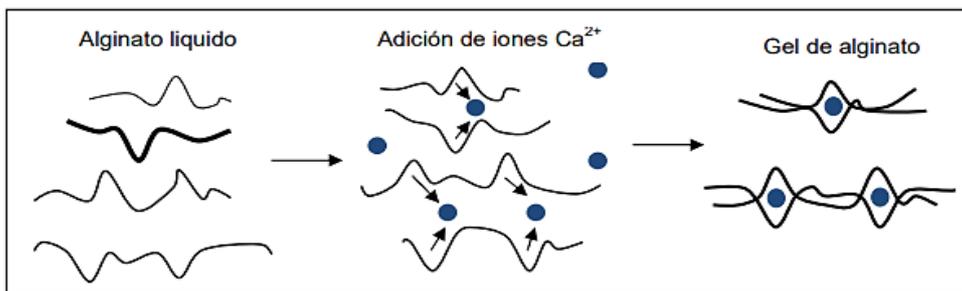
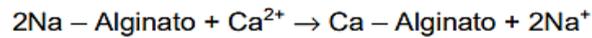
Según Huertas (2010), el alginato de calcio ( $C_{12}H_{14}CaO_{12}$ ) es el más utilizado para la encapsulación de bacterias debido gracias a su manejo sencillo, baja toxicidad y costo reducido. Se ha evidenciado que los cultivos inmovilizados con este compuesto incrementan significativamente la supervivencia bacteriana frente a diferentes ambientes.

El proceso de gelificación del alginato se inicia al combinar una solución de sal de alginato con una fuente de calcio, que difunde hasta las cadenas poliméricas. El ion calcio difunde hacia las cadenas poliméricas, provocando un reordenamiento estructural espacial que da lugar a la formación del gel. La concentración de calcio, la hidratación y la proporción de ácido gulurónico determinan el grado de gelificación (Funami et al., 2009).

## 2.6. Proceso de gelificación iónica

Se define el intercambio iónico como una relación reversible donde un ion es sustituido por otro con la misma carga. En la gelificación del alginato, este proceso ocurre cuando las cadenas poliméricas reaccionan con cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ), reemplazando los iones de sodio por

iones de calcio (González, 2009). Como resultado, se genera una gelificación inmediata que forma una capa de alginato de calcio en agua, peor permeable a ciertos fluidos. Esto permite que la inulinasa quede encapsulada dentro de la matriz, facilite la conversión de inulina que difunde por los poros del soporte, y libere el producto tras la reacción catalítica.



**Figura 2** Formación de alginato de calcio

*Nota:* se muestra la formación del alginato, información tomada de (López y Villalta, 2009)

## 2.7. Kefirán como soporte para inmovilización

El kefirán, un exopolisacárido producido por gránulos de kéfir, ha ganado interés en aplicaciones biotecnológicas debido a sus propiedades únicas. Como soporte para inmovilización, el kefirán posee propiedades y ventajas funcionales que lo convierten en un material prometedor para múltiples aplicaciones, destacando particularmente en los ámbitos de la biocatálisis y la biomedicina.

### 2.7.1. *Propiedades del Kefirán*

El kefirán es un biopolímero compuesto principalmente de glucosa y galactosa en una relación aproximada de 1:1. Este exopolisacárido tiene propiedades gelificantes, lo que le permite formar estructuras tridimensionales que pueden ser útiles como matrices de soporte. Además, el kefirán posee características como:

- **Biocompatibilidad:** Es compatible con tejidos biológicos y no es tóxico, lo que lo hace adecuado para aplicaciones médicas y farmacéuticas.

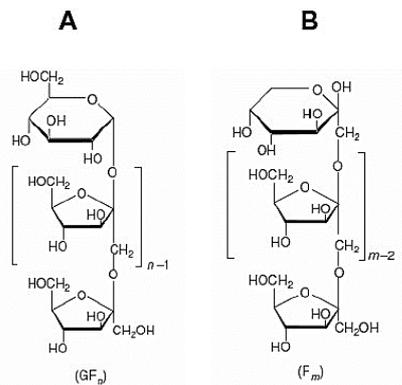
- **Capacidad Gelificante:** Su capacidad para formar geles lo convierte en un buen candidato para crear matrices de inmovilización.
- **Estabilidad Mecánica:** Los geles formulados con kefirán presentan una estabilidad adecuada, favoreciendo su uso en aplicaciones que demandan una matriz estructuralmente consistente (Farnworth, 2005).

## **2.8. Inulina**

La inulina es un polisacárido que se encuentra comúnmente en diversas plantas como reserva de energía, específicamente se almacena en raíces, bulbos y tubérculos de la planta; varios ejemplos de plantas que contienen inulina son la cebolla, ajo, espárragos, entre otras (Madrigal y Sangronis, 2007). En ese sentido, la inulina es un polisacárido de la familia de los fructanos constituido por moléculas de sacarosa y fructosa, siendo la segunda la contenida en mayor cantidad, razón por la que se han estudiado diferentes formas de aislarla con la mayor pureza posible (Madrigal y Sangronis, 2007).

### **2.8.1. Estructura de la inulina**

Según Castor (2011), La inulina está compuesta por unidades de fructosa mediante enlaces  $\beta$ -(2-1) fructosil-fructosa, calificándose dentro del grupo de los fructanos. En la figura se observa su estructura química. Debido a esta configuración, los fructanos no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas, permaneciendo intactos en el tránsito por el tracto gastrointestinal superior. Las inulinas naturales presentes en las plantas se encuentran formadas por 60 a 100 unidades de fructosa con moléculas de glucosa en los extremos (Castor, 2011).



**Figura 3** Estructura química de la inulina

Nota: se muestra la estructura química de la inulina; donde, A es la Molécula terminal de glucosa ( $\beta$ -D-glucopiranosil), y B es la Molécula terminal de fructosa ( $\beta$ -D-fructopiranosil). Información tomada de (Madrigal y Sangronis, 2007).

### 2.8.2. *Beneficios de la inulina*

La inulina se reconoce como una fibra de tipo prebiótico, ya que no se absorbe en el tracto intestinal y contribuye al desarrollo de la microbiota intestinal compuesta por bacterias beneficiosas (Corzo et al., 2015). La inulina posee un bajo valor calórico, y es considerado como hipoglicemiante, es decir, es un compuesto nutracéutico empleado para disminuir la concentración de glucosa sanguínea en pacientes diagnosticados con diabetes mellitus (Madrigal y Sangronis, 2007).

### 2.8.3. *Inulinasa*

La inulinasa es una enzima perteneciente a la familia de glicósido hidrolasa, también conocida como glucosidasa o enzima desramificante que cataliza la hidrólisis de inulina a fructosa. El desempeño y la estabilidad de la enzima depende de factores como el pH, temperatura, propiedades cinéticas y nivel del sustrato (Castillo Calderón y Chamy Maggi, 2010).

Estas enzimas hidrolizan la inulina principalmente en fructosa casi pura y en menor cantidad en glucosa. Por ello, se busca producirlas mediante cultivos microbianos, destacando las levaduras *Kluyveromyces marxianus* como las más relevantes en este campo, aunque también se emplea cepas de mohos *Aspergillus sp* y como sustratos fuentes de inulina se

encuentran extractos de yacón, tubérculos de dahlia, espárragos, entre otros (Castillo Calderón y Chamy Maggi, 2010).

## 2.9. Inmovilización de enzimas

La inmovilización enzimática permite mantener la estabilidad de la enzima, lo que facilita emplearla en producciones industriales de farmacéutica, químicas y alimentarias; se trata de situar la enzima en un área específica para conservar su actividad catalítica y permitir su reutilización repetida; entre las principales ventajas de este método destacan la mayor estabilidad enzimática, su reutilización que reduce los costos operativos, y la posibilidad de diseñar reactores enzimáticos fácilmente controlables y adaptables al uso de enzimas inmovilizadas (Arroyo, 1998). La Tabla 1 presenta un resumen de los beneficios y limitaciones asociados a la técnica de inmovilización enzimática.

**Tabla 1**

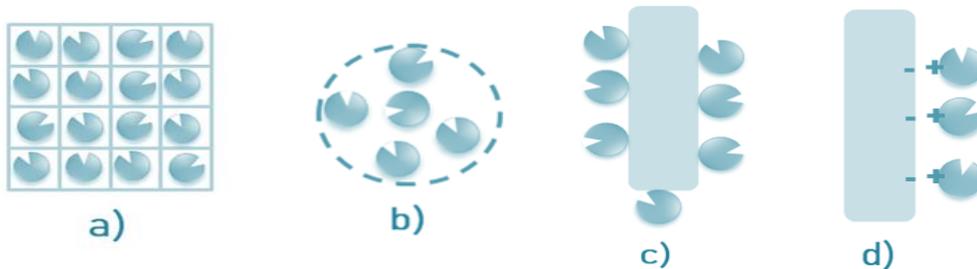
*Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas*

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reutilización de la enzima, disminución de costos del proceso.</li> <li>• Aumento de la concentración de la enzima en el medio de reacción</li> <li>• La enzima no permanece en la solución al fin del proceso</li> <li>• Aumento en la estabilidad de la enzima</li> <li>• Diseño de reactores de fácil manejo adaptables al tipo de enzima inmovilizada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afección negativa en la actividad catalítica</li> <li>• Alteración de la enzima respecto a su estado nativo.</li> <li>• Heterogeneidad del sistema enzima-soporte</li> </ul>

*Nota:* se presentan las ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas, información tomada de (Arroyo, 1998) y (Giraldo Gómez y Díaz Ramos, 2014)

Existen varios métodos de inmovilización enzimática y cada uno de ellos tiene diferentes niveles de complejidad y eficiencia durante el proceso catalítico. Las técnicas pueden

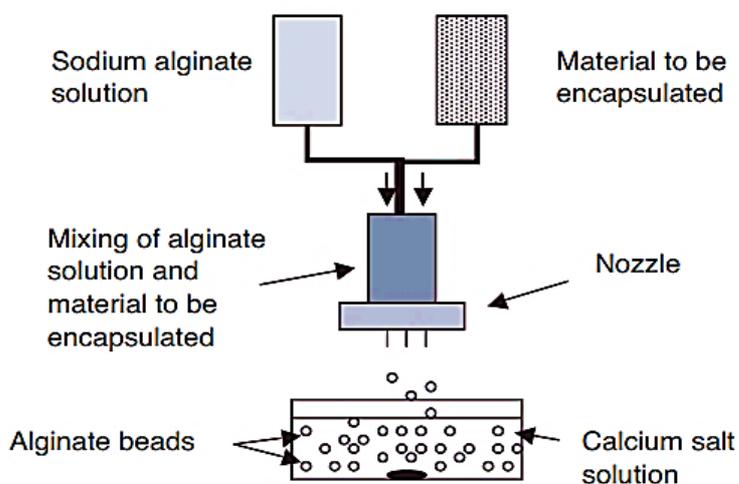
dividirse en dos categorías: aquella basadas en retención física y en unión química (Giraldo Gómez y Díaz Ramos, 2014). En la Figura 4 se muestran los métodos de inmovilización enzimática correspondientes a las categorías.



**Figura 4** Inmovilización de enzimas por retención física y química  
*Nota:* se muestra la inmovilización de las enzimas en donde **a)** es Atrapamiento, **b)** la Microencapsulación, **c)** la Adsorción, y **d)** Unión covalente. Información recopilada de (Morón, 2018)

### 2.10. Atrapamiento

En este método la enzima se encuentra libre en solución, pero está limitada en su movimiento por el gel, de tal manera que se evita la liberación de la enzima, pero sí la penetración del sustrato. Este procedimiento implica la disolución de la proteína en una solución monomérica, seguida de la iniciación de la polimerización por variaciones térmicas o por adición de un reactivo específico (Giraldo Gómez y Díaz Ramos, 2014). En la Figura 5 se muestra el proceso de gelificación iónica de enzimas inmovilizadas en alginato de sodio.



**Figura 5** Equipo para inmovilización de un líquido con alginato  
*Nota:* se muestra el equipo necesario para la inmovilización de un líquido con alginato, información tomada de (Imeson, 2009)

### **2.11. Biorreactores de lecho empacado**

Un biorreactor de lecho empacado es un tipo de reactor donde el biocatalizador (microorganismos o enzimas) se inmoviliza en un material de soporte, formando un lecho estacionario. Este soporte puede ser de naturaleza orgánica (como alginato, agar o gelatina) o inorgánica (como perlas de vidrio, carbón activado o cerámicas). El fluido que contiene los sustratos y productos se hace pasar a través de este lecho, donde ocurre la reacción biológica (Zapata, 2001).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

En este capítulo se detalla minuciosamente el proceso seguido para cumplir con los objetivos establecidos en la investigación.

#### **3.1. Tipo de investigación**

La línea investigativa de este plan de integración curricular (PIC) es de tipo cuantitativa con un alcance exploratorio. Esto debido a que la investigación presentó características plenas de un método cuantitativo como lo es la inferencia generalizable, relación entre variables, recolección y análisis de datos (Fassler, 2020).

#### **3.2. Ubicación del lugar.**

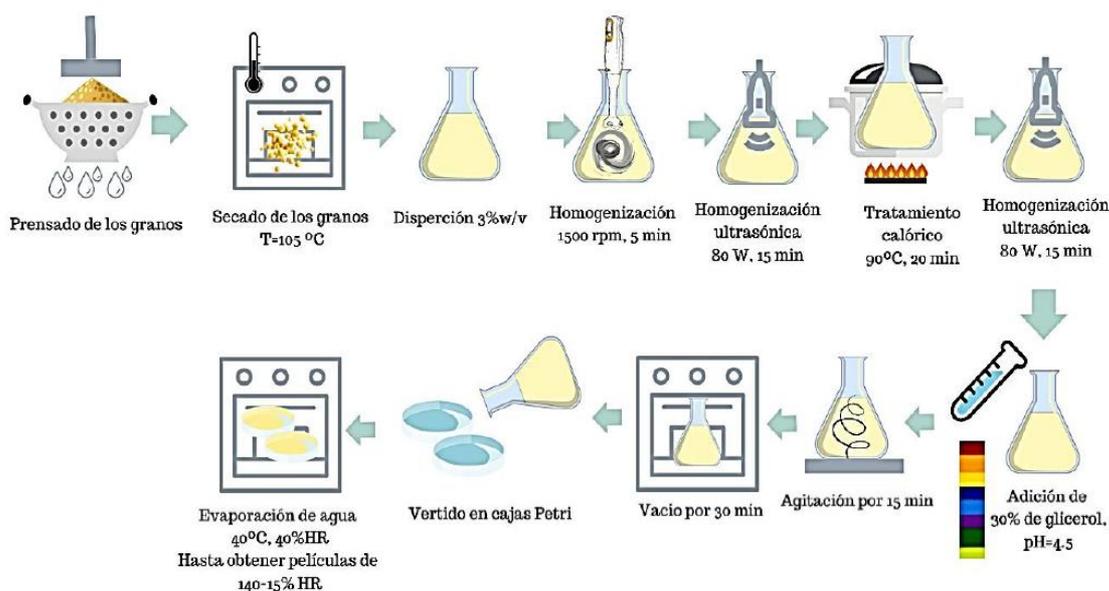
La fase experimental de esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de análisis experimental, innovación, fisicoquímicos y microbiológicos de la Universidad Técnica del Norte, ubicados en el campus San Vicente de Paúl de la ciudad de Ibarra con coordenadas (17N 821310.92 E; 38415.82 N).

#### **3.3. Adquisición de insumos**

Para el desarrollo de la investigación se adquirió alginato de sodio de grado analítico y kéfir del cual se obtiene el kefirán, constituyendo estos las principales materias primas del estudio. El kefirán fue obtenido en Soluciones Biotecnológicas Agroindustriales (SBA), un emprendimiento fundado por biotecnólogos, especializados en la producción, comercialización de alimentos funcionales probióticos y asesoría en procesos biotecnológicos. La empresa se localiza en la ciudad de Ibarra, específicamente en la calle Juana Atabalipa y Hernán Gonzáles de Saá.

### 3.4. Obtención de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche

El proceso que se llevó para obtención de kefirán a partir de biomasa del kéfir de leche se tomó como base los estudios de Ramírez Tapias et al. (2024) y Vargas y Ruiz-Espinosa (2024) referente a la extracción del polímero mencionado para posteriormente realizar películas y cubiertas de kefirán.



**Figura 6** Diagrama proceso simplificado para realizar películas de kefirán

*Nota:* se muestra el proceso de obtención y elaboración de películas de kefirán tomada de (Vargas y Ruiz-Espinosa, 2024)

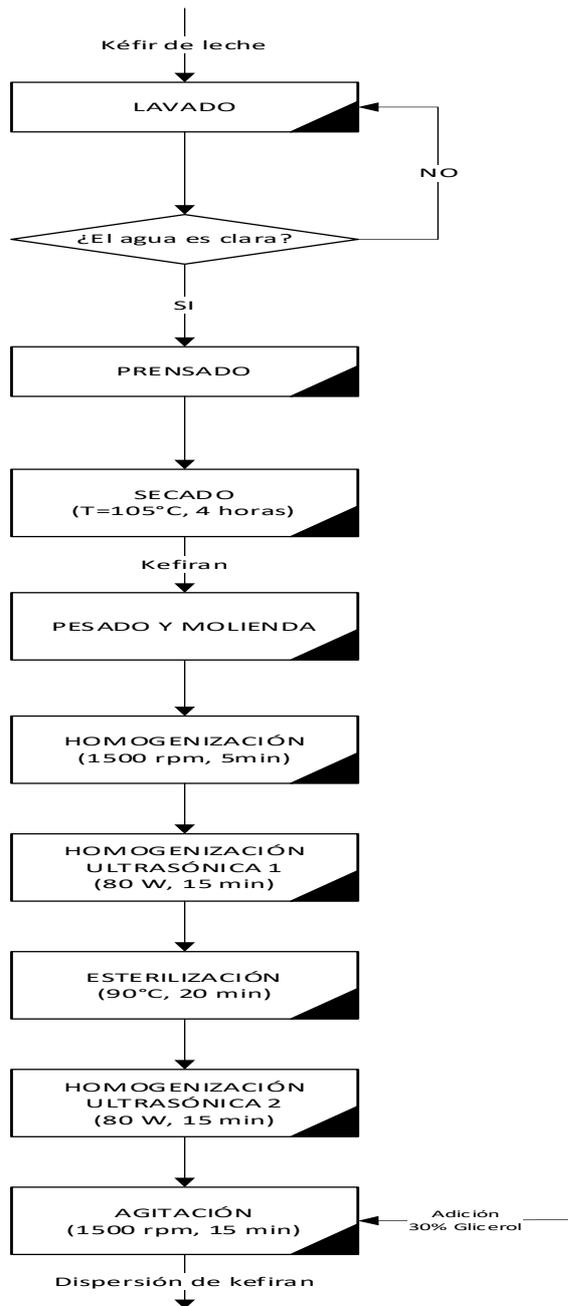
El enfoque para la purificación de biopolímeros es relevante en la actualidad si bien este proceso de extracción resulta complejo, aquellos que usan la biomasa resultan más eficientes ya que existe un mejor aprovechamiento de los polisacáridos (Vargas y Ruiz-Espinosa, 2024). Distintos estudios indican que la aplicación de la biomasa completa del kéfir de leche, en lugar de los sobrenadantes, garantizan una mejor extracción del kefirán y aumento en el rendimiento. Se busca realizar diversas dispersiones a diferentes concentraciones de kefirán como se muestra en la Tabla 2, para realizar posteriores tratamientos a las esferas de alginato.

**Tabla 2**

*Concentraciones de kefirán*

Código	Concentración %m/v
M1	1.0%
M2	2.0%
M3	3.0%

**3.4.1. Procedimiento aplicado para la obtención de kefirán**



**Figura 7** Diagrama de Flujo del proceso de obtención de Kefirán y diluciones

## **Descripción del proceso**

**Lavado:** Se realiza la limpieza de los gránulos de kéfir con agua destilada abundante, se deja reposar en un recipiente por unos momentos y con un colador plástico se procede al enjuague, se realiza el procedimiento hasta que el agua quede totalmente clara.

**Prensado:** Cuando se encuentre totalmente limpio se procede al prensado que tiene como objetivo retirar la mayor cantidad de agua antes del proceso de secado.

**Secado:** Previo a esta operación se realiza un pesado de la muestra húmeda para realizar el cálculo del rendimiento, una vez pesado se reparte en diversos crisoles para llevar a la estufa a una temperatura de 105°C por 4 horas.

**Pesado y Molienda:** Se deja en el desecador por unos minutos hasta que este frío y se procede a la medición de masa de kefirán y posteriormente a la molienda del mismo con la ayuda de un mortero para disminuir el tamaño de la partícula.

**Homogenización:** Se pesa los valores correspondientes de kefirán y se agrega agua para obtener las concentraciones deseadas en peso-volumen y con la ayuda de una licuadora de inmersión se procede a la homogenización de la solución a 1500 rpm durante 5 minutos.

**Homogenización ultrasónica 1:** Se utilizó el baño por ultrasonido a 80 W durante 15 minutos, se buscó disminuir aún más el tamaño de la partícula, para una mejor homogenización.

**Esterilización:** Se realiza un tratamiento térmico para esterilizar las disoluciones y mediante una placa magnética se agita regularmente para mantener la temperatura de 105 °C durante 20 minutos.

**Homogenización ultrasónica 2:** Se realiza en las mismas condiciones, se busca tener una mezcla homogénea sin saturaciones.

**Agitación:** Finalmente se procede a realizar la agitación de la solución agregando 30% masa-masa de glicerol al 99.5% como plastificante durante 15 minutos a 15 rpm.

### **3.5. Identificación de las características fisicoquímicas del alginato y kefirán**

Se realizaron diversos ensayos fisicoquímicos de pH, textura y difusividad de las esferas de alginato luego del baño de kefirán, y a la solución resultante de las concentraciones de kéfir. Para lo cual se realizó la inmovilización enzimática mediante alginato de sodio al 2% m/v conforme al estudio de Lara-Fiallos et al. (2024) en donde la enzima se diluye en agua destilada en proporción 1:1 y luego se añade la solución de alginato de sodio, agitando a 120 rpm hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, esta se deja caer en una solución al 10% de cloruro de calcio, utilizando una pipeta de 3 ml, permitiendo su reposo durante 30 minutos. Posteriormente, las perlas formadas se lavan para eliminar cualquier residuo de cloruro de calcio. Adicionalmente, el proceso se lleva a cabo a una temperatura de 35 °C y un pH de 9,6, según lo indicado en la misma investigación.

#### **3.5.1. *Proceso para la obtención de datos de pH de la solución***

Se utilizó el método NTE INEN 0973 (adimensional), se determina electrónicamente el pH en una muestra, empleando un electrodo de vidrio capaz de detectar las variaciones eléctricas asociadas a los cambios de pH en las muestras (Páez Aguas, 2023). Se realizan dos mediciones de la muestra, se debe lavar el electrodo con agua destilada y calibrar el aparato, utilizando soluciones de referencia cuyo pH sea similar al esperado en la muestra, se debe seguir los protocolos del fabricante, posteriormente se coloca la muestra y efectúa la determinación del pH.

#### **3.5.2. *Determinación de textura***

Se trabajó con un texturómetro Shimadzu EZ-SX de carga máx. 50N, el cual utiliza una aguja de corte en V, de alrededor de 1mm, con velocidad de ensayo de 1 mm/s (Páez Aguas, 2023). El procedimiento es sencillo se coloca la perla o la muestra acorde con el tratamiento en

la plataforma del texturómetro, el software del equipo inicia la medición y determina la fuerza (N) ejercida que determina la firmeza.



**Figura 8** Medición de textura de las esferas de alginato

### **3.5.3. *Determinación de difusividad***

Se realiza una prueba visual en donde se tiene presente el tiempo que se demora la esfera en reducir su tamaño, para lo cual se utiliza una superficie milimetrada, con el objetivo de calcular la reducción del diámetro de la perla, se azul de metileno como colorante para observar el cambio. Se toma como principio el estudio de (Ayala, 2020) en donde se mide la difusividad con condiciones de tiempo con la variación que se observa cuanto tiempo la esfera se tarde en absorber el colorante.

### **3.6. Diseño de la solución de recubrimiento de kefirán, mediante evaluación de productividad a diferentes concentraciones, para encontrar las mejores propiedades mecánicas.**

Con la presente investigación se busca realizar soluciones de kefirán en diversas concentraciones para luego sumergir en un baño las esferas de alginato de sodio que inmovilizan la enzima inulinasa, con el objetivo de formar una capa protectora que aumente la durabilidad de las encapsulaciones en el reactor de flujo continuo tomando como referencias parámetros presentes en la tesis de Godoy Montenegro (2023) en la cual se evalúa el reactor a

diferentes condiciones de temperatura, pH y flujo dando como resultado un tratamiento optimo en condiciones de 50°C, 4.5 pH y 0.23 ml/min, el cual se toma como punto de partida para la presente investigación.

Para la optimización de los resultados, se empleara la metodología de superficie Respuesta para identificar las condiciones óptimas de pH y temperatura que permitan el máximo rendimiento de la enzima inulinasa de *Aspergillus Niger* (Ayala, 2020). Los experimentos de esta investigación se realizaron mediante diseños Compuestos Centrales, considerando dos factores pH y temperatura y evaluando como variables de respuesta la concentración de fructosa (g/L) y la productividad (mg/h)

### **3.6.1. Cuantificación de sirope de fructosa en el reactor**

Se utilizó el método de Miller, también denominado como el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para ello, se realizó una dilución siguiendo la metodología descrita por (Godoy Montenegro, 2023), basada en el procedimiento de Miller (1959). Para preparar la solución, se disolvieron 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se incorpora 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 0,5 g de DNS, completando el volumen a 50 ml con agua destilada. La mezcla se conserva en un frasco ámbar a 4°C.

También se debe elaborar una curva de calibración de fructosa, la cual servirá como patrón en los procesos de conversión enzimática o hidrolisis. Para su análisis se empleara un espectrofotómetro ajustado a 540 nm de longitud de onda.



**Figura 9** Método DNS

Nota: Representación de cuantificación de fructosa tomado de (Godoy Montenegro, 2023)

Para elaborar la curva de calibración, se emplean soluciones con concentraciones previamente establecidas del analito, denominadas soluciones patrón o estándar (Dosal y Villanueva, 2008). Los autores también señalan que dichas soluciones deben prepararse por separado a partir de una o varias soluciones madre. Asimismo, el número de puntos utilizados para elaborar la curva de calibración variará según el objetivo particular de la misma.

### **3.6.2. *Evaluación de la productividad a diferentes concentraciones de kefirán***

La productividad del proceso catalítico depende netamente de la concentración de fructosa alcanzada, esta fue determinada mediante el cociente entre la producción de fructosa obtenida (mg) y los recursos utilizados (hora) (Ayala, 2020).

La cantidad de fructosa en miligramos se obtuvo del producto entre la concentración de fructosa obtenida mediante la metodología y el volumen total del medio de reacción. La ecuación permite calcular la productividad alcanzada durante el proceso (Godoy Montenegro, 2023). El cálculo de estos valores permite conocer el comportamiento del reactor con el paso del tiempo en las condiciones o tratamientos diversos.

$$\text{Productividad} = \frac{\text{Concentración de fructosa} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times \text{Volumen solución (ml)}}{\text{Tiempo (h)}}$$

### **3.6.3. *Factores para el modelamiento***

Como se mencionó anteriormente, la investigación se base en un estudio previo con el cual se obtuvo las condiciones óptimas del reactor de flujo continuo, sin embargo, se busca conocer si el baño de kéfir aplicado a las esferas ayuda a mejorar las propiedades mecánicas, por lo que se plantea un modelamiento con la ayuda de Design Expert versión 13 teniendo en

cuenta la concentración de kéfir y el tiempo de corrida del reactor como se muestra en la Tabla 3, dando como valor de respuesta la productividad.

**Tabla 3**

*Parámetros para modelamiento del reactor de flujo continuo*

<b>Parámetro</b>	<b>Rango</b>	<b>Unidad</b>
<b>Kefirán</b>	0-3	%
<b>Tiempo de corrida del reactor</b>	0.4-1.2	horas
<b>Temperatura</b>	50	°C
<b>pH</b>	4.5	
<b>Flujo</b>	0.23	ml/min

El objetivo principal es determinar los valores óptimos de los factores que maximizan la variable respuesta. La ecuación obtenida está relacionada con la productividad, considerando principalmente en el porcentaje de kéfir y el tiempo, resultando en una ecuación polinómica de distinto orden según el ajuste realizado, con una forma similar a:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \dots$$

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen detalladamente los resultados obtenidos en la investigación, con el fin de evaluar el grado de cumplimiento de los objetivos planteados, siguiendo las metodologías implementadas.

#### **4.1. Obtención de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche.**

Tal como se observa en el Anexo 1, después del proceso de limpieza y prensado del kéfir de leche se obtuvo una masa húmeda de 59.646 gramos la cual se colocó en crisoles para su posterior tratamiento térmico. Posteriormente tras el secado a 105°C, la masa seca resultante fue de 10.655 gramos dando un porcentaje de 17.86% al usar toda la biomasa de los gránulos. Como dato adicional, el porcentaje de humedad fue de 82.14%, valor que coincide con parámetros físicos estándar reportados en otros estudios.

El valor de masa seca se toma como rendimiento ya que en otros estudios como Lucena et al. (2022) y Ramírez Tapias et al. (2024), se tiene valor de 0.1% ya que buscan obtener el polímero de forma pura, sin embargo, al ser un valor muy bajo se optó por el uso de toda la biomasa para la realización de una dispersión de kéfir de leche.

#### **4.1.1. Preparación de solución de kéfir a diferentes concentraciones.**

En la Tabla 4, se aprecia la formulación para realizar las diversas diluciones de kefirán con el propósito de aplicarlas en las esferas de alginato, se tomó en cuenta las investigaciones de Vargas y Ruiz-Espinosa (2024) y Ramírez Tapias et al. (2024), para realizar películas de kéfir de agua y leche, se realizaron ligeros ajustes para llegar a realizar la dispersión más no formarlas como tal ya que se busca realizar el sumergimiento de las esferas en la solución de kéfir, tomando una idea que se muestra en Marangoni Júnior et al. (2020), la cual crea capas protectoras a los alimentos como frutas para mantener sus propiedades por más tiempo.

**Tabla 4***Formulación de soluciones de kefirán*

<b>Código</b>	<b>Concentración %m/v</b>	<b>Masa(g)</b>	<b>Volumen(ml)</b>	<b>Glicerol (30%) gramos</b>
<b>M1</b>	1.0%	0.6	60.0	0.18
<b>M2</b>	2.0%	1.2	60.0	0.36
<b>M3</b>	3.0%	1.8	60.0	0.54

Se observó que las muestras 1 y 2 se diluyeron casi por completo luego de la preparación de la muestra, sin embargo, para la muestra número 3 presentó sedimentación, por lo que empezó la saturación en la dilución. Sin embargo, en la investigación de Vargas y Ruiz-Espinosa (2024) se utiliza la misma concentración para la formación de películas de kefirán no presentan este problema al igual que (Ramírez Tapias et al., 2024) pese que se utiliza una concentración aun mayor de 5% m/v esto debido al uso del equipo para la homogenización ultrasónica el cual fue el *Ultrasonic processor VCX-750* y se adaptó en la investigación utilizando un equipo de baño para esta operación.

**Figura 10** Disolución de Kefirán 2% sin saturación

## 4.2. Identificación de las características fisicoquímicas del alginato y kefirán

En este apartado se detallan los resultados obtenidos acerca de las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones de kefirán y la solución de alginato de sodio al 2% m/v.

### 4.2.1. *Medición de pH en las diluciones de kefirán y alginato de sodio*

Los resultados de pH medidos en las muestras de kefirán a diversas concentraciones fue de un pH de 3.5 en todos los casos, en el estudio Vargas y Ruiz-Espinosa (2024) la solución resultante al 3% de kefirán dio valores de 4.5 pH, por lo que la dispersión de kefirán tiene valores ácidos, que a diferencia de la solución de alginato de sodio al 2% m/v que tiene un valor más básico con un pH de 9.6, lo cual de acuerdo con (Lara-Fiallos et al., 2024) es el valor que se obtiene al mezclar el alginato de sodio con agua destilada y el que se comprobó en laboratorio luego de la medición con potenciómetro.

### 4.2.2. *Prueba de textura de las esferas de alginato*

Se realizó un ensayo de textura para evaluar la dureza de las esferas tratadas con la solución de kefirán, para lo cual se utilizó el texturómetro Shimadzu EZ-SX de carga máxima 50 N. Como se muestra en las Tablas 5, las perlas recubiertas con kefirán presentaron una mayor resistencia, alcanzando un valor promedio de 0.4058 N, en comparación con las esferas no tratadas, que registraron una media de 0.3011 N.

**Tabla 5**

*Dureza de las esferas de alginato*

<b>Parámetros</b>	<b>Dureza 1 (N)</b>	<b>Parámetros</b>	<b>Dureza 2 (N)</b>
0% Kefirán	0.2288	2% Kefirán	0.3727
0% Kefirán	0.3700	2% Kefirán	0.4912
0% Kefirán	0.3044	2% Kefirán	0.3535
<b>Media</b>	0.3011		0.4058
<b>Desviación Estándar</b>	0.0707		0.0746

La dureza de las esferas de penden de la temperatura, tiempo de exposición al cloruro de calcio y las concentraciones de alginato ( Páez Aguas , 2023). El estudio señala varios factores que afectan la rigidez de las esferas. Se consideraron parámetros de 30 minutos de reposo en la solución, 2% de alginato de sodio y una temperatura de 21°C. Los resultados mostraron que la aplicación de kéfir influye en la firmeza de las esferas, con un incremento en la dureza de 34.79%.

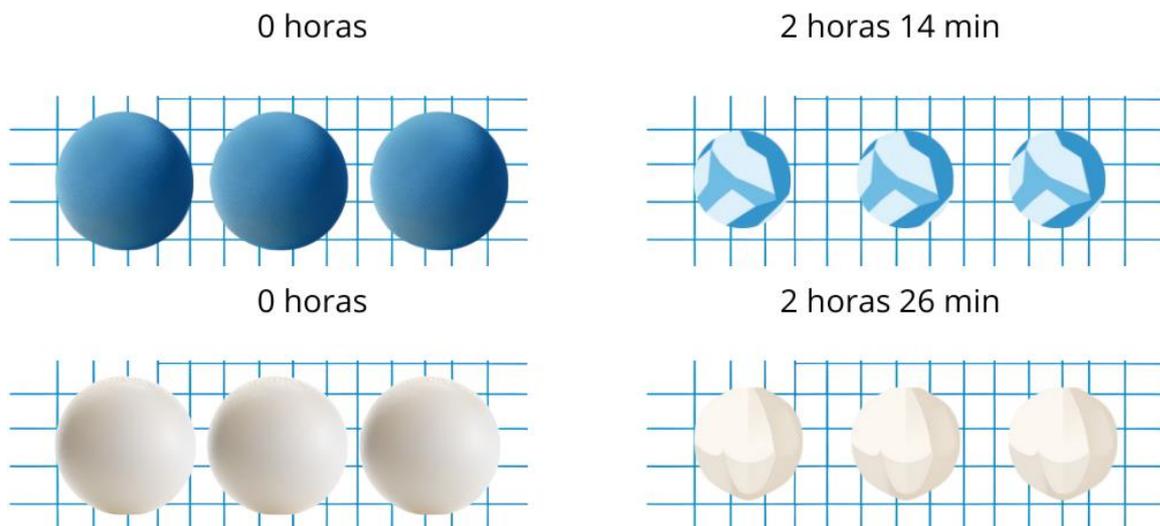
$$\text{Incremento} = \frac{\text{Valor tratado} - \text{Valor Control}}{\text{Valor Control}} \times 100$$

$$\text{Incremento} = \frac{0.4058 N - 0.3011N}{0.3011N} \times 100$$

$$\text{Incremento} = 34.79\%$$

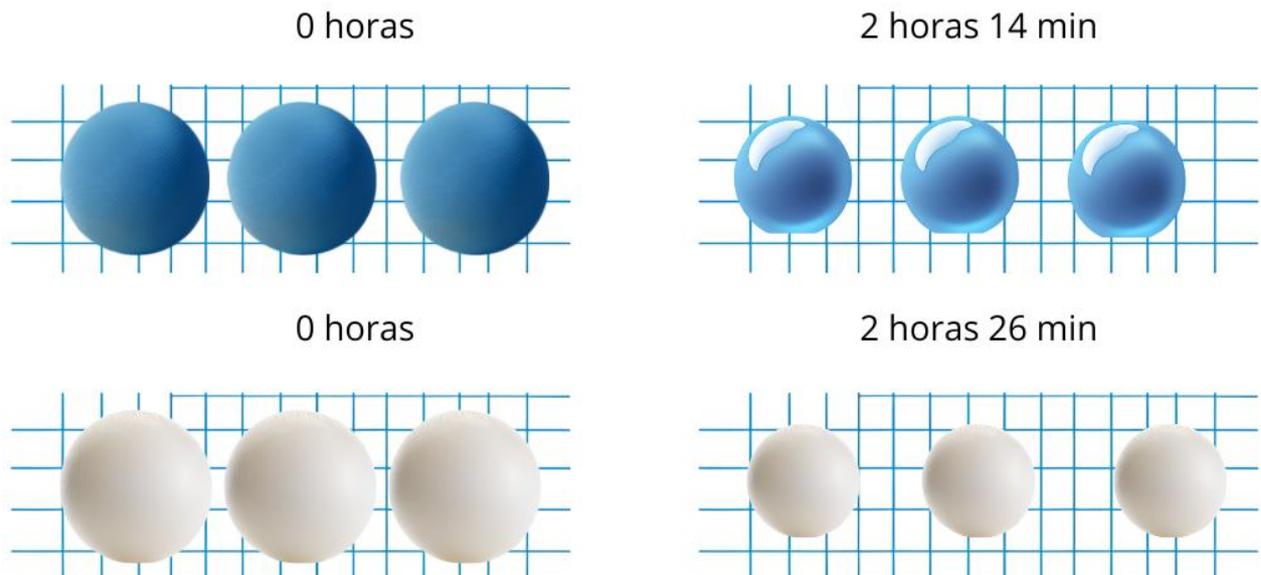
#### 4.2.3. Prueba de difusión de las esferas de alginato

Se realizó una prueba de difusión para analizar los cambios en el tamaño de las esferas tratadas con kefirán y las no tratadas. Se trabajó con dos muestras: a una se le añadió colorante y a la otra no. Ambas esferas, con un tamaño inicial de 4 mm, fueron sometidas a una solución de kéfir de leche al 2% y otras no.



**Figura 11** Esferas sin baño de kefirán

Tras 2 horas y 26 minutos, las esferas sin colorante redujeron su tamaño a 3 mm; sin embargo, aquellas tratadas con kefirán conservaron mejor su forma esférica en comparación con las no tratadas. Por otro lado, las esferas con colorante mostraron cambios a las 2 horas y 14 minutos, obteniéndose resultados similares, pero con la diferencia de que el color azul era más intenso en las esferas bañadas con kefirán.



**Figura 12** Esferas sometidas a baño de kefirán al 2% m/v

#### **4.3. Diseño de la solución de recubrimiento de kefirán, mediante evaluación de productividad a diferentes concentraciones, para encontrar las mejores propiedades mecánicas.**

Como se detallada en la sección de metodología de este documento, se tomaron las condiciones de temperatura, pH y flujo del punto optimo de un estudio previamente realizado el cual arroja valores de productividad de 3.58 mg/h bajo dichas condiciones. Sin embargo, al elaborar la curva patrón de fructosa con el espectrofotómetro Uv-Vis Specord 250 Plus disponible en los laboratorios de la institución, se obtiene un coeficiente de absorción de 0.0005 mg/l, la cual se detalle en el Anexo 2. Por esta razón, se decidió emplear como nuevo valor de comparación el resultado del tratamiento inicial donde no se aplica el baño de kefirán.

### 4.3.1. *Evaluación del modelamiento mediante la productividad*

Es importante aclarar que los resultados presentados en la Tabla 6 se basa en un modelamiento o ajustes de un tratamiento óptimo, por lo que no se lo considera como un diseño experimental. El objetivo es evaluar si existe mejora en la estabilidad mecánica del proceso, analizando el comportamiento en cada corrida del reactor, si se toma en cuenta solo la productividad se puede percibir claramente que el tratamiento T1 es mejor ante este parámetro, alcanzando un valor de 12.779 mg/h. Por esta razón, se toma como nuevo punto de partida los valores del tratamiento 1 como se explicó anteriormente.

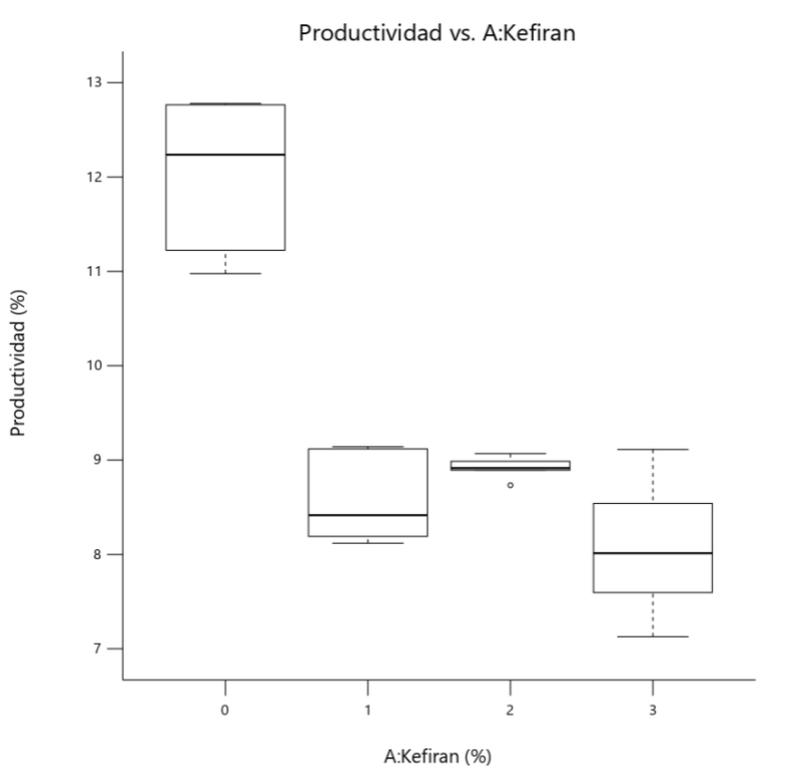
**Tabla 6**

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

<b>Tratamiento</b>	<b>Kefirán (%)</b>	<b>Tiempo h</b>	<b>Concentración g/l</b>	<b>Productividad mg/h</b>
<b>T1</b>	0.00	0.400	0.926	12.779
	0.00	0.533	0.924	12.751
	0.00	0.667	0.887	12.236
	0.00	0.800	0.934	12.889
	0.00	0.933	0.831	11.472
	0.00	1.067	0.795	10.976
<b>T2</b>	1.00	0.400	0.661	9.119
	1.00	0.533	0.662	9.141
	1.00	0.667	0.623	8.603
	1.00	0.800	0.596	8.229
	1.00	0.933	0.594	8.191
	1.00	1.067	0.588	8.119
<b>T3</b>	2.00	0.400	0.646	8.916
	2.00	0.533	0.657	9.068
	2.00	0.667	0.651	8.987
	2.00	0.800	0.646	8.915
	2.00	0.933	0.644	8.893
	2.00	1.067	0.633	8.733
<b>T4</b>	3.00	0.400	0.660	9.113
	3.00	0.533	0.619	8.540
	3.00	0.667	0.591	8.150
	3.00	0.800	0.571	7.876
	3.00	0.933	0.550	7.596
	3.00	1.067	0.517	7.128

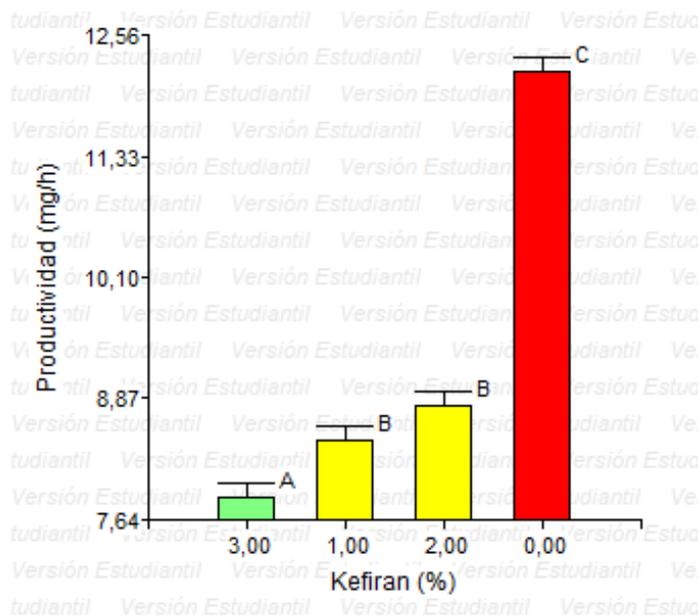
#### 4.3.2. *Análisis estadístico del modelamiento mediante Design Expert*

La Figura 13 muestra la interacción que tiene el kefirán en la productividad, en donde se afirma que los mayores valores de productividad están ubicados en el tratamiento que no se aplicó el baño de kefirán. En el caso de aquellos que si fueron sometidos al procedimiento tiene valores similares y no existe diferencia significativa aparente entre ellos.



**Figura 13** Box Plot Kefirán vs Productividad

La gráfica de barras muestra la relación de la media aritmética de los valores de productividad como se muestra en la Figura 14, confirma que el tratamiento sin kefirán es el más optimo en términos de productividad. Sin embargo, nos muestra que los tratamientos de 1% y 2% de kefirán, no existe diferencia significativa entre ellos y que el tratamiento con mayor concentración de polímero tuvo los valores más bajos.



**Figura 14** Gráfico de Barras InfoStat

#### 4.3.2.1 Análisis de varianza (ANOVA) del modelamiento del reactor teniendo como variable respuesta Productividad

Mediante el ajuste y validación del modelamiento que se presentó para conocer el comportamiento del reactor de flujo continuo luego de que le medio orgánico fue sometido a diluciones de kefirán, se busca conocer si realmente tiene una influencia significativa en la mecánica del proceso.

Los siguientes modelos representan las ecuaciones para estimar la productividad de fructosa durante los tratamientos aplicados en la investigación:

- Modelo en términos de factores codificados para la variable productividad

$$P = 0.8394 \cdot A - 0.2738 \cdot B + 0.0803 \cdot AB + 1.45 \cdot A^2 - 0.6665 \cdot A^2 B - 2.81 \cdot A^3 + 8.58$$

Donde:

P= Productividad expresada en mg/h

A= Variable codificada para Kefirán (%)

B= Variable codificada para Tiempo (h)

- Modelo en términos de factores reales para la variable productividad

$$P = -9.0643 * K - 3.06021 * T + 2.82522 * K * T + 5.03963 * K^2 - 0.888247 * K^2 * T - 0.831638 * K^3 + 14.24615$$

Donde:

P= Productividad expresada en mg/h

K= Variable codificada para Kefirán (%)

T= Variable codificada para Tiempo (h)

Como se muestra en la Tabla 7, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es 0.99, indicando alta confiabilidad del modelo. Los valores ajustado y predicho son 0.98 y 0.97 respectivamente, con una diferencia inferior a 0.2. La variación es del 1.99% esto indica una buena precisión y confiabilidad del experimento realizado.

**Tabla 7**

*Análisis del modelo aplicado*

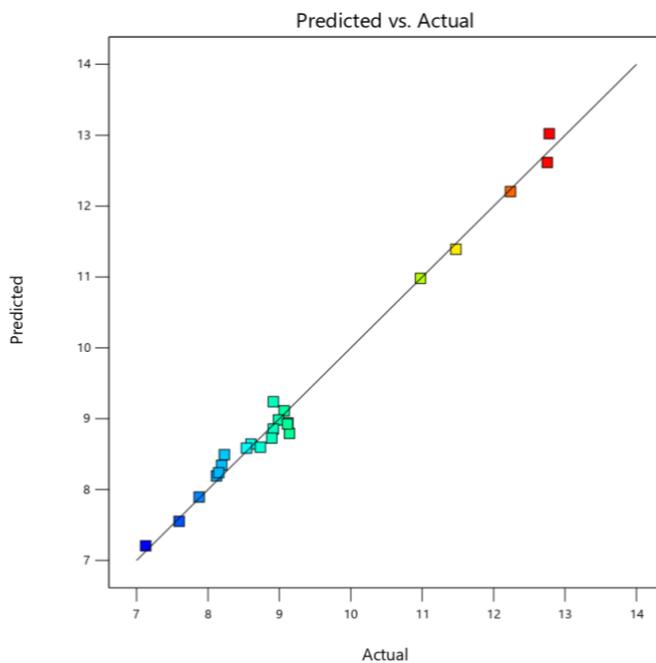
Desviación estándar	Media	$R^2$	$R^2$ ajustado	$R^2$ predicho	Coefficiente de variación (%)	Precisión adecuada
0.18	9.28	0.99	0.98	0.97	1.99	57.02

La Tabla 8 muestra el análisis ANOVA de segundo orden, destacando el término correspondiente del efecto de las diluciones de kefirán (A) y tiempo (B), el término del efecto cuadrático del kefirán ( $A^2$ ), el efecto cubico del mismo parámetro ( $A^3$ ) y la interacción entre estos valores (AB,  $A^2B$ ), del modelo fue significativo ya que tiene un valor-p de  $< 0.0005$ . El Valor-F del modelo es de 275.25 lo que manifiesta significativa, por lo tanto, puede emplearse para explorar el espacio del diseño.

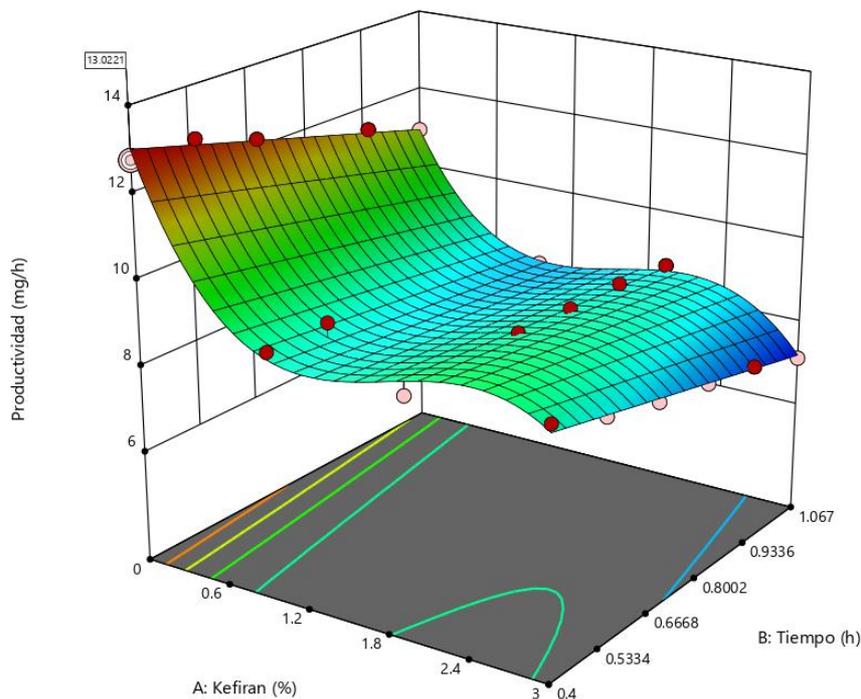
**Tabla 8***ANOVA para el modelamiento planteado*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Modelo</b>	56.44	6	9.41	275.25	< 0.0001
<b>A-Kefirán</b>	0.7412	1	0.7412	21.69	0.0003
<b>B-Tiempo</b>	0.3274	1	0.3274	9.58	0.0069
<b>AB</b>	0.0398	1	0.0398	1.16	0.2967
<b>A<sup>2</sup></b>	9.52	1	9.52	278.65	< 0.0001
<b>A<sup>2</sup>B</b>	0.9781	1	0.9781	28.62	< 0.0001
<b>A<sup>3</sup></b>	7.39	1	7.39	216.37	< 0.0001
<b>Residual</b>	0.5468	16	0.0342		
<b>Total</b>	56.99	22			

En la Figura 15 se muestra la correlación entre los valores predichos por el software Design Expert Versión 13.0 y los datos experimentales, con un coeficiente de determinación de 0.99 en el análisis de ANOVA, evidenciando una mínima dispersión.

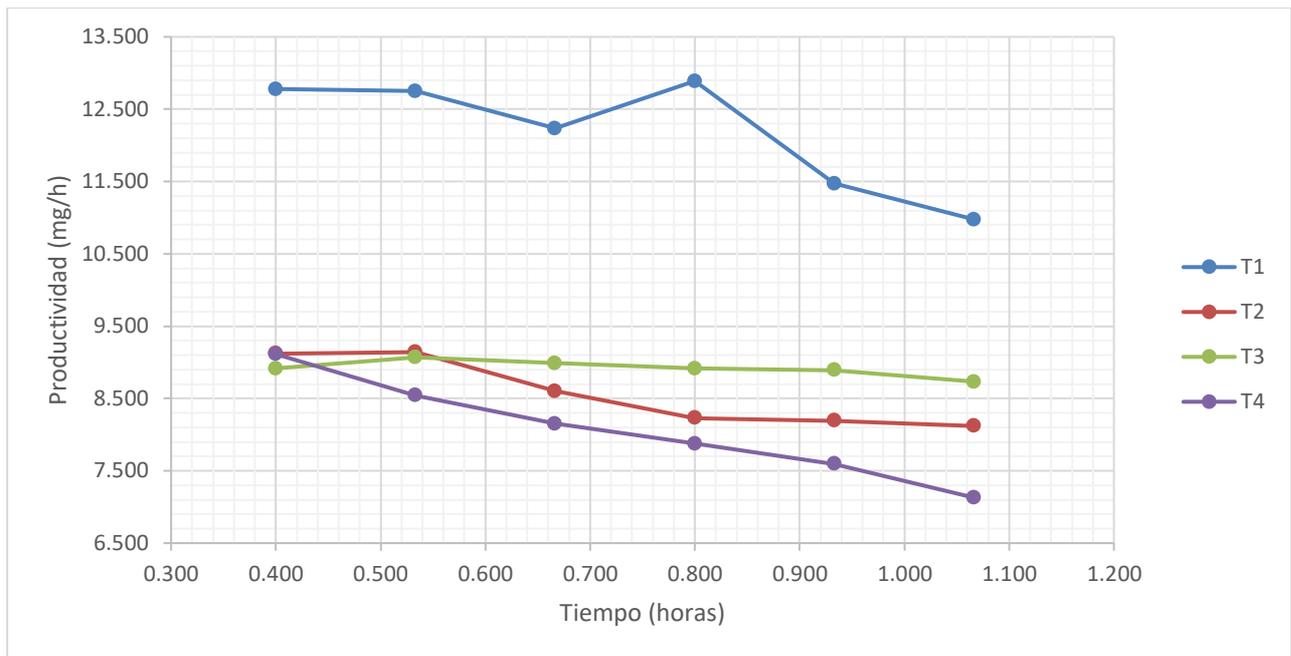
**Figura 15** Valores predichos vs reales de productividad del modelamiento planteado

Como se ha visto en el modelamiento los valores que se acercan a la mayor productividad son aquellos que no fueron sometidos al baño de kefirán como se observa en la Figura 16. Pero también se observa que a pesar de la productividad baja los tratamientos que fueron sometidos al baño de kefirán son valores similares con el paso del tiempo de reactor lo que nos dice que se estabilizan mejor y no hay cambios bruscos entre ellos como sucede con el tratamiento normal.



**Figura 16** Diseño de superficie respuesta correspondiente la modelamiento planteado

Como se muestra en la Figura 17, el Tratamiento 1 presenta niveles de productividad más elevada frente a los otros. No obstante, los tratamientos que se aplicó un baño kefirán en las esferas reducen la productividad debido a la capa añadida, ya que dificulta el acceso directo a la enzima inmovilizada. Sin embargo, se evidencia que el proceso tiende a estabilizarse y sin presentar fluctuaciones significativas. En particular, el Tratamiento 3 destaca por mantener una productividad constante aproximadamente una hora de funcionamiento del reactor.



**Figura 17** Comportamiento del reactor a los tratamientos

Para realizar una evaluación económica en el ámbito industrial, es fundamental considerar tanto los costos directos como indirectos asociados a la producción del producto final. Respecto a los reactores, estos costos incluyen los medios orgánicos utilizados en el proceso y los equipos necesarios para su funcionamiento (Abejón et al., 2015). Es fundamental considerar un factor económico como se presenta el Anexo 3, ya que el uso del medio orgánico como el alginato de sodio en el reactor, representa un costo significativo. Optimizar su uso puede deberse a la estabilidad mecánica del proceso, permitiendo que la enzima puede ser utilizada por más tiempo. Aunque la productividad por corrida sea menor, a largo plazo puede verse mejor rendimiento en el sistema.

El estudio de Godoy Montenegro (2023) menciona que las esferas de alginato presentan problemas de desgaste en el reactor de flujo continuo. Mejorar la resistencia podría generar un impacto económico positivo, ya que permitiría prolongar el uso del medio orgánico por mayor tiempo al que se estable en la investigación antes mencionada, optimizando así los costos del proceso.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- El proceso de obtención de kéfir de leche permitió alcanzar un rendimiento del 17.86% en masa seca, con un contenido de humedad del 82.14%, valores consistentes con estudios previos, estableciendo la mejora de la estabilidad de la solución que sirve de recubrimiento en concentraciones de hasta 2% m/v, ya que a valores superiores a este se observó sedimentación, indicando la sobresaturación de la solución.
- En cuanto a la textura, las esferas de alginato tratadas con kefirán mostraron un aumento del 34.79% en su dureza, lo que indica una mayor resistencia mecánica para ser sometidas a condiciones de flujo en el biorreactor. Además, las pruebas de difusión revelaron que el kefirán ayudó a mantener la forma y tamaño de las esferas, demostrando su efecto protector sobre la estructura del alginato.
- La implementación de diferentes concentraciones de kefirán en el proceso de recubrimiento de las esferas de alginato no presentan mejoras significativas con respecto a la productividad de fructosa, esto debido a que el T1 (tratamiento sin kefirán) mostró una conversión del 12.779 mg/h, a diferencia del 9,113 mg/h que cuantificó el T3 lo que indica en una reducción de productividad; sin embargo el reactor se mantiene más estable por lo que se mantiene con una operación continua haciendo que las esferas no pierdan su forma y tamaño lo que contribuye a la optimización de las condiciones para prolongar la vida útil del soporte de catalizador.

## 5.2.Recomendaciones

- Es necesario probar la solución de que kefirán en futuras investigaciones para ver si ayuda en el recubrimiento alimenticio debido que la investigación demostró que las propiedades mecánicas de las esferas aumentaron su dureza y ayudaron a mantener las enzimas lo que indica que puede prolongar la vida útil de los alimentos.
- Efectuar la experimentación de la extracción del kefirán en un mejor equipo de ultrasonido para poder tener una mejor dispersión que no tenga residuos para realizar un mejor recubrimiento.
- Además, se sugiere realizar un análisis más profundo sobre la influencia de diferentes concentraciones de kefirán en el proceso de estabilización, evaluando no solo la productividad, sino también la eficiencia y el costo a largo plazo del sistema

## REFERENCIAS

- Abejón, R., Belleville, M. P., y Sanchez-Marcano, J. (2015). Design, economic evaluation and optimization of enzymatic membrane reactors for antibiotics degradation in wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.072>
- Aldana, A., y Rodríguez, E. (2018). Ingeniería y Competitividad Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos CORE View metadata, citation and similar papers at core. *Universidad del Valle*, 5, 74–83.
- Arroyo, M. (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications | Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2).
- Ayala, Y. T. (2020). “OBTENCIÓN DE SIROPE DE FRUCTOSA A PARTIR DE TUNA BLANCA *Opuntia ficus-indica* POR EL MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE INULINASA”. [BachelorThesis]. Universidad Técnica del Norte.
- Calvo, M. (2007, junio 14). *Bioquímica de los alimentos*.
- Carrera Acosta, L. D. (2019). *Obtención de kefirán a partir de suero y gránulos de kéfir* [BachelorThesis, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/8961>
- Castillo Calderón, A., y Chamy Maggi, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus* Inulinase production by yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria 1*.
- Castor, L. (2011). INULINA: Polisacárido con interesantes beneficios a la salud humana y con aplicación en la industria farmacéutica. *inFARMate*, 27.
- Corbella, L. P. (2005). Analysis and design of catalytic packed-bed reactors. *Catalysis Today*, 107, 600–607.

- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., y Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Dosal, M., y Villanueva, M. (2008). INTRODUCCIÒN A LA METROLOGÍA QUÍMICA CURVAS DE CALIBRACIÓN EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. En *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir? a complex probiotic. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.13938>
- Fassler, K. W. (2020). *MÉTODOS CUANTITATIVOS DE ANÁLISIS*. <https://archivos.juridicas.unam.mx/www/bjv/libros/13/6180/7.pdf>
- Francke, P., y Acosta, G. (2020). Impacto de la suplementación con micronutrientes sobre la desnutrición crónica infantil en Perú. *Revista Medica Herediana*, 31(3), 148–154. <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i3.3803>
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Nishinari, K., y Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>
- Giraldo Gómez, G. I., y Díaz Ramos, M. (2014). Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada. *Producción más Limpia*, 8(2).

- Godoy Montenegro, J. I. (2023). *Análisis del proceso conversión enzimática de fructosano a sirope de fructosa en reactores flujo continuo y batch utilizando como medio de soporte materia orgánica* [BachelorThesis]. Universidad Técnica del Norte.
- González, G. (2009). *Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato*.
- Huertas, R. (2010). MICROENCAPSULACIÓN DE ALIMENTOS. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2).
- Imeson, A. (2009). Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents. En *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. <https://doi.org/10.1002/9781444314724>
- Jaibiba, P., Naga Vignesh, S., y Hariharan, S. (2020). Working principle of typical bioreactors. En *Bioreactors* (pp. 145–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00010-3>
- Lara-Fiallos, M., Ayala Chamorro, Y. T., Espín-Valladares, R., DelaVega-Quintero, J. C., Olmedo-Galarza, V., Nuñez-Pérez, J., Pais-Chanfrau, J.-M., y Martínez, A. P. (2024). Immobilised Inulinase from *Aspergillus niger* for Fructose Syrup Production: An Optimisation Model. *Foods*, 13(13), 1984. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods13131984>
- López, L., y Villalta, M. (2009). *Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicílico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica*.
- Lucena, M. de A., Ramos, I. F. da S., Geronço, M. S., de Araújo, R., da Silva Filho, F. L., da Silva, L. M. L. R., de Sousa, R. W. R., Ferreira, P. M. P., Osajima, J. A., Silva-Filho, E. C., Rizzo, M. D. S., Ribeiro, A. B., y da Costa, M. P. (2022). Biopolymer from Water Kefir as a Potential Clean-Label Ingredient for Health Applications: Evaluation of New Properties. *Molecules*, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123895>

- Madrigal, L., y 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).
- Marangoni Júnior, L., Vieira, R. P., y Anjos, C. A. R. (2020). Kefirán-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. En *Carbohydrate Polymers* (Vol. 246). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>
- Miranda Arcos, J. F. (2023). *Estudio de escalado de hidrólisis de inulina en un reactor continuo de lecho empacado con enzimas inmovilizadas* [BachelorThesis, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/15119>
- Morón, E. (2018). *BIOCATALIZADORES. LA NUEVA PIEDRA FILOSOFAL DE LA INDUSTRIA*. Steemit. <https://steemit.com/spanish/@emiliomoron/biocatalizadores-la-nueva-piedra-filosofal-de-la-industria>
- Ortiz, N., Ochoa, L., Gonzáles, S., Rutiaga, O., y Gallegos, J. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoLógicas*, 24(52), 1–19.
- Páez Aguas, K. G. (2023). *Análisis de reutilización de insumos químicos en el proceso de encapsulación con Alginato de Sodio* [BachelorThesis]. Universidad Técnica del Norte.
- Parra, C., y Adolfo, R. (2019). Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Ramírez Tapias, Y. A., Rezzani, G. D., Delgado, J. F., Peltzer, M. A., y Salvay, A. G. (2024). New Materials from the Integral Milk Kefir Grain Biomass and the Purified Kefirán: The Role of Glycerol Content on the Film's Properties. *Polymers*, 16(22), 3106. <https://doi.org/10.3390/polym16223106>

- Reddy, R. K., y Reddy, S. (2010). Effect of different Co-polymers on Sodium Alginate Microcapsules Containing Isoniazid. *Pharmaceutical Technology. Pharmaceutical Technology*, 2(4), 2198–2203.
- Romero, G. C. A., Malo, a L., y Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 1*.
- Sandoval, V. M. (2017). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. *Propiedades funcionales de hoy, 2016*, 181–218. <https://doi.org/10.3926/oms.358>
- Thomson, K. M., Dyer, C., Liu, F., Sands, K., Portal, E., Carvalho, M. J., Barrell, M., Boostrom, I., Dunachie, S., Farzana, R., Ferreira, A., Frayne, F., Hassan, B., Jones, E., Jones, L., Mathias, J., Milton, R., Rees, J., Chan, G. J., ... Parkhill, J. (2021). Effects of antibiotic resistance, drug target attainment, bacterial pathogenicity and virulence, and antibiotic access and affordability on outcomes in neonatal sepsis: an international microbiology and drug evaluation prospective substudy (BARNARDS). *The Lancet Infectious Diseases*, 21(12). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00050-5)
- Vargas, S. A., y Ruiz-Espinosa, H. (2024). Kéfir de agua: Características, producción y fabricación de biopelículas como una alternativa de uso de excedentes. *BioTecnología*, 28(1), 36–48. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2024/02/Vargas-y-Ruiz-2024.pdf>
- Zapata, A. D. (2001). *Evaluación de un biorreactor de lecho empacado para el desarrollo del hongo Beauveria bassiana* [Masther, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55910>

## ANEXOS

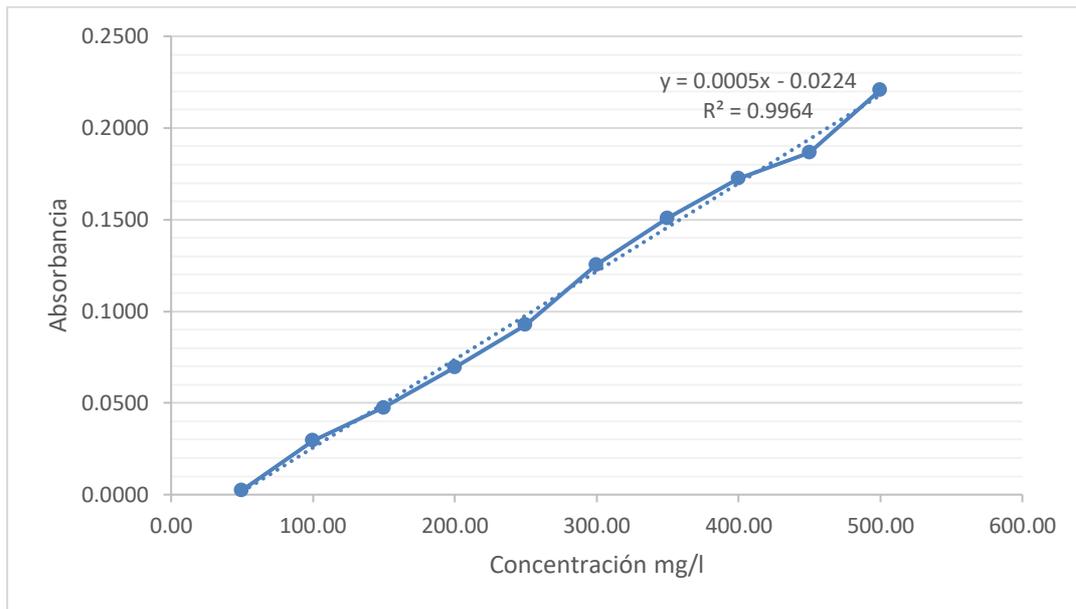
### Anexo 1

**Tabla 9**

*Resultados Secado de gránulos de Kéfir*

<b>Etiquetas de fila</b>	<b>Masa Húmeda (g)</b>	<b>Masa Seca (g)</b>
<b>J1</b>	2.545	0.333
<b>J2</b>	2.845	0.351
<b>J3</b>	2.598	0.326
<b>J4</b>	2.976	0.407
<b>J5</b>	3.653	0.475
<b>J6</b>	2.763	0.363
<b>J7</b>	1.911	0.388
<b>J8</b>	2.233	0.457
<b>J9</b>	2.235	0.422
<b>J10</b>	1.850	0.324
<b>J11</b>	2.362	0.459
<b>J12</b>	1.489	0.312
<b>J13</b>	2.464	0.503
<b>J14</b>	2.114	0.467
<b>J15</b>	2.087	0.369
<b>J16</b>	1.619	0.286
<b>J17</b>	3.472	0.697
<b>J18</b>	2.319	0.459
<b>J19</b>	2.467	0.501
<b>J20</b>	3.021	0.625
<b>J21</b>	2.503	0.477
<b>J22</b>	1.775	0.339
<b>J23</b>	3.376	0.662
<b>J24</b>	2.969	0.654
<b>Total general</b>	<b>59.646</b>	<b>10.655</b>

## Anexo 2



**Figura 18** Curva patrón de Fructosa

### Anexo 3

**Tabla 10**

*Costos del equipo*

<b>Reactivos/insumos/Equipos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Precio \$ USD</b>	<b>Porcentaje</b>
Algitano	1	kg	20.00	5.36
Kefir	1	kg	22.00	5.90
Agua destilada	2	galones	8.00	2.14
Inulinasa	1	kg	130.00	34.88
Inulina sigma	10	gramos	64.02	17.18
Ácido cítrico	1	kg	3.50	0.93
Bombas	2	5V	33.50	9.00
Mangueras	100	cm	1.00	0.26
Ensamble de bombas			30.00	8.05
Construcción del reactor			60.00	16.12
Total general			372.62	100%

## Anexo 4

### Desarrollo de la investigación

#### Pesado y Molienda del kefirán



#### Preparación de las soluciones de kefirán



### Baño de kefirán en las esferas de alginato



### Corrida de tratamiento y cuantificación de Fructosa



## Anexo 5

### Ficha técnica de le enzima 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: **16285**  
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 6

### Ficha técnica de inulina

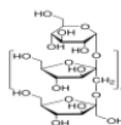
**Sigma-Aldrich**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA  
Website: [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)  
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)  
Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto: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 <sub>2</sub> 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](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.

