

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Producción de fructosa mediante glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en un reactor de lecho fluidificado

TESIS

Que presenta

JULIO ALBERTO VALENZUELA LAGARDA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. JOSÉ DE JESÚS CARO CORRALES DRA. ERIKA YUDIT RÍOS IRIBE

Culiacán, Sinaloa, México

Agosto de 2019

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Mediciones Termofísicas del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José de Jesús Caro Corrales y la Dra. Erika Yudit Ríos Iribe, así como, la asesoría del Dr. Oscar Martín Hernández Calderón y del Dr. Roberto Dorado Gutiérrez. El proyecto contó con financiamiento de la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2015/118). El IBQ. Julio Alberto Valenzuela Lagarda recibió beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales el día 27 del mes Agosto del año 2019, el que suscribe Julio Alberto Valenzuela Lagarda alumno del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 10005641, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. José de Jesús Caro Corrales y la Dra. Erika Yudit Ríos Iribe y cede los derechos del trabajo titulado "Producción de fructosa mediante glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en un reactor de lecho fluidificado", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Julio Alberto Valenzuela Lagarda

AGRADECIMIENTOS

En la dimensión académica, agradezco a mi comité de tesis por permitirme participar, aportar ideas y hacerme sentir que formaba parte del trabajo aquí presentado.

A mi director de tesis, el Dr. José de Jesús Caro Corrales la oportunidad de desarrollar el proyecto bajo su dirección, compartir abiertamente sus conocimientos y enseñarme que si somos capaces de resolver problemas de índole académica, fácilmente podremos abordar cualquier dificultad en nuestra vida personal.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Erika Yudit Ríos Iribe, por instruirme en el arte de la investigación, potenciar mis habilidades como investigador y brindarme la confianza de expresar y proponer ideas en un ambiente idóneo.

A mis asesores, el Dr. Oscar Martín Hernández Calderón y el Dr. Roberto Dorado Gutiérrez, referentes de la investigación quienes estuvieron siempre en la mejor disposición de concederme parte de su tiempo, sabiduría y paciencia las veces que así lo requerí, pocas, pero efectivas.

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, que a través del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y permitiendo el uso de los Laboratorios de Mediciones Termo físicas y Biotecnología y Bioingeniería, hicieron posible la realización y culminación de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por ser mi alma máter.

A mi esposa IBQ. Lourdes López e hijo Miguel, que vivieron la otra faceta de la investigación, estuvieron a mi lado en un proceso muy duro, lleno de retos y crecimiento, les agradezco su comprensión en aquellos momentos que tuve que estar en el laboratorio durante jornadas extenuantes, les dedico este trabajo, porque es suyo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
A. Fructosa	7
1. Generalidades	7
2. Importancia económica	7
3. Usos	7
B. Producción de fructosa	9
1. Jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF)	9
2. Glucosa isomerasa	10
3. Producción de glucosa isomerasa	11
C. Inmovilización de enzimas	12
D. Reactores enzimáticos	14
E. Descripción matemática	21
1. Mecanismo cinético	21
2. Modelo del reactor	23
a. Partícula catalítica	25
b. Reactor de lecho empacado	27
c. Propiedades físicas de lecho empacado y fluidificado	28
c. Reactor de lecho fluidificado	31
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. OBJETIVOS	35
A. Objetivo General	35
B. Objetivos Específicos	35
VI. MATERIALES Y METODOS	36

A. MATERIALES	36
1. Reactivos	36
2. Sistema de biorreacción de lecho fluidificado	36
3. Equipo polarímetro-refractómetro	36
B. MÉTODOS	38
1. Inmovilización de glucosa isomerasa	38
2. Estudio del efecto del caudal sobre la producción de fructosa	40
3. Estudio del coeficiente de transferencia de masa convectivo	40
4. Cuantificación y registro de caudal de fluidificación	40
5. Modelado matemático	42
a. Modelo del lecho fluidificado	42
b. Modelo de la perla catalítica	44
c. Modelo del depósito de recirculación	46
1) Volumen de solución en el depósito de recirculación	46
VII. RESULTADOS	48
A. Perlas de glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio	48
1. Efecto de condiciones de inmovilización sobre el diámetro de las perla	s 48
B. Fluidificación del lecho de perlas de alginato	51
1. Altura de fluidificación de perlas catalíticas en los experimentos	55
C. Producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado	60
D. Estudio de reactor de lecho fluidificado	64
1. Efecto de los parámetros de proceso en reactor de lecho fluidificado	75
VIII.CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	88
ABREVIATURAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1 Distintas configuraci	ones de reacción con enzimas inmovilizadas	17
2 Esquema del sistem	a de biorreacción en lecho fluidificado	37
3 Montaje del sistema	de inmovilización	39
4 Diagrama del sistem	a de medición y registro de caudal	41
5 Glucosa isomerasa i	inmovilizada en perlas de alginato de calcio	49
6 Diámetros de perlas	elaboradas a condiciones distintas	52
7 Expansión de lecho	con respecto al caudal de fluidificación.	54
8 Fluidificación de las	perlas por efecto de la densidad	56
9 Alturas de lecho de l	los experimentos registradas en los tratamientos	57
10 Historias de alturas	s y caudal de fluidificación	59
11 Comparación de Ψ	y Q en distintos lotes de perlas	61
12 Fructosa producida	en reactor de lecho fluidificado	62
13 Cinéticas de conve	rsión para las diferentes reutilizaciones de perla	65
14 Producción de fruct	tosa usando distintos lotes de perlas	66
15 Aproximación mate	emática de la producción de fructosa	69
16 Historia del coeficie	ente convectivo de transferencia de masa (k∟).	71
17 Historias del coefic	iente de dispersión axial	72
18 Efecto de la masa o	de enzima sobre la producción de fructosa.	77
19 Efecto del cambio d	de la concentración inicial de sustrato.	78
20 Efecto del cambio o	del diámetro de la partícula (D _p)	79
21 Efecto de la altura	y caudal de fluidificación	81
22 Efecto de la difusiv	idad efectiva y la eficiencia residual catalítica	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1 Poder edulcorante de algun	os carbohidratos.	8
2 Comparación de los reactor	es de lecho fijo y fluidificado	20
3 Parámetros cinéticos ajusta	dos a diferentes temperaturas	24
4 Difusividad efectiva de las p	perlas catalíticas	26
5 Parámetros de las perlas de	e alginato	50
6 Diámetro de perlas a difere	nte porcentaje de apertura de válvula	53
7 Comparación de fracciones	de conversión en diferentes reactores	63
8 Parámetros de proceso en	reactor de lecho fluidificado	67
9 Parámetros adimensionales	s y Us calculados para los tratamientos	74

I. RESUMEN

La utilización de fructosa se ha incrementado en los últimos años, llegando a reemplazar a la sacarosa en diversas aplicaciones industriales. Las propiedades que contribuyen al éxito de las aplicaciones industriales de la fructosa son la alta solubilidad, alta capacidad de depresión del punto de congelación y alta presión osmótica. La isomerización enzimática de glucosa para la producción de fructosa empleando glucosa isomerasa inmovilizada es uno de los procesos más utilizados en la producción de edulcorantes. La cinética observada en las enzimas es fuertemente afectada por el método de inmovilización y las configuraciones del reactor elegido. El correcto diseño de procesos de bioconversión dependen de la adecuada elección del reactor, la identificación de los mecanismos que afectan la reacción y el uso de modelos que tomen en cuenta su comportamiento hidrodinámico y los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en su interior, debido a que la cinética global de reacción es controlada por los fenómenos de transporte de masa, los cuales son regulados por la hidrodinámica del proceso. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo modelar matemáticamente la producción de fructosa en lecho fluidificado con la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio, para ello, se evaluó el efecto que ejerce el caudal de flujo y la estabilidad estructural de las perlas de alginato con la enzima inmovilizada sobre la cinética de isomerización de glucosa a fructosa en un reactor de lecho fluidificado. A las 4 h de proceso, se alcanzaron conversiones de 12.3 – 22.1 %, lo cual origina una velocidad de producción de fructosa 4 y 14 veces mayor que en sus análogos reactor de tanque agitado y reactor de lecho fijo, respectivamente. Además, estas mostraron tendencia a aumentar su altura de fluidificación al avanzar el tiempo de uso de la perla hasta llegar a un máximo y

después descender ligeramente, esto, debido a que los cambios estructurales influyen sobre las características de las perlas. En cuanto a lo que se refiere al coeficiente convectivo de transferencia de masa (k_L) y la dispersión axial (D_z) , el primero disminuyó durante los primeros dos usos de cada lote de perlas, mientras que aumentó en el último uso en un rango de 7.60x10⁻⁶ hasta 1.35x10⁻⁵ m s⁻¹, caso contrario a lo ocurrido con el D_z, que aumentó durante los primeros dos usos para disminuir durante el tercero en un rango de 1.2x10⁻⁵ a 4.5x10⁻⁵ m² s⁻¹. El ajuste del modelo matemático generó coeficientes de difusividad efectiva (D_{eff}) y eficiencia residual (η) catalítica en los rangos de 8.36×10^{-12} a 4.04×10^{-11} m² s⁻¹, y de 0.48 a 0.69, respectivamente. Con respecto a la altura y el caudal de fluidificación, la altura de fluidificación del lecho de perlas catalíticas depende del caudal de flujo empleado, ambas, así como del tiempo de vida de las perlas, se encontró que no ejercen efecto sobre la cinética de producción de fructosa, por lo que se infiere que los efectos hidrodinámicos no predominan en las condiciones de operación utilizadas en este proyecto. Finalmente, al analizar la difusividad efectiva y la eficiencia residual catalítica, se encontró que ambas influyen de manera positiva sobre la cinética de conversión. Debido a que estos últimos dos factores ejercen una gran influencia, puede concluirse que los efectos de transferencia de masa intrapartícula y cinéticos juegan un papel importante en la velocidad de conversión del sustrato en producto.

(Palabras clave: Glucosa, Fructosa, Glucosa isomerasa, Alginato de calcio, Fluidificación)

ABSTRACT

Fructose utilization has increased in recent years, replacing sucrose in various industrial applications. The properties that contribute to the success of the industrial applications of fructose are its high solubility, high capacity of its freezing point depression, and high osmotic pressure. Enzymatic isomerization of glucose to produce fructose using immobilized glucose isomerase is one of the most widely used processes in the production of sweeteners. The kinetics observed in enzymes is strongly affected by the immobilization method and the configuration of the chosen reactor. The correct design of the bioconversion processes depends on the appropriate choice of the reactor, the identification of the mechanisms that affect the reaction, and the use of models that take into account its hydrodynamic behavior and the mass transfer phenomena that occur inside, due to the overall reaction kinetics is controlled by mass transport phenomena, which are regulated by the hydrodynamics of the process. Therefore, this work aimed to mathematically model the production of fructose in a fluidized bed with glucose isomerase enzyme which was immobilized in calcium alginate beads; for this purpose, the effect of the flow rate and the structural stability of the alginate beads with the immobilized enzyme on the kinetics of glucose isomerization to fructose in a fluidized bed reactor. At 4 h of processing, conversions of 12.3-22.1 % were reached, which is 4 and 5 times higher than in its analogues stirred tank and fixed bed reactors, respectively. In addition, the beads showed a tendency to increase the fluidization height as time of use progressed until reaching a maximum and then descending slightly; this is because the structural changes influence the properties of the beads. As regards the convective mass transfer coefficient (k_L) and

axial dispersion (D_z) , the first decreased during the first two uses of each batch of beads, while increased in the last use in a range from 7.60x10⁻⁶ to 1.35x10⁻⁵ m s⁻¹, contrary to what happened with D_z , which increased during the first two uses and decreased during the third one in a range from 1.2x10⁻⁵ to 4.5x10⁻⁵ m² s⁻¹. The adjustment of the mathematical model generated effective diffusivity coefficients (D_{eff}) and catalytic residual efficiency (η) in the ranges from 8.36x10⁻¹² to 4.04x10⁻¹¹ m² s⁻¹, and from 0.480 to 0.696, respectively. With respect to the height and the fluidization flow rate, the fluidization height of the bed of catalytic beads depends on the used flow rate, both, as well as on the lifetime of the beads, it was found that they do not exert an effect on the kinetics of fructose production, so it is inferred that the hydrodynamic effects do not predominate in the operating conditions used in this project. Finally, when analyzing the effective diffusivity and the catalytic residual efficiency, it was found that both positively influence on the conversion kinetics. As these last two factors exert a high influence, it can be concluded that the intraparticle mass transfer and kinetic effects play an important role in the rate of conversion of the substrate into product.

(Keywords: Glucose isomerase, Calcium alginate, Fluidification)

II. INTRODUCCIÓN

La fructosa es un monosacárido empleado como edulcorante en la industria alimentaria, su fórmula química es idéntica a la de la glucosa (C₆H₁₂O₆). El consumo de fructosa se ha incrementado en los últimos años y en diversas aplicaciones industriales ha llegado a reemplazar a la sacarosa. Las propiedades que contribuyen al éxito de las aplicaciones industriales de la fructosa son: la alta solubilidad en agua, la tendencia a la cristalización, alta humectación, alta presión osmótica y la alta capacidad de depresión del punto de congelación. La bioconversión enzimática de glucosa a fructosa es una reacción reversible catalizada por la enzima glucosa isomerasa, proceso cuya viabilidad económica se debe en gran medida al uso de la enzima en forma inmovilizada. La enzima glucosa isomerasa se utiliza con frecuencia inmovilizada en alginatos debido a las propiedades gelificantes y no toxicidad de estos polímeros. Actualmente, la producción de fructosa se realiza empleando la enzima inmovilizada en el agente inmovilizante glutaraldehído empacadas en reactores de lecho fijo, mientras que los de lecho fluidificado se emplean con mucha menos frecuencia, siendo estos últimos una alternativa prometedora de nuevas configuraciones de biorreacción que son capaces de favorecer la bioconversión, al mismo tiempo que minimizan el requerimiento energético de las condiciones de proceso. Para el correcto diseño de un sistema para una biocatálisis, además de conocer los parámetros cinéticos, es imprescindible dilucidar el comportamiento hidrodinámico, así como los fenómenos de transferencia de masa que ocurren a nivel molecular, ya que la cinética de reacción está fuertemente influida por los fenómenos de transporte de masa, que a su vez son regulados por las condiciones hidrodinámicas del proceso. En este sentido, esta investigación gira en torno al estudio del efecto de

la hidrodinámica del proceso sobre la producción de fructosa a partir de glucosa empleando glucosa isomerasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio dentro de un sistema de biorreacción de lecho fluidificado.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Fructosa

1. Generalidades

La fructosa es un monosacárido identificado comúnmente como el azúcar de las frutas, su fórmula química es idéntica a la de la glucosa (C₆H₁₂O₆), pero difiere en su conformación espacial (McKee y McKee 2003). La fructosa es un azúcar reductor y, dado que es altamente levorrotatorio, se le designa con el nombre de levulosa. Se puede encontrar principalmente en jugos de diversas frutas y en mieles (Badui Dergal 1993).

La fructosa es considerada como el azúcar natural más dulce, su poder edulcorante, sin embargo, cambia de acuerdo con la formulación, una característica común en todos los edulcorantes, pero puede llegar a ser hasta 1.8 veces más dulce que la sacarosa (**Cuadro 1**) (Lima y col 2011).

2. Importancia económica

El consumo de fructosa se ha incrementado en los últimos años, llegando a reemplazar a la sacarosa en diversas aplicaciones industriales. Usualmente, la fructosa se obtiene por isomerización continua de la glucosa obtenida a partir del almidón de maíz. Sin embargo, debido al aumento del precio de este cereal, actualmente se investigan nuevas fuentes alternativas de almidones que puedan ser utilizadas en la producción de fructosa (Hernández y col 2008).

3. Usos

Además de su dulzura, la fructosa muestra considerable sinergia con varios edulcorantes artificiales de alta intensidad y edulcorantes a granel.

Edulcorante	Poder edulcorante relativo (%)
Fructosa (Forma anomérica cristalina de α- D-fructopiranosa)	180
Fructosa (Solución acuosa 5 – 15 %)	115-125
Jarabe de maíz de alta fructosa	100-130
Jarabe de azúcar invertido	105
Sacarosa (Cristalina)	100
Sacarosa (Solución acuosa 10 %)	100
Glucosa (Cristalina)	74-82
Glucosa (Solución acuosa 10 %)	65
Glucosa (Solución acuosa 50 %)	90-100
Xilitol (Solución acuosa 10 %)	100
Maltosa	50

Cuadro 1. Poder edulcorante de algunos carbohidratos.

Fuente: Lima y col 2011

Algunas de las propiedades que contribuyen al éxito de las aplicaciones industriales de la fructosa son: la alta solubilidad en agua, aproximadamente 4 g de fructosa por gramo de agua a 25 °C; la tendencia a la cristalización, lo que minimiza el endurecimiento en barras nutritivas; la alta humectación, lo que contribuye a la mejora de la vida útil de productos de panadería y similares; la alta presión osmótica; el poder considerable de mejora del sabor; y la alta capacidad de depresión del punto de congelación, lo que ayuda a formular helados adecuados para su consumo en invierno. La incorporación de fructosa en los alimentos también disminuye la actividad de agua, reduciendo así el riesgo de contaminación microbiana sin la eliminación de agua, que podría resultar en la alteración de textura del producto (Lima y col 2011).

La glucosa puede ser isomerizada catalíticamente a fructosa. El rápido crecimiento en la demanda de fructosa se atribuye a varios factores: tiene una dulzura mayor a la ofrecida por la sacarosa, puede ser producida a partir de almidón a un costo menor y tiene la importante ventaja de presentar un menor aporte energético al requerirse en menores cantidades para emular el poder edulcorante de sus análogos (Gaily y col 2010).

B. Producción de fructosa

1. Jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF)

La isomerización de glucosa a fructosa es una reacción reversible catalizada por una enzima isomerasa. Es un proceso industrial muy importante para producir jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF). Para la producción de edulcorantes, el almidón, un polímero de la glucosa, es calentado y procesado con enzimas que hidrolizan el almidón en 98-100 % de jarabe de glucosa. Con el fin de transformar este producto en

jarabes de fructosa, la glucosa se procesa adicionalmente en presencia de la enzima glucosa isomerasa, que convierte la glucosa en su isómero, fructosa. La conversión es de equilibrio limitado y con la tecnología de isomerización enzimática actual, la conversión de glucosa a fructosa es limitada económicamente a 42 % de fructosa (Zang y col 2004). La concentración de fructosa en el jarabe puede ser mejorada mediante la eliminación selectiva de glucosa o mediante la aplicación de métodos de separación cromatográfica de varias etapas (Hultin 1983).

2. Glucosa isomerasa

La fructosa es producida industrialmente como jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS, por sus siglas en inglés). El-Shora y col (2016) estudiaron la actividad de la enzima glucosa isomerasa producida a partir del microorganismo *Bacillus thuringiensis*, partiendo desde el cultivo microbiano hasta la extracción y purificación de la enzima. Se evaluó el efecto de varios factores, sobre la actividad de la enzima. También se reportó la capacidad de la enzima para utilizar D-ribosa, L-ramnosa, L-arabinosa y 2-desoxiglucosa junto a D-glucosa y D-xilosa como sustratos, encontrando como condiciones de temperatura y pH óptimas 50 °C y pH 7, respectivamente.

Blandish y col (2002) estudiaron la conversión de glucosa a fructosa a altas temperaturas (70 a 100 °C) utilizando glucosa isomerasa de *Streptomyces murinus* y dos especies hipertermófilas de *Thermotoga*. Estos autores establecieron que el equilibrio alcanzado durante la conversión enzimática de glucosa a fructosa es favorecido hacia la producción de fructosa a medida que se aumenta la temperatura; así la operación a temperaturas más altas podría potencialmente elevar las concentraciones de fructosa hasta el punto de volver innecesaria la inclusión de una

costosa etapa de enriquecimiento como es la cromatografía. Las mayores actividades enzimáticas fueron encontradas con la glucosa isomerasa proveniente de *Streptomyces murinus* a 80 °C, en presencia de Mg²⁺ y un intervalo de pH de 6.8 a 8.

3. Producción de glucosa isomerasa

Actualmente Novozymes[™] es el principal productor comercial de glucosa isomerasa, quien comercializa la enzima únicamente en forma inmovilizada, específicamente, soportada con el agente reticulante glutaraldehído.

Nwokoro (2015) estudió la producción de glucosa isomerasa utilizando *Bacillus licheniformis* bajo diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de la enzima. La enzima se produjo utilizando diversos sustratos como fuente de carbono, detectándose la mayor expresión de la enzima en un medio que contenía 0.5 % de xilosa y 1 % de glicerol. El pH y temperaturas óptimos de trabajo de la enzima producida fueron de 6.0 y 50 °C, respectivamente.

Por su parte, Lama y col (2001) investigaron la producción, purificación y caracterización de glucosa isomerasa termoestable a partir del cultivo de *Bacillus thermoantarcticus*. Probaron diferentes azúcares como fuentes de carbono y reportaron que la mayor producción de enzima se presentó utilizando xilosa como fuente de carbono. La enzima termoestable producida por *B. thermoantarcticus* mostró mayor estabilidad a temperatura de 90 °C y pH de 7.

La glucosa isomerasa es una enzima producida de manera intracelular, motivo por el que su costo de producción es elevado. Además, se necesitan grandes cantidades de esta enzima para compensar la baja afinidad entre la glucosa y la enzima (alta

constante de Michaelis-Menten para glucosa, K_m), por lo tanto, es imprescindible inmovilizar la enzima para asegurar la viabilidad económica de los altos volúmenes de producción requeridos para aplicaciones industriales. Recientemente se han estudiado y desarrollado diversos métodos de inmovilización de glucosa isomerasa, sin embargo, solo algunos de ellos son económicos, sencillos y adecuados para la producción comercial de jarabes fructosados a gran escala (Tumturk y col 2008).

C. Inmovilización de enzimas

Debido a que las enzimas son un grupo muy diverso de entidades biológicas, no existe ningún método universal para su inmovilización. Los procedimientos para la inmovilización de enzimas tienen que ser desarrollados considerando las características biológicas y fisicoquímicas de la enzima, procurando que después del proceso de inmovilización, la enzima conserve sus niveles de actividad en magnitudes razonables; y para fines operacionales, la matriz inmovilizante conserve su estabilidad y las propiedades de resistencia mecánica y térmica deseadas a largo plazo, lo cual podría facilitar su aplicación a escala industrial (Tumturk y col 2008).

Varias técnicas han sido desarrolladas para la inmovilización de enzimas, incluyendo la adsorción de materiales insolubles, atrapamiento en geles poliméricos, encapsulación en membranas, la reticulación con reactivos bifuncionales o uniones covalentes sobre soportes insolubles. Por lo tanto, la inmovilización puede lograrse de muchas maneras, pero el proceso siempre afecta en cierta medida a la actividad de la enzima. De las técnicas mencionadas, el atrapamiento en geles poliméricos es uno de los métodos más simples de inmovilización y bajo condiciones más suaves, por lo tanto, da lugar a una mínima desnaturalización del biocatalizador durante el proceso.

Esta técnica puede ser definida como la restricción física de la enzima dentro de un espacio confinado o red. La gelificación de los polímeros poli aniónicos o poli catiónicos por la adición de contraiones multivalentes es un método simple y común de atrapamiento de la enzima. Los alginatos son uno de los polímeros utilizados con más frecuencia debido a sus propiedades gelificantes y su no toxicidad. Las enzimas son atrapadas por la adición gota a gota de una solución acuosa que contiene alginato de sodio y el biocatalizador, a una solución de cloruro de calcio. El catión actúa como un agente de reticulación hacia el alginato y las gotas precipitan en forma de perlas con los biocatalizadores atrapados dentro de la red (Tumturk y col 2008).

Por otro lado, la selección del agente inmovilizante también juega un papel primordial en la bioconversión de un sustrato, debido a que debe elegirse aquel que ofrezca adecuada resistencia al corte, resistencia a la degradación térmica, así como presentar una porosidad de partícula que permita aceptables velocidades de difusión de los sustratos y los productos, y cuya síntesis sea de bajo costo.

Jørgensen y col (1988) estudiaron la inmovilización de glucosa isomerasa a partir de una cepa de *Streptomyces murinus* en un reactor tubular de flujo pistón. En el procedimiento de inmovilización utilizaron glutaraldehído como agente reticulante. El reticulado húmedo se extrude axialmente, se secan las partículas y se tamizan. Las principales ventajas de la enzima inmovilizada a partir de esta cepa son: una productividad de más de 10,000 kg de sustancia seca de jarabe por kg de enzima bajo condiciones industriales óptimas, aumento de la actividad y una muy baja formación de subproductos en el jarabe. Se encontró que el contenido de fructosa en el equilibrio

varía desde 50 % de concentración para una temperatura de 55 °C hasta 55.6 % de concentración para temperatura de 90 °C.

Tumturk y col (2008) estudiaron la inmovilización de glucosa isomerasa en perlas de gel de alginato de calcio modificado y sin modificar, evaluaron diversas características de la enzima inmovilizada y libre, tales como pH óptimo, temperatura e influencia de la estabilidad durante el almacenamiento sobre la actividad en un reactor de tanque agitado. Las temperaturas y pH óptimos para la enzima tanto inmovilizada como en su forma libre fueron de 60 °C y pH 7.5, respectivamente. Para la enzima en su forma libre e inmovilizada, los parámetros cinéticos fueron 1.79x10⁻² y 8.27x10⁻³ mol L⁻¹ para K_m y 2.39x10⁻³ y 6.03x10⁻³ mol L⁻¹ min ⁻¹ para V_{max} , respectivamente. Después de 42 días de almacenamiento a 4 °C, la enzima en su forma libre e inmovilizada retuvo 56 % y 86 % de su actividad inicial, respectivamente.

D. Reactores enzimáticos

Más del 80 % del valor comercial de las enzimas está vinculada a sus aplicaciones como catalizadores de un proceso. La forma tradicional del uso de enzimas ha sido mediante reacciones hidrolíticas realizadas con la enzima disuelta en un medio acuoso. Esta tecnología sigue representando una parte importante de los procesos enzimáticos, sin embargo, en las últimas décadas el uso de enzimas en la síntesis orgánica ha ampliado su ámbito de aplicación a niveles sin precedentes (Illanes y Altamirano 2008).

Los reactores enzimáticos pueden operar por lotes o de forma continua, también se ha propuesto la operación de alimentación por lotes (fed-batch) (Kumar y col 1996).

Los procesos por lotes con enzimas (por lo general hidrolasas) disueltas en un medio de reacción acuoso, a pesar de su amplia aplicación tienen varios inconvenientes, ya que las enzimas son poco estables y difíciles de recuperar en tales sistemas, lo que lleva a una baja productividad. Una pobre estabilidad es por lo general el factor limitante en cualquier proceso enzimático, de tal forma que la estabilización de la enzima durante el funcionamiento del reactor es una preocupación importante y entre las muchas estrategias para la estabilización de enzimas, la inmovilización de enzimas es la más relevante (Plou y Ballesteros 1999).

Las enzimas inmovilizadas se pueden utilizar en procesos por lotes, pero en este caso, la enzima puede ser reutilizada en lotes posteriores hasta que la inactivación acumulada hace necesario reemplazar el biocatalizador. Como consecuencia, la productividad específica se incrementa y el diseño del biorreactor se vuelve flexible para adaptarse a las necesidades particulares de un proceso específico. A pesar de las complejidades introducidas por la naturaleza heterogénea del proceso catalítico, las enzimas inmovilizadas son generalmente mucho más estables que sus homólogas solubles, ya que fácilmente pueden ser recuperadas del medio de reacción y reutilizadas. También se evita la contaminación del producto con el biocatalizador y la operación continua se vuelve factible (Katchalsky-Katzir 1993).

El funcionamiento continuo de los reactores enzimáticos está ligado en gran medida a enzimas inmovilizadas, ya que la estabilidad debe ser alta para justificar una operación continua. La excepción notable es el caso de la licuefacción de almidón con α -amilasa bacteriana, donde se utiliza la enzima soluble en la licuefacción continua de almidón de maíz para la elaboración de jarabe alto en fructosa; la enzima se dosifica de forma continua a un reactor tubular en donde se produce la hidrólisis y la gelatinización del almidón de manera simultánea (Linko y col 1975).

En este caso, el precio bajo de la enzima, y, en consecuencia, su poca importancia en el costo de operación permite un uso ineficiente del biocatalizador. Pero en la mayoría de los casos, los procesos continuos se realizan con enzimas inmovilizadas. A pesar de las ventajas de los procesos continuos con enzimas inmovilizadas, la industria se ha mostrado reacia a adoptarlos. La renuencia a modificar los procesos convencionales existentes, los costos asociados al control del proceso, las pérdidas de rendimiento durante la inmovilización y las limitaciones de transferencia de masa durante la operación han impedido un uso más extendido de las enzimas inmovilizadas como biocatalizadores de procesos. Esta situación empezó a cambiar a medida que surgieron nuevos procesos basados en la estabilidad del biocatalizador y se desarrollaron nuevas estrategias de inmovilización de enzimas (D'Souza 1999).

Se han propuesto y usado varias configuraciones de reactor para la realización de procesos catalizados por enzimas, como se muestra en la **Figura 1**. Las operaciones por lotes con enzimas solubles se llevan a cabo principalmente en reactores de tanque agitado, equipados con dispositivos para el mezclado, control de temperatura y pH, pero en contraste, cuando se utilizan enzimas inmovilizadas es necesario incluir un dispositivo para que permita la retención del biocatalizador después de la recuperación del producto al final de cada lote. El sistema más utilizado posee una malla de acero inoxidable, pero existen otras opciones como los reactores de tipo canasta y también retención de biocatalizadores *in-situ* y *ex-situ* en módulos de ultrafiltración. En ocasiones, se han empleado reactores por lotes con recirculación, la enzima es empa-



Figura 1. Distintas configuraciones de reacción con enzimas inmovilizadas. a) por lotes; b) por lotes continuo; c) por lotes con recirculación d) lecho empacado continuo e) lecho fluidificado continuo; f) lecho fluidificado con recirculación. Fuente: Illanes y Altamirano 2008 con modificaciones.

ecada en la forma de un lecho estrecho a través del cual el medio de reacción se hace circular hasta el punto en que la conversión deseada se alcanza. Esta configuración permite un funcionamiento suave cuando la reacción implica la producción o el consumo de protones y la enzima es sensible a la variación de pH. Dado que la conversión por etapas es baja (y controlable a voluntad), lo es también el cambio de pH, el cual es controlado en la cámara de recirculación. De esta manera, la enzima nunca está en contacto directo con el ácido o base utilizado para el control del pH (Illanes y Altamirano 2008). Las opciones existentes para la operación continua con enzimas inmovilizadas son muchas. Los reactores más utilizados son los de columna de lecho empacado (Marrazzo y col 1975), donde la enzima inmovilizada se fija dentro del reactor mientras que la corriente de sustrato pasa a través de este (Vásquez-Bahena y col 2004), sin embargo, estos presentan la desventaja de requerir elevados gradientes de presión para la óptima circulación del fluido debido a la baja porosidad del lecho. El uso de reactores de lecho fijo está muy extendido tanto en la producción de fructosa empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en glutaraldehído como en otras áreas industriales (obtención de SO₃ por el método Phillips, obtención de amoníaco, craqueo con vapor, etc.), mientras que los de lecho fluidificado se emplean con mucha menos frecuencia (Iborra y col 2013), siendo estos últimos una alternativa prometedora de nuevas configuraciones de biorreacción que son capaces de favorecer la bioconversión al mismo tiempo que minimizan el requerimiento energético de las condiciones de proceso (Ching y Chu 1988). Los factores para tener en cuenta al decidir entre uno u otro sistema de biorreacción son: el contacto sólidofluido, el control de temperatura, el tamaño de partícula a emplear (ligado íntimamente con la pérdida de presión permisible) y la manera de afrontar el problema de la

regeneración si el catalizador sufre desactivación rápida. El **Cuadro 2** muestra la comparación entre los reactores de lecho fijo y fluidificado atendiendo los factores mencionados (Iborra y col 2013; Illanes y Altamirano 2008).

Las principales ventajas de la fluidización consisten en que el sólido está vigorosamente agitado por el fluido que circula a través del lecho y la mezcla de los sólidos asegura que prácticamente no existan gradientes de temperatura en el lecho aun con reacciones fuertemente exotérmicas o endotérmicas. El movimiento de los sólidos también da lugar a elevadas velocidades de transmisión de calor y difusión hacia la pared o los tubos de refrigeración sumergidos en el lecho. Además de esto, debido al comportamiento fluidificado de las partículas sólidas, los reactores de lecho fluidificado presentan un mezclado más uniforme que el reactor de lecho fijo. Los gradientes de concentración axial y radial disminuyen permitiendo un mejor contacto entre el líquido y sólido mejorando la eficiencia en los procesos (Flores-Cortés y Posada-Noreña 2009).

El fenómeno de la fluidización se da a partir del flujo de un fluido (líquido, gas o ambos) a través de un lecho compuesto por partículas sólidas, a medida que el flujo se incrementa las partículas son elevadas levemente y dejan de estar en permanente contacto unas con otras, logrando un efecto final de mezcla donde se favorece el contacto entre las fases presentes, generando en el sistema alta conversión y eficiencia (Flores-Cortés y Posada-Noreña 2009). Cuando los fluidos ingresan al reactor, las partículas presentan una leve expansión, la velocidad del fluido a la cual se llega a este fenómeno se conoce como Velocidad Mínima de Fluidización (U_{mf})

	Lecho fijo	Lecho fluidificado	
		Flujo fluido complejo	
Modelo de flujo- contacto	Flujo del fluido próximo a flujo en pistón por lo que la eficacia del contacto es elevada	Si el fluido es un gas se forman burbujas grandes (cortocircuito o bypass) por lo que la eficacia del contacto es baja	
Control de temperatura	Formación zonas calientes, con desarrollo de ΔT* radial y axial.	Control fácil. ΔT*≈0	
Pérdida de presión/ Tamaño de partícula	La pérdida de presión es elevada al usar <i>d</i> _p * pequeños para reducir la influencia de la transferencia interna de materia (TIM)	Se pueden usar <i>d</i> _p * pequeños. La eficacia de partícula es elevada, y la pérdida de presión reducida.	
Desactivación- regeneración	Para solucionar los problemas por desactivación, el reactor se sobredimensiona y el catalizador se cambia en las paradas	Permite la extracción fácil del catalizador sin parar la unidad	
* d_{ρ} es diámetro de partículas, ΔT es diferencial de temperatura.			

Cuadro 2. Comparación de los reactores de lecho fijo y fluidificado

Fuente: Iborra y col 2013

A partir de este punto la masa de sólido y fluido, presenta las características de flujo de un líquido. A medida que la velocidad del fluido se incrementa más allá de la velocidad mínima de fluidización, el lecho continúa expandiéndose y se mantiene homogéneo por un tiempo (Couper y col 2005).

El correcto modelado matemático respecto a fenómenos de transferencia de masa de un reactor de lecho fluidificado requiere del previo conocimiento de propiedades del lecho como son la porosidad, el coeficiente de transferencia de masa convectivo y el coeficiente de dispersión axial. Extensas investigaciones de carácter experimental han sido realizadas con respecto a la evaluación de dichas propiedades.

Para el diseño de un sistema de biorreacción no es suficiente con conocer los parámetros cinéticos, también es necesario conocer su comportamiento hidrodinámico y los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en su interior (Cabral y col 1995), debido a que la cinética de reacción depende fuertemente de los fenómenos de transporte de masa, mismos que son regulados por la hidrodinámica del proceso. Por tanto, este trabajo se centra en el estudio del efecto del comportamiento hidrodinámico sobre la bioconversión de glucosa a fructosa por la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio dentro de un sistema de biorreacción de lecho fluidificado.

E. Descripción matemática

1. Mecanismo cinético

La transformación enzimática de α -D-glucosa a β -D-fructosa es típicamente representada por la siguiente ecuación química:

$$\alpha - D - \text{glucosa} \stackrel{\alpha - \text{glucosa}}{\rightleftharpoons} \beta - D - \text{fructosa}$$
(1)

Diversos estudios enfocados en establecer el comportamiento cinético de la isomerización de α -D-glucosa a β -D-fructosa han sido realizados; siendo el mecanismo Briggs-Haldane el más ampliamente utilizado (Chen y Wu 1987; Roels 1983):

$$G + E \xleftarrow[k_1]{k_1} X \xleftarrow[k_2]{k_2} F + E$$
(2)

donde *E* es la enzima libre activa, G es glucosa, *F* es fructosa y *X* es el complejo intermediario entre la enzima y la glucosa (*GE*) o fructosa (*EF*), respectivamente. Aquí, k_1 , k_2 y k_2 corresponden a las constantes de velocidad de las reacciones intermediarias. Aplicando la hipótesis del estado cuasi-estacionario, la técnica de Briggs-Haldane conduce a la siguiente cinética tipo Michaelis-Menten (Lee y col 1976):

$$-r_{i}' = \frac{V_{m}(c_{i} - c_{i,eq})}{K_{m} + (c_{i} - c_{i,eq})}$$
(3)

donde $-r_i$ es la velocidad de reacción de consumo de glucosa (i = 1) o producción de fructosa (i = 2) por unidad másica de enzima, c_i es la concentración de glucosa/fructosa, $c_{i,eq}$ es la concentración de glucosa/fructosa en equilibrio, la cual es obtenida de:

$$c_{1,eq} = \frac{\sum c_{i,0}}{1 + K_{eq}}$$
(4)

donde K_{eq} es la constante de equilibrio, la cual es definida como

$$K_{eq} = \frac{V_{mf}K_{mr}}{V_{mr}K_{mf}}$$
(5)

Los parámetros V_m y K_m , que aparecen en la Ec. (3), son parámetros análogos a la velocidad máxima de reacción y constante de afinidad de Michaelis-Menten para la isomerización y están dadas por

$$V_m = \frac{V_{mf}K_{mr}}{K_{mr} - K_{mf}} \left(1 + \frac{1}{K_{eq}}\right) \tag{6}$$

$$K_m = \frac{K_{mf}K_{mr}}{K_{mr} - K_{mf}} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{mf}} + \frac{K_{eq}}{K_{mr}}\right) \frac{c_{1,0} + c_{2,0}}{1 + K_{eq}} \right]$$
(7)

donde V_{mf} , V_{mr} , K_{mf} y K_{mr} son: la velocidad de reacción máxima de conversión de glucosa a fructosa, la velocidad de reacción máxima de la conversión de fructosa a glucosa, la constante de afinidad de Michaelis-Menten de la conversión de glucosa a fructosa y la constante de afinidad de Michaelis-Menten de la conversión de fructosa a glucosa, respectivamente, y son definidas como:

$$V_{mf} = k_2[E]_{total}; \quad K_{mf} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad V_{mr} = k_{-1}[E]_{total}; \quad K_{mr} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}$$
 (8)

donde, $[E]_{total}$ es la concentración total de enzima.

Los valores de dichas constantes de reacción ya han sido reportados por Carrazco-Escalante (2019), como resultado de la investigación realizada sobre la producción de fructosa mediante la enzima glucosa isomerasa libre en tanque agitado, mismas que se muestran en el (**Cuadro 3**).

2. Modelo del reactor

Т (°С)	<i>k</i> ₁ (L g⁻¹ min⁻¹)	<i>k</i> ₂ (mol min⁻¹ L⁻¹)	<i>k</i> ₋₁ (mol min ⁻¹ L ⁻¹)	<i>k</i> ₋₂ (L g⁻¹ min⁻¹)
55	1.70x10 ⁻³	1.90x10 ⁻³	2.56x10 ⁻⁴	2.80x10 ⁻³
60	2.30x10 ⁻³	2.20x10 ⁻³	2.19x10 ⁻⁴	2.20x10 ⁻³
65	2.90x10 ⁻³	2.30Ex10 ⁻³	7.01x10 ⁻⁹	1.70x10 ⁻³
70	3.40x10 ⁻³	4.40x10 ⁻³	1.88x10 ⁻⁶	3.30x10 ⁻³

Cuadro 3. Parámetros cinéticos ajustados a diferentes temperaturas

Fuente: Carrazco-Escalante 2019

a. Partícula catalítica

La distribución de concentración del sustrato en estado transitorio para la partícula catalítica porosa de geometría esférica es representada por la siguiente ecuación diferencial (Fogler 2005):

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \varepsilon_p \rho_p \eta r_i^{'}$$
(9)

sujeta a las condiciones de frontera

$$r = 0 \qquad -D_{eff} \frac{dc_i}{dr} = 0 \tag{10}$$

$$r = r_p - D_{eff} \frac{dc_i}{dr} = k_L (c_i - C_i)$$
(11)

y a la condición inicial

$$t = 0 \quad c_i = c_{i,0}$$
 (12)

donde c_i es la concentración de glucosa/fructosa dentro de la partícula, D_{eff} es el coeficiente de difusividad efectiva del sustrato en el interior de la partícula, ε_p es la porosidad, ρ_p es la densidad de la partícula, r_p es el radio de la partícula, k_L es el coeficiente de transferencia de masa de la película de la fase fluida adyacente a la partícula, η es eficiencia residual catalítica, es decir la fracción de masa equivalente de enzima inmovilizada (activa y disponible) en la estructura porosa por unidad de masa de perla, y C_i es la concentración de bulto del sustrato en la fase fluida que rodea a la partícula. En la investigación de Carrazco-Escalante (2019), se determinaron experimentalmente los parámetros D_{eff} , ε_p y ρ_p para glucosa isomerasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio con un radio de 1.5 mm a diferentes concentraciones de enzima (5, 7.5, 10 g de enzima L⁻¹ de alginato de calcio 2 % p/v) (**Cuadro 4**).

	D _{eff} ×10 ¹⁰ (m ² s ⁻¹)		
Concentración de enzima en perlas (g L-1)	oncentración de enzima en perlas (g L ⁻¹) [S] (mol L		
	0.55	0.83	1.11
5	4	3	2.89
7.5	4.52	4.15	3.63
10	5.64	4.82	4.51

Cuadro 4. Difusividad efectiva de las perlas catalíticas

Fuente: Carrazco-Escalante 2019

Nota: La concentración de enzima en perlas tiene valores en g de enzima L^{-1} de solución de alginato 2 % p/v.

a. Reactor de lecho empacado

La distribución de concentración del sustrato en la fase fluida para un reactor flujo pistón con dispersión axial puede ser representada por la siguiente ecuación diferencial (Fogler 2005):

$$\varepsilon_{b} - \frac{\partial C_{i}}{\partial t} = D_{z} \frac{\partial^{2} C_{i}}{\partial z^{2}} - U_{s} \frac{\partial C_{i}}{\partial z} + (1 - \varepsilon_{b}) k_{L} \hat{a}_{p} (c_{s,i} - C_{i})$$
(13)

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$z = 0 t > 0 - D_z \frac{\partial C_i}{\partial z} + C_i U_s = C_{feed,i} U_s (14)$$

$$z = L t > 0 \frac{dC_i}{dz} = 0 (15)$$

y a la condición inicial:

$$0 \le z \le L$$
 $t = 0$ $C_i = C_{i,0}$ (16)

donde C_i es la concentración de la especie *i* en la fase fluida del lecho empacado, D_z es el coeficiente de dispersión axial con base en la velocidad superficial U_s , k_L es el coeficiente de transferencia de masa convectivo, $c_{s,i}$ es la concentración de la especie *i* en la superficie de la partícula y $C_{feed,i}$ es la concentración de la especie *i* alimentada al reactor.

La condición de frontera expresada por la ecuación (15) representa la ausencia de un gradiente de concentración de sustrato a la salida del reactor debido a la escasez de la fuerza motriz de reacción, aun cuando la concentración de sustrato a la salida del reactor es diferente de cero (Asif y Abasaeed 1998).
En cuanto al modelo de la partícula biocatalítica, su expresión basada en la velocidad de reacción en la fase fluida adyacente a las partículas catalíticas está dada por:

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \frac{\eta}{1 - \varepsilon_b} \boldsymbol{r}_i$$
(17)

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$r = 0$$
 $t > 0$ $\frac{\partial c_i}{\partial r} = 0;$ (18)

$$r = r_p$$
 $t > 0$ $-D_{eff} \frac{dc_i}{dr} = k_L(c_i - C_i)$ (19)

y a la condición inicial:

$$0 \le r \le r_p$$
 $t = 0$ $c_i = c_{i,0}$; $C_i = C_{i,0}$ (20)

b. Propiedades físicas de lecho empacado y fluidificado

El modelado matemático de un reactor de lecho empacado o fluidificado requiere del previo conocimiento de propiedades del lecho como son la porosidad, el coeficiente de transferencia de masa para una partícula y el coeficiente de dispersión. Extensas investigaciones de carácter experimental se han realizado con respecto a la evaluación de dichas propiedades y han servido para fundamentar un conjunto de relaciones teóricas que a continuación son presentadas. En esta investigación, el resto de las propiedades, salvo la porosidad, no fueron evaluadas experimentalmente sino mediante correlaciones fenomenológicas.

1) Porosidad

La porosidad de la cama empacada del biorreactor conformado por partículas esféricas ha sido ampliamente estudiada, siendo una correlación frecuentemente utilizada, aquella establecida por Ribeiro y col (2010), la cual está expresada como:

$$\varepsilon = 0.373 + 0.917 \exp\left(-0.824 \frac{d_t}{d_p}\right) \qquad 2 \le \frac{d_t}{d_p} \le 19$$
 (21)

donde d_t es el diámetro del biorreactor (tubo) y d_p es el diámetro de la partícula catalítica.

2) Coeficiente de transferencia de masa

La correlación para una cama empacada propuesta por Wilson y Geankoplis (1966) está dada por:

$$j_m = \frac{1.09}{\varepsilon_b} \operatorname{Re}^{-2/3} \tag{22}$$

aquí *Re* es el número adimensional de Reynolds y j_m es el coeficiente de transferencia de masa de Colburn, que es un número adimensional resultante de la agrupación de otros parámetros adimensionales y está definido mediante la siguiente expresión:

$$j_m = \frac{\mathrm{Sh}}{\mathrm{Re}\,\mathrm{Sc}^{1/3}} \tag{23}$$

donde Sc y Sh son los números adimensionales de Schmidt y Sherwood. Los tres términos de esta expresión están definidos como:

$$\operatorname{Re} = \frac{\rho U_s d_p}{\mu} \tag{24}$$

$$Sc = \frac{\frac{\mu}{\rho}}{D_{AB}}$$
(25)

$$Sh = \frac{k_L d_p}{D_{AB}}$$
(26)

donde ρ y μ son la densidad y la viscosidad de la fase fluida, respectivamente, D_{AB} es el coeficiente de difusión molecular del sustrato en la fase fluida, U_s es la velocidad superficial, d_p es el diámetro de la partícula y k_L es el coeficiente convectivo de transferencia de masa.

3) Coeficiente de dispersión axial

Es necesario indicar que los sistemas continuos con enzimas inmovilizadas operan a regímenes de flujos bajos y, por tanto, la transferencia de masa por el mecanismo de dispersión (en reactores heterogéneos típicamente es denominada de esta manera a la difusión) y la convección en la fase fluida deben ser considerados con la misma importancia. La relación de ambos mecanismos de transporte se expresa a través del número de Peclet. El coeficiente de dispersión axial en la bioconversión de glucosa a fructosa ya fue abordado y reportado por Chung y Wen (1968), quienes bajo las condiciones de estudio elegidas en su investigación, establecieron la siguiente correlación basada en el número de Peclet:

$$\frac{1}{\text{Pe}_z} = \frac{\varepsilon_b \text{Re}}{0.2 + 0.011 Re^{0.48}}$$
(27)

donde Pe_z es el número de Peclet y está definido por la siguiente ecuación:

$$\operatorname{Pe}_{z} = \frac{U_{s}d_{p}}{D_{z}}$$
(28)

donde D_z es el coeficiente de dispersión axial del sustrato en la fase fluida de biorreacción.

Resulta evidente que el modelado adecuado de la bioconversión enzimática de glucosa a fructosa utilizando un sistema inmovilizado involucra la integración de diferentes teorías de transporte con un mecanismo cinético. Debido a ello, es necesario especificar:

a. El mecanismo cinético con parámetros independientes a los fenómenos convectivos y/o difusionales para la conversión de sustrato.

b. La transferencia de masa intra-partícula considerando la reacción química y difusión del sustrato.

c. La transferencia de masa extra-partícula considerando la dispersión del sustrato y la transferencia de masa convectiva partícula-fase fluida.

c. Reactor de lecho fluidificado

La distribución de concentración del sustrato en la fase fluida en estado transitorio para un reactor flujo pistón con dispersión axial puede ser representada por la siguiente ecuación diferencial (Fogler 2005):

$$\varepsilon \frac{\partial C_i}{\partial t} = -U_s \frac{dC_i}{dz} + \varepsilon D_z \frac{d^2 C_i}{dz^2} + k_L a_p (1 - \varepsilon) (c_i|_{r=R} - C_i)$$
(28)

sujetas a las condiciones de frontera de Danckwerts

$$z = 0 \qquad -\varepsilon D_z \frac{dC_i}{dz} + U_s C_i = C_{i,in}$$
(29)

$$z = L \qquad -D_z \frac{dC_i}{dz} = 0 \tag{30}$$

y a la condición inicial

$$t = 0, \qquad C_i = C_{i,0}$$
 (31)

donde C_i es la concentración de sustrato en la fase fluida en la posición *z*, U_s es la velocidad superficial de la fase fluida, $\varepsilon = \varepsilon(z)$ es el perfil de porosidad de la cama del reactor, D_z es el coeficiente de dispersión axial, *L* es la longitud de la cama del reactor, a_p es el área específica de las partículas, y $C_{i,0}$ y $C_{i,in}$ son la concentración de sustrato inicial y en la alimentación.

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una tendencia de aumento en el consumo de fructosa por parte de la industria alimentaria debido a su alto poder edulcorante. La materia prima principal utilizada para su producción industrial es el jarabe maíz, el cual es bioconvertido en jarabe de maíz de alta fructosa mediante la isomerización de glucosa a fructosa empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en glutaraldehído, sin embargo, debido a la baja resistencia al esfuerzo de cizalla que ofrece este agente inmovilizante, su uso está limitado a reactores continuos de lecho empacado, los cuales presentan el inconveniente de requerir elevados gradientes de presión para la circulación del jarabe de maíz a través del lecho empacado, debido a su baja porosidad; por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas configuraciones de biorreacción que favorezcan no únicamente la productividad de fructosa, sino también a las variables de operación como lo es el requerimiento energético del sistema de bombeo, objetivo que puede ser alcanzado mediante el uso de reactores de lecho fluidificado. Así, se plantea el uso del agente inmovilizante alginato de calcio, que ofrece una buena resistencia al esfuerzo de cizalla y a la degradación térmica, así como un adecuado tamaño de poro intrapartícula, además de su no toxicidad y bajo costo. Al momento de querer diseñar o modelar un sistema de biorreacción es necesario conocer los parámetros cinéticos, el comportamiento hidrodinámico y los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en su interior, debido a que la cinética de reacción depende fuertemente de los fenómenos de transporte de masa, mismos que son regulados por la hidrodinámica del proceso. Este estudio se realizó bajo una perspectiva ingenieril, es decir, se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos a través de una experimentación de tipo causa-efecto para desarrollar y

ajustar un modelo matemático en donde se consideran los fenómenos microscópicos de transporte y reacción que afectan la productividad de la biorreacción, permitiendo un entendimiento del proceso de biocatálisis para servir como herramienta en la mejora el diseño del sistema de bioconversión. En este sentido, en esta investigación se realizaron bioconversiones de glucosa a fructosa empleando perlas catalíticas de glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio a diferentes caudales de flujo empleando un sistema de reacción tubular de lecho fluidificado para el posterior estudio del efecto del comportamiento hidrodinámico sobre la bioconversión.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Desarrollar y validar un modelo matemático a partir de las cinéticas de bioproducción de fructosa capaz de predecir la velocidad de bioconversión para comprender la influencia de los fenómenos cinéticos, hidrodinámicos y de transferencia de masa en la eficiencia del proceso empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio.

B. Objetivos Específicos

- Inmovilizar la enzima glucosa isomerasa en alginato de calcio y evaluar las propiedades de las perlas catalíticas generadas.
- Determinar la conversión enzimática de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en un sistema de biorreacción de lecho fluidificado con recirculación.
- Desarrollar un modelo matemático capaz de predecir la producción de fructosa a partir de glucosa considerando los mecanismos cinéticos, de transferencia de masa y los efectos difusivos en las fases fluida y sólida en un reactor de lecho fluidificado.
- Validar el modelo matemático obtenido a partir de los datos experimentales obtenidos de las bioconversiones de glucosa a fructosa empleando un reactor de lecho fluidificado.
- Evaluar el efecto que ejercen los parámetros de proceso sobre las cinéticas de producción de fructosa mediante simulaciones del modelo matemático desarrollado.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

1. Reactivos

Los reactivos utilizados se adquirieron en la empresa Sigma-Aldrich: glucosa isomerasa (EC 5.3.1.5), glucosa (C₆H₁₂O₆), fructosa, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄•7H₂O), sulfito de sodio (Na₂SO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), alginato de sodio (C₆H₇O₆Na), cloruro de calcio (CaCl₂) y cloruro de sodio (NaCl).

2. Sistema de biorreacción de lecho fluidificado

Se utilizó un reactor de lecho fluidificado que consiste de un tubo cilíndrico de vidrio de borosilicato con diámetro interno y longitud de 4 y 76 cm, respectivamente, que posee una chaqueta que se utiliza para controlar la temperatura de interés mediante agua caliente. En el interior se lleva a cabo la biocatálisis de conversión de glucosa a fructosa al entrar en contacto la enzima inmovilizada y la corriente de la solución del sustrato. La fluidificación de la cama de perlas biocatalíticas se logró bombeando la solución de glucosa con una bomba de 15 W a través del cilindro interno del reactor. Debido a que el tiempo de residencia del sistema de biorreacción es bajo, el equipo experimental contó con un depósito de recirculación, el cual contiene la solución inicial de glucosa, misma que fue bombeada a la columna para posteriormente ser retornada al depósito de recirculación (**Figura 2**).

3. Equipo polarímetro-refractómetro

Este quipo además de calcular el ángulo de rotación y los grados Brix, también convierte y muestra la cantidad de fructosa (%) presente en un jarabe de maíz alto en fructosa. El principio de operación de este equipo es el siguiente: se hace pasar un haz de luz a través de una placa polarizante, para posteriormente pasar por la muestra.



Figura 2 Esquema del sistema de biorreacción en lecho fluidificado. Se muestran los componentes básicos del montaje: a) reactor tubular con chaqueta b) depósito de recirculación de solución de glucosa c) bomba para caudal de flujo d) bomba para chaqueta de calentamiento e) baño de agua a la temperatura de interés f) válvula antirretorno (check) g) caudalímetro h) válvula reguladora de caudal de flujo i) válvula reguladora de recirculación j) altura de la cama de perlas catalíticas k) flujo de agua a la temperatura de interés.

Inicialmente se utiliza agua desionizada ya que no desvía la luz y se establece como cero de referencia. Posteriormente se aplica la medición a la muestra y la luz sufre una desviación, si se coloca otra placa polarizante al final en el mismo ángulo que la inicial el sensor no será capaz de captar la señal de luz, por lo que esta placa tiene que rotar cierto ángulo para que la luz pase a través de ella y pueda ser detectada por el sensor. Este equipo puede detectar fructosa por sobre glucosa y sacarosa, ya que poseen ángulos de rotación específicos, la fructosa es levógira y la glucosa es dextrógira.

B. MÉTODOS

1. Inmovilización de glucosa isomerasa

Para el procedimiento de inmovilización de la enzima en perlas de alginato de calcio, se utilizó la metodología reportada por Tumturk y col. (2008). Se añadieron 2.5 g de glucosa isomerasa soluble a una solución de alginato de sodio (175 mL, 2 % p/v), se agitó suavemente y luego se agregó gota a gota esta mezcla a una solución de CaCl₂ (0.3 M). Las perlas biocatalíticas formadas se mantuvieron en una solución diluida de CaCl₂ (0.03 M) durante 1 día a 4 °C. Se almacenaron a 4 °C (**Figura 3**). El diámetro de las perlas se determinó mediante el uso de un estereoscopio (Motic, SMZ, EUA).

El proceso de inmovilización de la enzima por goteo por gravedad, aunque efectivo y simple en fundamento, en la práctica supuso una serie de retos y dificultades, entre las que destacan la sedimentación de las partículas pulverizadas de los extrudidos del reticulante hacia el cuello del embudo del sistema de inmovilización. Esto, además de



Figura 3 Montaje del sistema de inmovilización

generar una ligera variabilidad implícita de la concentración de enzima en las perlas, provocaba la obstrucción en la válvula y punta del sistema de inmovilización, que a su vez ocasionaba la necesidad de aumentar el porcentaje de apertura de la válvula para liberar dicha obstrucción.

2. Estudio del efecto del caudal sobre la producción de fructosa

Las perlas de alginato de calcio con glucosa isomerasa (2.5 g de enzima en 175 mL de alginato al 2 % p/v) del mismo diámetro se colocaron dentro del reactor. La temperatura del depósito fue controlada mediante agua a 70 °C bombeado a través del enchaquetado del reactor. Se tomaron periódicamente muestras del depósito de recirculación con la finalidad de cuantificar el contenido de glucosa y fructosa y así establecer el avance de la reacción. La cuantificación de fructosa se realizó mediante un equipo refractómetro-polarímetro (Atago, Re-Po 2, EUA) que determina la cantidad de fructosa (%) presente en una solución de glucosa-fructosa. El caudal se monitoreó mediante un sensor de flujo de agua de efecto Hall (Sea, YF-S104, EUA) y una placa electrónica (Arduino, UNO R3, EUA) programada para registrar el flujo volumétrico de la solución de sustrato a través de la cama de perlas catalíticas.

3. Estudio del coeficiente de transferencia de masa convectivo

Para alcanzar este propósito se utilizaron los datos de conversión de sustrato obtenidos para cada unidad experimental, los cuales se ajustaron al modelo matemático, mediante la optimización del coeficiente de transferencia de masa convectivo (k_L).

4. Cuantificación y registro de caudal de fluidificación

Para la medición del caudal de fluidificación, se utilizó un sistema compuesto de una placa electrónica Arduino Uno R3, conectada a un sensor de flujo de agua de



Figura 4 Diagrama del sistema de medición y registro de caudal

efecto Hall (Sea, YF-S104, EUA), un sensor de temperatura DS18B20 sumergible y una pantalla LCD 16x2 acoplada con módulo de comunicación I2C (**Figura 4**).

5. Modelado matemático

a. Modelo del lecho fluidificado

La distribución de concentración del sustrato en la fase fluida para un reactor flujo pistón con dispersión axial puede ser representada por la siguiente ecuación diferencial (Fogler 2005) para un lecho fluidificado, con una distribución homogénea de perlas, puede ser expresado de manera similar a la de un lecho fijo, con la diferencia que la altura del lecho *L*, la porosidad del lecho ε_b , el coeficiente de transferencia de masa k_L , y el coeficiente de dispersión D_z son dependientes del tiempo, esto es:

$$\varepsilon_b \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_z \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} - U_s \frac{\partial c_i}{\partial z} + (1 - \varepsilon_b) k_L \hat{a}_p (c_{s,i} - C_i)$$
(32)

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$z = 0 t > 0 - D_z \frac{\partial C_i}{\partial z} + C_i U_s = C_{feed,i} U_s (33)$$

$$z = L \quad t > 0 \qquad \frac{dC_i}{dz} = 0 \tag{34}$$

y a la condición inicial:

$$0 \le z \le L$$
 $t = 0$ $C_i = C_{i,0}$ (35)

Adimensionalizando el sistema anterior mediante: $\bar{z} = \frac{z}{L}$, $\bar{t} = \left(\frac{U_s}{L}\right)t$, y $\bar{C}_i = \frac{C_i}{c^*}$ y $\bar{c}_i = \frac{c_i}{c^*}$ donde c^* es una concentración de referencia, y $Pe_z = \frac{U_s L_0^{--}}{D_{z,0^{--}}}$ y $\alpha = \frac{k_L \hat{a}_p L_0^{--}}{U_s}$.

$$\varepsilon_b \gamma \frac{\partial \bar{c}_i}{\partial \bar{t}} = \frac{1}{P e_z} \frac{\beta_D}{\beta_c} \frac{\partial^2 \bar{c}_i}{\partial \bar{z}^2} - \frac{\partial \bar{c}_i}{\partial \bar{z}} + (1 - \varepsilon_b) \alpha \beta_c (\bar{c}_{s,i} - \bar{C}_i)$$
(36)

Donde los términos β_c y β_D hacen referencia a la relación de las alturas de lecho fluidificado y fijo, y la relación del coeficiente de dispersión axial para lecho fluidificado y fijo, respectivamente, es decir $\beta_c = \frac{L}{L_0^-}$ y $\beta_D = \frac{D_Z}{D_{Z,0^-}}$.

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$\bar{z} = 0 \qquad \bar{t} > 0 \qquad -\frac{1}{\operatorname{Pe}_{z}}\frac{\beta_{D}}{\beta_{c}}\frac{\partial\bar{c}_{i}}{\partial\bar{z}} + \bar{C}_{i} = \bar{C}_{feed,i}$$
(37)

$$\bar{z} = 1$$
 $\bar{t} > 0$ $\frac{d\tilde{c}_i}{d\bar{z}} = 0$ (38)

y a la condición inicial:

$$0 \le \bar{z} \le 1$$
 $\bar{t} = 0$ $\bar{C}_i = \frac{C_{i,0}}{c^*}$ (39)

Nótese que fue necesario aplicar la regla de la cadena bajo la siguiente forma

$$\frac{\partial \bar{C}_i}{\partial t} = \frac{\partial \bar{C}_i}{\partial \bar{t}} \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{U_s t}{L} \right) = \frac{U_s}{L} \frac{\partial \bar{C}_i}{\partial \bar{t}} \left(1 - \frac{t}{L} \frac{dL}{dt} \right) = \frac{U_s}{L} \frac{\partial \bar{C}_i}{\partial \bar{t}} \left(1 - \frac{U_c}{U_s} \bar{t} \right)$$
(40)

Y la definición

$$\gamma = 1 - \frac{u_c}{u_s} \bar{t} \tag{41}$$

Para el caso de una expansión de lecho exponencial, esto es $L = L_{\infty} + (L_{0^+} - L_{\infty})e^{-\kappa t}$ es posible expresar que la velocidad lineal de la expansión de la cama está dada por

$$U_c = \frac{dL}{dt} = -\kappa (L_{0^+} - L_{\infty})e^{-\kappa t}$$
(42)

b. Modelo de la perla catalítica

En cuanto al modelo de la partícula biocatalítica, su expresión basada en la velocidad de reacción en la fase fluida adyacente a las partículas catalíticas está dada por:

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \frac{\eta}{1 - \varepsilon_b} \boldsymbol{r}_i$$
(43)

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$r = 0$$
 $t > 0$ $\frac{\partial c_i}{\partial r} = 0;$ (44)

$$r = r_p$$
 $t > 0$ $- D_{eff} \frac{dc_i}{dr} = k_L (c_i - C_i)$ (45)

y a la condición inicial:

$$0 \le r \le r_p$$
 $t = 0$ $c_i = c_{i,0}$ (46)

Adimensionalizando el sistema anterior mediante: $\bar{r} = \frac{r}{R}$ y $\bar{r}_i = \frac{r_i}{V_{mf}}$, e incluyendo las

variables adimensionales definidas anteriormente, se tiene que:

$$\varepsilon_p \gamma \frac{\partial \bar{c}_i}{\partial \bar{t}} = \frac{\beta_c \varphi_L}{\mathsf{Pe}_r} \left(\frac{\partial^2 \bar{c}_i}{\partial \bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}} \frac{\partial \bar{c}_i}{\partial \bar{r}} \right) + \frac{\beta_c \eta}{1 - \varepsilon_b} D\bar{a} \, \boldsymbol{r}_i \tag{47}$$

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$\bar{r} = 0 \qquad \bar{t} > 0 \qquad \frac{\partial \bar{c}_i}{\partial \bar{r}} = 0;$$
(48)

$$\bar{r} = 1$$
 $\bar{t} > 0$ $\frac{d\bar{c}_i}{d\bar{r}} = -\operatorname{Bi}_m(\bar{c}_i - \bar{C}_i)$ (49)

y a la condición inicial:

$$0 \le \bar{r} \le 1$$
 $\bar{t} = 0$ $\bar{c}_i = \bar{c}_{i,0}$ (50)

donde $\varphi_L = \frac{L_0^-}{R}$, $\operatorname{Bi}_m = \frac{k_L R}{D_{eff}}$ es el Biot de masa, $Da = \frac{V_{mf}L_0^-}{U_S c^*}$ es el número de Damköhler, y $\operatorname{Pe}_r = \frac{U_S R}{D_{eff}}$ es el número de Peclet relacionado a la partícula biocatalitica. Debido a la naturaleza intrínseca de las perlas de alginato de calcio, que desprendían pequeños fragmentos de la enzima en el agente glutaraldehído, fue necesario realizar un ajuste de la eficiencia residual catalítica η considerando un factor de decaimiento de la eficiencia que están relacionados mediante la siguiente expresión:

$$\eta = \eta_0 e^{-\kappa_\eta t} \tag{51}$$

Donde κ_{η} es el factor de decaimiento de la eficiencia residual catalítica, derivado del lavado de las partículas de la enzima de las perlas de alginato de calcio, posiblemente debido a los daños estructurales causados por el proceso mismo de fluidificación. Por otro lado, la configuración del reactor es con recirculación total utilizando un depósito con mezcla perfecta, por tanto, aplicando el balance de materia en dicho depósito se tiene que:

$$V_{\infty} \frac{dC_{\infty,i}}{dt} = C_{i,out} S_c U_s - C_{\infty,i} S_c U_s$$
(52)

Sujeta a la condición inicial:

$$t = 0 \qquad C_{\infty,i} = C_{i,0} \tag{53}$$

donde V_{∞} es el volumen del depósito de recirculación, $C_{\infty,i}$ es la concetración de la especie *i* en el depósito, $C_{i,out}$ es la concentración de la especie *i* de salida del lecho fluidificado, y también es la concentración de la especie *i* alimentada en el depósito. Aquí es necesario precisar que:

$$C_{i,out} = C_i(z = L) \tag{54}$$

$$C_{feed,i} = C_{\infty,i} \tag{55}$$

Adimensionalizando, la expresión anterior:

$$\frac{\varphi_V \gamma}{\beta_c} \left(1 - \frac{U_c}{U_s} \bar{t} \right) \frac{d\bar{C}_{\infty,i}}{dt} = \bar{C}_{i,out} - \bar{C}_{\infty,i}$$
(56)

donde $\varphi_V = \frac{V_{\infty}}{A_c L_0^-}$ es la relación del volumen del depósito y del lecho fijo.

c. Modelo del depósito de recirculación

Se considerará que el depósito presenta mezclado perfecto, por tanto, a partir de un balance de materia se consigue que

$$\frac{1}{\operatorname{Pe}_{\tau}} \frac{d\bar{C}_{i,\infty}}{d\bar{t}} = \bar{C}_{i} \Big|_{\bar{z}=1} - \bar{C}_{i,\infty}$$
(57)

$$\bar{t} = 0 \qquad \bar{C}_{i,\infty} = \bar{C}_{i,0} \tag{58}$$

donde $\bar{C}_{i,\infty} = \frac{C_{i,\infty}}{C_{i,max}} C_{i,\infty}$ es la concentración de glucosa/fructosa en el depósito de recirculación y $\bar{C}_i|_{\bar{z}=1}$ es la concentración normalizada de glucosa/fructosa a la salida del biorreactor.

El coeficiente de transferencia de masa convectivo (k_L) se optimizó de manera que la historia de la concentración de glucosa simulada del depósito de recirculación se ajuste a la concentración de glucosa experimental; para ello el sistema de ecuaciones diferenciales parciales se discretizó usando el método de diferencias finitas, generando un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias, mismas que fueron integradas mediante Runge-Kutta 4-5.

1) Volumen de solución en el depósito de recirculación

Debido a la naturaleza misma del montaje del sistema de biorreacción, donde el depósito de recirculación está contenido dentro del sistema de calentamiento de agua

a la temperatura de reacción, se presentaron efectos de evaporación del agua que se traducían en una disminución del volumen de la solución contenida en el depósito de recirculación, por lo que era necesario estar agregando agua para compensar la que se perdía por evaporación, debido a esto, fue imprescindible considerar este fenómeno en el modelo matemático, lo cual, se consiguió mediante la siguiente ecuación:

$$V_{\infty} = V_{\infty,0} + (E_{\nu,D}t) + H(t - t_{a\tilde{n}})V_{a\tilde{n}}$$

Donde V_{∞} es el volumen en el depósito al tiempo t, $V_{\infty,0}$ es el volumen inicial en el depósito, $E_{v,D}$ es la tasa de evaporación constante de la solución en el depósito, $H(t - t_{a\tilde{n}})$ es la función de Heasivide de la diferencia entre el tiempo t y el tiempo en que se añade agua para compensar la evaporación $t_{a\tilde{n}}$, y $V_{a\tilde{n}}$ es el volumen añadido. A su vez, la tasa de evaporación constante en el depósito $E_{v,D}$ está dada por:

$$E_{\nu,D} = \frac{(V_{\infty,f} - V_{\infty,0} - \sum V_{a\tilde{n}})}{t_t}$$

Donde $V_{\infty,f}$ es el volumen final de solución en del depósito de recirculación, $\sum V_{a\tilde{n}}$ es el total de líquido añadido al depósito al final del proceso de bioconversión y t_t es el tiempo que duró cada tratamiento.

VII. RESULTADOS

A. Perlas de glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio

Se inmovilizaron 2.5 g de la enzima glucosa isomerasa usando alginato de calcio como agente reticulante (2 % p/v) para elaborar las perlas que se muestran en la **Figura 5.** Se pueden identificar partículas de tonalidad más oscura dentro de la estructura interna de las perlas, estos son los fragmentos resultantes de la pulverización de los extrudidos de la enzima comercial. Por otro lado, se presentan las dimensiones de las perlas, mismas que se usaron para determinar el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las perlas. Análogamente al diámetro de la perla se evaluaron los parámetros densidad, masa y porosidad promedio de las perlas, registrados después de aplicar un tratamiento para retirar el exceso de calcio de las perlas posterior a su elaboración (**Cuadro 5**).

1. Efecto de condiciones de inmovilización sobre el diámetro de las perlas

Debido a las obstrucciones en la válvula por la sedimentación de partículas en el embudo del sistema de inmovilización, en las condiciones de este trabajo, se varió el porcentaje de apertura en un rango de 40 – 60 % para liberar dichas obstrucciones, presentándose en porcentajes de apertura superiores un flujo (en lugar de goteo) de solución de alginato-enzima hacia el cloruro de calcio, resultando en cilindros alargados en vez de perlas de alta esfericidad, mientras que en porcentajes de apertura menores a 40 % se presentaba goteo lento o nulo.



Figura 5 Glucosa isomerasa inmovilizada en perlas de alginato de calcio. Dimensiones en mm de una muestra de las perlas de alginato de calcio elaboradas por goteo, 2.5 g de enzima disuelta en 175 mL de alginato de calcio (2 % p/v).

	D _p (mm)	ρ _p (g cm ⁻³)	m _թ (g)	٤p
Promedio	3.681	1.052	0.0318	0.9658
D.E.	0.199	0.020	0.0011	0.1250
C.V.	5.4	1.9	3.4	0.1

Cuadro 5 Parámetros de las perlas de alginato

Nota: se evaluaron después del tratamiento de eliminación de calcio posterior a la elaboración de las perlas. D_{ρ} diámetro, ρ_{ρ} densidad, m_{ρ} masa, ε_{ρ} porosidad de partícula, D.E. desviación estándar, C.V. coeficiente de variación.

Se obtuvieron fotografías con las dimensiones de 35 perlas de la enzima inmovilizada a 40 y 60 % de apertura de la válvula del sistema de inmovilización para determinar si la variación del porcentaje de apertura de la válvula de goteo durante la inmovilización tiene efecto sobre el diámetro promedio de las perlas de alginato (Figura 6). Los diámetros obtenidos de estos dos tratamientos, justamente después de su elaboración, se muestran en el Cuadro 6, el diámetro para 40 % de apertura fue 3.209 ± 0.1466 mm, para 60 % fue 3.221 ± 0.1126 mm. No existe diferencia significativa en el promedio de ambos lotes de perlas, por lo que se podría concluir que, si bien la apertura de la válvula influye en la velocidad de goteo de la mezcla alginato/enzima, no influye significativamente sobre el diámetro promedio de las perlas obtenidas. La diferencia entre los promedios del Cuadro 6 y el Cuadro 5, se deben a que durante el tratamiento de lavado de las perlas aplicado se presenta un aumento de diámetro de las perlas de alginato. En este estudio se consideró que el aumento del diámetro durante el tratamiento de lavado de las perlas es constante e independiente de las condiciones de inmovilización de la enzima; esto debido a que el estudio, validación y cuantificación del efecto de este fenómeno físico escapa del alcance y finalidad de este proyecto.

A. Fluidificación del lecho de perlas de alginato

Los experimentos realizados durante esta investigación se llevaron a cabo empleando 150 g de perlas de alginato (2.5 g de glucosa isomerasa) dentro de un reactor con 75 y 4 cm, de longitud y diámetro interno, respectivamente. La fluidificación de las perlas catalíticas se logró bombeando la solución de glucosa con una bomba de 15 W a través del cilindro interno del reactor, en flujo ascendente. En la **Figura 7** se muestran fotografías de la altura de fluidificación de perlas catalíticas a diferentes caudales de flujo,



Figura 6 Diámetros de perlas elaboradas a condiciones distintas de apertura de la válvula de inmovilización. a) 40 % de apertura b) 60 % de apertura. Fotografías tomadas con un estereoscopio (Motic, USA) posterior a la elaboración de las perlas.

Apertura de válvula	40 %	60 %	
D _{prom} (mm)	3.209	3.221	
DE (mm)	0.1466	0.1126	
CV	4.569	3.497	

Cuadro 6 Diámetro de perlas a diferente porcentaje de apertura de válvula

Evaluados posterior a su elaboración. No existe diferencia significativa entre las medias. Prueba de Fisher. α = 0.05, LSD = 0.09. D_{prom} diámetro promedio, DE desviación estándar, CV coeficiente de variación.



Figura 7 Expansión de lecho con respecto al caudal de fluidificación. Cama de aproximadamente 150 g de perlas (2.5 g GI) a distintos caudales de fluidificación: a) sin fluidificación (lecho fijo) b) 105 mL min⁻¹ c) 265 mL min⁻¹ d) 280 mL min⁻¹ e) 320 mL min⁻¹ f) 410 mL min⁻¹ g) 445 mL min⁻¹ h) 565 mL min⁻¹ i) 660 mL min⁻¹ j) 730 mL min⁻¹.

desde 0 hasta 730 mL min⁻¹. Como puede observarse por las diferentes alturas alcanzadas, el flujo ejerce una gran influencia sobre la altura de fluidificación de las perlas. Por este motivo, se estableció que

$$L = f(Q)$$

Es decir, un modelo matemático que correlacionara la altura de lecho (L) y el caudal empleado. Sin embargo, se observó que además del caudal, la altura de lecho está determinada por el tiempo de vida de la perla (t_P) de tal manera que:

$$L = f(tp, Q).$$

Por esto, la altura del lecho en cada tratamiento se monitoreo periódicamente. En la **Figura 8** se muestra un singular y lento fenómeno de fluidificación y flujo descendente sin caudal que se presentaba previo al comienzo de la conversión de las perlas. Las perlas se elevaban por efecto de diferencia de densidades, para después lentamente descender probablemente debido a un efecto del aumento de la densidad de la perla causado posiblemente por la difusión del sustrato hacia el centro de la perla. Este fenómeno duraba de 30-45 minutos, y se presentó en todos los tratamientos experimentales desarrollados.

1. Altura de fluidificación de perlas catalíticas en los experimentos

En la **Figura 9** se muestran todas historias de las alturas de fluidificación de los tratamientos, en el eje de las abscisas se muestra el tiempo en horas, mientras que el eje de las ordenadas muestra las alturas de lecho de perlas, las cuales variaron de 33 hasta 75 cm. Las alturas del gráfico no presentan una tendencia o comportamiento predecible. Esto, debido a la naturaleza misma de la perla y al daño que el proceso



Figura 8 Fluidificación de las perlas por efecto de la densidad



Figura 9 Alturas de lecho de los experimentos registradas en los tratamientos experimentales desarrollados. Los símbolos en el gráfico representan la reutilización de la perla \blacktriangle = 1° uso, \blacksquare = 2° uso, \blacklozenge = 3° uso. Los colores indican el lote de perlas empleado, azul = A, verde claro = B y naranja = C.

produce sobre su estructura, haciendo variar sus características de fluidificación en función del tiempo de vida de la perla (t_p) y el caudal de fluidificación (Q), cada lote de perlas se reutilizó en 3 tratamientos, un tiempo de 4 horas por tratamiento, cada lote de perlas mostró un tiempo de vida de 13 h, después del cual, la perla se fragmentaba y estos fragmentos se elevaban hacia el tope superior del reactor. En la Figura 10 se presentan las alturas y el caudal de fluidificación de los experimentos, mostrados en forma de resumen. En la Figura 10a se muestran las historias de altura de fluidificación (eje y) de cada juego de perlas, en función del tiempo de vida de la perla (eje x). Cada línea de tendencia del gráfico representa 3 tratamientos, pueden observarse aumentos y descensos pronunciados en las alturas de lecho, esto se debe a que cada tratamiento fue realizado a diferentes flujos seleccionados aleatoriamente. En general, la altura de lecho tiende a aumentar conforme transcurre el tiempo de vida de la perla, hasta llegar a un máximo aproximadamente entre las 9-10 horas, para posteriormente, comenzar a disminuir. En la **Figura 10b**, se muestran las historias de caudal correspondientes a cada tratamiento, en función del tiempo de vida de las perlas. Se evaluó el efecto de distintos caudales sobre la cinética de conversión, 100, 200, 300 y 350 mL min⁻¹. En la Figura 10c, se muestra el cociente del caudal de fluidificación (Q) y la altura de lecho (L), el cual se define como Ψ , que es el flujo (mL min⁻¹) necesario para elevar 1 cm la altura del lecho de perlas catalíticas. En todos los tratamientos Ψ disminuyó desde 9 hasta \approx 3 (mL min⁻¹ cm⁻¹) conforme aumentaba el tiempo de uso de la perla, físicamente, esto puede interpretarse como que la densidad de la perla se aproximó a la densidad del fluido conforme el tiempo de proceso transcurrió, por lo que se podría aseverar que $\Psi = f(t_p)$



Figura 10 Historias de alturas y caudal de fluidificación. a) Historia de las alturas de fluidificación en función del tiempo de vida de la perla (t_p) b) caudales empleados en función de t_p c) historia de la variable Ψ en función del t_p . Los colores indican el lote de perlas empleado, azul = A, verde claro = B y naranja = C.

En las **Figuras 11a, b, c** se muestra la comparación de Ψ y Q contra t_p para los lotes de perlas A, B, y C, respectivamente. En estos gráficos se observan escalones en la variable Ψ , por lo que se puede deducir que Ψ conjuntamente al tp, también depende del caudal empleado, de tal forma que

$$\Psi = f(Q, t_p)$$

B. Producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado

En la Figura 12 se muestran las cinéticas de producción de fructosa empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en un reactor de lecho fluidificado de 75 x 4 cm de longitud y diámetro, empleando 150 g de perlas (con 2.5 g de GI) a 74 °C, 2.5 L de solución de glucosa a 100 g L⁻¹, 2.8 g L⁻¹ de MgSO₄ y 2.8 g L⁻¹ ¹ de Na₂SO₃. En el eje de las abscisas se representa el tiempo de operación en horas, en el eje de las ordenadas se tienen los porcentajes de fructosa producida. Los rendimientos de producción de fructosa mostraron una tendencia a aumentar la variabilidad al avanzar el tiempo de proceso. A las 4 horas de proceso, se alcanzaron fracciones de conversión de 0.123 - 0.221 (12.3 - 22.1 %). Recientemente Carrazco-Escalante y col (2019), utilizaron la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en reactores de tanque agitado y lecho fijo, alcanzando fracciones de conversión máxima de 0.31 y 0.41, usando concentraciones de 6.29 y 10.6 g L⁻¹ de enzima para tanque agitado y lecho fijo, respectivamente (**Cuadro 7**). A pesar de que la fracción de bioconversión de 0.22 alcanzada en esta investigación es menor que las alcanzadas en reactor de tanque agitado y lecho fijo, la velocidad de producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado (fructosa producidad / tiempo de reacción) es 4 y 14 veces mayor que en sus análogos reactor de tanque agitado y lecho fijo, respectivamente.



Figura 11 Comparación de Ψ y Q en distintos lotes de perlas con respecto al tiempo de vida de las perlas para los distintos lotes de perlas a) lote A, b) lote B, c) lote C.



Figura 12 Fructosa producida en reactor de lecho fluidificado empleando glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio a T = 74 °C, [E] = 1 g L⁻¹. Los símbolos en el gráfico representan la reutilización de la perla \blacktriangle = 1° uso, \blacksquare = 2° uso, \blacklozenge = 3° uso. Los colores indican el lote de perlas empleado, azul = A, verde claro = B y naranja = C.

Sistema de reacción	Tiempo de reacción (min)	[<i>E</i>] (g L ⁻¹)	Fracción de conversión	Fructosa producida (g)
Tanque agitado con enzima inmovilizada	210	6.292	0.312	12.39
Lecho empacado	600	10.618	0.414	9.7475
Lecho fluidificado	240	1	0.221	55.25

Cuadro 7. Comparación de fracciones de conversión en diferentes reactores.

Fuente: Carrazco-Escalante (2019) con modificaciones.

Nota: se empleó la misma masa de enzima en todos los casos (2.5 g), sin embargo,

su concentración cambia en función del volumen total de reacción.
En la Figura 13 se comparan las cinéticas de conversión en función de la reutilización de las perlas. En la Figura 13a se observan las conversiones de fructosa (%) en relación con el tiempo de proceso (h) para el primer uso de las perlas. La tendencia de las conversiones del primer uso de las perlas sugiere una disminución de la velocidad de conversión a las ≈1.5-2 horas de la reacción, que coincide con la disminución de la razón de cambio de la altura de lecho de la Figura 10a (p. 59). Las Figuras 13b y 13c presentan una pendiente relativamente constante que coincide con las alturas de lecho relativamente constante (en cada tratamiento) mostradas en la Figura 10a (p. 59). En general las cinéticas del lote de perlas C mostró tener las conversiones más elevadas en todas las reutilizaciones de las perlas.

En las **Figuras 14a – 14c** se comparan las cinéticas de conversión obtenidas en cada uso de cada lote de perlas. Cada lote de perlas muestra cinéticas de conversión muy similares en sus 3 tratamientos, siendo el segundo uso de cada lote de perlas el tratamiento con conversiones ligeramente mayores para todos los casos. Las cinéticas muestran comportamientos similares durante la primera mitad del proceso, a partir del cual, se presenta variabilidad en las velocidades de conversión, generadas probablemente por los diferentes daños estructurales de las perlas por efecto de las condiciones de proceso, destacando, entre otras variables de proceso, la temperatura de operación. Estudio de reactor de lecho fluidificado

Los parámetros de operación durante la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado se muestran en el **Cuadro 8**, en el cuadro se aprecian los parámetros de operación registrados para cada tratamiento: Caudal (Q), reutilización (uso), temperatura



Figura 13 Cinéticas de conversión para las diferentes reutilizaciones de perla. a) 1° uso b) 2° uso c) 3° uso. Los símbolos en el gráfico representan la reutilización de la perla \blacktriangle = 1° uso, \blacksquare = 2° uso, \blacklozenge = 3° uso. Los colores indican el lote de perlas empleado, azul = A, verde claro = B y naranja = C.



Figura 14 Producción de fructosa usando distintos lotes de perlas. a) lote A b) lote B c) lote C. Cada conjunto de perlas se utilizó para 3 experimentos. Los símbolos en el gráfico representan la reutilización de la perla \blacktriangle = 1° uso, \blacksquare = 2° uso, \blacklozenge = 3° uso. Los colores indican el lote de perlas empleado, azul = A, verde claro = B y naranja = C.

				Т	ratamient	0			
Parámetro	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Q (mL min ⁻¹)	350	200	100	300	200	250	350	300	200
Uso	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T (°C)	66.4	67.3	67.1	67.2	78.7	67.7	71.4	66.9	62
V₀ (mL)	1380	1710	1770	1410	1660	1720	1710	1700	1660
L _{fix, 0} (cm)	32	37	36	33	26	29	31	39	37
L₀ (cm)	37	51.2	62.4	50.9	42	80.6	37.3	42.9	72
L _{inf} (cm)	58.3	63.8	46	68.7	52	54.7	54.7	73.2	65
Κη	3.85x10 ⁻⁴	2.24x10 ⁻⁴	8.6x10 ⁻⁵	6.36x10 ⁻⁶	3.75x10 ⁻⁴	4.683x10 ⁻⁵	4.04x10 ⁻⁴	4.4x10 ⁻⁴	1.9x10 ⁻⁴

Cuadro 8. Parámetros de proceso en reactor de lecho fluidificado.

Las diferentes letras de los tratamientos (A, B, C) indican el lote de perlas usado, el número (1,2,3) indica el uso del lote de perlas. Q representa el caudal de fluidificación empleado en el tratamiento, Uso se refiere al número de uso de cada lote de perlas, T simboliza la temperatura de operación, V₀ hace referencia al volumen inicial de solución de glucosa en el depósito de recirculación, L_{fix,0} significa la altura de lecho sin fluidificación al inicio del tratamiento, L₀ representa la altura de lecho fluidificado al inicio del proceso, L_{inf} concierne a la altura de lecho fluidificado al final del proceso, K_n se refiere al factor de decaimiento de la eficiencia residual catalítica de cada tratamiento.

(°C), volumen del tanque de recirculación inicial y final (V_{t0} y V_{tfinal}), altura de lecho sin flujo (L_{fix}), altura de lecho fluidificado inicial e infinita (L_0 y L_{inf}). Estos parámetros se utilizaron en el modelo matemático para predecir el comportamiento de las cinéticas de conversión. En la Figura 15 se muestra una comparación de la predicción del modelo matemático y las conversiones registradas para cada tratamiento. Se muestran 9 gráficos, correspondiente a los 9 tratamientos realizados. Las figuras de las columnas 1, 2, 3 representan los diferentes juegos de perlas usados, A, B y C, respectivamente, mientras que las filas 1, 2 y 3 representan el orden de uso 1, 2 y 3. En cada gráfico, en el eje x se muestra el tiempo en minutos, en el eje y se aprecia la fracción de fructosa producida. Las cinéticas de conversión experimental se representan con círculos, mientras que las aproximaciones matemáticas se visualizan con una línea continua azul. Se puede observar que las predicciones generadas por el modelo matemático son buenas teniendo ligeras subestimaciones de la concentración de fructosa producida durante las primeras horas del proceso, y sobreestimaciones hacia el final, esto debido probablemente a fenómenos físicos que tienen influencia sobre la cinética de conversión que no están siendo considerados dentro del modelo matemático. En cuanto a los valores del coeficiente convectivo de transferencia de masa (k_L), se obtuvieron a partir del ajuste de los parámetros del modelo matemático bioconversión obtenidas tener concordancia con las cinéticas de para experimentalmente, haciendo uso del software de cómputo numérico MATLAB[®]. En la Figura 16 se presentan las historias del coeficiente convectivo de transferencia de masa (k_L) para los diferentes tratamientos realizados, las figuras de las columnas 1, 2, 3 representan los diferentes juegos de perlas usados, A, B y C, respectivamente, mien-



Figura 15 Aproximación matemática de la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado. Los círculos representan las fracciones de fructosa experimentales, las líneas azules representan las fracciones de fructosa obtenidas por aproximación matemática para cada tratamiento realizado. a) A1, b) B1, c) C1, d) A2, e) B2, f) C2, g) A3, h) B3, i) C3.

tras que las filas 1, 2 y 3 representan el orden de uso 1, 2 y 3, en cada gráfico se presenta la variación del k_L con respecto al tiempo de proceso, en el eje x se representa el tiempo en minutos, en el eje y se aprecia el k_L en unidades de m s⁻¹. el valor de k_L varió en un rango de 7.6x10⁻⁶ hasta 1.35x10⁻⁵, valores dentro del mismo orden de magnitud pero ligeramente menores a los publicados por Beck y col. (1986) usando la enzima glucosa isomerasa comercial (Optisweet 22) inmovilizada en SiO₂, que reportaron k_L en un rango de 4x10⁻⁵ hasta 10x10⁻⁵ m s⁻¹ para velocidades superficiales (Us) de 1x10⁻³ a 3x10⁻³ m s⁻¹, que coinciden con las velocidades superficiales calculadas en este trabajo, con valores de 2.5x10⁻³ hasta 4.5x10⁻³ m s⁻¹ (Cuadro 9). Los gráficos de la **Figura 16** muestran una tendencia de k_L a disminuir en los primeros dos usos de cada juego de perlas utilizados en los tratamientos, como se aprecia en las **Figuras 16a – 16f**. El coeficiente convectivo de transferencia de masa (K_L) tuvo un valor mínimo en el último uso de las perlas como se puede observar en las Figuras 16g - 16i. Este comportamiento puede explicarse, debido a que el coeficiente de transferencia de masa depende fuertemente de la porosidad del lecho fluidificado, la cual, a su vez, se ve influenciada antagónicamente por la altura de fluidificación, es decir, a mayor altura del lecho de perlas catalíticas, menor será el coeficiente de transferencia de masa. De acuerdo con la Figura 10a, la altura de fluidificación aumenta durante el proceso para los primeros 2 usos de las perlas catalíticas, y disminuye para el último uso de perlas, explicando la tendencia del coeficiente de transferencia a disminuir en los primeros dos usos de las perlas, y aumentar en el último. En la Figura 17 se muestran las historias del coeficiente de dispersión axial de cada tratamiento al transcurrir el tiempo de proceso. En los ejes horizontales se puede observar el tiempo en minutos, mientras que en los ejes verticales se representan las



Figura 16 Historia del coeficiente convectivo de transferencia de masa (k_L). obtenidos durante la conversión de glucosa a fructosa en reactor de lecho fluidificado para diferentes tratamientos realizados. Las figuras de las columnas 1, 2, 3 representan los diferentes juegos de perlas usados, A, B y C, respectivamente, mientras que las filas 1, 2 y 3 representan el orden de uso 1, 2 y 3.



Figura 17 Historias del coeficiente de dispersión axial. Historias del coeficiente de dispersión axial obtenidos durante la conversión de glucosa a fructosa en reactor de lecho fluidificado para diferentes tratamientos realizados. Las figuras de las columnas 1, 2, 3 representan los diferentes juegos de perlas usados, A, B y C, respectivamente, mientras que las filas 1, 2 y 3 representan el orden de uso 1, 2 y 3.

dispersiones axiales (D_z) en unidades de m² s⁻¹. Los valores de D_z oscilaron en un rango de 1.2x10⁻⁵ a 4.5x10⁻⁵ m² s⁻¹ en los diferentes tratamientos. De manera contraria al coeficiente de transferencia de masa, los primeros dos usos de cada lote de perlas presentan un aumento de la dispersión axial al aumentar el tiempo, mientras que el último uso de cada lote de perlas catalíticas presenta una disminución de la dispersión axial al avanzar el proceso. Este comportamiento se podría explicar considerando que la dispersión axial depende de manera proporcional a la porosidad del lecho fluidificado, la cual, está en función de la altura de lecho. En el cuadro 9, se resumen los números adimensionales ajustados para cada tratamiento, así como la velocidad superficial (U_s). El coeficiente de transferencia de masa de Colburn (j_m), varió desde 0.44 hasta 0.65 con excepción del tratamiento A3, que tuvo un valor de 1.01, el número de Reynolds a su vez varió de 4.9 hasta 16.9. El número de Schmidt (Sc) se mantuvo en 1428.6 para todos los tratamientos, esto debido a que este número depende de la densidad, viscosidad y difusión del sustrato en la fase fluida, es decir, de variables del proceso que se mantuvieron constantes en todos los tratamientos. Para el número de Sherwood (Sh), se tuvieron valores de 55.9 hasta 84.6. En el caso de la velocidad superficial (U_s), varió desde 1.3x10⁻³ hasta 4.6x10⁻³ m s⁻¹. En cuanto a la difusividad efectiva, se obtuvieron valores que variaron desde 8.356x10⁻¹² hasta 4.0356x10⁻¹¹ m² s⁻¹, con valores promedio 1.913x10⁻¹¹, 2.313x10⁻¹¹ y 2.535x10⁻¹¹ m² s⁻¹ para el primer, segundo y tercer uso de los lotes de perlas, respectivamente. Estos valores concuerdan con lo reportado por Palazzi y Converti (2001), que trabajaron con glucosa isomerasa inmovilizada en geles de alginato. Esta tendencia a aumentar la difusividad efectiva con el orden de uso puede atribuirse al daño estructural que las perlas presentan debido a las condiciones de temperatura y caudales relativamente elevados,

Tratamiento	j Mfix	Re	Sc	Sh _{fix}	U₅ (m s⁻¹)	D _{eff} (m ² s ⁻¹)	η
A1	0.4485	16.633	1428.6	84.01	0.00452	8.356x10 ⁻¹²	0.696
A2	0.6348	9.876	1428.6	70.61	0.00268	1.87x10 ⁻¹¹	0.557
A3	1.0114	4.911	1428.6	55.94	0.00133	2.035x10 ⁻¹¹	0.48
B1	0.6466	9.608	1428.6	69.97	0.00261	1.87x10 ⁻¹¹	0.696
B2	0.6537	9.452	1428.6	69.59	0.00257	2.035x10 ⁻¹¹	0.557
B3	0.5460	12.381	1428.6	76.14	0.00336	1.53x10 ⁻¹¹	0.48
C1	0.4421	16.995	1428.6	84.62	0.00462	3.035x10 ⁻¹¹	0.696
C2	0.4899	14.568	1428.6	80.38	0.00396	3.035x10 ⁻¹¹	0.557
C3	0.6594	9.330	1428.6	69.29	0.00253	4.035x10 ⁻¹¹	0.48

Cuadro 9 Parámetros adimensionales y Us calculados para los tratamientos

Las diferentes letras de los tratamientos (A, B, C) indican el lote de perlas usado, el número (1,2,3) indica el uso del lote de perlas. j_{Mfix} representa el coeficiente de transferencia de masa de Colburn para lecho fijo, Re, Sc, Sh se refieren a los números adimensionales de Reynolds, Schmidt y Sherwood, respectivamente. Us simboliza la velocidad superifical, D_{eff} hace referencia a la difusividad efectiva, y η representa la eficiencia residual catalítica.desni

ya que cuando la perla se daña, tiende a aumentar su volumen y masa, es decir, absorbe agua, por lo cual su difusividad tiende a aproximarse a la difusividad del sustrato en agua, 7x10⁻¹⁰ m² s⁻¹. Para el caso de la eficiencia residual catalítica, se obtuvieron valores de 0.696, 0.557 y 0.48, para el primer, segundo y tercer uso de las perlas catalíticas, respectivamente. Esta disminución de la eficiencia podría estar relacionada con la pérdida de las partículas de enzima contenidas en las perlas de alginato que se desprendían, y podían apreciarse al final de cada tratamiento como pequeñas partículas sedimentadas en el tanque de recirculación, como resultado del daño estructural que presentaron las perlas. Debido a esta disminución de la eficiencia residual, se propone dentro del modelo matemático un decaimiento de la eficiencia residual K_n que se aproxima con una ecuación exponencial que considera valores para K_n cuyos promedios fueron 2.31x10⁻⁵, 1.38x10⁻⁵ y 1.85x10⁻⁵ para el primer, segundo y tercer uso de las perlas. El factor de decaimiento fue menor para el segundo uso de las perlas, lo cual significa que durante este uso, las perlas perdieron la menor cantidad de enzima, lo cual probablemente podría explicar porque los segundos usos de cada lote de perlas tenía conversiones ligeramente mayores (véase Figura 14 p. 68).

1. Efecto de los parámetros de proceso en reactor de lecho fluidificado

A través de simulaciones se analizó el efecto que ejercen ocho de los parámetros de operación más importantes: masa de enzima ([E]) en las perlas catalíticas, concentración inicial de sustrato ([S]₀), diámetro de las partículas catalíticas (D_p), caudal de fluidificación (Q), altura de fluidificación (L), difusividad efectiva (D_{eff}) y la eficiencia residual catalítica (η). Los parámetros de operación base fueron mE = 2.5 g, [S]₀ = 100 g L⁻¹, D_p = 3.68 mm, Q = 200 mL min⁻¹, L₀ = 0.42 m y L_{inf} = 0.52 m, D_{eff} = $2.03 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ y} \text{ η} = 0.48.$

Primero se analizó el efecto de la masa de enzima glucosa isomerasa presente en cada lote de perlas (150 q de perlas) sobre la cinética de producción de fructosa. En la Figura 18 se pueden observar las cinéticas de conversión para 10 diferentes concentraciones de enzima, desde 0.5 g hasta 10 g por lote de perlas. Obteniendo conversiones desde 9 hasta 23 % a las 4 horas de proceso para 0.5 y 10 g, respectivamente. Se observó que, en todos los casos, el aumento en la masa de enzima produce un aumento en la producción de fructosa, sin embargo, también puede observarse que conforme mayor es la masa de la enzima, menor es el efecto que produce un incremento de ésta. Esto puede apreciarse en el hecho de que, a pesar de que 0.5 g es 20 veces menor que 10 g de enzima, la fracción de fructosa producida con 10 g de enzima es solamente 3 veces mayor que la producida por 0.5 g. en la Figura 19 se aprecia el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la cinética de producción de fructosa (eje y), para 4 horas de proceso (eje x). En el gráfico se observan concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 g L⁻¹ de glucosa. Al aumentar la concentración de sustrato, se observa una disminución en la fracción de fructosa producida (de 0.18 a 0.14), esto debido a que al aumentar la concentración de fructosa se disminuye la relación [E]/[S], lo que ocasiona una disminución en la cinética de conversión en términos de fracción de producto. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que 18 % de 50 g L⁻¹ es equivalente a 18 g L⁻¹ de fructosa producida, y 14 % de 250 g L⁻¹ de glucosa, equivale a 35 g L⁻¹ de fructosa. También es necesario considerar que el modelo matemático propuesto no considera el hecho de que un aumento en la concentración inicial de sustrato implica un aumento en la densidad y la viscosidad de la solución, lo que podría traer consigo un cambio en la fluidificación de las perlas. En la Figura 20 se aprecia el efecto que ejerce el diámetro de la partícula sobre la conver-



Figura 18 Efecto de la masa de enzima sobre la producción de fructosa en reactor de

lecho fluidificado.



Figura 19 Efecto del cambio de la concentración inicial de sustrato sobre la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado.



Figura 20 Efecto del cambio del diámetro de la partícula (D_p) sobre la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado.

sión. Se presenta la cinética para 4 horas de proceso, para 5 distintos diámetros de partícula desde 2 hasta 4 mm, con una disminución en la fracción de fructosa de 0.27 hasta 0.15 al aumentar el diámetro. Esto se debe a que una disminución en el diámetro de la partícula incrementa la relación área/volumen de la perla, y considerando que la biorreacción ocurre en la superficie de la perla, resulta muy importante, lo que beneficia la conversión con la disminución del diámetro.

En las Figuras 21a y 21b se aprecia el efecto que ejercen la altura y el caudal de fluidificación sobre la cinética de conversión de glucosa a fructosa. La Figura 21a muestra las cinéticas de conversión (fracción de fructosa) de 7 alturas de fluidificación que van desde 30 hasta 60 cm, en incrementos de 5 cm, para 4 horas de proceso. Estas alturas son las referentes al rango de las registradas en los tratamientos experimentales. Si bien tanto el caudal y la altura de fluidificación empleados tienen efecto sobre el coeficiente convectivo de transferencia de masa k_L, y el coeficiente de dispersión axial Dz, así como en los números adimensionales calculados para la estimación de estos, el efecto que ejercen sobre la cinética de conversión es pequeño, esto sugiere que los efectos hidrodinámicos no juegan un papel importante en la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado usando alginato como inmovilizante, en las condiciones de operación de este trabajo. El conocimiento y entendimiento de la influencia de estos parámetros de operación sobre la cinética de conversión adquiere importancia al momento del diseño óptimo de un proceso de bioconversión de reactores de lecho fluidificado empleando la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio.

Finalmente, en las Figuras 22a-b se presenta el efecto que ejercen la difusividad



Figura 21 Efecto de la altura y caudal de fluidificación sobre la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado. a) Efecto de la altura de fluidificación; b) efecto del caudal de fluidificación.



Figura 22 Efecto de la difusividad efectiva y la eficiencia residual catalítica sobre la producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado. a) Efecto de la difusividad efectiva; b) Efecto de la eficiencia residual catalítica.

efectiva (D_{eff}) y la eficiencia residual (n) de las perlas catalíticas. En la **Figura 22a** se presentan las cinéticas de siete diferentes difusividades efectivas desde 8.356x10⁻¹² hasta 4.035x10⁻¹¹ m² s⁻¹; en el gráfico se puede observar que el aumento de la difusividad efectiva viene acompañado con un aumento en la fracción de fructosa convertida desde 0.1 hasta 0.22. Este es uno de los factores de proceso que mayor efecto ejercen sobre la cinética de producción de fructosa en reactor de lecho fluidificado a las condiciones de operación de este trabajo. En cuanto a la eficiencia residual catalitica (n), se puede observar en la Figura 22b las cinéticas de conversión para cinco valores de n, para 4 horas de proceso. Para un aumento de n desde 0.418 hasta 0.696 se obtienen un aumento en la fracción de fructosa alcanzada desde 0.16 hasta 0.19. Tanto D_{eff} como n son parámetros que dependen de las características de las perlas catalíticas, y tienen un efecto importante sobre la cinética de conversión de glucosa a fructosa en un sistema de reacción de lecho fluidificado en un reactor tubular con dimensiones de 4 cm x 75 cm, con caudales de 100-300 mL min⁻¹, con perlas de 3.681 mm de diámetro y 2.5 g de enzima inmovilizada en alginato de calcio a las 4 horas de proceso empleando un sistema de recirculación hacia un depósito con la solución de sustrato a 100 g L⁻¹.

Dado el impacto significativo que estos dos parámetros ejercen sobre la cinética de producción de fructosa, y que éstos a su vez dependen de las características de la perla catalítica, y que, en las condiciones de operación de esta investigación, el caudal y la altura de fluidificación ejercen un efecto no significativo, es recomendable realizar un estudio más a fondo de las propiedades de la perla y optimizarlas de tal manera que se favorezca la conversión de glucosa a fructosa.

VIII. CONCLUSIONES

El proceso de inmovilización de la enzima glucosa isomerasa en perlas de alginato de calcio no afecta significativamente las características de la perla de un lote a otro. Las perlas presentaron un ligero aumento en su diámetro, posterior a la aplicación de los lavados para retirar calcio, también presentaron un aumento considerable de la masa de las perlas.

Las dimensiones del reactor y las características de las perlas fueron las indicadas para lograr la fluidificación dentro de un rango de caudales que pudieran ser controlados y reproducidos. La altura de fluidificación del lecho de perlas catalíticas depende del caudal de flujo empleado, pero a su vez, se ve fuertemente influenciada por el tiempo de vida de las perlas, el cual está afectado directamente por la temperatura de proceso.

Las alturas de lecho registradas en los diferentes tratamientos no mostraron una tendencia o comportamiento al analizar cada tratamiento en forma independiente, sin embargo, analizando los tratamientos conjuntos de cada lote de perlas, fue posible identificar una tendencia de las perlas, a aumentar su altura de lecho (manteniendo el flujo constante) al avanzar el tiempo de vida de la perla, hasta llegar a un máximo, y después descender ligeramente, esto, debido a cambios estructurales que influyen sobre las características de las perlas, mismos que se presentan por efecto de las condiciones de operación, entre las que predomina la temperatura. El parámetro Ψ , cociente del caudal de fluidificación y la altura de lecho, disminuyó al aumentar el tiempo y disminuir el caudal, esto significa, que con el avance del tiempo es más fácil fluidificar la cama de perlas. En cuanto a la bioconversión, a las 4 horas de proceso,

se alcanzaron fracciones de conversión de 0.123 – 0.221 (12.3 – 22.1 %), esto origina una velocidad de producción de fructosa 4 y 14 veces mayores que en sus análogos reactor de tanque agitado y lecho fijo, respectivamente.

Fue posible aproximar las cinéticas de conversión de fructosa mediante un modelo matemático que considera los mecanismos cinéticos, de transferencia de masa y los efectos difusivos de las fases sólida y fluida del reactor de lecho fluidificado. Sin embargo, a pesar de las consideraciones tomadas y de que todos los parámetros que lo conforman poseen un sentido físico que describe fenómenos reales que suceden a nivel molecular, aún existen factores y fenómenos que influyen sobre la cinética de producción de fructosa que no se consideran en el modelo. A pesar de ello, se lograron excelentes aproximaciones matemáticas de las cinéticas observadas en los distintos tratamientos.

En cuanto a lo que se refiere al coeficiente convectivo de transferencia de masa k_L y la dispersión axial (D_z), el primero disminuyó en los primeros dos usos de cada lote de perlas, mientras que aumentó en el último tratamiento en un rango de 7.60x10⁻⁶ hasta 1.35x10⁻⁵ m s⁻¹, caso contrario a lo ocurrido con el D_z , que aumentó los primeros dos usos para disminuir durante el tercero en un intervalo de 1.2x10⁻⁵ a 4.5x10⁻⁵ m² s⁻¹.

El ajuste del modelo matemático arrojó coeficientes de difusividad efectiva y eficiencia residual catalítica desde 8.36x10⁻¹² hasta 4.04x10⁻¹¹ m² s⁻¹, y de 0.480 hasta 0.696, respectivamente.

Se realizó un estudio del efecto que ejercen la masa de enzima en las perlas catalíticas, concentración inicial de sustrato, diámetro de las partículas catalíticas, caudal de fluidificación, altura de fluidificación, difusividad efectiva y la eficiencia residual catalítica, mediante simulaciones empleando el modelo matemático. Se encontró que un aumento en la masa de enzima de 20 veces (0.5 – 10 g), produce el triple de conversión. Al aumentar la masa de enzima se aumenta también la velocidad de reacción, caso contrario ocurre con el diámetro de las perlas que, al aumentar, disminuye la fracción de fructosa producida, mientras que la concentración inicial de sustrato tiende a disminuir la fracción de fructosa, pero a aumentar la cantidad de fructosa presente en la solución. En cuanto a la altura y el caudal de fluidificación, se encontró que no ejercen efecto sobre la cinética de producción de fructosa, por lo que se infiere que los efectos hidrodinámicos no son los predominantes en las condiciones de operación de este proyecto. Finalmente, al analizar la difusividad efectiva y la eficiencia residual catalítica, se encontró que ambas influyen de manera positiva sobre la cinética de conversión, sin embargo, estos dos parámetros que dependen de las propiedades de las perlas, cambiaron por efecto del daño estructural que las perlas presentaron, aumentando la difusividad efectiva con el tiempo a causa de la absorción de agua en el gel de alginato, mientras que la eficiencia residual disminuía por efecto de la pérdida de partículas de la enzima.

Debido a que estos dos últimos factores ejercen una gran influencia, puede concluirse que los efectos de transferencia de masa intrapartícula y cinéticos juegan un papel importante en la velocidad de conversión del sustrato en producto. Es por ello, que el estudio de las propiedades intrínsecas a la perla es de vital importancia para asegurar la rentabilidad económica del proceso de producción de fructosa usando glucosa isomerasa inmovilizada en alginato de calcio en un reactor de lecho fluidificado.

BIBLIOGRAFÍA

Asif M, Abasaeed AE. 1998. Modeling of glucose isomerization in a fluidized bed immobilized enzyme bioreactor. Bioresource Technology 229-235.

Badui-Dergal S. 1993 Química de los alimentos. 3ª Edición. Estado de México: Pearson Educación. 738.

Blandish R, Hess M, Epting K, Vieille C, Kelly R. 2002. Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from Streptomyces murinus and two hyperthermophilic Thermotoga species. Biotechnology and Bioengineering 185-194.

Cabral AKA., Zaiat M, Foresti E. 1995. Caracterizayao Hidrodinamica de um Reator Anaer6bio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF). XXIII Congresso Brasileiro de sistemas Particulados. Maingá - Paraná: Universidad Estadual de Maringá. 23-30.

Chen KC, Wu JK. 1987. Substrate protection of immobilized glucose isomerase. Biotechnology Engineering 817-824.

Ching CB, Chu KH. 1988. Modelling of a fixed bed and a fluidized bed immobilized enzyme reactor. Applied Microbiology Biotechnology 316-322.

Couper JR, Penney WR, Fair JR, Walas SL. 2005. Chemical process equipment selection and design. Oxford: Butterworth-Heinemann Elsevier.

D'Souza SF. 1999. Immobilized enzymes in bioprocess. Current Science 69-79.

El-Shora H, Ahmed ES, Ghoneim J. 2016. Activity of glucose isomerase from Bacillus thuringiensis under different treatments. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 579-589.

Flores-Cortés DM, Posada-Noreña J. 2009. Diseño conceptual de un reactor de lecho fluidizado a escala laboratorio para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de grado, Medellín: Universidad EAFIT.

Fogler HS. 2005. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. 4ª ed. Estado de México: Pearson Educación.

Gaily M, Basheir ME, Ahmed A, Mohammad AS. 2010. Isomerization and kinetics of glucose into fructose. International Journal of Engineering & Technology.

Hernández JP, Rodríguez-Ambriz SL, Bello-Pérez LA. 2008. Obtención de jarabe fructosado a partir de almidón de plátano (Musa paradisíaca L.) caracterización parcial. Asociación Interciencia 372-376.

Hultin HO. 1983. Current and potential uses of immobilized enzymes. Food Technology 66-82.

Iborra M, Tejero J, Cunill F. 2013. Reactores multifásicos. Universitat de Barcelona.

Illanes A, Altamirano C. 2008. Enzyme reactors. En: Enzyme Biocatalysts principles and applications. Dordrecht: Springer. 201-251.

Jørgensen OB, Karlsen LG, Nielsen NB, Pedersen S, Rugh S, Denmark B. 1988. A new immobilized glucose isomerase with high productivity produced by a strain of Streptomyces murinus. Starch Stärke 307-313.

Katchalski-Katzir E. 1993. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. Trends in Biotechnology 471-478.

Khalilpour, R, y Reza R. 2008. Development and verification of a model to describe an immobilized glucose isomerase packed bed bioreactor. Biochemical Engineering Journal 328-336.

Kumar R, Krishnamurthy SA, Shankar HS. 1996. Kinetics and reaction engineering of penicillin G hydrolysis. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 243-250.

Lama L, Nicolaus B, Calandreli B, Romano I, Basile R, Gambacorta A. 2001. Purification and characterization of thermostable xylose(glucose) isomerase from Bacillus thermoantarcticus. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 234-240.

Lee YY, Fratzke AR, Wun R, Tsao GT. 1976. Glucose isomerase immobilized on porous glass. Biotechnology and Bioengineering 389-413.

Lima BM, Fernandes P, Sampaio ND, Figueiredo-Ribeiro RC, Assis SA. 2001. Fructose syrup: A biotechnology asset. Food Technology Biotechnology 424-434.

Linko YY, Saarinen P, Linko M. 1975. Starch conversion by soluble and immobilized a-amylase. Biotechnology and Bioengineering 153-165.

Marrazo WN, Merson RL. 1975. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor kinetic parameters and mass transfer effects. Biotechnology and Bioengineering 1515-1528.

McKee T, McKee JR. 2003. Bioquímica la base molecular de la vida. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.

Nwokoro O. 2015. Studies on the production of glucose isomerase by Bacillus licheniformis. Polish Journal of Chemical Technology 84-88.

Palazzi E, Converti A. 2001. Evaluation of diffusional resistances in the process of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. Enzyme and microbial technology 28(2-3): 246-252.

Plou F, Ballesteros A. 1999. Stability and stabilization of biocatalyst. En: Stability and stabilization of enzymes, de W. J. J. van der Tweel, A Harder y R. M. Buitelaar, 304-306. Madrid. Elsevier.

Roels JA. 1983. Energetics and Kinetics in Biotechnology. Elsevier 163-203.

Tumturk H, Gokhan D, Haydar A, Serpil A, Nesrin H. 2008. Immobilization of glucose isomerase in surface-modified alginate gel beads. Journal of Food Biochemistry 32:234-246.

Vásquez-Bahena J, Montes-Horcasistas MC, Ortega-López J, Magaña-Plaza I, Flores-Cotera LB. 2004. Multiple steady states in a continuous stirred tank reactor an experimental case study for hydrolysis of sucrose by invertase. Process Biochemistry 2179-2182.

\widehat{a}_p	Área específica de partícula (m ⁻¹)					
Bim	Biot de masa					
<i>c</i> ₁	Concentración de sustrato (M)					
C 1eq	Concentración de sustrato en equilibrio (M)					
<i>C</i> ₂	Concentración de producto (M)					
C _{2eq}	Concentración de producto en equilibrio (M)					
C _{s,i}	Concentración en la superficie de la partícula (M)					
Cfeed,i	Concentración alimentada al reactor (M)					
C_i	Concentración en la fase líquida (M)					
Da	Número de Damköhler					
$d_{ ho}$	Diámetro de la partícula catalítica					
d_t	Diámetro del biorreactor					
D _{eff}	Coeficiente de difusión efectivo (m ² s ⁻¹)					
D_z	Coeficiente de dispersión axial (m ² s ⁻¹)					
$E_{V,D}$	Tasa de evaporación en el depósito de recirculación (m ³ t ⁻¹)					
[E]	Concentración de enzima (g L ⁻¹)					
j_m	Coeficiente de transferencia de masa de Colburn					
k_1, k_{-2}	Constantes de velocidad de las reacciones intermediarias (M ⁻¹ ·s ⁻¹)					
k_2, k_{-1}	Constantes de velocidad de las reacciones intermediarias					
V	(moi/(g·s))					
Λ _{eq}	Constante de equilibrio					
k_L	(m s ⁻¹)					
K_m	Constante de afinidad de Michaelis-Menten (M)					
K _{mf}	Constante de afinidad de Michaelis-Menten para la conversión					
	glucosa-fructosa (M)					
K _{mr}	Constante de afinidad de Michaelis-Menten para la conversión					
	fructosa-glucosa(M)					
L	Longitud de la cama del reactoy (m)					
Pez	Numero adimensional de Peclet					
Q	Caudal de fluidificación (m ³ s ⁻¹)					
r	Radio (m)					
$-r_1$	Velocidad de reacción de consumo de sustrato (M s ⁻¹)					
r_p	Radio de la perla biocatalítica (m)					

Re	Número adimensional de Reynolds
Sc	número adimensional de Schmidt
Sh	número adimensional de Sherwood
Umf	Velocidad mínima de fluidificación (m s ⁻¹)
Us	Velocidad superficial (m s ⁻¹)
Т	Temperatura (°C)
t	Tiempo (s)
Vañ	Volumen de agua añadida al depósito de recirculación (m ³)
V _{max}	Velocidad máxima de reacción (M min ⁻¹)
V _{mf}	Velocidad máxima de reacción para la conversión glucosa-fructosa
V _{mr}	Velocidad máxima de reacción para la conversión fructosa-glucosa (M/s)
V_{∞}	Volumen del depósito de recirculación (m ³)
X	Complejo intermediario

Alfabeto griego

- α, β, γ Parámetros usados en la Ecuación 36
 - ε Porosidad (L / L)
 - κ_{η} Factor de decaimiento de la eficiencia residual catalítica
 - μ Viscosidad de la fase fluida (kg m⁻¹·s⁻¹)
 - η Eficiencia residual catalitica
 - *P* Densidad de la fase fluida (kg m-³)
 - φ Fracción volumétrica de la fase líquida en el biorreactor (L / L)

Subíndice

- *B* Lecho fluidificado
- 0⁻ Lecho fijo
- Exp Condiciones experimentales
 - *i* Especies químicas (glucosa = 1, fructosa = 2)
- In Alimentación
- F Final
- P Partícula
- T Total
- 0 Condición inicial (Ecuación 13)