EFECTO DE LA MEMBRANA EN RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA *IN SITU* A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

KAREN ALEJANDRA BUENO-ZABALA

Tesis presentada como requisito para optar al título de Doctora en Ingeniería.
Área de Énfasis Sistemas Energéticos

Directora

ANGELA ADRIANA RUIZ-COLORADO

Ingeniera Química, Ph.D.

Docente – Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MINAS

POSGRADO EN INGENIERÍA – SISTEMAS ENERGÉTICOS

MEDELLÍN

2018

NOTA DE ACEPTACIÓN:

_____

_____

_____

_____

Ing. ANGELA ADRIANA RUIZ COLORADO, Ph.D.
Directora de Tesis

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Medellín, Mayo de 2018

DEDICATORIA

A Dios porque en su infinita gloria me brinda siempre lo mejor para mi vida, siendo este otro gran logro alcanzado.

A mi hijo Ángel Ricardo Bedoya Bueno por ser mi motivación a ser mejor persona y formarme académicamente para darte lo mejor en tu futuro.

A mi madre Olivia Zabala Quiñones, mi padre Asbel Bueno Vargas, mi hermana Lucy Carolina Bueno Zabala, mi tía Esly Lucy y el resto de mi familia porque siempre me han brindado su compresión, apoyo indispensable y palabras de aliento que me motivan a seguir adelante.

Kaleja

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Dios por darme cada día la sabiduría, inspiración, fortaleza, dirección, fe y confianza requeridas para culminar esta etapa de mi vida profesional y por haber puesto en mi camino a las personas e instituciones a las que hoy doy las gracias:

*A la profesora **Ángela Adriana Ruiz Colorado** por su apoyo continuo, dedicación, conocimientos, sugerencias y compresión.*

*Al Grupo de Investigación "**Bioprocesos y Fluxs Reactivos**" y al "**Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e biotecnologie**" especialmente a los profesores **Stefano Curcio, Sudip Chakraborty, Catia Lopresto, Aldo Borzillo** y **Vincenza Vincenza Calabrò,** quienes me permitieron conocer y ampliar mi conocimiento en membranas y estuvieron siempre disponibles para sacar adelante mi trabajo, haciendo lo inalcanzable para brindarme los recursos y cumplir los objetivos planteados.*

*A los estudiantes **Kelly Johana Bentacur, Juan Camilo Acosta, John Henry Castro, Yeison Tangarife, Alejandra María Peláez, Lizeth Lenis y César Gómez,** que por su colaboración continúa e incondicional pude culminar las fases experimentales de mi trabajo de grado.*

*A mis amigos **Nataly Bonilla, Edison Berrio, Ranj Kareem, Rodrigo Benitez, Federica Costantino** y todos los demás amigos, por brindarme su sincero apoyo, y llenar de felicidad cada uno de mis días junto a ustedes en el camino de obtener este gran logro en mi vida.*

*A la **Universidad Nacional de Colombia** y **la Università della Calabria** por permitir formarme como investigadora y apoyarme en el desarrollo del trabajo de investigación.*

*A **COLCIENCIAS** por su apoyo financiero mediante la otorgación de la Beca - Crédito para el desarrollo de mis estudios doctorales.*

*A los evaluadores **Ph. D. María Elena Lienqueo, Ph. D. Hernán Darío Álvarez y Ph. D.Vincenza Calabrò** por su total disposición y valiosos aportes.*

RESUMEN

Los jarabes de glucosa se pueden obtener a partir de la hidrólisis del almidón. Esta técnica ha sido utilizada durante muchos siglos presentando como principal desventaja la inhibición de enzimas y necesitar una posterior purificación de los jarabes obtenidos. Una de las maneras de disminuir estas desventajas es la integración del sistema de reacción de hidrólisis enzimática junto con la separación de producto por medio de membranas, llamado "In Situ Product Recovery (ISPR)". Los estudios reportados utilizando ISPR, se han enfocado en la alimentación continua de sustrato y han observado un incremento de las eficiencias comparados con producción en discontinuo. Además, otros estudios con diferentes enzimas han reportado que existe inmovilización en las membranas por mecanismos de ensuciamiento. Sin embargo, hasta el momento no se han explicado las reacciones que ocurren en la membrana y los parámetros de operación que afectan la producción de jarabes de glucosa en el proceso ISPR.

Esta investigación tuvo como propósito establecer el efecto de las enzimas inmovilizadas por ensuciamiento de la membrana en el diseño del proceso de hidrólisis enzimática y recuperación de jarabe de glucosa *in situ*. Se realizaron cinco etapas presentadas en cada capítulo. En la primera etapa se realizó una revisión conceptual de los parámetros de operación de los procesos de hidrólisis enzimática y separación con membranas, identificando el pH y la temperatura como parámetros en común que pueden afectar la inmovilización de las enzimas durante la operación del ISPR.

La segunda etapa evaluó el proceso de hidrólisis enzimática para la licuefacción y sacarificación del almidón de trigo y su aplicación en un residuo agroindustrial. Se llevaron a cabo diseños estadísticos de superficie de respuesta, encontrándose las mejores condiciones para la producción de glucosa y un modelo empírico en modo discontinuo evaluando los parámetros de operación como pH, temperatura y relación enzima/sustrato. En la tercera etapa se realizó una revisión de los diferentes modelos cinéticos planteados para la hidrólisis enzimática en procesos discontinuos. Se seleccionó el modelo representado por Morales et al. (2008) el cual plantea los efectos de la producción de los diversos oligosacáridos, temperatura e inactivación enzimática para los procesos de licuefacción y sacarificación. Se adicionó el efecto del pH según lo planteado por Tijskens et al. (2001) y se validó el modelo presentando un buen ajuste de parámetros.

Teniendo claro el comportamiento de la hidrólisis enzimática en procesos discontinuos, se realizó la etapa cuatro, evaluando los parámetros en común de la hidrólisis enzimática y el proceso de membranas. Para poder identificar el efecto que genera el uso de membranas en la hidrólisis enzimática, se operó el sistema en modo de diafiltración discontinua, evitando el ingreso de nuevo sustrato y enzimas que puedan influenciar en el incremento de la producción de glucosa. Como aporte novedoso de investigación, se utilizaron membranas sumergidas con material PVDF en un reactor de 1,5L, las cuales no han sido reportadas hasta el momento. Se realizó un diseño

estadístico de Box-Baken observando los efectos de pH y temperatura que mejoran la producción de jarabes de glucosa, analizando la respuesta de estos parámetros respecto al flux de las membranas. Esta etapa permitió obtener las mejores condiciones que maximizan la producción de jarabes de glucosa y se validó que existe inmovilización de enzimas en las membranas al operar el proceso ISPR.

Con la validación de las enzimas inmovilizadas, se realizó la última etapa en la que se plantea un modelo heterogéneo, identificando los efectos de transferencia de masa interna y externa por las enzimas inmovilizadas en la membrana, y el aporte de las enzimas libres en el proceso ISPR. Se utilizó como base el modelo de hidrólisis enzimática para la sacarificación de la etapa tres, que incluye la producción de los diversos oligosacáridos, efectos de temperatura, inactivación enzimática y pH. Posteriormente se realizó la cinética del almidón de trigo puro y un residuo agroindustrial, validando el modelo heterogéneo. Este nuevo modelo heterogéneo planteado presenta un nuevo aporte a la comunidad científica, siendo más completo que los modelos básicos de Michaels-Menten que se han reportado. Además, este modelo se puede aplicar a otros sistemas con enzimas inmovilizadas y libres en el mismo reactor.

En general, los resultados de esta investigación permitieron establecer el efecto de las enzimas inmovilizadas por ensuciamiento de la membrana durante la operación del proceso ISPR en modo de diafiltración, con membranas sumergidas y utilizando el material PVDF. Este aporte permitirá complementar un análisis específico de los efectos de transferencia de masa y no únicamente enfocándose en las eficiencias del proceso como lo reportado en estudios con alimentación continua.

Palabras clave:
Biorreactor de membranas, catálisis enzimática, inmovilización, jarabes de glucosa, modelo heterogéneo, residuo agro-industrial.

ABSTRACT

Glucose syrups can be getting from starch hydrolysis. This method has been used during centuries ago with the disadvantages as the enzyme inhibition and purification process. A way to decrease the disadvantages is with the process called In Situ Product Recovery – ISPR, consisting of the integration between hydrolysis process and membranes. The previous articles have used continuous substrate feed and they show more efficiency compared with fed-batch. Also, others articles with different kind of enzymes have showed that the enzymes can be immobilized by membrane fouling. So far, there is not an explanation about the reaction inside the membrane and the parameters that affect the glucose syrup production on ISPR process.

The objective for this research was establish of the effect from immobilized enzymes by fouling of the membrane in the design of starch hydrolysis process and in situ glucose syrup recovery. There were five stages present in every chapter. The first chapter presents a review about the operation parameters of the enzymatic hydrolysis and separation with membranes. The pH and temperature are the common parameters between both process and they can affect the enzyme immobilization during the operation ISPR.

The second stage evaluated the enzymatic hydrolysis for the liquefaction and saccharification process with pure wheat starch and its application with an agro-industrial waste. A response surface design was applied to get the best conditions for the glucose syrup production and a fed-batch empiric model with pH, temperature and enzyme/substrate rate. The third stage shows an enzymatic hydrolysis kinetic model review in batch process. The most completely model has the effect on the oligosaccharides production, temperature and enzyme inactivation for the liquefaction and saccharification process. The model improved with the addition of pH effect and validate with well adjust parameters.

The fourth stage evaluated the common parameters between enzymatic hydrolysis and membrane process. To identify the effect to use membranes with enzymatic hydrolysis, ISPR process operated in diafiltration semi-continuous mode avoid adding new substrate and enzymes that they can increase the glucose syrup production. Innovate contribution of this research is the use of submerge membranes PVDF in 1.5L volume reactor, there are not any report. Statistical design of Box-Baken was applied with pH and temperature parameters to get the best conditions and maximize the glucose syrups. Also, this stage shows that the enzymes are immobilized in/on the membrane when ISPR process has operated.

With the enzymes immobilized in/on the membrane, the last stage shows a new heterogeneous model. This model identified the internal and external mass transfer by enzymes immobilized in/on the membrane with Michaels-Menten kinetic. The model was validated with pure wheat starch and an agro-industrial waste. This new heterogeneous model presents a new contribution for the scientific community because it is more complete than others basic models reported. Also, this model can be used in others systems with enzymes immobilized and free in the same reactor.

In general, the results of this research allow establish the effect of enzymes immobilized by fouling of the membrane during the ISPR operation in diafiltration mode, submerges membranes and PVDF material. This contribution will allow a specific analysis effect of internal and external mass transfer, different with the other research focus in the efficiency of the process.

Key words:
Agro-industrial waste, enzymatic hydrolysis, glucose syrups, heterogeneous model, immobilization, membrane bioreactor.

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de las enzimas inmovilizadas por ensuciamiento de la membrana en el diseño del proceso de hidrólisis enzimática y recuperación de jarabe de glucosa *in situ*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar las variables y parámetros de operación más importantes de la hidrólisis enzimática y separación por membranas que incrementan la inmovilización de enzimas.

- Formular la cinética heterogénea para el proceso de hidrólisis con enzimas inmovilizadas por ensuciamiento de la membrana.

- Integrar el proceso de hidrólisis enzimática con la cinética heterogénea de las enzimas inmovilizadas en la membrana

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **5**

ABSTRACT **7**

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN **9**

OBJETIVO GENERAL **9**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **9**

CAPÍTULO 1: ..... **FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES DE LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA Y APLICACIÓN CON MEMBRANAS** **18**

1.1 INTRODUCCIÓN 18
1.2 PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA 18
1.3 PURIFICACIÓN DEL JARABE DE GLUCOSA 27
1.4 RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A PARTIR DE MEMBRANAS 30
1.4.1 Materiales, módulos de membranas y tamaño de poro *31*
1.4.2 Configuración de las membranas *32*
1.4.3 Limpieza de membranas *34*
1.4.4 Parámetros de operación que afectan la inmovilización de enzimas en membranas *36*
1.5 BIBLIOGRAFÍA 38

CAPÍTULO 2: ..... **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA** **48**

2.1 INTRODUCCIÓN 48
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS 48
2.2.1 Caracterización de materias primas y medición de actividad enzimática específica *48*
2.2.2 Condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa *49*
2.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS 51
2.3.1 Caracterización de materias primas y medición de actividad enzimática específica *51*
2.3.2 Condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa *55*
2.3.2.1 Proceso de licuefacción 55
2.3.2.2 Proceso de sacarificación 62
2.4 CONCLUSIONES 73
2.5 BIBLIOGRAFÍA 74

CAPÍTULO 3: ..... **MODELO MATEMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA EN SISTEMAS DISCONTINUOS** **78**

3.1 INTRODUCCIÓN 78
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS 79
3.2.1 Modelo de licuefacción *79*
3.2.2 Modelo de sacarificación *81*
3.2.3 Validación del modelo *84*
3.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS 85

3.3.1 Modificación del modelo de licuefacción y sacarificación 85
3.3.2 Validación del modelo con almidón de trigo y residuo agroindustrial 87
3.4 CONCLUSIONES 92
3.5 BIBLIOGRAFÍA 92

CAPÍTULO 4: ..... PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA *IN SITU* A TRAVÉS DE MEMBRANAS SUMERGIDAS 95

4.1 INTRODUCCIÓN 95
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 96
4.2.1 Identificación de las condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas 97
4.2.2 Verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor 100
4.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS 101
4.3.1 Identificación de las condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas 101
4.3.2 Verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor 105
4.4 CONCLUSIONES 108
4.5 BIBLIOGRAFÍA 109

CAPÍTULO 5: ..... CINÉTICA HETEROGÉNEA PARA LA PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA *IN SITU* A TRAVÉS DE MEMBRANAS SUMERGIDAS 114

5.1 INTRODUCCIÓN 114
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS 120
5.2.1 Desarrollo del modelo heterogéneo de hidrólisis enzimática en membranas 122
5.2.2 Validación experimental del modelo con almidón y residuo agroindustrial 129
5.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS 131
5.3.1 Desarrollo del modelo heterogéneo de hidrólisis enzimática en membranas 131
5.3.2 Validación experimental del modelo con almidón y residuo agroindustrial 139
5.4 CONCLUSIONES 141
5.5 BIBLIOGRAFÍA 141

CONCLUSIONES GENERALES 144

ANEXOS 146

ANEXO 1. PROTOCOLOS DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA ALFA-AMILASA Y GLUCOAMILASA 146

ANEXO 2. PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO BRADFORD 154

ANEXO 3. ENSAYOS PRELIMINARES DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA EL PROCESO DE LICUEFACCCIÓN 157

ANEXO 4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DEL MODELO EMPÍRICO ESTADÍSTICO PARA EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN PARA EL ALMIDÓN DE TRIGO PURO 165

ANEXO 5. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DEL MODELO EMPÍRICO ESTADÍSTICO PARA EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN PARA EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 166

ANEXO 6. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DEL MODELO EMPÍRICO ESTADÍSTICO PARA EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN PARA EL ALMIDÓN DE TRIGO PURO 167

ANEXO 7. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DEL MODELO EMPÍRICO ESTADÍSTICO PARA EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN PARA EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 168

ANEXO 8. CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN EN MATLAB PARA EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN 169

ANEXO 9. RESULTADOS DE CINÉTICA DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN PARA ALMIDÓN DE TRIGO PURO 171

ANEXO 10. RESULTADOS DE CINÉTICA DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN PARA EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 172

ANEXO 11. CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN EN MATLAB PARA EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN 173

ANEXO 12. RESULTADOS DE CINÉTICA DEL PROCESO DE SACARIFICACIÓN PARA ALMIDÓN DE TRIGO PURO 176

ANEXO 13. RESULTADOS DE CINÉTICA DEL PROCESO DE SACARIFICACIÓN PARA EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 177

ANEXO 14. CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN EN R 178

ANEXO 15. RESULTADOS DE ALMIDÓN DE TRIGO PURO 10% DE SÓLIDOS MODO DISCONTINUO 179

ANEXO 16. RESULTADOS DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 10% DE SÓLIDOS MODO DISCONTINUO 180

ANEXO 17. PROPIEDADES DE COMPONENTES DE REACCIÓN 181

ANEXO 18. CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN EN MATLAB PARA MODELO HETEROGÉNEO 182

ANEXO 19. RESULTADOS DE ALMIDÓN DE TRIGO PURO 10% DE SÓLIDOS CON MEMBRANAS 194

ANEXO 20. RESULTADOS DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL 10% DE SÓLIDOS CON MEMBRANAS 197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Contenido y composición de diferentes fuentes de almidón 19
Tabla 1.2 Condiciones de proceso de gelatinización para diferentes materias primas de almidón 21
Tabla 1.3 Condiciones del proceso de licuefacción para diferentes materias primas de almidón 23
Tabla 1.4 Condiciones del proceso de sacarificación para diferentes materias primas de almidón 25
Tabla 1.5 Diferentes presiones de trabajo en procesos de membrana 28
Tabla 1.6 Comparación de las características para membranas sumergidas y externas 33
Tabla 2.1 Métodos para la caracterización de biomasas 49
Tabla 2.2 Peso retenido en cada malla del residuo agroindustrial con característica salada 51
Tabla 2.3 Peso retenido en cada malla del residuo agroindustrial con característica dulce 52
Tabla 2.4 Resultados caracterización de la mezcla del residuo agroindustrial y almidón de trigo puro comparado con otros estudios 54
Tabla 2.5 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial 56
Tabla 2.6 ANAVA de licuefacción del residuo agroindustrial 56
Tabla 2.7 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial 57
Tabla 2.8 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro 59
Tabla 2.9 ANAVA de licuefacción de almidón de trigo puro 59
Tabla 2.10 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro 60
Tabla 2.11 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de sacarificación del residuo agroindustrial 62
Tabla 2.12 ANAVA de sacarificación del residuo agroindustrial 63
Tabla 2.13 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial 67
Tabla 2.14 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de sacarificación del almidón de trigo puro. 68
Tabla 2.15 ANAVA de sacarificación del almidón de trigo puro. 68
Tabla 2.16 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro 73
Tabla 3.1 Reacciones principales y valores de m para oligosacáridos con un GP igual a n 80
Tabla 3.2 Condiciones de licuefacción para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo 84
Tabla 3.3 Condiciones de sacarificación para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo ... 85
Tabla 3.4 Parámetros de licuefacción para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 87
Tabla 3.5 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 89
Tabla 3.6 Parámetros de sacarificación para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 90
Tabla 3.7 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 91
Tabla 4.1 Caracterización del almidón de trigo puro 96
Tabla 4.2 Condiciones del ensayo para maximizar la producción de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir de almidón de trigo puro 99
Tabla 4.3 Condiciones de máxima producción de glucosa con biorreactores de membranas a partir de almidón de trigo puro 100

Tabla 4.4 Matriz del diseño estadístico con valores experimentales para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro 101
Tabla 4.5 ANAVA para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro 102
Tabla 4.6 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso ISPR del almidón de trigo puro 103
Tabla 5.1 Condiciones de los procesos de producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir de almidón de trigo puro 121
Tabla 5.2 Condiciones de los procesos de producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir del residuo agroindustrial 121
Tabla 5.3 Parámetros ajustados del modelo de sacarificación homogéneo a los datos experimentales de hidrólisis con membranas 132
Tabla 5.4 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 132
Tabla 5.5 Coeficientes de difusividad y difusividad efectiva para los oligosacáridos del almidón de trigo puro y residuo agroindustrial 133
Tabla 5.6 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial 140

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1.1 Enlaces glucosídicos de almidón para amilosa y amilopectina. 19
Figura 1.2 Representación esquemática de la estructura granular del almidón: (a) un gránulo con capas amorfas y semicristalinas, (b) vista expandida de la capa semicristalina de un anillo creciente. 19
Figura 1.3 Operaciones para la producción de jarabes de glucosa a partir de enzimas..... 20
Figura 1.4 Diagrama de fase del estado y la transición de fase del almidón con perfil de temperatura..... 21
Figura 1.5 Esquema del efecto de la acción de las enzimas que degradan el almidón..... 22
Figura 1.6 Mecanismos de las O-glicosil hidrolasas: (a) mecanismo de retención; (b) mecanismo de inversión 25
Figura 1.7 Corrientes dentro de las membranas 28
Figura 1.8 Posibles resistencias sobre el transporte de solvente 29
Figura 1.9 Principio de la eliminación de la glucosa durante la hidrólisis enzimática para disminuir la inhibición del producto de las enzimas. 31
Figura 1.10 Modos de configuración de las membranas en los procesos de hidrólisis enzimática, membrana externa y membrana sumergida. 33
Figura 1.11 Efecto de polarización de la concentración en membranas 34
Figura 1.12 Flux transmembranal frente al contenido de sólidos 35
Figura 1.13 Efecto de los tipos de ensuciamiento en membranas 35
Figura 2.1 Montaje de tamices con residuo agroindustrial con característica salada..... 52
Figura 2.2 Montaje de tamices con residuo agroindustrial con característica dulce 52
Figura 2.3 Análisis granulométrico diferencial (izquierda) y acumulado (derecha) del residuo agroindustrial con características saladas 53
Figura 2.4 Análisis granulométrico diferencial (izquierda) y acumulado (derecha) del residuo agroindustrial con características dulces 53
Figura 2.5 Resultados de contorno y superficie de respuesta del proceso de licuefacción. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares reductores como variable respuesta para el residuo agroindustrial. 58
Figura 2.6 Resultados de contorno y superficie de respuesta. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares reductores como variable respuesta. 61
Figura 2.7 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y %E/S con pH constante de 4,25 unidades (punto central del diseño). 64
Figura 2.8 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y pH con E/S constante de 0,3% (punto central del diseño). 65
Figura 2.9 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre pH y E/S constante de temperatura en 52,5°C (punto central del diseño). 66
Figura 2.10 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y %E/S con pH constante de 4,25 (punto central del diseño). 70
Figura 2.11 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y pH con E/S constante de 0,3% (punto central del diseño). 71
Figura 2.12 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre pH y E/S constante de temperatura en 52,5°C (punto central del diseño) 72
Figura 3.1 Resultados de simulación para licuefacción con el almidón de trigo puro 88

Figura 3.2 Resultados de simulación para licuefacción con el residuo agroindustrial 88
Figura 3.3 Resultados de simulación para sacarificación con el almidón de trigo puro 90
Figura 3.4 Resultados de simulación para sacarificación con el residuo agroindustrial 91
Figura 4.1 Montaje del diseño de experimentos para la maximización de glucosa con membranas sumergidas. 1) Sistema de control de temperatura, pH y bomba de vacío. 2) Manómetro para medir la presión. 3) Bomba para adición de buffer. 4) Sistema de hidrólisis enzimática con membranas sumergidas. 5) Recolección de permeado 97
Figura 4.2 Acercamiento de la operación del ISPR. A) Reactor de hidrólisis enzimática con membranas sumergidas. B) Membranas de fibra hueca dentro del reactor ISPR. C) Membranas PVDF. 98
Figura 4.3 Saturación de membranas con concentración de 20% p/p de sólidos 98
Figura 4.4 Resultados de superficie de respuesta para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro. Interacción entre la temperatura (°C) y el pH (Unidades) con glucosa (g/L) como variable respuesta. 103
Figura 4.5 Efectos del pH (unidades) en el flux (L/m2.h) para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro 104
Figura 4.6 Efectos de la temperatura (°C) en el flux (L/m2.h) para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro 105
Figura 4.7 Concentración de oligosacáridos de grado de polimerización 1 a 5 obtenidos durante la filtración de maltodextrinas. 106
Figura 4.8 Producción y separación del jarabe de glucosa en biorreactores de membrana 106
Figura 5.1 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa interna y externa 114
Figura 5.2 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa interna. 118
Figura 5.3 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa externa. 119
Figura 5.4 Cinética de hidrólisis enzimáticas en modo discontinuo para el almidón de trigo puro 131
Figura 5.5 Cinética de hidrólisis enzimáticas en modo discontinuo para el residuo agroindustrial 131
Figura 5.6 Módulo de Thiele (ϕm) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del almidón de trigo puro 134
Figura 5.7 Factor de efectividad interna (ηim) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del almidón de trigo puro 134
Figura 5.8 Módulo de Thiele (ϕm) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del residuo agroindustrial 135
Figura 5.9 Factor de efectividad interna (ηim) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del residuo agroindustrial 135
Figura 5.10 Módulo observable de transferencia de masa externa para el almidón de trigo puro 136
Figura 5.11 Factor de efectividad externo para el almidón de trigo puro 136
Figura 5.12 Módulo observable de transferencia de masa externa para el residuo agroindustrial 137
Figura 5.13 Factor de efectividad externo para el residuo agroindustrial 137
Figura 5.14 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita para efectos de transf. De masa externa A) con efectos B)Sin efectos. 138
Figura 5.15 Comportamiento del flux durante la operación del ISPR con almidón de trigo puro 138
Figura 5.16 Comportamiento del flux durante la operación del ISPR con residuo agroindustrial. 139

Figura 5.17 Cinética de hidrólisis enzimáticas con efectos de transferencia de masa para el almidón de trigo puro 139
Figura 5.18 Cinética de hidrólisis enzimáticas con efectos de transferencia de masa para el residuo agroindustrial 140

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES DE LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA Y APLICACIÓN CON MEMBRANAS

1.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se sintetizan algunos conceptos y aspectos claves de los procesos de hidrólisis enzimática y operación con membranas. En el proceso de hidrólisis enzimática se presentan las características de la producción de jarabes de glucosa como la gelatinización, licuefacción y sacarificación. Se incluyen los parámetros de operación que influyen en la producción de jarabes de glucosa a partir de almidón. Posteriormente, para el proceso de membranas, se presentan conceptos claves de operación y aplicación en la recuperación de jarabes de glucosa. Y finalmente, se presentan los parámetros de operación en común entre el proceso de hidrólisis enzimática y membranas que afectan la inmovilización de enzimas.

1.2 PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA

Los jarabes son líquidos de consistencia viscosa que generalmente están conformados por soluciones concentradas de azúcares como la sacarosa (azúcar común), en agua o en otro líquido. Los jarabes se usan desde hace mucho tiempo y antes de descubrirse el azúcar, éstos se preparaban con miel (Gerena Barón, 2013).

El jarabe de glucosa es uno de los productos más utilizados por diversos tipos de industrias como fermentación alcohólica, alimentos, helados, confitería, carnes procesadas, farmacéuticos, entre otros (Dávila et al. 2014; Rodríguez Reinoso, 2011). Éstos aportan textura, brillo, disminuyen la temperatura de congelación, es anticristalizante del azúcar y regulador del dulzor (Hull, 2010; Rodríguez Reinoso, 2011) y se pueden obtener a partir de residuos agroindustriales que contengan celulosa y/o almidón.

El almidón es la fuente de carbohidratos más importante en el planeta y su producción mundial ha aumentado continuamente en los últimos años, debido a la demanda constante de las industrias que consumen almidón (Fujita, 2017; Hua & Ruijin, 2016). Químicamente, el almidón se compone de dos polímeros de diferente estructura: la amilosa y la amilopectina. La amilosa contiene el monómero de D-Glucosa representado como anillos de piranos, unidos en el enlace glucosídico α-1,4, siendo un polímero de cadena lineal o recta (Cruz, 2012). La amilopectina, con mayor peso molecular, es un polímero del monómero de D-Glucosa de cadenas ramificadas de longitud mediana unidos en la cadena principal mediante el enlace glucosídico α-1,4 y con enlaces α-1,6 en los puntos de ramificación, formando una estructura ramificada (Fujita, 2017) como se observa en la Figura 1.1.

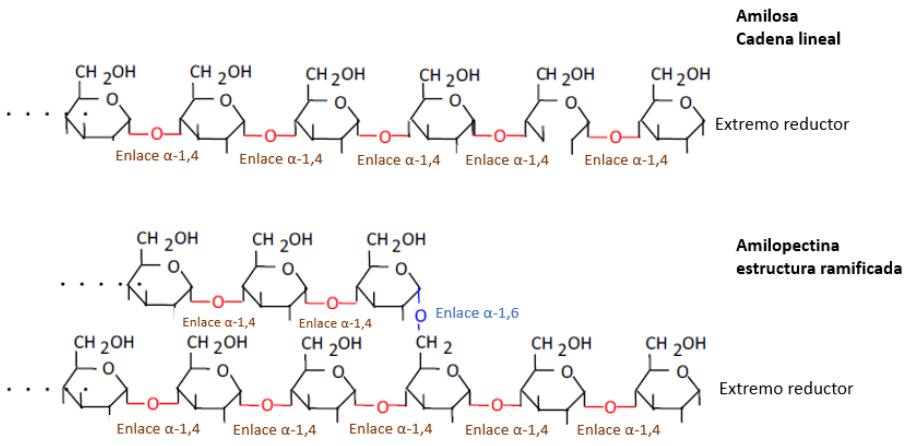


Figura 1.1 Enlaces glucosídicos de almidón para amilosa y amilopectina.
Fuente: Modificado de Fujita (2017)

Generalmente, la amilopectina representa entre 70 – 80% p/p y la amilosa entre 20 – 30% p/p del almidón en base seca (Acevedo-Estupiñan et al. 2015). La composición química del almidón varía dependiendo de la fuente, como se observa en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Contenido y composición de diferentes fuentes de almidón

Materia prima	% Almidón	%Amilosa	%Amilopectina
Arroz	62 – 86	18	82
Maíz	70 – 75	26	74
Trigo	57 – 75	25	75
Yuca	14 – 40	17	83
Papa	12 – 14	20	80

Fuente: Hua & Ruijin (2016); Mahmood et al. (2017)

La Tabla 1.1 presenta las principales fuentes industriales de almidón como arroz, maíz, trigo, yuca y papa (Apar & Özbek, 2007). Los porcentajes de almidón de estas fuentes varían entre un 12 a 86%, presentando al maíz, trigo y papa un mayor contenido de amilosa, lo que facilitaría la producción de jarabes de glucosa.

La amilopectina es la responsable de la estructura del gránulo de almidón, el cual consiste de áreas cristalinas (cristales, micelas) y no cristalinas (amorfas, fase gel), arregladas en capas concéntricas como se presenta en la Figura 1.2.

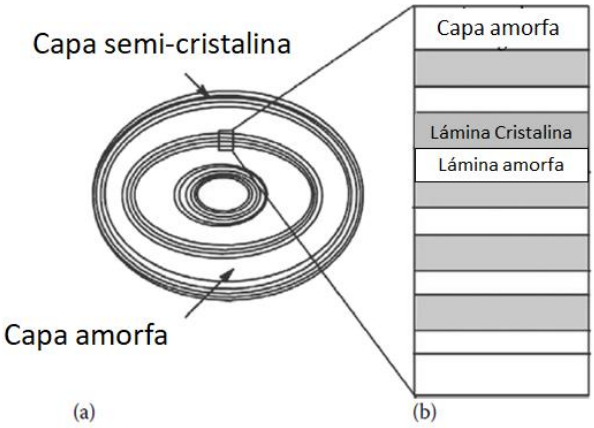


Figura 1.2 Representación esquemática de la estructura granular del almidón: (a) un gránulo con capas amorfas y semicristalinas, (b) vista expandida de la capa semicristalina de un anillo creciente.
Fuente: Sandoval et al. (2005)

Las capas cristalinas están conformadas por dobles hélices de las ramificaciones de la amilopectina, mientras que los puntos de ramificación están en las zonas amorfas. El almidón presenta un grado de cristalinidad entre 20-40% (Sandoval et al. 2005).

Para obtener los jarabes de glucosa se llevan a cabo cuatro operaciones: Gelatinización, licuefacción, sacarificación y purificación, representados en la Figura 1.3.

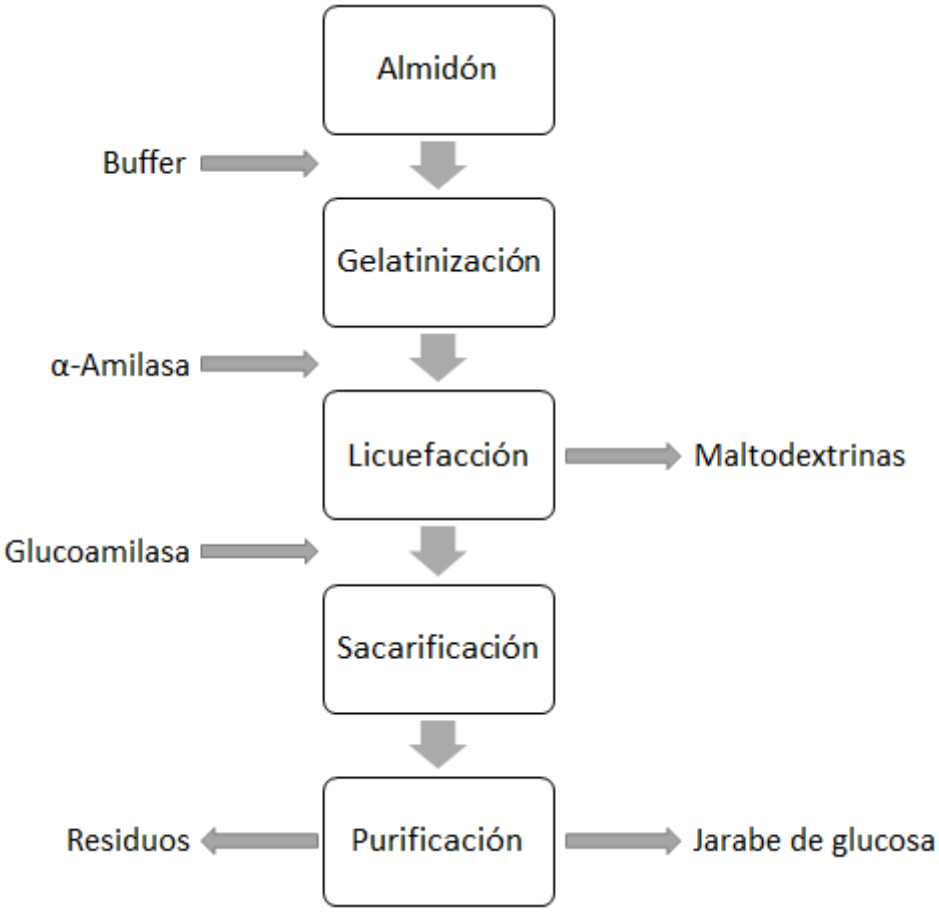


Figura 1.3 Operaciones para la producción de jarabes de glucosa a partir de enzimas
Fuente: Elaboración propia

La producción de jarabes de glucosa comienza con la gelatinización, ya que los gránulos de almidón son prácticamente insolubles en agua fría. Por lo tanto, se calientan con exceso de agua para liberar los polímeros de amilosa y amilopectina, permitiendo el acceso de las enzimas para la producción del jarabe (Ruiz et al. 2011).

La Figura 1.4 presenta las transiciones de fase de estado y de aparición del almidón durante el calentamiento. Calentar una mezcla de almidón y agua experimenta, en primer lugar, la transición vítrea reversible. Si la temperatura aumenta más, se puede detectar el proceso de gelatinización irreversible (Sandoval et al. 2005; Schirmer et al. 2015).

La transición vítrea de las suspensiones es una transición inducida por la temperatura de un estado vítreo amorfo a un estado progresivamente más viscoso. Esta "absorción de agua" en regiones amorfas es ciertamente posible antes de que se completen los pasos irreversibles dentro del proceso de gelatinización. Los cambios estructurales resultantes de la transición vítrea facilitan la hidratación y la disociación de dobles hélices en cristalitos. La disociación de los cristalitos se inicia después de la temperatura de

transición vítrea de las regiones amorfas, y se denomina gelatinización (Schirmer et al. 2015).

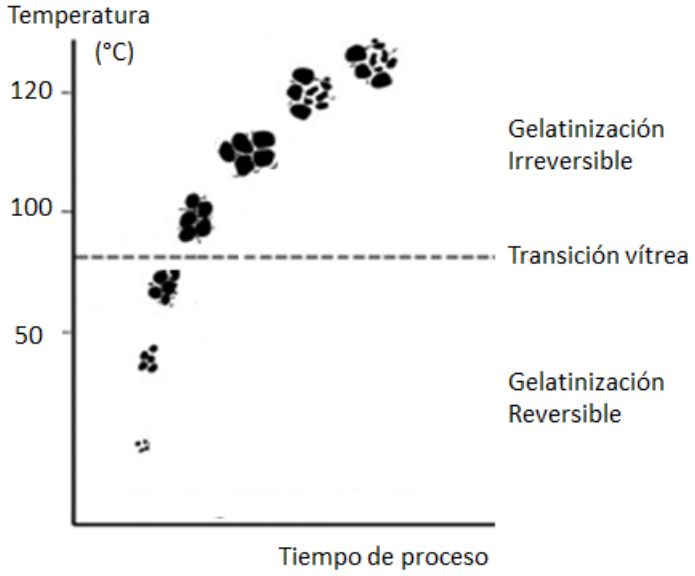


Figura 1.4 Diagrama de fase del estado y la transición de fase del almidón con perfil de temperatura. Fuente: Modificado de Schirmer et al. 2015

La gelatinización se inicia por la absorción de agua en los gránulos que conduce a la hidratación de la capa amorfa y la interrupción simultánea de enlaces de hidrógeno. En un cierto grado de expansión de los gránulos provocada por la hidratación, las tensiones desestabilizadoras y perturbadoras inducidas por el hinchamiento de los anillos amorfos se transmiten además a los cristalitos. Este proceso está mediado por largas cadenas amilopectina que interconectan los grupos de cadenas laterales dentro de las regiones semicristalinas, así como dentro de las dos regiones alternas semicristalinas y amorfas. La continua transferencia de calor da como resultado cambios irreversibles comprobados con la gelatinización de los gránulos de almidón (Jenkins & Donald, 1998).

La gelatinización representa la mayoría de los cambios estructurales de los gránulos de almidón que se producen durante el calentamiento de un sistema con una relación almidón/agua. Estos cambios ocurren en un rango de temperatura definido para diferentes fuentes de almidón debido a las propiedades específicas (Schirmer et al. 2015). La Tabla 1.2 presenta un rango de contenido de agua, temperaturas y tiempos utilizados para el proceso de gelatinización y diferentes materias primas.

Tabla 1.2 Condiciones de proceso de gelatinización para diferentes materias primas de almidón

Tipo Almidón	**Dosis de almidón (%p/p)**	**Temperatura (°C)**	**Tiempo (horas)**	**Referencia**
Trigo	32-35	105 - 110	0,08-0,12	Genencor, 2006
	5-20	50-90	0,1-1	Baks et al. 2008
Yuca	10	66	0,5	Ruiz et al. 2011
	20	60	1	Krajang & Chamsart, 2015
Papa	28	97	0,5	Betiku et al. 2013
Maíz	10-60	90	1	Li et al. 2015
	70 apróx.	90	0,08-0,25	Zabed et al. 2016

Dependiendo de la estructura del almidón semicristalino, la temperatura exacta para la transición vítrea puede ser difícil de detectar, lo cual se observa en la Tabla 1.2. En general, se han evaluado diferentes dosis de almidón o contenido de agua, utilizando temperaturas promedio entre 50 a 110°C con un tiempo entre 0,08 y 1h. Esto es debido a la dependencia de la temperatura de la transición vítrea, la cual se ve afectada por factores como las propiedades de barrera del almidón amorfo (permeabilidad y porosidad), la densidad, el volumen libre y la densidad energética (Schirmer et al. 2015).

A partir del almidón gelatinizado se continúa con el proceso enzimático utilizando amilasas: alfa-amilasas para el proceso de licuefacción y glucoamilasas para el proceso de sacarificación. La Figura 1.5 presenta un esquema de la acción de estas enzimas en el almidón.

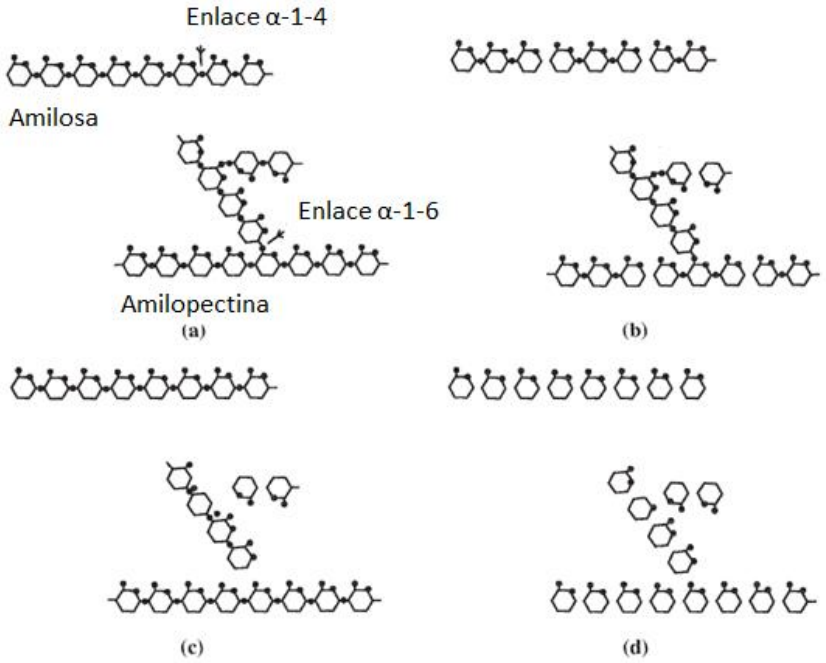


Figura 1.5 Esquema del efecto de la acción de las enzimas que degradan el almidón. (a) estructuras de amilosa y amilopectina. (b) Efecto de a-amilasa fúngica sobre amilosa y Amilopectina (proceso de licuefacción). (c) Efecto de una enzima desramificante sobre amilosa y Amilopectina (proceso de licuefacción). (d) Efecto de la enzima glucoamilasa en amilosa y Amilopectina (proceso de sacarificación).
Fuente: Olsen, 1995

La licuefacción es llevado a cabo por enzimas alfa-amilasas que hidrolizan aleatoriamente el enlace químico α-1-4 en amilosa y amilopectina, produciendo maltodextrinas con 5 a 10 unidades de glucosa, pequeñas cantidades de polisacáridos de alto peso molecular, maltosas, maltotriosas y maltopentosas con un equivalente de dextrosa (DE) entre 15-30 (Baks et al. 2008; Ruiz et al. 2011; Cruz, 2012; Tomasik & Horton, 2012). Este procesamiento enzimático del almidón permite una reducción rápida en la viscosidad de la solución en virtud de una hidrólisis parcial (Cruz, 2012). La Tabla 1.3 presenta condiciones del proceso de licuefacción para diferentes materias primas.

Tabla 1.3 Condiciones del proceso de licuefacción para diferentes materias primas de almidón

Tipo Almidón	Enzima	Relación E/S (%)	Temperatura (°C)	pH (und)	Tiempo (Hora)	Referencia
Trigo	α amilasa de *B. licheniformis* MB-80	56 U/mL	100	7,0	NR	Yankov et al. 1986
	α amilasa BAN 240L de Novo Nordisk	0,15%p/p	80	6,5	NR	Ewa Nebesny, 1998
	Gemsize 4A	0,25 %v/v	65	6,5	0,5	Ozbek & Yuceer, 2001
	α amilasa A6814, A6211 y A3403 de Sygma company.	NR	40	6,5	1,5	Apar & Ozbek, 2004a
	Termamyl type L. De Novozymes	10%p/p	50	5,8	NR	Baks et al. 2008
	Liquozyme SC DS de Novozymes.	130 U/g	80	5,0	NR	Ruiz et al. 2011
	Liquozyme Supra de Novozymes	0,068%p/p	90	7,0	2	Smrčková et al. 2013
Yuca	Starmax TG 120 de Prozyn	0,8%p/p	95	5,5	1	Collares et al. 2012
	Liquozyme SC DS de Novozymes.	0,01-0,2%p/p	85	4,5-5,0	2	Virunanon et al. 2013
	Amilasa UEB-S (purificada)	4U,90U y 135U	80	5,0	2	Khawla et al. 2014
	Spezyme alpha de *Bacillus licheniformis* de Genencor	NR	40	NR	Cinética de 72h	Krajang & Chamsart, 2015
Papa	Spezyme® Fred de Genencor	0,66%p/p	90	5,8	1,5	Murthy et al. 2009
	Enzima purificada	1%v/v	56,4	6,5	1	Betiku et al. 2013
Maíz	Spezyme® Fred from Genencor	NR	90	5,8	1	Johnston & McAloon 2014
	Alfa amilasa de *Bacillus subtilis*	12 U/ g de almidon	90	6,0	2	Li et al. 2015
	Spezyme® Fred de Genencor	0,003% p/p	90	6	2	Zabed et al. 2016

NR: No reporta

Como se observa en la Tabla 1.3 existen diferencias entre las condiciones del proceso de licuefacción dependiendo de las propiedades, tipo y porcentaje de almidón utilizado que define la dosis de enzima/sustrato oscilando entre 0,003 hasta 10%p/p. En general, enzimas alfa-amilasas tienen mejor desempeño en el rango de temperatura 40-100°C y pH de 4,5-7,0 lo que indican que toleran los medios alcalinos mejor que las soluciones ácidas.

Las enzimas alfa-amilasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos (Presečki et al. 2013). Las α-amilasas producidas por el género *Bacillus*, como *Bacillus*

licheniformis, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Pandey et al. 2000; Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2007) y algunos *Actinomicetos* termoestables, incluidos *Thermomonospora* y *Thermoactinomyces*, tienen una buena termoestabilidad, que puede cumplir con los requisitos de licuefacción en la industria del almidón (Sindhu et al. 1997). El peso molecular reportado para las α-amilasas provenientes de *Bacillus licheniformis* se encuentra alrededor de los 60kDa (Cheetham, 1991; Ivanova et al. 1993; Mendu et al. 2005).

Los hongos que producen α-amilasa se han limitado principalmente a algunas especies de hongos mesófilos, principalmente *Aspergillus* y *Penicillium* (Kathiresan & Manivannan 2006). La producción de α-amilasa por *Aspergillus* ha atraído cada vez más atención ya que la cepa puede secretar α-amilasa extracelular con cantidades considerables y alta actividad hidrolítica (Jin et al. 1998). Además, *Aspergillus* puede tolerar un pH de fermentación bajo (< 3) evitando la contaminación por bacterias.

Son también conocidas como α-1,4glucanohidrolasa EC 3.2.1.1 es una glucanasa endoactiva que cataliza la hidrólisis al azar de los enlaces α-(1,4) glicosídicos de la región central y con una velocidad de hidrólisis más lenta en los enlaces cercanos a los puntos de ramificación de las cadenas de amilosa y amilopectina (Suckling, 1990; Åkerberg et al. 2000). La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de maltodextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por cuatro o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces α -1,6 provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original. Los productos obtenidos en mayor concentración son maltosa, maltotriosa y maltopentosas, hidrolizando completamente la maltohexosa (Cheetham, 1991; Presečki et al. 2013).

Se cree que las enzimas clasificadas en la familia α-amilasa (GH13) tienen un mecanismo de acción similar, por lo que se cree que los restos de aminoácidos catalíticos son comunes a todas las enzimas (Svensson, 1994 citado por Hua & Yang, 2016). El doble mecanismo de acción de las alfa-amilasas citado por Hua & Yang (2016) se presenta en la Figura 1.6.

En primer lugar, el grupo carboxilo de la enzima protona el oxígeno glucosídico en el sustrato, dando como resultado la división del enlace C1-O y la formación transitoria de un estado de transición de iones como oxocarbenio. Mientras tanto, un grupo carboxílico disociado ataca nucleofilicamente el carbono anomérico del azúcar para dar un intermedio de la enzima β-glicosil mientras que la aglicona del sustrato sale del sitio activo. En la segunda etapa, el proceso descrito se invierte esencialmente mediante un ataque en el centro anomérico por una molécula de agua activada por la forma carboxilato del donador de protones.

Una de las característica de las enzimas alfa-amilasas provenientes de *Bacillus licheniformis* es que pueden actuar en presencia de bajo contenido de calcio, ya que estas enzimas contienen tres iones de calcio por molécula que participan en la estabilización de su estructura tridimensional y evitan que la enzima se inactive (Presečki et al. 2013; Hua & Yang, 2016).

El resultado de las alfa-amilasas hidrolizan en general el almidón entre 30-40% y el siguiente proceso de sacarificación entre 50-90% utilizando enzimas glucoamilasas (Tomasik & Horton, 2012; Hua & Yang, 2016). Las enzimas glucoamilasas o amiloglucosidasas EC 3.2.1.3 son empleadas en la producción de jarabes de glucosa, ya que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces α-1,4 de los extremos no reductores de

polisacáridos para la formación de glucosa. Estas enzimas también poseen la capacidad de hidrolizar enlaces α-1,6 a más baja velocidad (Cruz, 2012). La Tabla 1.4 presenta condiciones del proceso de sacarificación para diferentes materias primas.

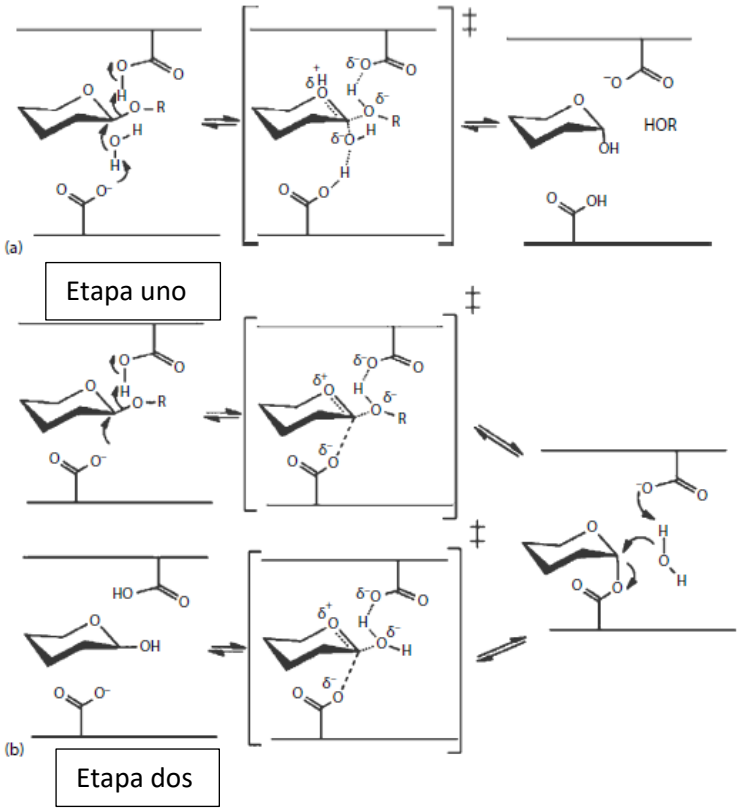


Figura 1.6 Mecanismos de las O-glicosil hidrolasas: (a) mecanismo de retención; (b) mecanismo de inversión
Fuente: Hua & Yang, 2016

Tabla 1.4 Condiciones del proceso de sacarificación para diferentes materias primas de almidón

Tipo Almidón	Enzima	Relación E/S (%)	Temperatura (°C)	pH (und)	Tiempo (Horas)	Referencia
Trigo	Glucoamilasa AMG 300L de Novo Nordisk	0,2; 0,25; 0,3 %p/p	60	4,5	72	Nebesny et al. 1998
Yuca	Spirizyme Fuel from Novozymes	5,8 U/g	46	4,5	0,75	Ruiz et al. 2011
	Starmax GA 400 de Prozym	0,52%p/p	60	4	4	Collares et al. 2012
	Spirizyme Fuel from Novozymes	0,046-0,066%p/p	70	4,5-5,0	2	Virunanon et al. 2013
	DISTILLASE ASP de Genencor	0,1%p/p	40	NR	72	Krajang & Chamsart, 2015
Papa	Enzima purificada	1 %v/v	45	NR	1	Betiku et al. 2013
	Amiloglucosidasa de Novozyme	9 U	60	4,5	24	Khawla et al. 2014

NR: No reporta

Como se observa en la Tabla 1.4 existen diferencias entre las condiciones del proceso de sacarificación dependiendo de las propiedades, tipo y porcentaje de almidón utilizado que define la dosis de enzima/sustrato las cuales varían entre 0,046 hasta 0,52%p/p. En general, enzimas glucoamilasas tienen mejor desempeño en el rango de temperatura 40-70°C y el rango pH entre 4,5-5,0 unidades.

La glucoamilasa puede ser producida tanto por hongos como por bacterias. Los diversos hongos que sintetizan glucoamilasa son activos a temperaturas más altas como *Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus terreus, Mucor rouxians, Mucor javanicus, Neurospora crassa, Rhizopus delmar, Rhizopus oryzae* (Pandey et al. 2000) y *Arthrobotrys amerospora* (Jaffar et al. 1993; Norouzian & Jaffar, 1993). El peso molecular de las glucoamilasas de diversas fuentes fúngicas suele estar en el rango de 60 a 70 kD (Cruz, 2012).

Estas enzimas presentan un mecanismo clásico de desplazamiento en un solo paso Koshland, que implica la transferencia de protones del catalizador al oxígeno glucosídico del enlace escindible (Weil et al. 1954). El mecanismo intermedio del ión oxocarbenio se considera adecuado para la glucoamilasa (Chiba, 1997) y este mecanismo es sustancialmente un mecanismo catalítico ácido base general.

En general se ha identificado que los parámetros que afectan la producción de jarabes de glucosa en los procesos de licuefacción y sacarificación son la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y la dosis de enzima.

Efecto de la temperatura

La temperatura puede alterar significativamente la susceptibilidad del almidón en la hidrólisis enzimática siendo un factor crucial en la actividad de la enzima. Una temperatura demasiado alta puede desactivar completamente la enzima, aunque las enzimas desactivadas de forma incompleta pueden restaurar su actividad (Guzmán-Maldonado et al. 1993; Vijayakumar et al. 2005). Por debajo de la temperatura de inactivación, el perfil del producto de hidrólisis cambia con la temperatura y depende del origen del almidón (trigo, yuca, papa, maíz, entre otros) (Tomasik & Horton, 2012; Presečki et al. 2013; Virunanon et al. 2013).

Cambios en la temperatura altera de manera irregular la hidrólisis de los almidones de maíz, trigo, arroz y papa con alfa amilasa de *B. subtilis* a 50 y 60°C a pH 6,0. El orden de hidrólisis de tales almidones después de 1 h a 50°C cambió de arroz> papa = trigo >> maíz a papa> trigo >> arroz> maíz después de 1 h de hidrólisis a 60°C (Sujka et al. 2006).

Efecto del pH

Las alfa-amilasas permiten que los procesos funcionen a un pH más bajo, ya que su rendimiento óptimo generalmente es de alrededor de pH 5-7 (Yankov et al. 1986; Ruiz et al. 2011; Smrčková et al. 2013; Khawla et al. 2014). El pH óptimo es específico para cada enzima dada. Con las alfa amilasas, un pH inferior suprime la formación de maltotetraosa y productos de oligosacáridos superiores. A medida que el pH aumenta, aumenta el rendimiento de maltotetraosa y mayores oligosacáridos (Ramesh & Lonsane, 1989). Para las glucoamilasas, el rango de pH reportado es 4,5-5,0 unidades, lo que indica que cualquier cambio de pH puede influir en la estabilidad de la enzima y afectar la hidrólisis (Ewa Nebesny, 1998; Murthy et al. 2009; Khawla et al. 2014; Zabed et al. 2016).

Efecto de la concentración de sustrato y la dosis de enzima

La concentración de la suspensión de almidón también es importante. Las amilasas provenientes de bacterias, presentan buena hidrólisis entre 2-30% de almidón, por encima de cuya concentración se inhiben las enzimas (Slaughter et al. 2011). Los primeros estudios de Myrbäck & Johansson (1945) y Eadie (1926) citados por Tomasik & Horton, (2012) sobre el modo de acción de las amilasas en almidón, confirmaron que la tasa de hidrólisis es una función del tipo de almidón y la afinidad de los almidones por las enzimas es igual a su concentración.

Apar & Özbek (2004b) evaluaron concentraciones de almidón de 10 a 80 g/L=1%, 2%, 4%, 8% y observaron que al aumentar la cantidad de almidón, el grado de hidrólisis se redujo desde 83,5 hasta 75,9% (reducción de 9,1%) al final de 10 minutos, debido a una mayor producción de inhibidores como resultado de una mayor concentración de almidón. La concentración de sustrato debe ser analizada con la cantidad de enzima utilizada para lograr una adecuada hidrólisis de acuerdo con la relación enzima/sustrato. Zanin & De Morales (1996) y Hua & Ruijin (2016), indican que al aumentar la dosis de enzima, aumenta la velocidad de reacción hasta un cierto máximo, pero un mayor aumento en la cantidad de enzima tendría poco efecto, confirmando que es necesario encontrar una relación adecuada de enzima/sustrato.

1.3 PURIFICACIÓN DEL JARABE DE GLUCOSA

Después de producirse los jarabes de glucosa provenientes de la hidrólisis enzimática, es necesario retirar y/o inactivar las enzimas y el almidón no hidrolizado, los cuales aportan turbiedad al jarabe, para posteriormente ser utilizados en la industria alimenticia (Olsen, 1995; Menkhaus et al. 2010). Los métodos que se llevan a cabo incluyen sedimentación, floculación, filtración y en algunos casos un tratamiento con carbono para la eliminación de impurezas orgánicas solubles junto con el intercambio iónico (Olsen, 1995; Singh & Cheryan, 1998; Domínguez et al. 2004).

Estos métodos requieren de espacios grandes y en algunas ocasiones la adición de químicos que incrementan los costos por almacenamiento, inestabilidad en el proceso productivo y disposición final. De acuerdo a lo anterior, existen diversas alternativas técnicas que son rentables, fáciles de incorporar dentro de los sistemas existentes y no contaminantes, como los procesos de separación por membrana (microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, intercambio iónico o electrodiálisis), principalmente la microfiltración y ultrafiltración, ya que son adecuados para la separación y eliminación del color sin ningún efecto negativo sobre la calidad nutricional del jarabe (Hamachi et al. 2003; Abels et al. 2013).

Una membrana se denomina a las barreras delgadas entre dos medios fluidos, a través de las cuales bajo la acción de una fuerza (diferencia o gradientes de presión, concentración, temperatura o potencial eléctrico), tiene lugar un transporte que permite la transferencia de determinados componentes de un medio al otro a través de ella y evita o restringe el paso de otros componentes (Benito et al. 2004). En todos los procesos con membranas existen tres corrientes como se presentan en la Figura 1.7.

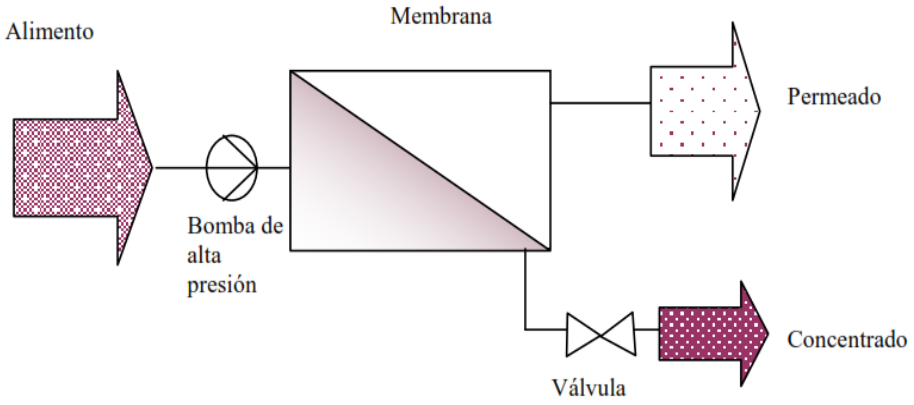


Figura 1.7 Corrientes dentro de las membranas
Fuente: Raventós & Duarte, 2005

1) Alimento: Solución que se quiere tratar.

2) Permeado: Corriente que es capaz de pasar a través de la membrana. Está constituido por el solvente y algunos solutos. Es rico en sustancias con tendencia a atravesar la membrana.

3) Retenido: Corriente que no ha pasado a través de la membrana. Ha perdido parte de la disolución del alimento y, por tanto, aumenta la concentración de sustancias que no pueden atravesar la membrana.

Las membranas de más aplicación en la industria alimentaria son las de microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF), ya que pueden trabajar a altas temperaturas y garantizan una desinfección y esterilización de los sistemas en que se manipulan alimentos, a la vez que se mantienen sus cualidades organolépticas. El transporte a través de este tipo de membranas se efectúa por la acción de la presión como fuerza impulsora (Raventós & Duarte, 2005). La Tabla 1.5 presenta los tamaños y presiones aplicadas en los procesos de microfiltración y ultrafiltración.

Tabla 1.5 Diferentes presiones de trabajo en procesos de membrana

Membrana	**Tamaño de poro (µm)**	**Presión aplicada (bar)**	**Aplicaciones típicas**
Microfiltración (MF)	10 – 0,05	0,1 – 2	Separación de coloides y partículas
Ultrafiltración (UF)	0,05 – 0,002	1 – 10	Separación de macromoléculas

Fuente: *Beier (2006)*

La microfiltración y ultrafiltración son básicamente similares en que el modo de separación es tamizado molecular a través de poros cada vez más finos. Las membranas de microfiltración filtran partículas coloidales y las bacterias de 0,1 a 10 micras de diámetro. Las membranas de ultrafiltración se pueden utilizar para filtrar macromoléculas disueltas, tales como proteínas a partir de soluciones (Baker, 2004).

Una de las razones más importantes por las que el proceso de membranas no se utiliza en la industria es la disminución del flux durante la filtración. El ensuciamiento puede resultar en un aumento en los costos operativos, debido a un aumento de la demanda de energía, mano de obra adicional para el mantenimiento, la limpieza y los costos químicos, más la corta vida de la membrana (Shi et al. 2014).

La disminución del flux se debe principalmente a una pérdida de la fuerza impulsora y/o a un incremento en las resistencias del proceso. La Figura 1.8 presenta las resistencias que existen generalmente en un proceso de filtración.

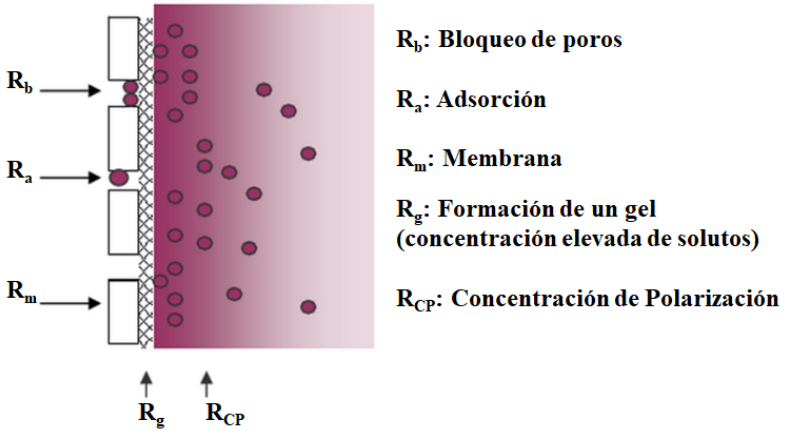


Figura 1.8 Posibles resistencias sobre el transporte de solvente
Fuente: Raventós y Duarte, (2005)

La adsorción se produce cuando existen interacciones específicas entre partículas y solutos con la membrana. Es una consecuencia de la energía superficial y un proceso de equilibrio termodinámico. Las interacciones tienen generalmente tres tipos: debido a las fuerzas débiles de Van der Waals, atracción electrostática o unión química, dependiendo de los grupos funcionales implicados. Una monocapa de solutos se puede formar en la superficie de una membrana, incluso en ausencia de un flux de permeación, produciéndose de forma espontánea y casi instantáneamente. Este es un problema común para la separación de macromoléculas como proteínas y ácidos húmicos, siendo a menudo irreversible (Jones y O'Melia, 2000; Shi et al. 2014).

La fuerte afinidad de las proteínas hacia la superficie de la membrana se origina en la heterogeneidad de sus constituyentes moleculares. Sus moléculas contienen diversos grupos funcionales, (por ejemplo, ácidos hidrófobos) que hacen de parte lipofílica, permitiendo que estas macromoléculas participen en interacciones superficiales. Las membranas que presentan adsorción por estas macromoléculas, no se pueden recuperar sin la limpieza química, debido a que la desorción es termodinámicamente desfavorable. El material adsorbido sobre la membrana puede alterar sus características superficiales, tales como hidrofobicidad o carga. Un depósito de multicapas no está tan fuertemente unido a la membrana como una monocapa adsorbida (D'souza & Mawson, 2005).

El bloqueo de poros se produce por el cierre total o parcial de los poros de la membrana por coloides y partículas. Suele ocurrir rápidamente en las etapas iniciales de la filtración cuando la superficie de la membrana está libre de depósitos y las partículas entrantes pueden estar en una interacción directa con un poro de la membrana. El bloqueo de poros produce un aumento del flux local a través de los poros que permanecen libres y una mayor tasa de transferencia de masa que pueden o no pueden aumentar el ensuciamiento interno, si la tasa de flux a través de toda la membrana se mantiene invariante (Field & Wu, 2011; Shi et al. 2014).

La formación de una capa torta (*cake layer*) o gel es el proceso por el cual las partículas se acumulan capa por capa en la superficie externa de una membrana, dando lugar a una resistencia adicional al flux de permeado. Una capa torta puede constar de diferentes

tipos de soluto incluyendo coloides químicamente inertes o activos. Una formación de una capa torta inicial con coloides inertes cerca de la superficie de la membrana, impide un contacto directo con otras partículas y la superficie de la membrana, incluso si las partículas finales a depositar están activas. Las partículas inertes funcionan como un prefiltro que sirve como 'coadyuvante de filtración'. Por otro lado, las partículas activas pueden llegar a la primera superficie de la membrana y formar un puente entre las partículas inertes. La morfología de la capa torta implica la disminución de flux, mientras que la interacción entre la capa torta y la superficie de la membrana, determina un ensuciamiento reversible (Shi et al. 2014).

La polarización por concentración es originada por la retención de solutos en la membrana. A medida que el solvente pasa a través de la membrana, las grandes moléculas o solutos se mueven en dirección a la superficie de la membrana y se van acumulando tendiendo a una colmatación, de manera que forman una capa o película que reduce la permeabilidad y actúa como una resistencia adicional. Al mismo tiempo, se origina una retrodifusión de permeado o difusión en sentido opuesto al flux, debida al gradiente de concentraciones; sin embargo, esta retrodifusión es muy lenta. A largo plazo, el flux siempre es más pequeño que el flux original o a tiempo cero. Este fenómeno es un proceso reversible que por sí mismo no afecta a las propiedades intrínsecas de la membrana; esto significa que, en el momento en que se deja de aplicar la fuerza impulsora para conducir el alimento, la capa concentrada desaparece espontáneamente (descolmatación). Además, se puede reducir haciendo pasar agua pura, que arrastra los solutos por el flux tangencial con un efecto de aclarado (Raventós y Duarte, 2005).

En la práctica, sobre todo, durante la filtración con alimentaciones complejas o la mezcla, el ensuciamiento implica más de una forma de trabajo al mismo tiempo. La importancia relativa de los diferentes mecanismos de ensuciamiento depende de las condiciones de operación, corrientes de alimentación, y propiedades de la membrana (Shi et al. 2014).

1.4 RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A PARTIR DE MEMBRANAS

Una de las maneras de disminuir los efectos de inhibición de las enzimas para la producción de jarabes de glucosa es la integración del sistema de reacción de hidrólisis enzimática junto con la separación de producto por medio de membranas. Esta unión de procesos denominada “In Situ Product Recovery (ISPR)”, mejoraría las velocidades de reacción, lo que se reconoce como el principal obstáculo para lograr una viabilidad económica en la operación comercial de la hidrólisis enzimática (Gan et al. 2002; Chakraborty et al. 2016). En la práctica, la ISPR ha utilizado membranas de ultrafiltración y nanofiltración para la separación del producto, recomendando las de ultrafiltración (Andrić et al. 2010).

La Figura 1.9 presenta el proceso general mostrando la separación del producto de interés (glucosa), con el fin de disminuir posibles efectos inhibitorios y preservar durante más tiempo las enzimas que se encargan de realizar los procesos de hidrólisis.

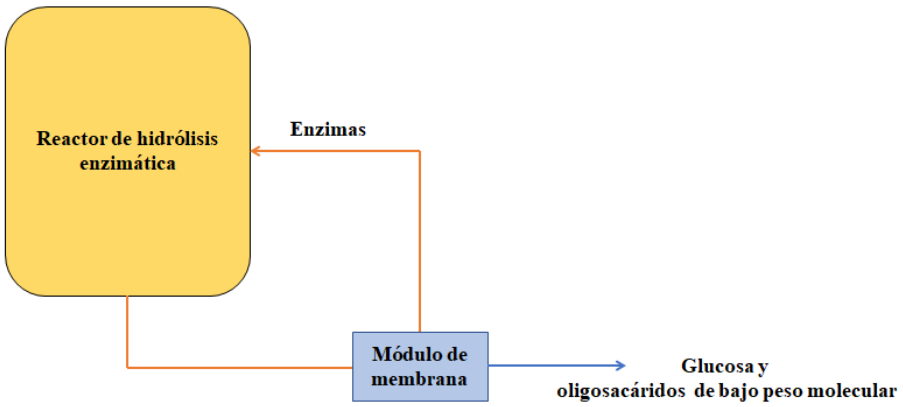


Figura 1.9 Principio de la eliminación de la glucosa durante la hidrólisis enzimática para disminuir la inhibición del producto de las enzimas.
Fuente: Modificado de Abels et al. 2010

La ISPR retiene las enzimas presentes en el sistema mientras que permite la transferencia a través de la membrana de productos de reacción de bajo peso molecular como la glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrinas (Prazeres & Cabral, 1994; Rausch, 2002; Chakraborty et al. 2016).

Hinkova et al. (2004) y Andrić et al. (2010) muestran que las principales ventajas de la utilización de membranas con retirada del producto durante la hidrólisis enzimática son:

- ✓ Uso de enzimas por largos periodos de tiempo mediante la retención en el sistema
- ✓ La obtención de un mayor grado de conversión debido a la reducción de la inhibición por producto
- ✓ Obtener productos de hidrólisis como glucosa, libre de enzimas y sustrato no convertido, reduce el color y turbiedad (comparado con filtros convencionales)
- ✓ La posibilidad de mantener una corriente constante de producto sin suministrar enzimas adicionales
- ✓ Disminución de los costos de enzimas
- ✓ Los biorreactores de membrana son generalmente fáciles de operar, las reacciones se producen a una presión y temperatura moderadas y, en la mayoría de los casos, no requieren el uso de aditivos adicionales

1.4.1 Materiales, módulos de membranas y tamaño de poro

La selección de los materiales de las membranas depende de la operación en presión, temperatura y pH. Existe una amplia gama de membranas poliméricas, incluyendo polisulfona, polietersulfona, polifluoruro de vinilideno, poliamida y polipropileno como también membranas cerámicas que incluyen óxido de zirconio y alúmina (Raventós y Duarte, 2005).

Los materiales cerámicos son ventajosos para bioprocesos, debido a que son altamente resistentes a la esterilización, presión, temperatura, así como tratamientos químicos fuertes para regeneración o incluso la esterilización y exhiben alta resistencia mecánica, permeabilidad y tamaños de poro bien distribuidos. Además, son fáciles de limpiar pero tales membranas de cerámica son costosas (Hinkova et al. 2004; Carstensen et al. 2012). Las membranas poliméricas son menos costosas que otros materiales de membrana y al utilizarlas con módulos de fibra hueca, son ventajosas para biorreactores de membrana

debido a que proporcionan altas densidades (Lopez-Ulibarri & Hall, 1997; Sarbatly et al. 2007).

Las membranas poliméricas incluyen polisulfona (PSF), poliétersulfona (PES), poliacrilonitrilo (PAN), poliamida, poliimida, polifluoruro de vinilideno (PVDF) y politetrafluoroetileno (PTFE). El PVDF es uno de los materiales de membrana más utilizados y ha recibido mucha atención por parte de investigadores y fabricantes en los últimos años (Liu et al. 2011). El PVDF es un polímero semicristalino con unidades repetidas de $-(CH_2CF_2)_n-$. Presenta una alta resistencia mecánica, buena resistencia química y estabilidad térmica, así como una excelente resistencia al envejecimiento, que son muy importantes para la aplicación real de las membranas de separación. Además, el PVDF muestra una buena procesabilidad para preparar láminas planas, fibras huecas o membranas tubulares (Kang & Cao, 2014).

Hasta ahora, ha habido varios artículos que informan sobre los campos de aplicación de las membranas del PVDF, incluyendo microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), biorreactor de membrana (MBR), destilación de membrana, separación y eliminación de gases, eliminación de contaminantes del agua (por ejemplo: boro, compuestos orgánicos volátiles y amoníaco), recuperación de biocombustibles, separador para batería de iones de litio, proceso de intercambio iónico y otros. Sin embargo, hasta el momento no se encuentra reportado este material de membrana en procesos ISPR para almidón (Alkhudhiri, Darwish & Hilal, 2012; Feng, Khulbe & Tabe, 2012; Mansourizadeh, 2012; Xiao et al. 2013; Ike et al. 2017; Zhou at al., 2017).

En cuanto al calor y resistencia química o resistencia mecánica, por lo general las membranas poliméricas muestran un rendimiento más bajo que las de cerámica, a excepción de las membranas en politetrafluoretileno y polifluoruro de vinilideno (Turmanova et al. 1997; Zhou et al. 2012; Ma et al. 2016).

La selección de las membranas con respecto al corte molecular tiene influencia sobre la tasa de flux y la eliminación de la glucosa, la retención de enzimas y la respuesta al cambio de presión transmembranal. En general, las tasas más altas de flux con ultrafiltración y el aumento de las tasas de eliminación de glucosa se observaron con los valores de corte más altas, en este caso 10 a 30 kDa, 5-17 L/m^2h. Por otro lado, el aumento de la línea de corte a más de 30-50 kDa, puede dar lugar a fugas de las enzimas través de la membrana (Mores et al. 2001) y utilizar cortes <4 kDa requerirá mayor presión para un flux adecuado (Andrić et al. 2010).

1.4.2 Configuración de las membranas

La ISPR presenta la opción de operar de dos maneras respecto a la ubicación de la membrana en el reactor de hidrólisis enzimática: en un módulo externo o de manera sumergida, como se muestra en la Figura 1.10.

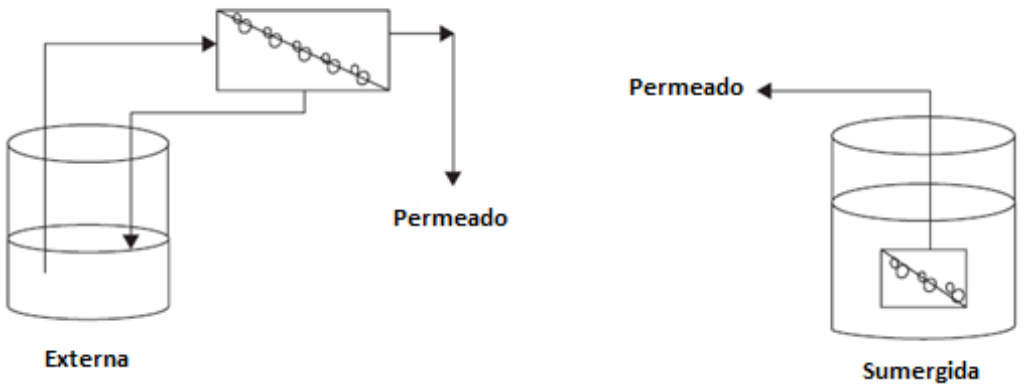


Figura 1.10 Modos de configuración de las membranas en los procesos de hidrólisis enzimática, membrana externa y membrana sumergida.
Fuente: Modificado de Wei et al. (2014).

Varias configuraciones se han descrito tanto para módulos externos como para sumergidos (Bouhallab & Touzé, 1995; Pasta et al. 1999; Greiner et al. 2003; Zhang et al. 2011 Chakraborty et al. 2016). Reactores con módulos externos son los más utilizados hoy en día para la recuperación del producto. Por lo general son operados en modo de flux transversal, donde la suspensión a filtrar fluye paralela a la superficie de la membrana. Estos reactores de módulo externo presentan ventajas en el control del ensuciamiento de la membrana en comparación con módulo sumergido. Sin embargo, los módulos externos requieren volúmenes de reacción adicionales y mayor energía para mantener las tasas de flux continuo a través de la membrana (Carstensen et al. 2012).

Stark & Von Stockar (2003) señalaron que los procesos de membranas sumergidas han sido rara vez utilizados debido a la falta de disponibilidad y de dificultades en el escalado a nivel comercial (Malmali et al. 2015). Sin embargo, las membranas sumergidas ofrecen varias ventajas sobre los sistemas de membrana externa como se presenta en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6 Comparación de las características para membranas sumergidas y externas

Características	Membranas sumergidas	Membranas externas
Retención eficiente	★	★
Bajos requerimientos de mantenimiento	★	★
Prevención de estrés por cizallamiento	★	
Condiciones constantes de operación	★	
No inversión adicional	★	
Prevención de inhibición de producto	★	★
Moderado consumo de electricidad	★	
Control de ensuciamiento		★
Fácil reemplazo		★

Fuente: *Modificado de Carstensen et al. (2012)*

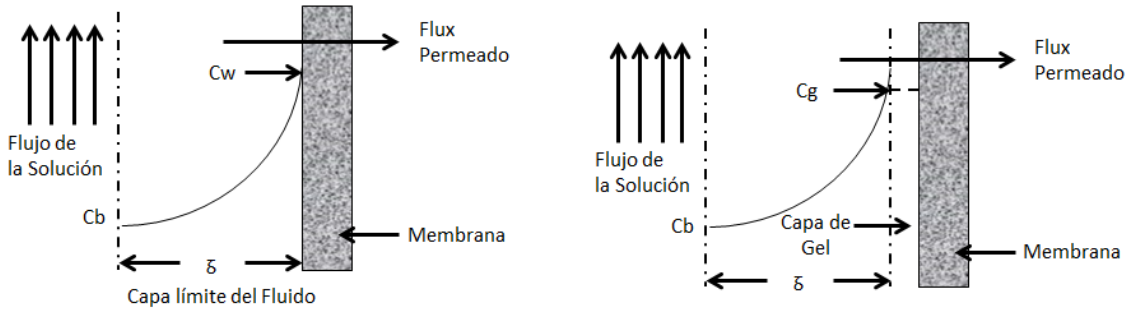
La Tabla 1.6 muestra que las membranas sumergidas cumplen con varias características comparadas con membranas externas como bajo estrés de cizalladura, condiciones de operación constantes, baja inversión en costos adicionales por reactor, bajo consumo de energía, bajo riesgo de contaminación. Se debe tener en cuenta que al estar la membrana

sumergida, se puede incrementar el ensuciamiento pero se pueden utilizar métodos de limpieza combinados para eliminar esta limitación.

Para membranas sumergidas se recomiendan módulos de fibra hueca o tubular ya que proporcionan alta densidad y tienen bajos costos. Para una configuración externa se sugieren los módulos en placa paralelas, ya que pueden desmontarse fácilmente para su limpieza o cambio manual de las membranas (Carstensen et al. 2012).

1.4.3 Limpieza de membranas

Las materias primas como el almidón contienen polisacáridos insolubles y proteínas, que pueden acumularse cerca, sobre y en el interior de la membrana, reduciendo la permeabilidad de ésta al bloquear los poros y formar una capa de resistencia adicional al flux a través de la membrana (Sweity et al. 2011; Zhou et al. 2012). Las reducciones en el flux del permeado a través del tiempo pueden ser sustanciales y representan una pérdida en la capacidad de una instalación de membranas de manera reversible e irreversible (Wiesner & Aptel, 1998). El ensuciamiento de la membrana (reversible o irreversible) está basado con la polarización de la concentración como se observa en la Figura 1.11.



Cw: Conc. soluto en la superficie de la membrana

Cb: Conc. soluto en la solución

Cg: Conc. soluto en la capa de gel

Figura 1.11 Efecto de polarización de la concentración en membranas
Fuente: Huerta, 2015

El soluto (Cw) en la superficie de la membrana tiende a acumularse hasta convertirse en una capa de gel (Cg), disminuyendo el flux del permeado como se presenta en la Figura 1.11 (Huerta, 2015). Este comportamiento lo observaron Fráter et al. (2005) al utilizar una membrana de placa plana hidrolizando almidón y glucoamilasas a partir de *Aspergillus awamori*. Este estudio presentó el comportamiento de la Figura 1.12, observando que a medida que se incrementan las concentraciones de almidón, el flux se ve afectado.

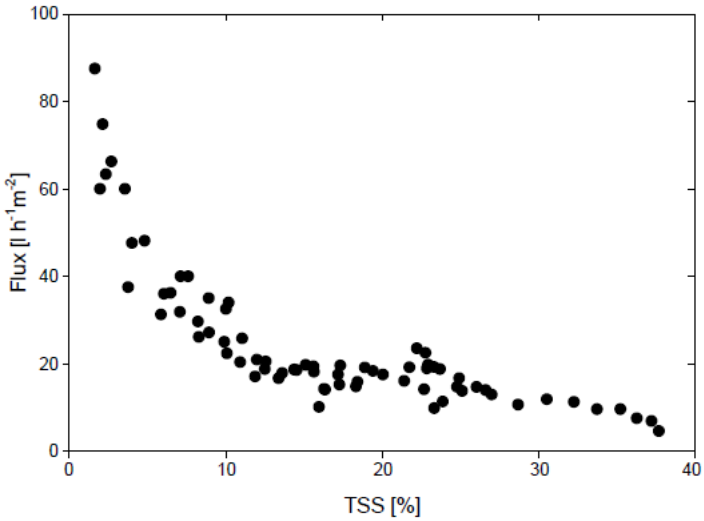


Figura 1.12 Flux transmembranal frente al contenido de sólidos
Fuente: Fráter et al. (2005)

Esta disminución de flux se puede recuperar por medio de métodos de limpieza, presentando diferentes tipxos de ensuciamiento como reversible, irreversible y envenenamiento, mostrados en la Figura 1.13 (Wiesner & Aptel, 1998).

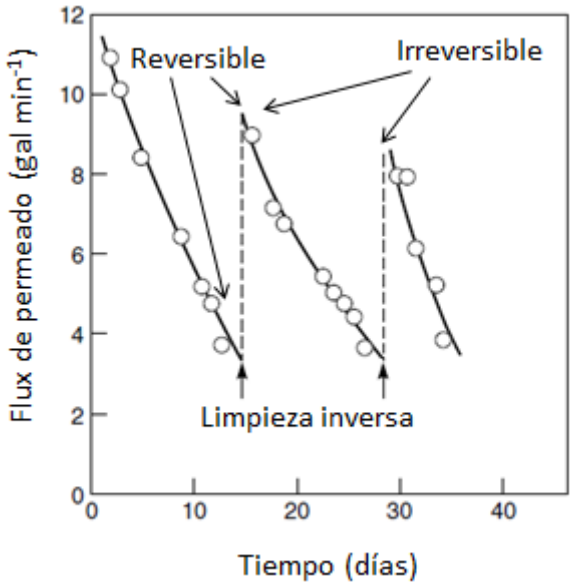


Figura 1.13 Efecto de los tipos de ensuciamiento en membranas
Fuente: Wiesner & Aptel, 1998.

La Figura 1.13 muestra que al aplicarse métodos de limpieza como los hidráulicos, se recupera parte de la capacidad de filtración. Posteriormente, cuando los métodos de limpieza hidráulicos no recuperan la mayor parte de flux permeado, se aplican otros métodos más severos con tratamientos químicos, denominándose a éste ensuciamiento irreversible. Finalmente, cuando la membrana presenta envenenamiento, es decir que no se puede recuperar el flux, es necesario su reemplazo (Wiesner & Aptel, 1998).

La configuración de la membrana externa o sumergida requiere métodos de limpieza. Uno de éstos es la operación con flux transversal o flux cruzado, la cual se aplica para

ambas configuraciones. El flux transversal permite que el alimento sea transversal al flux del permeado evitando acumulaciones más rápidas en la membrana (Carstensen et al. 2012). Para la configuración en membranas sumergidas es necesaria la operación en flux transversal y otro método adicional de limpieza. Los otros métodos de limpieza que se proponen son:

i) Lavado contracorriente: Ha tenido muy buenas eficiencias cercanas al 100% para enzimas y sustancias poliméricas extracelulares, con altas frecuencias y corta duración (0.1 segundos entre 1-5 segundos) (Carstensen et al. 2012)
ii) Agitación: Aumentar las revoluciones del agitador o colocar los agitadores cerca o encima de la membrana (Park et al. 1997).
iii) Aireación: Se ha reportado 2.4vvm (vol por vol de reactor por minuto), aproximadamente 4L/min de aire presentando un aumento en el flux del 65%. Sin embargo, aumenta los costos (Park et al. 1997).
iv) Vibración de la membrana: El agitador puede moverse verticalmente (Beier & Jonsson, 2009).

1.4.4 Parámetros de operación que afectan la inmovilización de enzimas en membranas

Es necesario saber escoger el material de la membrana debido a las interacciones entre las enzimas y la membrana, que pueden afectar el rendimiento del proceso y por ende una inmovilización involuntaria de enzimas. Los efectos del pH, temperatura y presión juegan un papel importante en las retenciones y separaciones (Benito et al. 2004).

Efecto del pH

Para comprender el efecto del pH en la inmovilización de enzimas se debe tener en cuenta que para membranas poliméricas, existen interacciones entre las enzimas y las membranas con una fuerte dependencia al pH como la adsorción electrostática, hidrofilicidad o por puentes de hidrógeno y por deposición/agregación de partículas (Larson, 1980; Ahmad et al. 2011; Luo et al. 2014a, b). Larsson (1980) propuso la teoría DLVO, la cual se basa en la superposición de fuerzas de van der Waals y atracción en fuerzas de repulsión electrostáticas, donde esta última se da, si la molécula y la superficie de la membrana tienen cargas opuestas.

La adsorción electrostática está relacionada con el punto isoeléctrico, el cual es la concentración de pH donde la carga neta de la enzima es nula. Se debe evaluar cuál será la carga de la enzima al valor de pH del proceso para la hidrólisis enzimática, lo cual se realiza comparando el pH de operación con el punto isoeléctrico de la enzima, teniendo en cuenta que estarán cargados positivamente o negativamente a valores de pH por debajo o por encima de su punto isoeléctrico, respectivamente (Marshall et al. 1993). Rico (1990) encontró que el punto isoeléctrico de las glucoamilasas provenientes de *Aspergillus niger* es de 3,54 y autores como Zhou et al. (2012) y Ma et al. (2016) indican que las membranas presentan cargas positivas o negativas a pH diferentes pH, lo que hace necesario conocer las características de las mismas.

Lazaridou & Biliaderis (2007) midieron los potenciales eléctricos de las membranas de polisulfona y de policarbonato, encontrando que estos dependían directamente de la presencia de grupos ácidos en la estructura de la membrana obteniendo cargas positivas o negativas las cuales dependen del pH. Este comportamiento debe ir ligado con el punto isoeléctrico de las enzimas, como lo presenta Childress & Elimelech (1996). Ellos encontraron un pico máximo en el flux cuando la membrana operaba cerca del punto

isoeléctrico de las enzimas, por lo cual las enzimas tenderían a tener una carga neutra evitando la inmovilización en la membrana.

Efecto de la temperatura

La temperatura influye en las propiedades de solubilidad y viscosidad para el almidón y por ende a los diferentes sacáridos, y su efecto se observa en la velocidad del flux de permeado. A mayores grados de temperatura en comparación con la temperatura ambiente, el flux de la solución de alimentación a través de la membrana se incrementa debido a que se disminuye la viscosidad de la solución. Tsuru et al. (2000) explica que para membranas hidrofílicas, existe una reducción de la capa de agua adsorbida cuando la temperatura aumenta, lo que resulta en una disminución de la tensión superficial y una apertura del tamaño de poro efectivo. Este mismo comportamiento lo observaron Madaeni et al. (2012) y Ike et al. (2017) explicando que los efectos de la temperatura pueden estar relacionados con el grado de despliegue de las cadenas moleculares del polímero, donde la temperatura de la disolución define en qué medida las cadenas moleculares del polímero se pueden desplegar/disolver.

De este modo, al presentarse temperaturas que incrementen la porosidad de las membranas puede permitir inmovilización física de las enzimas; sin embargo, si la porosidad se incrementa hasta el punto de generar un tamaño de corte molecular mayor al tamaño de las enzimas, éstas pueden salir en el permeado (Paolucci-Jeanjean et al. 2001; Ríos et al. 2004; Andrić et al. 2010). Según, Pinelo et al. (2009), cuando se realiza la hidrólisis enzimática junto con las membranas, es necesario asegurar que la temperatura promueva una actividad enzimática adecuada, que no solo incremente el flux y/o la cantidad de enzimas inmovilizadas.

Efecto de la presión

La presión como fuerza impulsora de las membranas de micro y ultrafiltración, genera un efecto de inmovilización de las enzimas. Luo et al. (2014a, b) evaluaron la enzima alcohol deshidrogenasa con diferentes presiones y concentraciones de enzima. A la presión más baja, las enzimas eran más propensas a entrar en los poros de la membrana, dando lugar a interacciones fuertes entre enzimas y membranas y a su vez, el aumento irreversible de la resistencia a la filtración. Además, el aumento de la concentración de enzima (volumen constante) causó que se depositaran más enzimas formando una capa de torta o gel. She et al. (2009) encontraron que la tasa de ensuciamiento es directamente proporcional a las presiones aplicadas y las concentraciones de enzimas.

Como regla general, siempre hay una relación lineal entre el flux de permeado y la presión aplicada hasta un cierto valor de flux. Cuando se trabaja con diferentes soluciones de azúcares, Aydogan et al. (1998) atribuyeron un máximo flux a presiones crecientes debido a un aumento en la concentración de polarización; sin embargo, la operación de membranas a nivel industrial utiliza una presión constante evaluando el comportamiento del flux a través del tiempo (Baker, 2004). Por otro lado, Goulas et al. (2002) observaron una menor eficiencia de separación para glucosa, sacarosa y rafinosa cuando se aumentó la presión, debido a una reducción del tamaño de poro causada por la compresión. La compresión provocada por las altas presiones induce dos efectos competitivos opuestos: (1) una reducción en el espesor de la membrana, que conduciría a un mayor flux de permeado, y (2) una reducción del tamaño de poro responsable del retenido de la membrana.

Presiones aplicadas entre 0,01-600MPa a 40°C sobre almidón hidrolizado con alfa-amilasa proveniente de *B. subtilis* tuvo un efecto importante en el perfil del producto

(Matsumoto, 1972, 1996). La maltopentosa fue el producto principal y hubo una disminución en la cantidad de glucosa, maltosa y maltotriosa. Gomez et al. (1998) sugirieron que este efecto está asociado con la gelatinización del almidón. Cuando la presión se elevó a 800MPa, las alfa-amilasas mostraron una pérdida de actividad debido a la asociación de las enzimas a través de los enlaces disulfuro. Liang et al. (1970) realizaron ensayos con sorgo, almidón de maíz y enzima glucoamilasa, observando que la susceptibilidad de los sustratos al ataque enzimático aumentó con un aumento en la presión aplicada de 23 a 85psi. Como se muestra por espectroscopía infrarroja, las alfa amilasas de *B. licheniformis, B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* cambiaron sus conformaciones con presiones de 6,5, 7,5 y 11 kbar, respectivamente. Estas enzimas presentan una correlación entre sus estabilidades térmicas y de alta presión, mostrando que la alfa amilasa a partir de *B. licheniformis* es considerablemente más estable que las otras dos, que mostraron una estabilidad casi igual en las condiciones aplicadas (Weemaes et al. 1996). Estos resultados confirman que las membranas deben operarse a baja presión para maximizar la selectividad, incluso si se necesitara un área más grande, y que la selectividad puede disminuir a medida que aumenta el corte de la membrana (Pinelo et al. 2009).

De acuerdo con lo anterior, los parámetros de operación en común entre el proceso de hidrólisis enzimática e implementación con membranas son el pH y la temperatura. Estos parámetros han sido estudiados en los procesos individualmente, por lo que es necesario realizar un análisis en conjunto e identificar las mejores condiciones de proceso que permitan generar mayores concentraciones de glucosa a partir de almidón como materia prima. De acuerdo con Paolucci-Jeanjean et al. (2001), Hinkova et al. (2004), Grześkowiak-Przywecka & Słomińska, (2007), Słomińska & Niedbacha (2009) y Acevedo-Estupiñan et al. (2015), el rango de pH y temperatura a evaluar estaría comprendido entre 3 – 6 unidades y 40 – 60°C, respectivamente.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

Abels, C., Carstensen, F., & Wessling, M. (2013). Membrane processes in biorefinery applications. *Journal of Membrane Science*, 444, 285-317.

Acevedo-Estupiñan, M. V., Parra-Escudero, C. O., & Muvdi-Nova, C. J. (2015). Estudio del proceso de clarificación de hidrolizados de almidón de yuca utilizando membranas cerámicas. *Vitae, Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas Y Alimentarias*, *22*(2), 121–129.

Ahmad, A. L., Ideris, N., Ooi, B. S., Low, S. C., & Ismail, A. (2011). Morphology and polymorph study of a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for protein binding: Effect of the dissolving temperature. *Desalination*, 278(1), 318-324.

Åkerberg, C., Zacchi, G., Torto, N., & Gorton, L. (2000). A kinetic model for enzymatic wheat starch saccharification. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 75(4), 306-314.

Alkhudhiri, A., Darwish, N., & Hilal, N. (2012). Membrane distillation: a comprehensive review. *Desalination*, 287, 2-18.

Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., & Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology advances*, 28(3), 407-425.

Apar, D.K., & Özbek, B. (2004a). Corn, rice and wheat starch hydrolysis by using various alpha-amylase enzymes at temperature 40°*C. J Eng. Nat. Sci*, 2, 55-67.

Apar, D. K., & Özbek, B. (2004b). α-Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 39(9), 1137-1144.

Apar, D. K., & Özbek, B. (2007). Estimation of kinetic parameters for rice starch hydrolysis inhibited by added materials. *Chemical Engineering Communications*, *194*(3), 334–344.

Aydogan, N., Gurkan, T. & Yilmaz, L. (1998). Effect of operating parameters on the separation of sugars by nanofiltration, Sep. *Sci. Technol*. 33, 1767–1772.

Baker, R. W. (2004). Overview of membrane science and technology. Membrane Technology and Applications, Second Edition, 1-14.

Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with a-amylase from Bacillus licheniformis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 488–495.

Beier, S. P. (2006). Pressure driven membrane processes. Avalible in: bookboon.com. 22p.

Beier, S. P., & Jonsson, G. (2009). A vibrating membrane bioreactor (VMBR): Macromolecular transmission—influence of extracellular polymeric substances. *Chemical Engineering Science*, 64(7), 1436-1444.

Benito, J. M., Conesa, A., & Rodríguez, M. A. (2004). Membranas cerámicas. Tipos, métodos de obtención y caracterización. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 43(5), 829-842.

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 467–476.

Bouhallab, S., & Touzé, C. (1995). Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Le Lait*, 75(3), 251-258.

Carstensen, F., Apel, A., & Wessling, M. (2012). In situ product recovery: Submerged membranes vs external loop membranes". *Journal of Membrane Science*, 394, 1-36.

Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S., & Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36(1), 43-58.

Cheetham P. (1991). Aplicación de las enzimas en las industrias, en Manual de biotecnología de las enzimas, Wiseman A. Segunda edición. Editorial Acribia S.A, Zaragoza-España. 319-330p.

Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(8): 1233–1239.

Childress, A. E. & Elimelech, M. (1996). Effect of solution chemistry on the surface charge of polymeric reverse osmosis and nanofiltration membranes, *J. Membr. Sci*. 119, 253–268.

Collares, R. M., Miklasevicius, L. V. S., Bassaco, M. M., Salau, N. P. G., Mazutti, M. a., Bisognin, D. a., & Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(7), 579–586.

Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidónes gelatinizados del fruto de la planta de banano*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Dávila, J. A., Hernández, V., Castro, E., & Cardona, C. A. (2014). Economic and environmental assessment of syrup production. Colombian case. Bioresource technology. *Bioresource Technology*, *161*, 84–90.

Domínguez, Ó. F. C., Guerrero, G. T. C., González, G., & Ayala, A. Y. R. (2004). Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón. *Ingeniería e Investigación*, 24(2), 8-21.

D'souza, N. M., & Mawson, A. J. (2005). Membrane cleaning in the dairy industry: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(2), 125-134.

Feng, C., Khulbe, K. C., & Tabe, S. (2012). Volatile organic compound removal by membrane gas stripping using electro-spun nanofiber membrane. *Desalination*, 287, 98-102.

Field, R. W., & Wu, J. J. (2011). Modelling of permeability loss in membrane filtration: Re-examination of fundamental fouling equations and their link to critical flux. *Desalination*, 283, 68-74.

Fráter, T., Nemestóthy, N., Gubicza, L., & Bélafi-Bakó, K. (2005). Enhancement of operation and storage stability of glucoamylase from Aspergillus awamori by a protease inhibitor preparation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3-4), 281-284.

Fujita, N. (2017). Starch. In B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edi, Vol. 2, pp. 106–111). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00162-3

Gerena Baron, F. M. (2013). *Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (Citrus sinensis l var valencia) y papa (Solanum tuberosum) variedad Diacol Capiro (R-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos.* (Trabajo de grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Duitama, Colombia.

Gomez, M. R. A., Clark, R., & Ledward, D. A. (1998). Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*, 63(3), 363-372.

Goulas, A.K., Kapasakalidid, P.G., Sinclair, H.R., Rastall, R.A. & Grandison, A.S. (2002). Purification of oligosaccharides by nanofiltration, J. *Membr. Sci*. 209, 321–335.

Greiner, L., Müller, D. H., van den Ban, E. C., Wöltinger, J., Wandrey, C., & Liese, A. (2003). Membrane aerated hydrogenation: enzymatic and chemical homogeneous catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(6-7), 679-683.

Grześkowiak-Przywecka, A., & Słomińska, L. (2007). Saccharification of potato starch in an ultrafiltration reactor. *Journal of food engineering*, 79(2), 539-545.

Guzmán-Maldonado H. & Paredes-Lopez, O. (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review, *Crit. Revs. Food Sci. Nutr*., 35, 373–403.

Hamachi, M., Gupta, B. B., & Aim, R. B. (2003). Ultrafiltration: a means for decolorization of cane sugar solution. *Separation and Purification Technology*, 30(3), 229-239.

Hinkova, A., Bohacenko, I., Bubnik, Z., Hrstkova, M., Jankovska, P. (2004). Mineral membrane filtration in refinement of starch hydrolysates. *Journal of Food Engineering*. 61(4), 521-526.

Hua, X., & Ruijin, Y. (2016). Enzymes in Starch Processing. In *Enzymes in Food and Beverage Processing* (pp. 139–170). CRC Press Taylor & Francis Group.

Huerta Ochoa, S. (2015). Procesos de membrana. Planta piloto de Fermentaciones Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Procesos_de_Membrana.pdf. Consultado Abril 11 de 2015

Hull, P. (2010). Application Properties of Glucose Syrups. In *Glucose Syrups: Technology and Applications* (First, pp. 61–75). John Wiley & Sons Ltd.

Ike, I. A., Zhang, J., Groth, A., Orbell, J. D., & Duke, M. (2017). Effects of dissolution conditions on the properties of PVDF ultrafiltration membranes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 716-726.

Ivanova, V. N., Dobreva, E. P., & Emanuilova, E. I. (1993). Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biotechnology*, 28(2-3), 277-289.

Jaffar, M. B., Bharat, R. P., Norouzian, D., Irani, S. D., Shetty, P. (1993). Production of glucoamylase by nematiphagus fungi *Arthrobotrys* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31: 87–89.

Jenkins, P. J., & Donald, A. M. (1998). Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate research*, 308(1), 133-147.

Jin, B., Van Leeuwen, H. J., Patel, B., & Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α-amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource technology*, 66(3), 201-206.

Johnston, D. B., & McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource technology*, 154, 18-25.

Jones, K. L., & O'Melia, C. R. (2000). Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *Journal of Membrane Science*, 165(1), 31-46.

Kang, G. D., & Cao, Y. M. (2014). Application and modification of poly (vinylidene fluoride)(PVDF) membranes–A review. *Journal of Membrane Science*, 463, 145-165.

Kathiresan, K., & Manivannan, S. (2006). α-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African journal of Biotechnology*, 5(10), 829–832.

Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G., & Oumèma, N. E. (2014). Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 52, 144–149.

Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1), 150-157.

Krajang, M., & Chamsart, S. (2015). Raw Cassava Starch Hydrolysis for Single-Step Ethanol Production Using Combination of Raw Starch Hydrolysis and Fermentation. In The 6 th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products July 29th–31st, Centara Hotel & Convention Centre, Khon Kaen, Thailand (p. 14)

Larsson, K. (1980). Interfacial phenomena-bioadhesion and biocompatibility. *Desalination*, 35, 105-114.

Lazaridou, A. & Biliaderis, C.G. (2007). Molecular aspects of cerealβ-glucan functionality: physical properties, technological applications and physiological effects, *J. Cereal Sci*, 46, 101–118.

Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., & Cheng, L. (2015). The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 48, 189–196.

Liang, Y. T., Morrill, J. L., Anstaett, F. R., Dayton, A. D., & Pfost, H. B. (1970). Effect of Pressure, Moisture, and Cooking Time on Susceptibility of Corn or Sorghum Grain Starch to Enzymatic Attack. *Journal of Dairy Science*, 53(3), 336-341.

Liu, F., Hashim, N. A., Liu, Y., Abed, M. M., & Li, K. (2011). Progress in the production and modification of PVDF membranes. *Journal of membrane science*, 375(1), 1-27.

Lopez-Ulibarri, R., & Hall, G. M. (1997). Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(6), 398-404.

Luo, J., Marpani, F., Brites, R., Frederiksen, L., Meyer, A. S., Jonsson, G., & Pinelo, M. (2014a). Directing filtration to optimize enzyme immobilization in reactive membranes. *Journal of Membrane Science*, 459, 1-11.

Luo, J., Meyer, A. S., Jonsson, G., & Pinelo, M. (2014b). Enzyme immobilization by fouling in ultrafiltration membranes: impact of membrane configuration and type on flux behavior and biocatalytic conversion efficacy. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 79-89.

Ma, J., Qin, L., Zhang, X., & Huang, H. (2016). Temporal evolution of the selectivity-permeability relationship during porous membrane filtration of protein solutions. *Journal of Membrane Science*, 514, 385-397.

Madaeni, S. S., Pourghorbani, R., & Vatanpour, V. (2012). Investigation of parameters affecting the flux of microfiltration poly (vinylidenefluoride) membranes for particulate removal. *Advances in Polymer Technology*, 31(1), 29-40.

Mahmood, K., Kamilah, H., Shang, P. L., Sulaiman, S., Ariffin, F., & Alias, A. K. (2017). A review: interaction of starch/non-starch hydrocolloid blending and the recent food applications. *Food Bioscience*, 19, 110-120.

Malmali, M., Stickel, J., & Wickramasinghe, S. R. (2015). Investigation of a submerged membrane reactor for continuous biomass hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 189-197.

Mansourizadeh, A. (2012). Experimental study of CO 2 absorption/stripping via PVDF hollow fiber membrane contactor. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(4), 555-562.

Marshall, A. D., Munro, P. A., & Trägårdh, G. (1993). The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. *Desalination*, 91(1), 65-108.

Matsumoto, T. (1972). Studies on enzyme reaction under high pressure. I, Repts. Ind. Res. Center Shiga Pref. *Chem. Abstr*., (120) 7, 59–65.

Matsumoto, T. (1996). Maltopentaose manufacture with amylase under high pressure, Jpn. Kokai Tokkyo Koho. *Chem. Abstr.*, 124 200-302.

Mendu, D. R., Ratnam, B. V. V., Purnima, A., & Ayyanna, C. (2005). Affinity chromatography of α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 712-717.

Menkhaus, T. J., Anderson, J., Lane, S., & Waddell, E. (2010). Polyelectrolyte flocculation of grain stillage for improved clarification and water recovery within bioethanol production facilities. *Bioresource technology*, 101(7), 2280-2286.

Mores W. D., Knutsen, J. S. & Davis R. H. (2001). Cellulase recovery via membrane filtration. *Appl Biochem Biotechnol*, 91, 297–309.

Murthy, G. S., Sall, E. D., Metz, S. G., Foster, G., & Singh, V. (2009). Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 67–72.

Nebesny, E., Rosicka, J., & Pierzgalski, T. (1998). Enzymatic hydrolysis of wheat starch into glucose. *Starch-Stärke*, 50(8), 337-341

Norouzian, D. & Jaffar, M. B. (1993). Immobilization of glucoamylase produced by fungus *Arthrobotrys amerospor*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31: 680–681.

Olsen, H. S. (1995). Chapter 2: Enzymatic production of glucose syrups. In: *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*, 26-64p.

Ozbek, B., & Yuceer, S. (2001). Alpha-Amylase Inactivation During Wheat Starch Hydrolysis Process. *Process Biochemistry*, 37(1), 87–95.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31: 135–152.

Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., & Rios, G. M. (2001). A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor–application to starch hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3), 273-278.

Park, B. G., Lee, W. G., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (1997). Effects of periodic backflushing with filtrate on filtration performance in an internal-filtration bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 16(5), 253-256.

Pasta, P., Carrea, G., Monzani, E., Gaggero, N., & Colonna, S. (1999). Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidation of methyl phenyl sulfide with dihydroxyfumaric acid/oxygen or ascorbic acid/oxygen as oxidants. *Biotechnology and bioengineering*, 62(4), 489-493.

Pinelo, M., Jonsson, G., & Meyer, A. S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 1-11.

Prazeres, D. M. F., & Cabral, J. M. S. (1994). Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(9), 738-750.

Presečki, A. V., Blažević, Z. F., & Vasić-Rački, Đ. (2013). Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by α-amylases from Bacillus licheniformis: effect of calcium, pH and temperature. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(1), 117-126.

Ramesh M. V. & Lonsane, B. K. (1989). End product profiles of starch hydrolysis by bacterial alphaamylases at different temperature and pH values, *Biotechnol. Lett*., 11, 649–652.

Rausch, K. D. (2002). Front end to backpipe: membrane technology in the starch processing industry. *Starch-Stärke*, 54(7), 273-284.

Raventós, M., & Duarte, S. (2005). Tecnología de membranas. Industria alimentaria tecnologías emergentes. Ediciones UPC. Barcelona, 173-210.

Rico, Y. (1990). Producción, purificación y caracterización parcial de una glucoamilasa de aspergillus niger. *Revista Colombiana de Química*, 19(1), 61-71.

Ríos, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., & Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors–a review. *Journal of Membrane Science*, 242(1), 189-196.

Rodríguez Reinoso, C. E. (2011). *Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (Musa cavendish) para la obtención de jarabe de glucosa*. (Trabajo de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torrresa, R. G., & Molina, D. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2337–2343.

Sandoval, A. A., Rodríguez, S. E., & Fernández, Q. A. (2005). Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*, 72(146), 45-53.

Sarbatly, R., Krishnaiah, D. & England, R. (2007). Continuous recycle enzymatic membrane reactor system for In-situ production of pure and sterile glucose solution. *Journal of Applied Sciences*, 7(15), 2063-2068.

Schirmer, M., Jekle, M., & Becker, T. (2015). Starch gelatinization and its complexity for analysis. *Starch-Stärke*, 67(1-2), 30-41.

She, Q., Tang, C. Y., Wang, Y. N., & Zhang, Z. (2009). The role of hydrodynamic conditions and solution chemistry on protein fouling during ultrafiltration. *Desalination*, 249(3), 1079-1087.

Shi, X., Tal, G., Hankins, N. P., & Gitis, V. (2014). Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: a review. *Journal of Water Process Engineering*, 1, 121-138.

Sidhu, G. S., Sharma, P., Chakrabarti, T., & Gupta, J. K. (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(7), 525-530.

Singh, N. & Cheryan, M. (1998). Membrane Technology in Corn Refining and Bioproduct-Processing. *Starch-Stärke*, 50(1S), 16–23.

Slaughter, S. L., Ellis, P. R., & Butterworth, P. J. (2001). An investigation of the action of porcine pancreatic α-amylase on native and gelatinised starches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1525(1), 29-36.

Słomińska, L., & Niedbacha, J. (2009). Study on the influence of the so-called filtration enzyme action on the membrane filtration process of wheat starch hydrolysates. *Desalination*, 241(1-3), 296-301.

Smrčková, P., Horský, J., Šárka, E., Koláček, J., Netopilík, M., Walterová, Z., … Hrušková, K. (2013). Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 43–49.

Stark, D., & Von Stockar, U. (2003). In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. In Process Integration in Biochemical Engineering. Springer Berlin Heidelberg. 149-175p.

Suckling C. (1990). Enzyme Chemistry: Impact and applications. Chapman and Hall. Second Edition. London. 310-318p.

Sujka, M., Udeh, K. O., & Jamroz, J. (2006). α-Amylolysis of native corn, potato, wheat and rice starch granules. *Italian journal of food science*, 18(4).

Sweity, A., Ying, W., Belfer, S., Oron, G., & Herzberg, M. (2011). pH effects on the adherence and fouling propensity of extracellular polymeric substances in a membrane bioreactor. *Journal of membrane science*, 378(1), 186-193.

Tomasik, P., & Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 68, 59-436.

Tsuru, T., Izumi, S., Yoshioka, T. & Asaeda, M. (2000). Temperature effect on transport performance by inorganic nanofiltration membranes, *AIChE J.* 46, 565–574.

Turmanova, S., Trifonov, A., Kalaijiev, O. & Kostov, G. (1997). Radiation grafting of acrylic acid onto polytetrafluoroethylene films for glucose oxidase immobilization and its application in membrane biosensor. *Journal of Membrane Science*, 127(1), 1-7.

Vijayakumar, G. R., Manohar, B., & Divakar, S. (2005). Amyloglucosidase-catalyzed synthesis of n-octyl-d-glucoside—analysis using response surface methodology. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 272-277.

Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V., & Chulalaksananukul, W. (2013). Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production*, 39, 273–279.

Weemaes, C., De Cordt, S., Goossens, K., Ludikhuyze, L., Hendrickx, M., Heremans, K., & Tobback, P. (1996). High pressure, thermal, and combined pressure–temperature stabilities of α-amylases from Bacillus species. *Biotechnology and bioengineering*, 50(1), 49-56.

Wei, P., Cheng, L. H., Zhang, L., Xu, X. H., Chen, H. L., & Gao, C. J. (2014). A review of membrane technology for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 388-400.

Weil, C. E., Burch, R. J. & Van Dyk, J. W. (1954). An α-amyloglucosidase that produces β-glucose. *Cereal Chemistry*, 131: 150–158.

Wiesner M. R. & Aptel P. (1998). Capítulo 4: Transporte de masa, caudal de permeado y ensuciamiento en procesos impulsados por presión. En: Tratamiento del agua por procesos de membrana: Principios, procesos y aplicaciones. AWWA. McGraw Hill. 71-106p.

Xiao, Y., Liu, X. D., Wang, D. X., Lin, Y. K., Han, Y. P., & Wang, X. L. (2013). Feasibility of using an innovative PVDF MF membrane prior to RO for reuse of a secondary municipal effluent. *Desalination*, 311, 16-23.

Yankov, D., Dobreva, E., Beschkov, V., & Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(11), 665–667.

Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 467–475.

Zanin, G. M., & De Moraes, F. F. (1996). Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57–58(1), 617–625.

Zhang, M., Su, R., Li, Q., Qi, W., & He, Z. (2011). Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. *Bioenergy Research*, 4(2), 134-140.

Zhou, Q., Xu, S., Zhu, C., Cao, B., Kausar, F., Xu, A., ... & Zhang, Y. (2017). Towards high-performance hybrid hydrophilic membranes: chemical anchoring of hydroxyl-rich nanoparticles on PVDF membranes via a silane coupling agent. *Journal of Materials Science*, 52(19), 11737-11748.

Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, Q., Xi, X., Zhang, J., & Yang, W. (2012). Equilibrium and thermodynamic studies on adsorption of BSA using PVDF microfiltration membrane. *Desalination*, 307, 61-67.

CAPÍTULO 2: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA

2.1 INTRODUCCIÓN

El almidón de trigo por ser fuente de carbohidratos, su demanda constante de las industrias alimenticias y su contenido de amilosa, se ha reportado como la segunda opción para producir jarabes de glucosa (Hua & Ruijin, 2016; Fujita, 2017). Los procesos para la producción de jarabes de glucosa son la licuefacción y sacarificación, los cuales se realizan mediante enzimas amilolíticas. Estas enzimas (alfa-amilasa y glucoamilasa) se usan comúnmente en soluciones y pueden ser susceptibles de inhibición tanto para sustratos como para productos (Ruiz et al. 2011). En este capítulo se utilizaron dos materias primas a partir del almidón de trigo: almidón puro y un residuo agroindustrial. Las materias primas se caracterizaron mediante la metodología de NREL (National Renewable Energy Laboratory) NREL/TP-510- 42620 y las actividades enzimáticas mediante la metodología de Sigma-Aldrich (2017a y 2017b). Para la identificación de las variables que afectan los procesos de licuefacción y sacarificación, se utilizó la metodología de superficie de respuesta, la cual se ha aplicado con éxito identificando los princípiales efectos e interacciones de las variables sobre la producción de jarabes de glucosa (Kunamneni & Singh, 2005).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Caracterización de materias primas y medición de actividad enzimática específica

Se utilizaron dos materias primas amiláceas. Una materia prima es un residuo agroindustrial amiláceo que se encuentra compuesto por una mezcla entre 60% de residuo con características saladas y un 40% de un residuo con características dulces, ambos molidos. La otra materia prima fue almidón de trigo puro. La caracterización de las materias primas se basó en la metodología de NREL/TP-510- 42620. Para la preparación de muestras, se realizó el análisis granulométrico a la composición de los residuos con características saladas y dulces.

Para la homogenización de los residuos agroindustriales salados y dulces, se utilizaron 500 g aproximadamente y se procesaron dos veces en el cuarteador. Este proceso se realizó hasta completar el total de la muestra recibida. Las muestras obtenidas en cada colector de la homogenización se pasaron a bolsas plásticas por separado y al completar cada bolsa con 5 muestras homogenizadas se sellaron y se almacenaron.

Para determinar la granulometría de los residuos agroindustriales salados y dulces molidos se utilizó una de las bolsas homogenizada, se extendió en un papel craft, se homogenizó de nuevo, se dividió la muestra en cuatro partes y se le realizó la granulometría por triplicado con 150 g de muestra. Se utilizaron 9 tamices en un rotap con número de malla de 8, 18, 20, 35, 40, 70, 80, 100, 200 durante 15 minutos. Antes y después del tamizado se tomaron los pesos de los tamices y por diferencia de peso se calculó la cantidad de biomasa retenida en cada malla. Los porcentajes de material retenido y el retenido acumulado en los tamices, se determinan por las Ecuaciones 2.1 y 2.2 (Hames et al. 2008).

Fracción másica retenida diferencial

$$\Delta X_i = \frac{M_i}{M_t} x100 \qquad (2.1)$$

Fracción másica acumulada

$$X_i = X_{i-1} + \Delta X_i \qquad (2.2)$$

Posterior a la granulometría, se realizó la caracterización de las materias primas basada en la metodología de NREL utilizando la fracción retenida en la malla 70 para el análisis composicional de las materias primas. La Tabla 2.1 presenta los métodos utilizados para la caracterización de las biomasas.

Tabla 2.1 Métodos para la caracterización de biomasas

Análisis	**Método**
Humedad	Termogravimétrico por secado 105ºC / NREL/TP-510-42621
Cenizas	NREL/TP-510-42622
Extractivos en agua, etanol y hexano	NREL/TP-510-42619
Proteína	Método Kjeldahl
Almidón	Polarimetría

Para la determinación de la actividad de las enzimas alfa amilasa Spezyme® Fred y glucoamilasa Optidex® L-400, se siguieron los protocolos de Sigma-Aldrich, los cuales son presentados en el Anexo 1. Éstos fueron basados en las definiciones de actividad para cada una de las enzimas utilizadas. Para obtener la actividad específica de las enzimas, se realizó la medición de proteína por el Método de Bradford, el cual consiste en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 a los residuos arginil y lisil de las proteínas, colorante que es medido a 595nm (Kruger, 2002) y presentado en el Anexo 2.

2.2.2 Condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa

Para realizar esta etapa se utilizaron las dos materias primas manteniendo el proceso de gelatinización con iguales valores para las variables de operación. Para los procesos de licuefacción y sacarificación se evaluaron diferentes niveles de variables como se describe a continuación.

Proceso de Gelatinización

Los ensayos fueron realizados en Erlenmeyer de 500 mL con un peso efectivo de 100 g y utilizando buffer fumárico a 0,1M. Las condiciones de la etapa de gelatinización fueron las siguientes: 20%p/p de almidón (Smrčková et al. 2013), 95ºC (Betiku, Akindolani, & Ismaila, 2013; Li et al. 2015; Zabed et al. 2016), 150rpm (Baks et al. 2008, Ruiz et al. 2011, Zabed et al. 2016), 10 min para el residuo agroindustrial y 30 min para el almidón de trigo (Genencor, 2006; Baks et al. 2008; Ruiz et al. 2011; Cruz, 2012; Li et al. 2015). La diferencia de tiempos es un resultado de ensayos preliminares, donde se observó que el almdión de trigo por contener más porcentaje de almidón que el residuo agroindustrial, requirió más tiempo para lograr liberar los polímeros de amilosa y amilopectina utilizados en los ensayos de licuefacción (Ruiz et al. 2011; Schirmer et al. 2015).

Proceso de Licuefacción

Se utilizó la enzima amilasa Spezyme® Fred con una actividad específica de 2389 U/g, la cual proviene de una cepa genéticamente modificada de *Bacillus licheniformis*. Se seleccionó la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto, como herramienta para encontrar las condiciones de máxima producción de oligosacáridos. Esta técnica estadística es empleada para describir el efecto individual y acumulado de las variables a probar y sus efectos sobre la variable de respuesta (Roberto et al. 2003, Montgomery, 2004; Gutiérrez Pulido & De la Vara, 2008).

De acuerdo con la revisión bibliográfica del Capítulo 1, el rango para la relación enzima/sustrato se encuentra entre 0,003 hasta 10%p/p (Ewa Nebesny, 1998; Ozbek & Yuceer, 2001; Genencor, 2006; Virunanon et al. 2013). La enzima α-amilasa que proviene de la bacteria *Bacillus licheniformis,* siendo la utilizada para este estudio, es más termoestable comparada con *B. stearothermophilus* y *B. amyloliquefaciens* (Dey et al. 2016) y su rango de temperatura está entre 40 – 100°C (Murthy et al. 2009; Johnston & McAloon, 2014; Zabed et al. 2016; Brenda, 2017).

La termoestabilidad de la enzima α-amilasa proveniente de *Bacillus licheniformis* está ligada al pH y la adición de calcio (Crabb & Mitchinson, 1997). Para ser compatible con el pH óptimo de estas enzimas, la solución de almidón debe ajustarse desde su pH natural de 4,5 a un pH entre 5,5-6,0 y adición de iones de calcio entre 5-20ppm (Genencor, 2006; Johnston & McAloon, 2014; Zabed et al. 2016). De acuerdo a la ficha técnica de la enzima y las diferentes publicaciones, se definió el pH en 5,8 unidades y 10ppm Ca^{+2} (Genencor, 2006; Murthy et al. 2009; Johnston & McAloon, 2014).

Debido a que el rango de la relación enzima/sustrato y la temperatura son muy amplios, se realizaron ensayos preliminares, los cuales permitieron limitarlos y se presentan en el Anexo 3. Por lo anterior, se realizó un diseño central compuesto para el residuo agroindustrial evaluando los factores de relación enzima/sustrato (E/S 0,04 – 0,10 %) y la temperatura (70 – 80°C). Para el almidón de trigo puro se realizó un diseño central compuesto evaluando los factores de relación enzima/sustrato (E/S 0,02 – 0,10 %) y la temperatura (30 – 80°C). Los parámetros fijos fueron 20%p/p sólidos, pH 5,8 unidades, 150 rpm, 1 hora y 10 ppm de Ca^{+2}.

Al final de cada experimento se tomó muestra y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4ºC para el residuo agroindustrial y a 40°C para el almidón de trigo puro con el fin de obtener más sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante fue filtrado al vacío con papel filtro de 45 µm de poro. La concentración de azúcares reductores como variable respuesta, fue determinada por triplicado con el método de DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico).

El diseño estadístico arrojó 13 corridas con 5 puntos centrales, un nivel de significancia del 5% y azúcares reductores como variable respuesta. Tanto la formulación del diseño de experimentos como el tratamiento estadístico de los datos fueron realizados en el software MINITAB® 15.1.20.0. (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos) obteniendo las condiciones de máxima producción de oligosacáridos. Se validó el modelo empírico estadístico evaluando la condición de máxima producción de cada materia prima arrojada por el programa de MINITAB® 15.1.20.0. y dos puntos por encima y por debajo por triplicado. Los resultados son presentados en el Anexo 4 y 5 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente.

Proceso de Sacarificación

Se utilizó la enzima glucoamilasa Optidex® L-400 con una actividad específica de 3064,46 AUG/g a partir de una cepa de *Aspergillus niger*. Se seleccionó la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto para encontrar las condiciones de máxima producción de oligosacáridos (Roberto et al. 2003, Gutiérrez Pulido & De la Vara, 2008). Se realizó un diseño central compuesto evaluando los factores de E/S (E/S 0,10 – 0,50%), temperatura (40 – 65°C) y pH (4 – 4,5unidades). Los parámetros fijos fueron 20%p/p sólidos, 150 rpm y 1 hora. El rango de parámetros seleccionados se basó en la revisión de literatura presentada en el Capítulo 1.

Al final de cada experimento se tomó muestra y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C. La concentración de glucosa en el sobrenadante como variable respuesta, se determinó por HPLC usando la columna Aminex HPX-87P a 60°C con un flux de 0,6mL/min con detector RID y agua como fase móvil.

El diseño estadístico arrojó 20 corridas con 6 puntos centrales, un nivel de significancia del 5% y como variable respuesta glucosa. Tanto la formulación del diseño de experimentos como el tratamiento estadístico de los datos fueron realizados en el software MINITAB® 15.1.20.0. (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos), obteniendo las condiciones de máxima producción de glucosa. Se validó el modelo empírico estadístico evaluando la condición de máxima producción de cada materia prima arrojada por el programa de MINITAB® 15.1.20.0. y dos puntos por encima y por debajo por triplicado. Los resultados son presentados en el Anexo 6 y 7 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente.

2.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.3.1 Caracterización de materias primas y medición de actividad enzimática específica

La Tabla 2.2 y 2.3 y las Figuras 2.1 a 2.4 presentan el peso retenido del residuo agroindustrial con características saladas y dulces por cada tamiz y el resultado del análisis granulométrico, respectivamente.

Tabla 2.2 Peso retenido en cada malla del residuo agroindustrial con característica salada

Muestra tamizada:		**150 g**	**150 g**	**150 g**
No. de Malla	**Abertura (mm)**	**Peso retenido(g)**	**Peso retenido(g)**	**Peso retenido(g)**
8	2,36	21	20	20
18	1,0	35	35	35
20	0,85	6	60	18
35	0,5	28	18	47
40	0,425	29	7	24
70	0,212	31	10	6
80	0,18	0	0	0
100	0,15	0	0	0
200	0,075	0	0	0
Colector		0	0	0

Tabla 2.3 Peso retenido en cada malla del residuo agroindustrial con característica dulce

Muestra tamizada:		**150 g**	**150 g**	**150 g**
No. de Malla	**Abertura (mm)**	**Peso retenido(g)**	**Peso retenido(g)**	**Peso retenido(g)**
8	2,36	13	13	13
18	1,0	42	42	43
20	0,85	30	29	30
35	0,5	64	63	63
40	0,425	1	1	1
70	0,212	1	0	1
80	0,18	0	0	0
100	0,15	0	0	0
200	0,075	0	0	0
Colector		0	0	0

Figura 2.1 Montaje de tamices con residuo agroindustrial con característica salada

Figura 2.2 Montaje de tamices con residuo agroindustrial con característica dulce

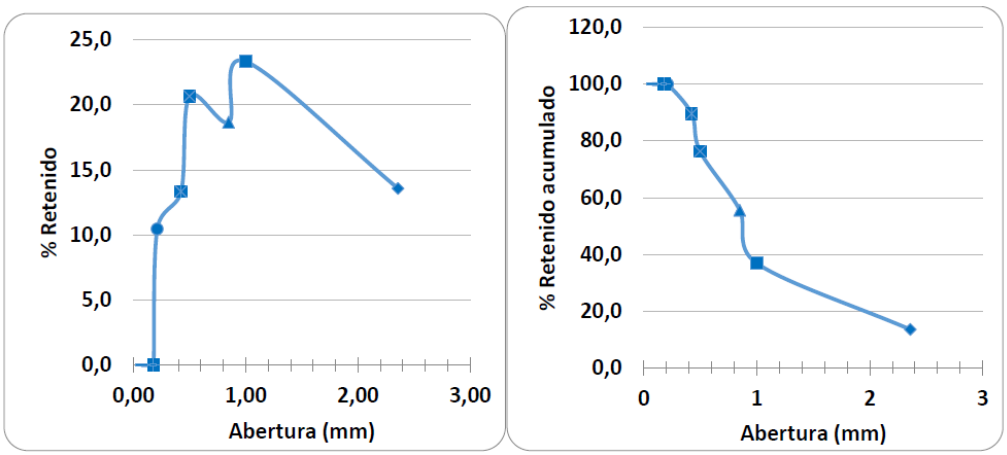


Figura 2.3 Análisis granulométrico diferencial (izquierda) y acumulado (derecha) del residuo agroindustrial con características saladas

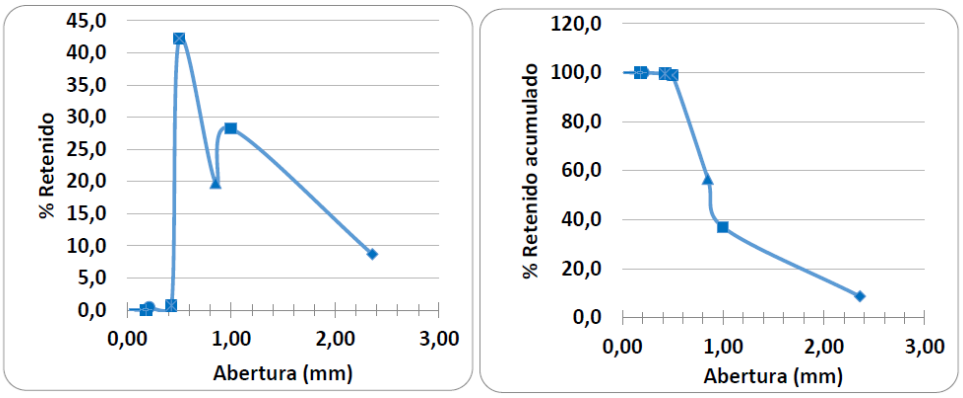


Figura 2.4 Análisis granulométrico diferencial (izquierda) y acumulado (derecha) del residuo agroindustrial con características dulces

Del análisis granulométrico se puede concluir que el 64% del residuo agroindustrial (salado y dulce) está entre tamaños de partícula entre 0,15 y 1,0 mm, encontrándose para el residuo agroindustrial dulce una mayor retención (42%) en malla 35 con abertura de 0,5 mm, seguida de la malla 18 con abertura de 1,0mm reteniendo un 28,8%. Para el residuo agroindustrial salado se encontró una mayor retención (23,3%) en malla 18 con abertura de 1,0 mm, seguida de la malla 35 con abertura de 0,5mm reteniendo un 20,6%. Estos tamaños de partícula permiten una adecuada hidrólisis según Ballesteros et al. (2002), ya que el tamaño de la partícula aumenta el área superficial por unidad de volumen y la viabilidad de la enzima para la unión del sustrato, lo que conduce a un aumento de la velocidad de hidrólisis (Mahasukhonthachat et al. 2010; de la Hera et al. 2013). Además del tamaño de las partículas, se debe tener en cuenta que la hidrólisis del almidón también depende de otras propiedades, como el tamaño de los gránulos, el grado de cristalinidad, los poros superficiales o canales, los demás componentes del almidón (grasas, proteínas, inertes) y la relación amilosa:amilopectina (Mahasukhonthachat et al. 2010).

Los resultados de la caracterización de la mezcla del residuo agroindustrial y almidón de trigo puro se presentan en la Tabla 2.4 con los resultados de otros estudios.

Tabla 2.4 Resultados caracterización de la mezcla del residuo agroindustrial y almidón de trigo puro comparado con otros estudios

Componente (%)	**Mezcla del Residuo agroindustrial en este estudio**	**Almidón de trigo puro en este estudio**	**Harina de trigo integral[1]**	**Almidón de trigo[1]**	**Harina de trigo[2]**	**Trigo[2]**	**Salvado de trigo [3]**
Humedad	2,6±0,1	7,9±0,2	11,16±0,27	7,96±0,09	13,75±0,27	13,07±0,66	NR
Sólidos	97,4±0,1	92,1±0,2	NR	NR	NR	NR	NR
Extractivos con hexano (grasas)	13,6±0,4	0,03±0,01	1,37±0,38	0,32±0,01	NR	NR	NR
Extractivos con agua (material inorgánico, azúcares solubles y material nitrogenado, entre otros)	12,7±0,5	2,3±0,1	NR	NR	NR	NR	NR
Extractivos con etanol (ceras u otros componentes menores)	5,41±0,1	1,0±0,1	NR	NR	NR	NR	NR
Almidón base seca	56,0±0,1	80,7±0,1	73,84±0,98	25,33±0,33*	67,78±1,33	70,77±1,24	17,96±1,21**
Cenizas	0,7±0,1	0,2±0,1	0,42±0,09	0,29±0,02	0,63±0,09	1,95±0,41	NR
Proteína base seca	13,2±0,1	2,3±0,1	11,35±0,34	0,39±0,01	11,58±0,28	15,17±1,13	0,15±0,07
Total	101,6	86,5	87,0	26,33	80,00	87,9	18,11

NR: No Reporta. *Amilosa. **27,61% Amilosa del contenido de almidón. [1] Bashir et al. 2017. [2] Frakolaki et al. 2017. [3] Xie et al. 2008.

Los resultados de la Tabla 2.4 indican que el almidón de trigo puro presentó mayor humedad y menor contenido de cenizas en comparación con el residuo agroindustrial similares al estudio de Bashir et al. (2017). En cuanto a los diferentes porcentajes de cenizas (0,2% para el almidón de trigo puro, frente a 0,7% para el residuo agroindustrial) se puede justificar considerando que el almidón de trigo puro trabajó como un patrón, mientras que el residuo agroindustrial proviene de un proceso complejo para su producción, dando como resultado un contenido más alto de minerales.

Otro de los aspectos importantes del residuo agroindustrial es el contenido de grasas que se obtuvieron a partir de los extractivos con hexano, el cual presenta un porcentaje mayor que en otros estudios para materias primas proveniente de almidón e influye en los procesos de hidrólisis enzimática (Ai, Hasjim & Jane, 2013); mientras que el almidón de trigo puro presentó bajas concentraciones de grasas por ser un patrón. Los demás extractivos con agua y etanol, representan el material inorgánico, azúcares propios del residuo, material nitrogenado y otros componentes menores (Sluiter et al. 2008). Estos resultados no son reportados en otros estudios siendo más completa la caracterización presentada, el porcentaje de extractivos en agua y etanol se deben tener en cuenta, ya que al no reaccionar en el proceso de hidrólisis enzimática pueden acumularse en el fondo de los reactores siendo necesario su retiro del sistema (Andrić et al. 2010).

El comportamiento del contenido de proteínas fue similar al de las cenizas, observándose en la Tabla 2.4 que el almidón de trigo puro presenta menores cantidades de proteína comparado con otras materias primas. Los dos tipos diferentes de materias primas contienen cantidades importantes de almidón. Su diferencia es atribuida al procesamiento de las materias primas, ya que el almidón de trigo puro es en su mayoría (80%) almidón, mientras que para el residuo agroindustrial presenta 56%. La actividad específica de la enzima Spezyme® Fred fue 2389 U/g y la enzima Optidex® L-400 presenta una actividad específica de 3064,46 AUG/g.

2.3.2 Condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa

2.3.2.1 Proceso de licuefacción

Residuo agroindustrial

La concentración de azúcares reductores de cada ensayo del diseño central compuesto se presentan en la Tabla 2.5, la cual muestra que se obtuvieron las mayores concentraciones de azúcares reductores entre 59,3 y 67,7 g/L en las corridas de los puntos centrales (75°C y 0,07% E/S).

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para ajustar los resultados experimentales a un modelo estadístico con el programa MINITAB® 15.1.20.0. (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos). La Tabla 2.6 presenta los términos del modelo, sus coeficientes y el análisis de varianza (ANAVA) que permite establecer el efecto de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Tabla 2.5 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial

Corrida	Temperatura (°C)	E/S (%)	Azúcares reductores - DNS (g/L)
1	75,00	0,0700	59,37
2	70,00	0,1000	52,02
3	75,00	0,0700	59,60
4	80,00	0,1000	38,76
5	70,00	0,0400	64,42
6	75,00	0,0299	55,53
7	67,93	0,0700	58,33
8	75,00	0,0700	62,15
9	82,07	0,0700	29,37
10	75,00	0,0700	61,11
11	80,00	0,0400	54,39
12	75,00	0,0700	67,60
13	75,00	0,1110	55,95

Tabla 2.6 ANAVA de licuefacción del residuo agroindustrial

Término	Coeficiente	Valor P
Constante	-1743,05	0,000
Temperatura (°C)	49,2195	0,004*
E/S (%)	671,977	0,112
T*T	-0,336328	0,004*
E/S*E/S	-2734,95	0,264
T*E/S	-5,37898	0,771

*Significancia <0,05

Los resultados de la Tabla 2.6 permiten observar una diferencia estadísticamente significativa (valor $P \leq 0,05$) para la temperatura y para el término cuadrático de este factor, es decir, que afectan significativamente sobre la hidrólisis en la etapa de licuefacción y, por lo tanto, variaciones en su valor dentro del rango evaluado, generan cambios apreciables en los azúcares reductores producidos. Caso contrario se obtuvo con la relación enzima/sustrato (E/S), lo que indica que para el rango evaluado, estadísticamente cualquier relación E/S que se seleccione generará el mismo efecto en la producción de azúcares reductores.

Para cuantificar el ajuste del modelo se emplea el coeficiente de determinación R^2. Este valor se define como la relación entre la variabilidad de la respuesta explicada por el modelo respecto a la variabilidad total y puede tomar un valor entre 0 y 1; cuanto mayor sea, indicará un mejor ajuste de los datos experimentales al modelo, un $R^2 > 0,75$ indica que un modelo es apropiado (Han, Kim, Kim, Chung, & Choi, 2011; Liscano Martínez, 2014). El coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado) considera los términos que permitan explicar la respuesta y se recomienda un coeficiente de determinación ajustado de al menos 0,7 (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2008).

El ajuste de los datos al modelo fue 0,85 (R^2), por lo tanto, el 85% de la variabilidad en la respuesta puede ser explicada por el modelo estadístico. El R^2 ajustado fue del 0,74

siendo éste una herramienta útil para comparar la potencia explicativa de modelos con diferentes predictores, este valor aumentará solamente si el nuevo factor mejora el modelo más de lo que se esperaría solo por razones de probabilidad (Martínez, 2014).

La Ecuación 2.3 del modelo es la siguiente:

$$AR = -1743{,}05 + (49{,}2195 * T) + (671{,}977 * E/S) - (0{,}336328 * T^2) - (2734{,}95 * (E/S)^2) - (5{,}37898 * T * E/S) \quad (2.3)$$

Donde:
AR: Concentración de azúcares reductores, g/L
T: Temperatura, °C
E/S: Relación enzima sustrato, %.

La Figura 2.5 presenta los resultados de contorno y la superficie de respuesta del diseño estadístico que describe la interacción entre los factores y la variable respuesta para la licuefacción del residuo agroindustrial.

En la Figura 2.5 se evidencia que la producción de azúcares reductores presenta una curvatura en la temperatura cercana a 75°C maximizando su producción. El rango evaluado de temperatura tuvo una diferencia de 10°C y se observa que la enzima disminuye la producción de AR al aumentar y disminuir este factor en los extremos, lo que puede indicar que la enzima con las condiciones de pH y adición de calcio, presenta su termoestabilidad en esta temperatura (Crabb & Mitchinson, 1997).

En el comportamiento de la relación E/S, el análisis de ANAVA indica estadísticamente que cualquier realción E/S generará el mismo efecto; sin embargo, en el comportamiento del proceso se observa una máxima producción de AR aproximadamente en 0,05%, disminuyendo su producción al aumentar la relación E/S. Este comportamiento es debido a las características del sustrato, ya que la enzima rompe principalmente los enlaces α-1,4 de la amilosa y aunque se incremente la cantidad de enzimas, no habría más disponibilidad de sustrato que incremente la producción de AR pero sí aumentarían los costos del catalizador en el proceso (Ruiz et al. 2011; Dey, 2016). A partir del modelo estadístico (Ecuación 2.3) se obtuvieron las condiciones de máxima producción de AR con una temperatura de 72,78°C y una relación E/S de 0,0516%. La Tabla 2.7 presenta los resultados de validación del modelo estadístico.

Tabla 2.7 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial

E/S (%)	Temperatura (°C)	Producción Actual (gAR/L)	Respuesta Predicha (gAR/L)
0,0516	**72,8**	**64,11±0,78**	**64,83**
0,0350	76,0	60,41±0,42	60,86
0,0600	71,0	63,49±0,51	63,66

De acuerdo con los resultados de validación se verificó que la condición obtendia por el programa MINITAB corresponde al valor de máxima producción de azúcares reductores. La condición de máxima producción está dentro de los rangos reportados en la literatura.

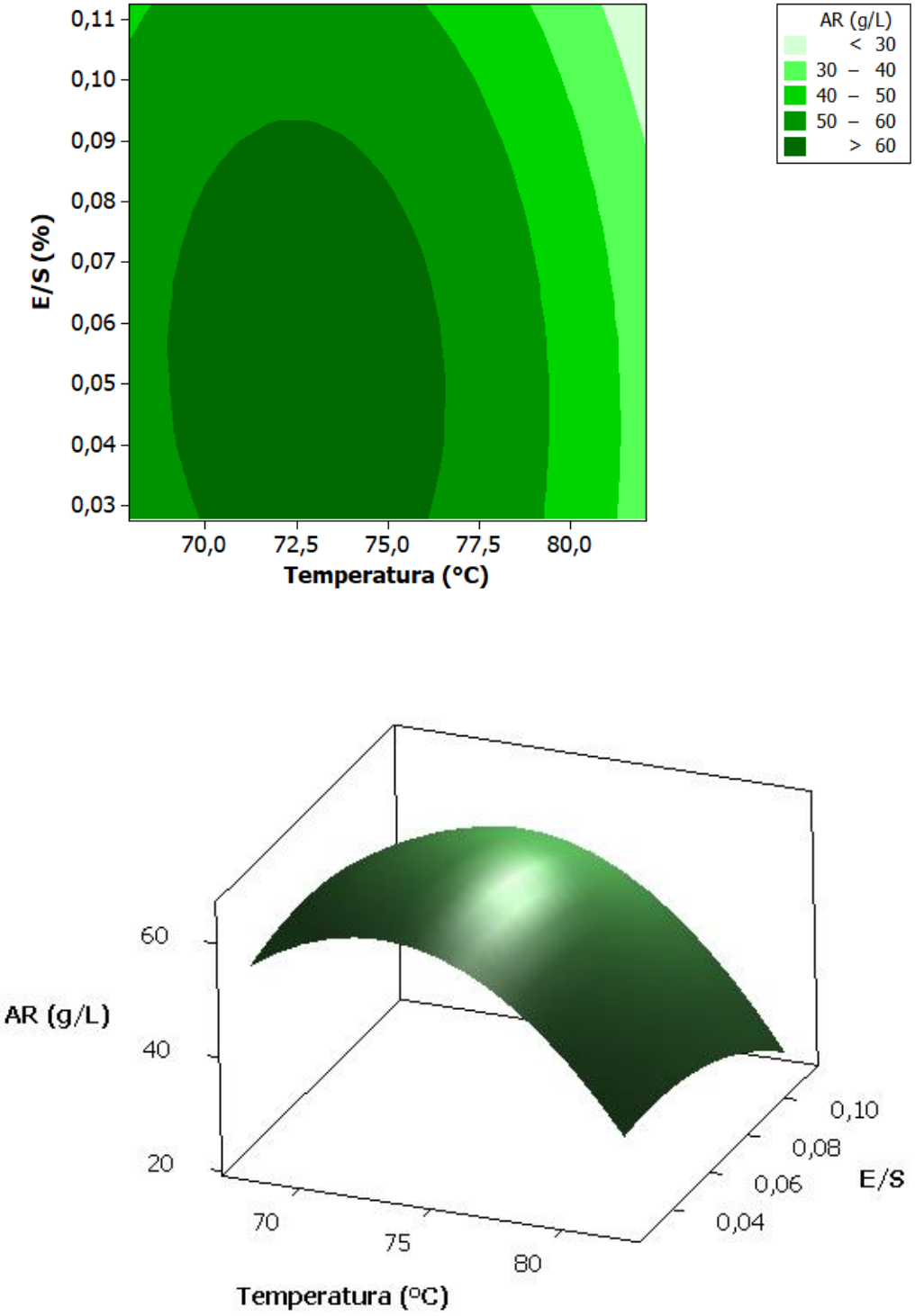


Figura 2.5 Resultados de contorno y superficie de respuesta del proceso de licuefacción. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares reductores como variable respuesta para el residuo agroindustrial.

Almidón de trigo puro

La Tabla 2.8 presenta la concentración de azúcares reductores de cada ensayo del diseño central compuesto. Se evidencia que la mayor concentración de azúcares reductores (142,46 g/L) se obtuvo con el extremo inferior de la relación enzima sustrato (0,02%) y el extremo superior de temperatura (80°C).

Tabla 2.8 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro

Corrida	Temperatura (°C)	E/S (%)	Azúcares reductores (g/L)
1	85	0,1	61,95
2	59,5	0,003	88,80
3	34	0,1	65,31
4	85	0,02	142,46
5	59,5	0,06	118,49
6	34	0,02	75,39
7	59,5	0,06	119,88
8	59,5	0,11	44,36
9	59,5	0,06	115,34
10	95,5	0,06	79,48
11	59,5	0,06	125,0
12	26,6	0,06	103,44
13	59,5	0,06	119,85

La Tabla 2.9 presenta los términos del modelo, sus coeficientes y el análisis de varianza (ANAVA) que permite establecer el efecto de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Tabla 2.9 ANAVA de licuefacción de almidón de trigo puro

Término	Constante	Valor P
Constante	-54,9225	0,000
Temperatura (°C)	3,77203	0,360
E/S (%)	2385,39	0,005*
T*T	- 0,0213935	0,040*
E/S*E/S	-15314,1	0,002*
T*E/S	-17,2636	0,037*

*Significancia < 0,05

Para el almidón de trigo puro se encontró estadísticamente que todos los términos, a excepción de la temperatura, afectan significativamente la hidrólisis en la etapa de licuefacción, es decir, que variaciones en estos factores generan cambios apreciables en los azúcares reductores producidos.

El ajuste de los datos al modelo fue 0,88 (R^2), siendo mayor a 0,75 lo que indica que el modelo es apropiado para describir los datos obtenidos (Han et al. 2011). El R^2 ajustado fue del 0,79 y la cercanía de estos dos valores, confirma que la mayoría de los términos

del modelo presentan efectos significativos con la variable respuesta (Chowdhury, Sarkar, & Mitra, 2016).

La Ecuación 2.4 del modelo es la siguiente:

$$AR = -54{,}9225 + (3{,}77203 * T) + (2385{,}39 * E/S) - (0{,}0213935 * T^2) - (15314{,}1 * (E/S)^2) - (17{,}2636 * T * E/S) \quad (2.4)$$

Donde:
AR: Concentración de azúcares reductores, g/L
T: Temperatura, °C
E/S: Relación enzima sustrato, %.

La Figura 2.6 presenta los resultados de contorno y la superficie de respuesta del diseño central compuesto que se realizó para evaluar la licuefacción del almidón de trigo.

En la Figura 2.6 se observa nuevamente el comportamiento similar al residuo agroindustrial para la producción de AR con una curvatura en la temperatura cercana a 75°C que maximiza su producción aunque los resultados del ANAVA indican estadísticamente que esta es una variable no significativa del proceso. Esto confirma que la enzima es termoestable en esta temperatura junto con las condiciones de pH y adición de calcio de este estudio (Crabb & Mitchinson, 1997).

Para el caso de la relación E/S, se observa que al aumentar la relación E/S, se disminuye la producción de AR y su máxima producción se presenta en los límites inferiores. En comparación con el residuo agroindustrial, la relación E/S es menor debido a que el almidón de trigo puro no contiene otros componentes como grasas e inertes que pueden implicar una mayor cantidad de enzima para generar la máxima producción de AR. Ai, Hasjim, & Jane (2013) encontraron que la amilosa forma complejos helicoidales únicos (ALC) con lípidos como ácidos grasos, monoglicéridos y alcoholes. Estos complejos restringen el hinchamiento del gránulo y, consecuentemente, decrece la velocidad de la hidrólisis enzimática y la viscosidad del almidón.

A partir del modelo estadístico (Ecuación 2.4) se obtuvieron las condiciones de máxima producción de AR con una temperatura de 73,3°C y una relación E/S de 0,0366%. La Tabla 2.10 presenta los resultados de validación del modelo estadístico.

Tabla 2.10 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro

E/S (%)	Temperatura (°C)	Producción Actual (gAR/L)	Respuesta Predicha (gAR/L)
0,0366	**73,3**	**127,85±0,12**	**127,10**
0,0150	80,0	122,23±0,6	121,54
0,0500	65,0	124,31±0,13	124,75

De acuerdo con los resultados de validación se verificó que la condición obtendia por el programa MINITAB corresponde al valor de máxima producción de azúcares reductores. La condición de máxima producción está dentro de los rangos reportados en la literatura.

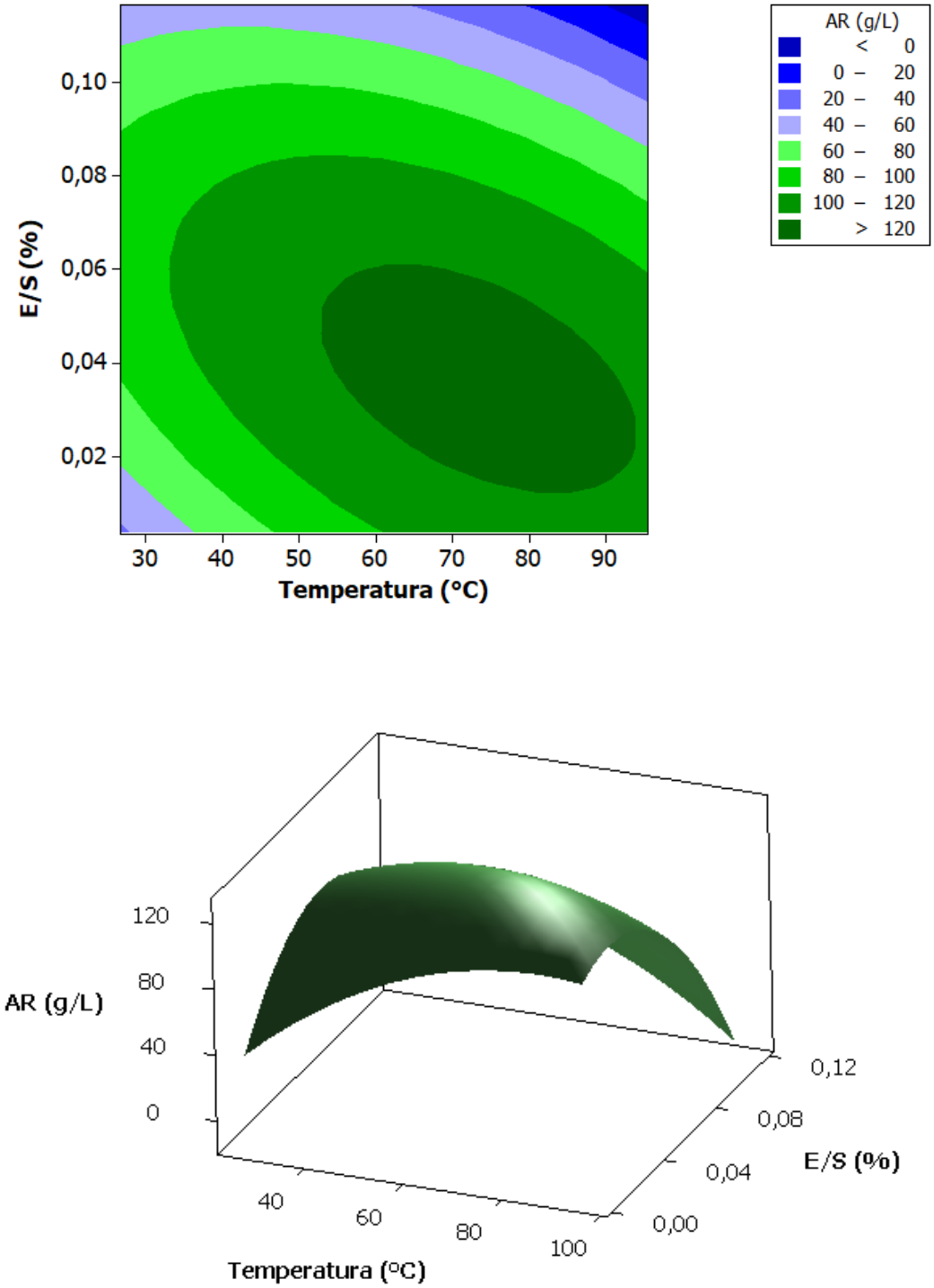


Figura 2.6 Resultados de contorno y superficie de respuesta. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares reductores como variable respuesta.

2.3.2.2 Proceso de sacarificación

Residuo agroindustrial

La concentración de glucosa de cada ensayo del diseño central compuesto se presenta en la Tabla 2.11, la cual muestra que se obtuvieron las mayores concentraciones de glucosa entre 86,53 y 90,53 g/L correspondiente a los extremos superiores de relación E/S y temperatura y en todo el rango del pH.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para ajustar los resultados experimentales a un modelo estadístico con el programa MINITAB® 15.1.20.0. (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos). La Tabla 2.12 presenta los términos del modelo, sus coeficientes y el análisis de varianza (ANAVA) que permite establecer el efecto de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Tabla 2.11 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de sacarificación del residuo agroindustrial

Orden Corrida	pH (unidades)	Temperatura (°C)	E/S (%)	Glucosa (g/L)
1	4,50	65,0	0,100	43,03
2	4,00	40,0	0,100	19,96
3	4,25	52,5	0,300	61,41
4	4,25	52,5	0,636	59,92
5	4,00	40,0	0,500	53,62
6	4,25	31,5	0,300	27,61
7	4,67	52,5	0,300	46,21
8	4,25	52,5	0,300	60,43
9	3,83	52,5	0,300	46,38
10	4,00	65,0	0,100	61,12
11	4,25	52,5	0,300	64,21
12	4,50	40,0	0,100	24,9
13	4,50	40,0	0,500	52,71
14	4,25	52,5	0,300	67,68
15	4,25	73,5	0,300	66,72
16	4,25	52,5	0,300	62,2
17	4,25	52,5	0,300	59,02
18	4,50	65,0	0,500	90,82
19	4,00	65,0	0,500	86,53
20	4,25	52,5	0,000	10,93

Tabla 2.12 ANAVA de sacarificación del residuo agroindustrial

Término	Constante	Valor P
Constante	-983,619	0,000
Temperatura (°C)	5,68947	0,000*
pH	405,082	0,770
E/S (%)	-7,83778	0,000*
T*T	-0,0160541	0,316
pH*pH	-45,0567	0,246
E/S*E/S	-191,801	0,014*
T*pH	-0,713200	0,502
T*E/S	0,586500	0,657
pH*E/S	41,3250	0,533

**Significancia < 0,05*

Los resultados de la Tabla 2.12 permiten identificar una diferencia estadísticamente significativa (valor P≤0,05) para el término cuadrático de la relación E/S, indicando que esta variable afecta significativamente sobre la hidrólisis en la etapa de sacarificación existiendo variaciones de glucosa dentro del rango evaluado. Para los términos de temperatura y E/S con un valor p 0,000 indica que no existe suficiente evidencia para determinar si es una variable significativa. El término de pH indica estadísticamente que para el rango evaluado, cualquier valor de pH que se seleccione generará un efecto similar en la producción de glucosa.

El ajuste de los datos al modelo fue 0,90 (R^2), valor que es mayor al 0,75 propuesto por Han et al. (2011), lo que indica que este modelo es apropiado para describir los datos obtenidos. El R^2 ajustado fue del 0,80 y la diferencia con el R^2 representa los términos del modelo que generan efectos significativos con la variable respuesta (Chowdhury, Sarkar, & Mitra, 2016).

La Ecuación 2.5 del modelo es la siguiente:

$$\begin{aligned} G = & -983{,}619 + (5{,}68947 * T) + (405{,}082 * pH) - (7{,}83778 * E/S) \\ & - (0{,}0160541 * T^2) - (45{,}0567 * pH^2) - (191{,}801 * (E/S)^2) \\ & - (0{,}713200 * T * pH) + (0{,}5865 * T * E/S) \\ & + \left(41{,}3250 * pH * \frac{E}{S}\right) \end{aligned} \tag{2.5}$$

Donde:
G: Concentración de glucosa, g/L
T: Temperatura, °C
E/S: Relación enzima sustrato, %.
pH: pH, unidades

Las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9 presentan los resultados de contorno y superficie de respuesta del diseño central compuesto para la sacarificación del residuo agroindustrial. En estas figuras se dejó constante una de las tres variables del modelo en el valor medio, mientras las dos variables restantes se movieron entre todos los posibles valores de su rango.

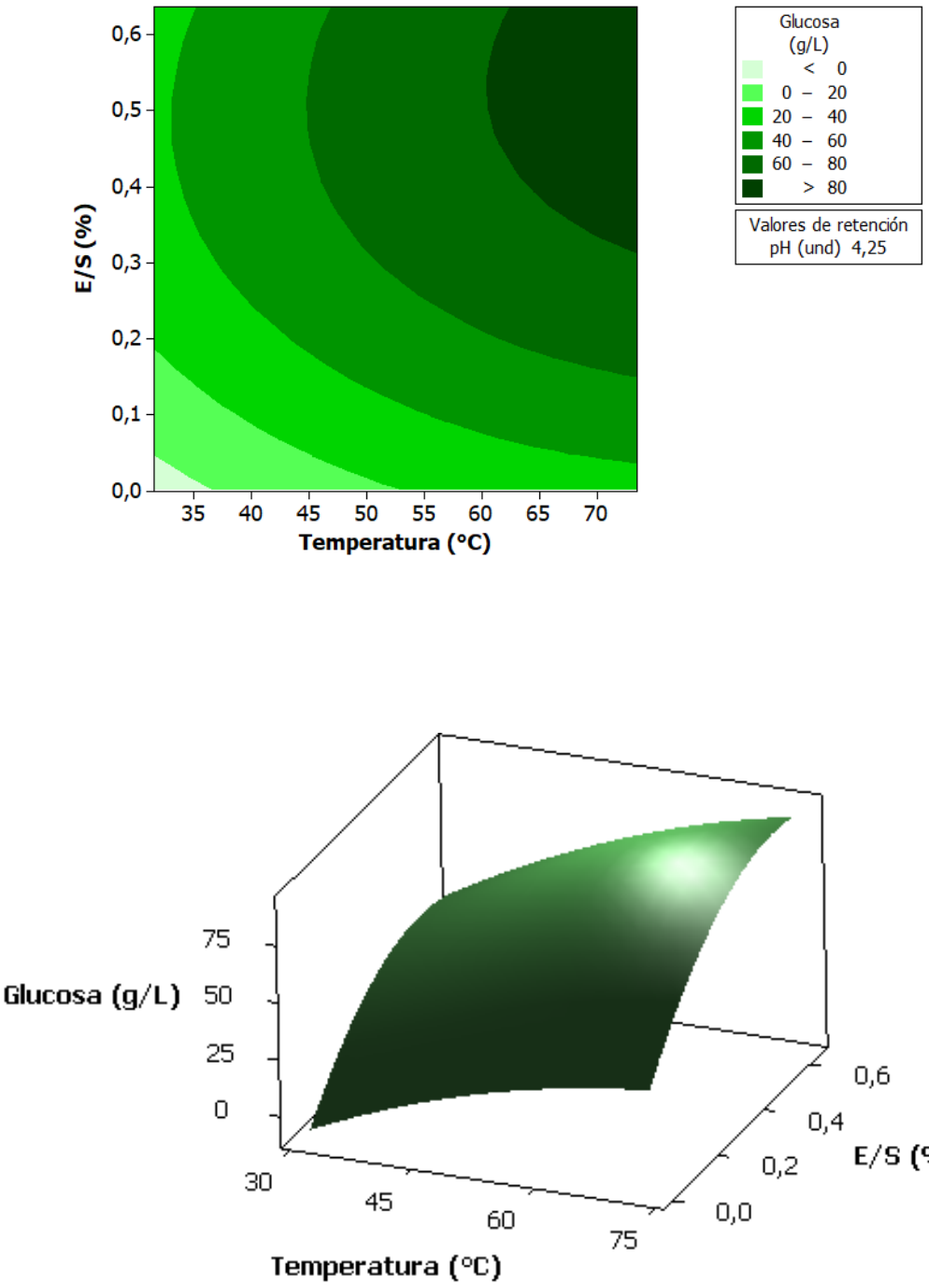
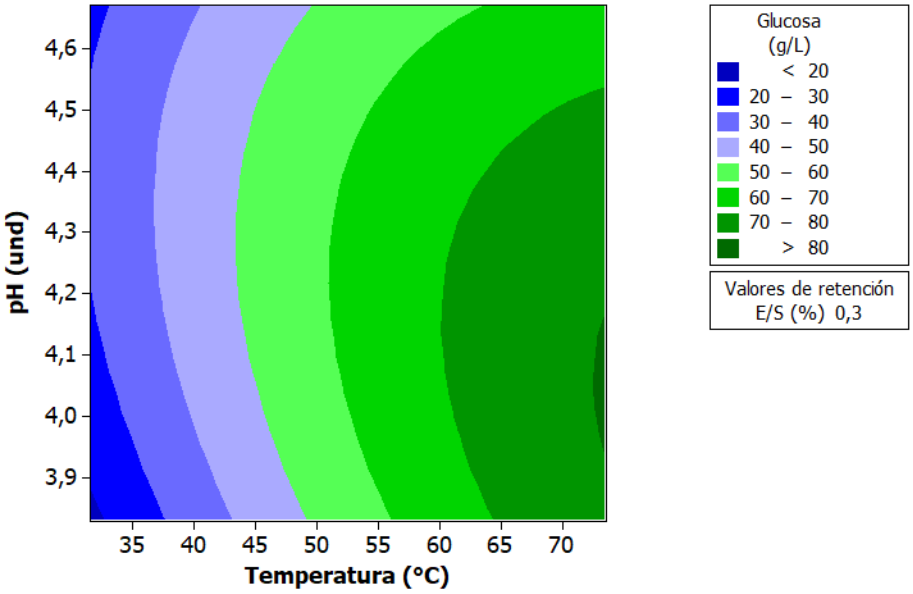


Figura 2.7 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y %E/S con pH constante de 4,25 unidades (punto central del diseño).



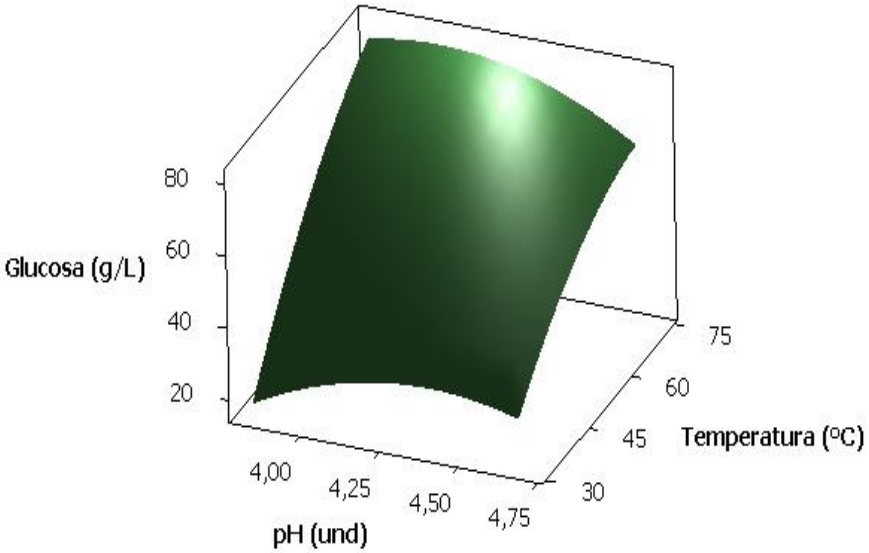
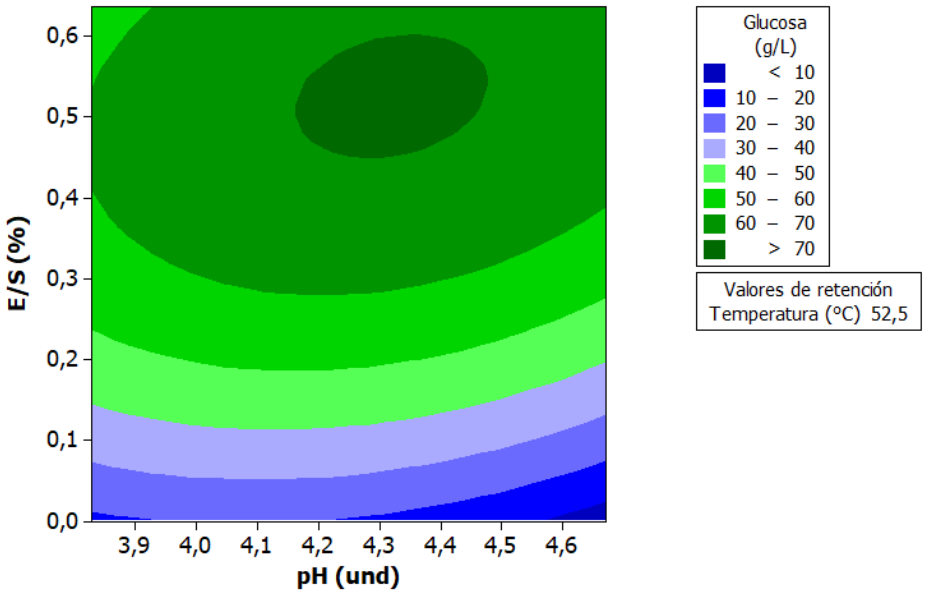


Figura 2.8 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y pH con E/S constante de 0,3% (punto central del diseño).



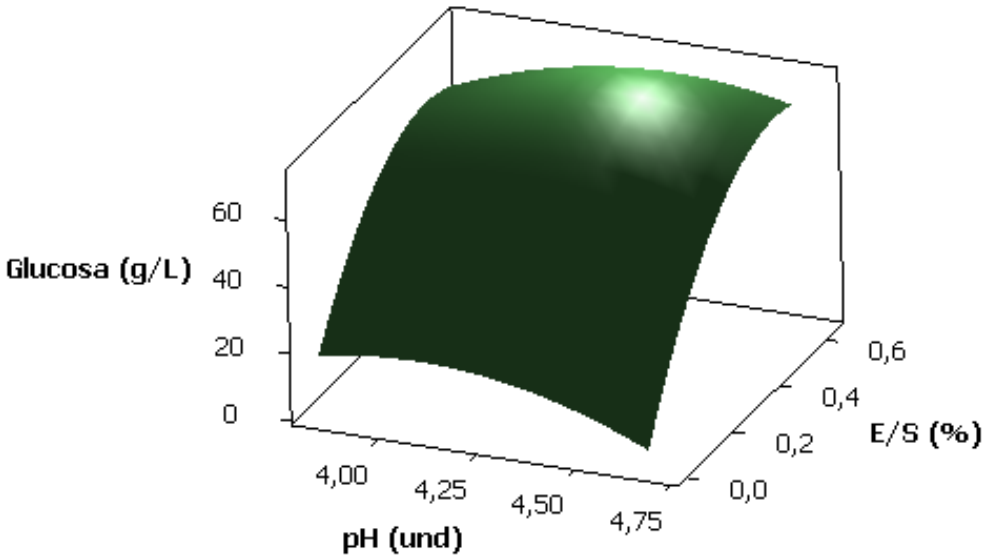


Figura 2.9 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre pH y E/S constante de temperatura en 52,5°C (punto central del diseño).

La Figura 2.7 y 2.8 muestran que la producción de glucosa incrementa con la temperatura acelerando la reacción y generando la mayor cantidad de glucosa en el proceso de sacarificación. Esto puede ser debido a la complejidad de la materia prima ya que ésta posee un 14% de grasas, las cuales se hacen más solubles a mayor temperatura y por ende la interacción de la enzima con el sustrato se genera y aumenta la producción de glucosa (Ai et al. 2013). La temperatura que genera la máxima producción de glucosa está aproximadamente en 70°C, valor que ha sido reportado por Virunanon et al. (2013).

El comportamiento de la relación E/S que se observa en las Figuras 2.7 y 2.9 muestran una curvatura en aproximadamente 0,5%, disminuyendo su producción al aumentar y disminuir la relación E/S. Esto demuestra que existe una concentración determinada para este residuo agroindustrial, la cual genera la máxima producción de glucosa. El análisis ANAVA indica estadísticamente que la variación del pH genera un efecto similar en la producción de glucosa; sin embargo, el pH también presenta una curvatura como la relación E/S en las Figuras 2.8 y 2.9, indicando que la enzima trabaja a pH aproximadamente en 4,3 unidades. Este valor de pH está dentro de los rangos reportados por la literatura (Virunanon et al. 2013, Ruiz et al. 2011, Collares et al. 2012, Ewa Nebesny, 1998, Khawla et al. 2014, Zabed et al. 2016, Johnston & McAloon, 2014, Murthy et al. 2009). A partir del modelo estadístico (Ecuación 2.5) se obtuvieron las condiciones de máxima producción de glucosa con una temperatura de 73,5°C y una relación E/S de 0,5399%. La Tabla 2.13 presenta los resultados de validación del modelo estadístico.

Tabla 2.13 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del residuo agroindustrial

E/S (%)	Temp. (°C)	pH (und)	Producción Actual (g gluc/L)	Respuesta Predicha (g gluc/L)
0,540	**73,5**	**4,2**	**90,60±0,46**	**91,12**
0,460	70,0	4,3	85,58±0,53	86,50
0,580	63,0	4,4	82,36±0,81	81,29

De acuerdo con los resultados de validación se verificó que la condición obtendia por el programa MINITAB corresponde al valor de máxima producción de glucosa. La condición de máxima producción está dentro de los rangos reportados en la literatura.

Almidón de trigo puro

La Tabla 2.14 presenta la concentración de glucosa de cada ensayo del diseño central compuesto. Se evidencia que la mayor concentración de glucosa (127,23 y 131,29g/L) corresponde a los extremos superiores de relación E/S y temperatura y en todo el rango del pH, similar a los resultados con el residuo agroindustrial.

Tabla 2.14 Matriz del diseño central compuesto con valores experimentales para la etapa de sacarificación del almidón de trigo puro.

Orden Corrida	pH (unidades)	Temperatura (°C)	E/S (%)	Glucosa (g/L)
1	4,50	65,0	0,100	76,63
2	4,00	40,0	0,100	29,58
3	4,25	52,5	0,300	56,31
4	4,25	52,5	0,636	115,17
5	4,00	40,0	0,500	70,05
6	4,25	31,5	0,300	42,94
7	4,67	52,5	0,300	91,67
8	4,25	52,5	0,300	74,48
9	3,83	52,5	0,300	85,62
10	4,00	65,0	0,100	79,62
11	4,25	52,5	0,300	81,1
12	4,50	40,0	0,100	22,69
13	4,50	40,0	0,500	75,21
14	4,25	52,5	0,300	76,16
15	4,25	73,5	0,300	82,97
16	4,25	52,5	0,300	85,03
17	4,25	52,5	0,300	76,38
18	4,50	65,0	0,500	127,23
19	4,00	65,0	0,500	131,29
20	4,25	52,5	0,000	10,42

La Tabla 2.15 presenta los términos del modelo, sus coeficientes y el análisis de varianza (ANAVA) que permite establecer el efecto de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Tabla 2.15 ANAVA de sacarificación del almidón de trigo puro.

Término	Constante	Valor P
Constante	1699,28	0,000
Temperatura (°C)	4,30694	0,000*
pH	-852,487	0,978
E/S (%)	52,6180	0,000*
T*T	-0,0178553	0,436
pH*pH	100,686	0,097
E/S*E/S	-90,2805	0,357
T*pH	-0,212800	0,889
T*E/S	0,464000	0,807
pH*E/S	27,4500	0,773

**Significancia < 0,05*

Los resultados de la Tabla 2.15 muestran estadísticamente que para los términos de temperatura y E/S con un valor p 0,000, indica que no existe suficiente evidencia para determinar si es una variable significativa dentro del modelo estadístico. Esto se puede analizar según las Figuras 2.10, 2.11 y 2.12, ya que el rango evaluado de temperatura y

relación E/S, muestran un incremento de la producción de glucosa con el incremento de estas variables sugiriendo una evaluación de rangos mayores. Sin embargo, la revisión de literatura y la ficha de la enzima, sugieren que rangos por encima del evaluado no se han reportado. El término de pH estadísticamente indica que para el rango evaluado, cualquier valor de pH que se seleccione generará un efecto similar en la producción de glucosa. Estos resultados son similares para el residuo agroindustrial.

El ajuste de los datos al modelo fue 0,91 (R^2), valor que es mayor al 0,75 propuesto por Han et al. (2011), lo que indica que este modelo es apropiado para describir los datos obtenidos. El R^2 ajustado fue del 0,82 y la diferencia con el R^2 representa los términos del modelo que generan efectos significativos con la variable respuesta (Chowdhury, Sarkar, & Mitra, 2016).

La Ecuación 2.6 del modelo es la siguiente:

$$\begin{aligned} G = \; & 1699{,}28 + (4{,}30694 * T) - (852{,}487 * pH) \\ & + (52{,}6180 * E/S) - (0{,}0178553 * T^2) + (100{,}686 * pH^2) \\ & - (90{,}2805 * (E/S)^2) - (0{,}212800 * T * pH) + (0{,}46400 * T * E/S) \\ & + \left(27{,}4500 * pH * \frac{E}{S}\right) \end{aligned} \tag{2.6}$$

Donde:
G: Concentración de glucosa, g/L
T: Temperatura, °C
E/S: Relación enzima sustrato, %.
pH: pH, unidades

Las Figuras 2.10, 2.11 y 2.12 presentan los resultados de contorno y superficie de respuesta del diseño central compuesto para la sacarificación del almidón de trigo puro. En estas figuras se dejó constante una de las tres variables del modelo en el valor medio, mientras las dos variables restantes se movieron entre todos los posibles valores de su rango.

La Figura 2.10 y 2.11 muestran que la producción de glucosa incrementa con la temperatura similar al resultado del residuo agroindustrial. La temperatura que genera la máxima producción de glucosa está sobre los 65°C, valor que ha sido reportado en la base de datos Brenda (2017) y por Morales et al. (2008) alcanzando temperaturas hasta 75°C, lo que indica que la enzima es termoestable a esta temperatura (Crabb & Mitchinson, 1997).

El comportamiento de la relación E/S que se observa en las Figuras 2.10 y 2.12 muestra que la cantidad de enzima afectó positivamente la conversión, explicándose esto con la mayor disponibilidad de catalizador en el medio, lo cual aceleró la reacción y permitió obtener una mayor cantidad de glucosa al final del proceso. La relación E/S aproximada de 0,6% ha sido reportada en trabajos como Murthy et al. (2009) y Collares et al. (2012) alcanzando una conversión aproximada del 50% en 1 hora. Por lo tanto, la relación E/S será uno de los extremos mayores evaluados y posteriormente se analizará la cinética durante el tiempo ya que una mayor cantidad de enzima puede aumentar el contenido de glucosa, pero también aumentará los costos del catalizador en el proceso.

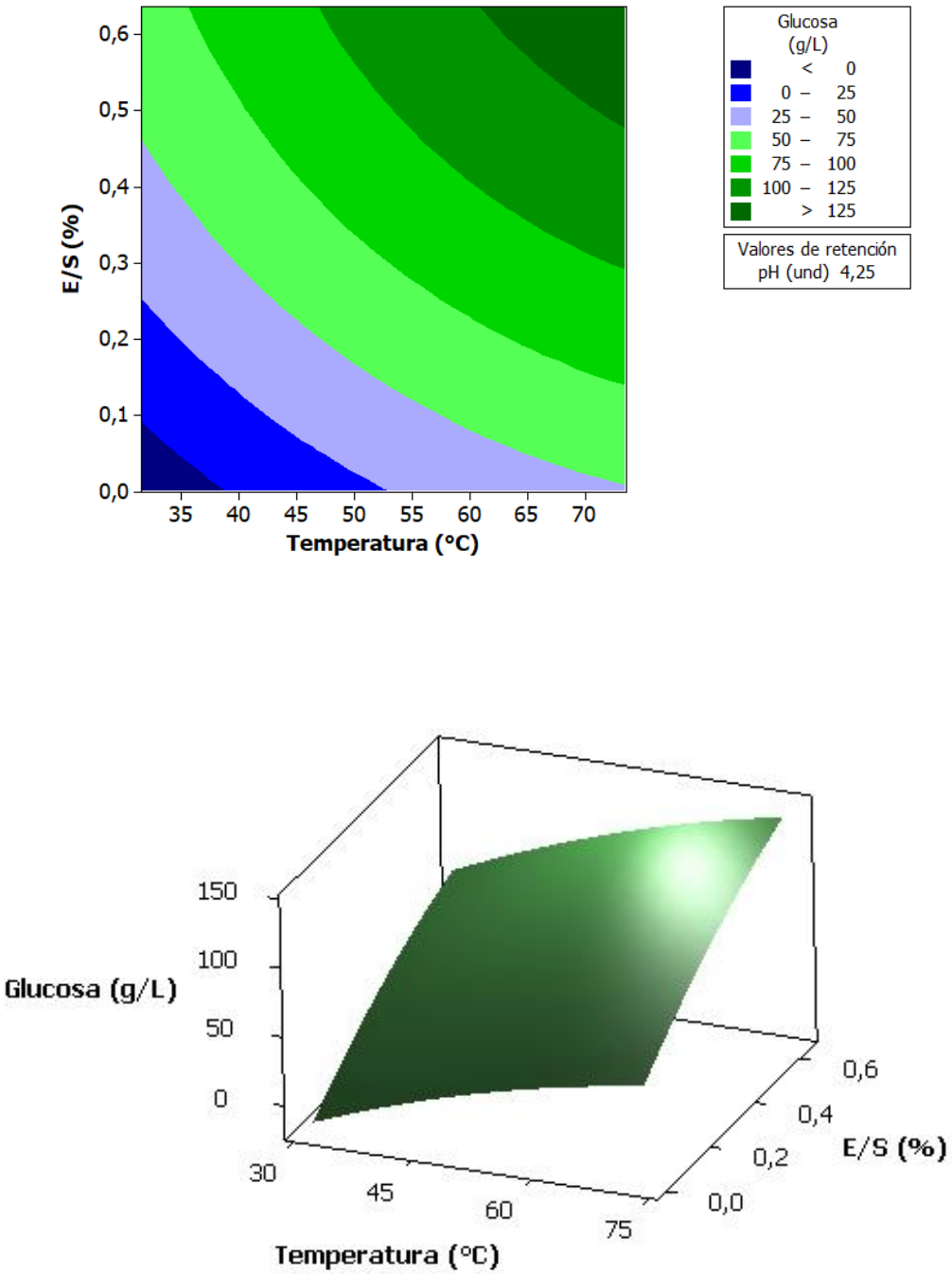
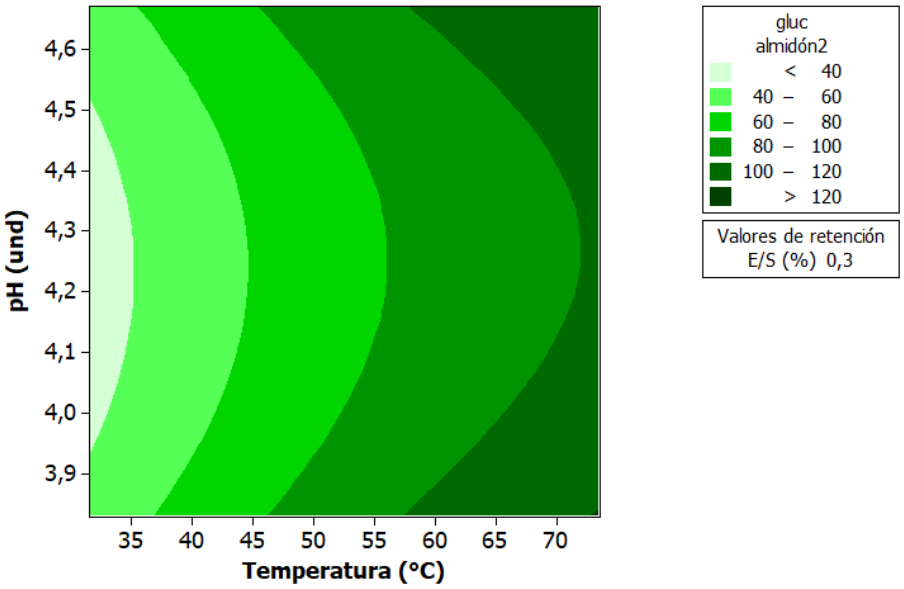


Figura 2.10 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y %E/S con pH constante de 4,25 (punto central del diseño).



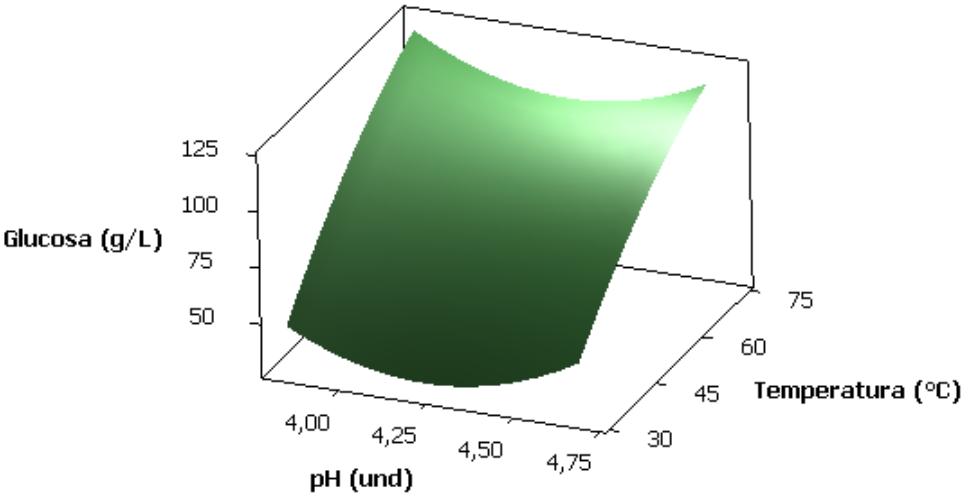


Figura 2.11 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre la temperatura y pH con E/S constante de 0,3% (punto central del diseño).

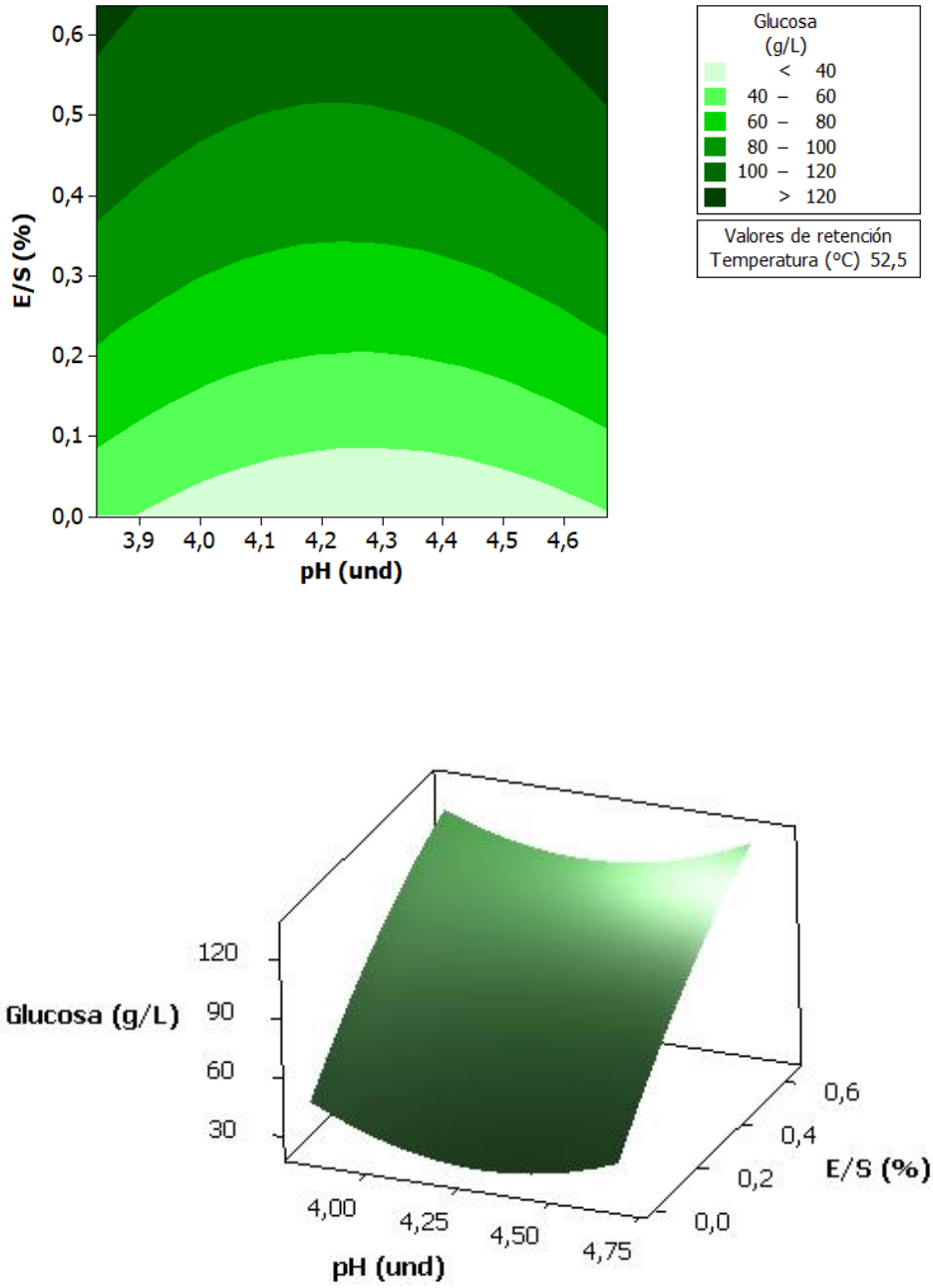


Figura 2.12 Resultados de contorno y superficie de respuesta para la concentración de glucosa. Interacción entre pH y E/S constante de temperatura en 52,5°C (punto central del diseño)

El análisis ANAVA indica estadísticamente que la variación del pH genera un efecto similar en la producción de glucosa, sin embargo, el pH presenta una curvatura en las Figuras 2.11 y 2.12, indicando que la enzima genera mayores cantidades de glucosa en los extremos, con una mayor producción en el extremo superior de pH 4,6 unidades. De acuerdo con la ficha de la enzima, el rango evaluado genera la mayor producción de glucosa y según la revisión de literatura se presentan más reportes con pH > 4,5 unidades como Ewa Nebesny (1998), Ruiz et al. (2011), Virunanon et al. (2013), Khawla et al. (2014) y Johnston & McAloon (2014).

A partir del modelo estadístico (Ecuación 2.6) se obtuvieron las condiciones de máxima producción de glucosa con una temperatura de 73,3°C y una relación E/S de 0,0366%. La Tabla 2.16 presenta los resultados de validación del modelo estadístico.

Tabla 2.16 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para la etapa de licuefacción del almidón de trigo puro

E/S (%)	Temp. (°C)	pH (und)	Producción Actual (g gluc/L)	Respuesta Predicha (g gluc/L)
0,636	**73,5**	**4,7**	**160,80±0,24**	**161,24**
0,600	70,0	4,6	147,78±0,46	148,15
0,550	62,0	4,6	133,42±0,17	132,96

De acuerdo con los resultados de validación se verificó que la condición obtendia por el programa MINITAB corresponde al valor de máxima producción de azúcares reductores. La condición de máxima producción está dentro de los rangos reportados en la literatura.

2.4 CONCLUSIONES

Para el residuo agroindustrial, el tamaño de partícula se encuentra entre 1,0 y 0,5mm permitiendo una adecuada hidrólisis.

La caracterización de las materias primas identificó que existe una diferencia sustancial de sus componentes, debido a que el almidón de trigo puro en su mayoría contenía un porcentaje de almidón del 80%, mientras que el residuo agroindustrial proveniente de un proceso complejo para su producción, incluye alto contenido de minerales, grasas y baja cantidad de almidón (56%).

Para el proceso de licuefacción del residuo agroindustrial, se encontró un modelo cuadrático con un R^2 de 85% y un R^2 ajustado de 74%. La optimización de dicho modelo permitió encontrar las máximas condiciones del proceso para la producción de azúcares reductores. Para el residuo agroindustrial fueron una temperatura de 72,78°C y una relación E/S de 0,0516% y un pH fijo de 5,8 unidades, los cuales fueron validados.

Para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro, se encontró un modelo cuadrático con un R^2 de 88% y un R^2 ajustado de 79%. Las máximas condiciones del proceso de licuefacción para la producción de azúcares reductores a partir del almidón de trigo puro fueron una temperatura de 73,3°C y 0,0366% E/S y un pH fijo de 5,8 unidades, los cuales fueron validados.

Para el proceso de sacarificación del residuo agroindustrial, se encontró un modelo cuadrático con un R^2 de 90% y un R^2 ajustado de 80%. La optimización de dicho modelo permitió encontrar las máximas condiciones del proceso para la producción de

glucosa. Para el residuo agroindustrial fueron una temperatura de 73,5°C, una relación E/S de 0,5399% y un pH de 4,2 unidades, los cuales fueron validados.

Para el proceso de sacarificación del almidón de trigo puro, se encontró un modelo cuadrático con un R^2 de 91% y un R^2 ajustado de 82%. Las máximas condiciones del proceso de sacarificación para la producción de glucosa a partir del almidón de trigo puro fueron una temperatura de 73,5°C, una relación E/S de 0,6364% y un pH de 4,7 unidades, los cuales fueron validados.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

Ai, Y., Hasjim, J., & Jane, J. L. (2013). Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 120-127.

Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., & Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology advances*, 28(3), 407-425.

Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with a-amylase from Bacillus licheniformis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 488–495.

Bashir, K., Swer, T. L., Prakash, K. S., & Aggarwal, M. (2017). Physico-chemical and functional properties of gamma irradiated whole wheat flour and starch. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 131-139.

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. Brazilian J*ournal of Chemical Engineering*, 30(3), 467–476.

Brenda (2017). Bases de datos: Information on EC 3.2.1.1 - alpha-amylase. En línea: https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.1#TEMPERATURE OPTIMUM. Consultado Octubre 06 de 2017.

Chowdhury, A., Sarkar, D., & Mitra, D. (2016). Esterification of Free Fatty Acids Derived from Waste Cooking Oil with Octanol: Process Optimization and Kinetic Modeling. *Chemical Engineering & Technology*. Recuperado a partir de http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ceat.201400745/pdf

Collares, R. M., Miklasevicius, L. V. S., Bassaco, M. M., Salau, N. P. G., Mazutti, M. a., Bisognin, D. a., & Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. J*ournal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(7), 579–586.

Crabb, W. D., & Mitchinson, C. (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, 15(9), 349-352.

Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidónes gelatinizados del fruto de la planta de banano*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

de la Hera, E., Gomez, M., & Rosell, C. M. (2013). Particle size distribution of rice flour affecting the starch enzymatic hydrolysis and hydration properties. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 421-427.

Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2006). Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64(3), 452-465.

Dey, T. B., Kumar, A., Banerjee, R., Chandna, P., & Kuhad, R. C. (2016). Improvement of microbial α-amylase stability: strategic approaches. *Process Biochemistry*, 51(10), 1380-1390.

Ewa Nebesny, J. R. T. P. (1998). Enzymatic Hydrolysis of Wheat Starch into Glucose. *Starch-Stärke*, 50(1979), 337–341.

Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., & Tzia, C. (2017). Chemical characterization and breadmaking potential of spelt versus wheat flour. J*ournal of Cereal Science*. doi: 10.1016/j.jcs.2017.08.023

Fujita, N. (2017). Starch. In B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edi, Vol. 2, pp. 106–111). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00162-3

Genencor (2006). SPEZYME ® FRED- Ficha Técnica. Genencor International, Inc.,2p.

Gutierrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). Capítulo 12: Optimización de procesos con metodología de superficie de respuesta. En *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda Ed, pp. 384–420). México, D. F.: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA.

Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Preparation of samples for compositional analysis. *Laboratory Analytical Procedure* (LAP), Technical Report NREL/TP-510-426201617, 9p.

Han, M., Kim, Y., Kim, Youngran, Chung, B. & Choi, G. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. Korean J. *Chem. Eng., January*, Vol. 28, No.1: 119-125.

Hua, X., & Ruijin, Y. (2016). Enzymes in Starch Processing. In Enzymes in Food and Beverage Processing (pp. 139–170). CRC Press Taylor & Francis Group.

Johnston, D. B., & McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource Technology*, 154, 18–25.

Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G., & Oumèma, N. E. (2014). Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 52, 144–149.

Kilic D.A, Ozbek B. Corn, rice and wheat starch hydrolysis by using various alpha-amylase enzymes at temperature 40oc. *Journal of Engineering and Natural Sciences*. 55-67.

Krajang, M., & Chamsart, S. (2014). Raw Cassava Starch Hydrolysis for Single-Step Ethanol Production Using Combination of Raw Starch Hydrolysis and Fermentation to Pilot-Scale. KMUTNB: *International Journal of Applied Science and Technology*, 7 (1), 1 – 9.

Kunamneni, A., & Singh, S. (2005). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2), 179-190.

Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., & Cheng, L. (2015). The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 48, 189–196.

Liscano Martínez, Y., & others. (2014). Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Recuperado a partir de http://www.bdigital.unal.edu.co/46389/

Mahasukhonthachat, K., Sopade, P. A., & Gidley, M. J. (2010). Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 18-28.

Montgomery, D. C. (2004). Capítulo 11: Métodos de superficies de respuesta y otros enfoques para la optimización de procesos. En *Diseño y análisis de experimentos* (Segunda ed, pp. 427–500). México, D. F.: Editorial Limusa S.A. De C.V.

Morales, S., Álvarez, H., & Sánchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1), 25–30.

Murthy, G. S., Sall, E. D., Metz, S. G., Foster, G., & Singh, V. (2009). Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. Industrial C*rops and Products*, 29(1), 67–72.

Murthy, G. S., Singh, V., Rausch, K. D., Johnston, D. B., & Tumbleson, M. E. (2006). Mathematical modelling of enzymatic hydrolysis of starch: application to fuel ethanol production, (January 2006). http://doi.org/10.13031/2013.21555

Ozbek, B., & Yuceer, S. (2001). Alpha-Amylase Inactivation During Wheat Starch Hydrolysis Process. *Process Biochemistry*, 37(1), 87–95.

Roberto, I.C., Mussatto, I., & Rodrigues, RCLB. (2003). Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice strew in a semi pilot reactor. *Industrial Crops and Products*. 17, 171-176.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torrresa, R. G., & Molina, D. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2337–2343.

Smrčková, P., Horský, J., Šárka, E., Koláček, J., Netopilík, M., Walterová, Z., … Hrušková, K. (2013). Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 43–49. http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.065

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory, 9p.

Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V., & Chulalaksananukul, W. (2013). Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production*, 39, 273–279. http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.07.055

Kruger, N. (2002). *The Bradford Method for Protein Quantitation*. In: The protein protocols handbook. Second Edition. Humana Press, Inc. New Jersey. 15-23p. Consultado en Agosto de 2016. Disponible en http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Protein%20workshop/Protein%20Handbook.pdf

Xie, X. S., Cui, S. W., Li, W., & Tsao, R. (2008). Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International*, 41(9), 882-887.

Yankov, D., Dobreva, E., Beschkov, V., & Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable ??-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(11), 665–667.

Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. Journal of the Taiwan *Institute of Chemical Engineers*, 58, 467–475.

CAPÍTULO 3: MODELO MATEMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA EN SISTEMAS DISCONTINUOS

3.1 INTRODUCCIÓN

El almidón es la fuente de carbohidratos más importante en el planeta y su producción mundial ha aumentado continuamente en los últimos años debido a la demanda constante de las industrias que consumen almidón (Hua & Ruijin, 2016; Fujita, 2017). A partir del almidón se pueden generar los jarabes de glucosa, siendo uno de los productos más utilizados por diversos tipos de industrias como fermentación alcohólica, alimentos, helados, confitería, carnes procesadas, farmacéuticos, entre otros (Rodríguez Reinoso, 2011; Dávila et al. 2014). Los jarabes de glucosa son característicos por aportar textura, brillo, disminuyen la temperatura de congelación, son anticristalizante del azúcar y regulador del dulzor (Hull, 2010; Rodríguez Reinoso, 2011).

Una de las alternativas para obtener los jarabes de glucosa es por medio de procesos enzimáticos los cuales son licuefacción y sacarificación. El proceso de licuefacción se realiza con la enzima alfa-amilasa que hidroliza los enlaces glucosídicos α-1,4 de la cadena del almidón, produciendo dextrinas, maltosa, maltotriosa y maltopentosas, presentando una mayor concentración de las últimas (Ruiz et al. 2011; Prunescu & Sin, 2013). El proceso de sacarificación se realiza con la enzima amiloglucosidasa la cual hidroliza los productos finales de la licuefacción rompiendo los enlaces glucosídicos α-1,4 y α-1,6, para finalmente producir glucosa y azúcares con grado de polimerización (GP) 2 y 3 (Hua & Ruijin, 2016).

El proceso de producción de jarabes de glucosa puede ser representado mediante modelos matemáticos que permiten predecir el comportamiento de las reacciones. La mayoría de los modelos cinéticos que implican una reacción enzimática tienen como hipótesis que la tasa de producción obedece al comportamiento clásico de Michaelis-Menten (Paolucci-Jeanjean et al. 2000a). Existen aproximaciones generales como el modelo planteado por Cruz (2012), el cual no presenta inhibición por sustrato ni glucosa y el modelo presentado por Apar & Özbek (2007) basado en la medición de almidón. Sin embargo, estos modelos son básicos y es necesario plantear modelos con una relación más compleja que incluya factores de inhibición y tasas de producción de azúcares.

Rodríguez et al. (2006) plantean el modelo incluyendo la desactivación enzimática con la ecuación de Arrhenius de segundo orden. Presečki, Blažević & Vasić-Rački (2013) presentan el modelo de Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa y maltosa, incluyendo la desactivación enzimática por un modelo de inactivación en dos pasos que asume la formación de un intermediario en la ruta entre la forma nativa y desnaturalizada de la enzima; sin embargo, este modelo solo tiene en cuenta la producción de glucosa y maltosa, omitiendo los demás azúcares de mayor GP producidos. Por otro lado, Murthy et al. (2006) presenta el efecto temperatura, pH, actividad enzimática, dosis de enzima y efectos de inhibición por glucosa, maltosa y matotriosa mediante el método de Montecarlo. Åkerberg et al. (2000) sugieren un modelo cinético debido a la acción combinada de las enzimas α-amilasa y amiloglucosidasa incluyendo efectos de pH; sin embargo, este enfoque no es útil para el procesamiento del almidón que se pretende modelar, ya que utiliza un modelo integrado.

Morales et al. (2008) presentan modelos planteados a partir de los balances elementales de materia, complementados con ecuaciones empíricas, los cuales se definen como modelos semifísicos de base fenomenológica, separando las etapas de licuefacción y sacarificación, incluyendo la producción de oligosacáridos con un GP de 1 a 5, los efectos de temperatura, desactivación enzimática e inhibición por sustrato y producto, siendo el más completo encontrado en la literatura y que ha sido citado por varios autores. Por lo anterior, este capítulo propone el uso del modelo planteado por Morales et al. (2008), incluyéndole los efectos de pH, simulación, ajuste de parámetros y validación con otro tipo de almidón y su aplicación en un residuo agroindustrial.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Modelo de licuefacción

El modelo de la etapa de licuefacción está basado en el trabajo realizado por Morales, Álvarez & Sánchez (2008) quienes tuvieron en cuenta los modelos planteados por Paolucci-jeanjean et al. (2000a, 2000b, 2001). En esta etapa de licuefacción, se plantea la producción de oligosacáridos a diferentes niveles de polimerización conformados por dos grupos:

1. Oligosacáridos con un nivel de GP (grado de polimerización) de 1 a 3: son los productos finales de la licuefacción y no son susceptibles a un ataque enzimático, ya que las enzimas hidrolizan polímeros de alto peso molecular como sustrato.
2. Oligosacáridos de GP 6 y 7 que muestran un valor máximo de concentración en un tiempo inicial y son parcialmente hidrolizados en oligosacáridos de menor GP, presentando el GP5 como producto predominante en la licuefacción.

Por medio de un análisis de curva, Paolucci-jeanjean et al. (2000a) y Morales et al. (2008), sugieren la Ecuación 3.1 para describir la velocidad de formación de cualquier oligosacárido a la concentración total de moléculas con mayor GP.

$$V_f(n) = k_n\left(x_n\left(S_o - \sum_{i=m}^{\infty} C_i\right) - \sum_{i=m}^{\infty} C_{i,lim}\right); \quad 1 \leq n \leq 5 \qquad (3.1)$$

Donde:

$V_f(n)$: Velocidad de formación de un oligosacárido con grado de polimerización (GP) igual a n (GP= n-oligosacárido)

x_n: Constante adimensional. Representa la cantidad determinada de sustrato disponible para producir cada uno de los oligosacáridos.

S_o: Concentración inicial de sustrato

C_i: Sustrato disponible para la formación de oligosacáridos GP=n y por lo tanto, todos los oligosacáridos que producen oligosacáridos a través de la hidrólisis con GP =n están agrupados juntos como C_i

$C_{i,lim}$: Oligosacáridos del grupo 1 con GP=n que permanecen no hidrolizables una vez que la hidrólisis ha sido completada

m: corresponde al GP del oligosacárido más pequeño que conduce al producto con GP=n, a través de la hidrólisis, por lo tanto, m>n

k_n: Constante de reacción que describe la habilidad del sustrato disponible para ser hidrolizado (Paolucci-jeanjean et al. 2000a) y que puede ser representada por la Ecuación 3.2. Ésta comprende dos constantes que son identificadas experimentalmente (p_n, q_n), las cuales están asociadas con cada oligosacárido de grado de polimerización n y la concentración de enzima E.

$$k_n = \left(\frac{p_n}{S_o} - q_n\right) E \qquad (3.2)$$

La Ecuación 3.1 es de primer orden respecto al sustrato, similar a la ecuación de Michaelis-Menten, cuando la velocidad de reacción tiene una dependencia lineal del sustrato (Morales et al. 2008). Cuando los términos C_i y $C_{i,lim}$ son restados, el resultado representa el sustrato neto disponible para producir oligosacáridos durante la hidrólisis. El término $C_{i,lim}$ puede ser calculado con la Ecuación 3.3.

$$\sum_{i=m}^{\infty} C_{i,lim} = h_n S_o \qquad (3.3)$$

Donde:

h_n: Constante que debe ser experimentalmente identificada y sirve para delimitar la concentración inicial de oligosacáridos en el sustrato para la producción de cada oligosacárido (Paolucci-jeanjean et al. 2000a).

Las reacciones principales y sus valores asociados *m* se muestran en la Tabla 3.1 (Paoulucci et al. 2001).

Tabla 3.1 Reacciones principales y valores de m para oligosacáridos con un GP igual a n

Valor de n	Principales reacciones	Valor de m
n=7	GP > 7 → GP 7	m = 8
n=6	GP > 7 → GP 6 GP 7 → GP 6	m = 7
n=5	GP > 7 → GP 5 GP 7 → GP 5 GP 6 → GP 5	m = 6
n=4	GP > 7 → GP 4 GP 7 → GP 4	m = 7
n=3	GP > 7 → GP 3 GP 7 → GP 3	m = 7
n=2	GP > 7 → GP 2 GP 7 → GP 2 GP 6 → GP 2 GP 6 → GP 4 → GP 2	m = 6
n=1	GP > 7 → GP 1 GP 7 → GP 1 GP 6 → GP1	m = 6

Fuente: *Paoulucci et al. 2001*

Esta tabla muestra que sólo pueden hidrolizarse azúcares con un GP mayor que 5 y que los oligosacáridos GP 5 y GP 4 no se hidrolizan en cadenas más pequeñas. También vale la pena señalar que la maltohexaosa produce maltosa y no maltotetraosa. De hecho, la hidrólisis de maltotetraosa en maltosa parece ser lo suficientemente rápida para equilibrar la producción de maltotetraosa como ya se ha sugerido por Govindasamy et

al. (1992). Según Govindasamy et al. (1992) en la primera etapa, el material amiláceo es hidrolizado a oligosacáridos con GP=7 y GP=6; en la segunda etapa, se producen los oligosacáridos con GP=5, GP=3, GP=2 y GP=1, siendo GP=5 el compuesto predominante, similar a la acción de la alfa-amilasa *B. licheniformis.* Este autor también menciona que oligosacáridos con GP=4 están ausentes en los productos formados, lo cual podría ser debido a la hidrólisis inmediata de G3 (maltotriosa) + G1 (glucosa) y/o G2 (maltosa) + G2 (maltosa) o por la completa ausencia de la formación de esta dextrina.

Según Morales et al. (2008), debido a que algunos sistemas operan por largos periodos de tiempo con la enzima, es necesario determinar el efecto de la desactivación enzimática de acuerdo con la Ecuación 3.4.

$$E = E_0 \exp(-k_d t) \qquad (3.4)$$

Donde:
E_0: Concentración inicial de enzima
k_d: Constante de desactivación enzimática
t: Tiempo

3.2.2 Modelo de sacarificación

El modelo para la etapa de sacarificación se basó en el trabajo realizado por Morales et al. (2008) los cuales tuvieron en cuenta el modelo planteado por Zanin & De Morales (1996). El modelo está basado en la ecuación de Michaelis-Menten, donde existen varios sustratos que compiten por el sitio activo de la enzima, reacciones reversibles para maltotriosa y maltosa y la inhibición debido al sustrato y producto.

El modelo tiene en cuenta las siguientes suposiciones o consideraciones (Zanin & De Moraes, 1996):

1. Debido a que el sustrato es almidón y ha sido previamente hidrolizado con alfa amilasa, el grado de polimerización promedio de los oligosacáridos remanentes con GP >3 es asumido como 5.
2. Estos oligosacáridos son considerados que están formados por dos fracciones: (a) fracción más susceptible a hidrólisis, comprendiendo aproximadamente el 77% de las moléculas, y contiene los enlaces α-1,4 que son rápidamente hidrolizados. (b) la segunda fracción es resistente a la hidrólisis, comprende el 23% remanente de las moléculas, y contiene los enlaces α-1,6 asociados con las ramificaciones que son hidrolizadas más lentamente que los enlaces α-1,4.
3. La sacarificación procede a través de múltiples reacciones que ocurren simultáneamente y son divididas en tres clases:

a. Reacciones de hidrólisis de oligosacáridos con GP>3 están agrupadas juntas como una única clase que está dividida en dos ya mencionadas: susceptible GP=4 y resistentes GP=6

$$oligos\ susceptible\ \ (GP_4) + (n-3)H_2O \rightarrow maltotriosa\ (GP_3) + (n-3)glucosa\ (GP_1) \quad (3.5)$$

$$oligos\ resistentes\ (GP_6) + (n-3)H_2O \rightarrow maltotriosa\ (GP_3) + (n-3)glucosa\ (GP_1) \quad (3.6)$$

b. Hidrólisis de maltrotriosa (GP_3) produce maltosa (GP_2) y es reversible

$$maltotriosa\ (GP_3) +\ H_2O \leftrightarrow maltosa\ (GP_2) + glucosa\ (GP_1) \quad (3.7)$$

c. Hidrólisis de maltosa produce glucosa (GP_1) y es reversible:

$$maltosa\ (GP_2) +\ H_2O \leftrightarrow 2\ glucosa\ (GP_1) \quad (3.8)$$

4. Existe inhibición por producto (Ki) de glucosa, para las reacciones de las Ecuaciones 3.5 a 3.8.
5. Existe inhibición por sustrato (Ks) por los oligosacáridos con GP>3, pero no por maltrotriosa y maltosa.
6. Varios sustratos (GP_4, GP_6, GP_3, GP_2) compiten por el sitio activo de la amiloglucosidasa.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la velocidad de reacción de hidrólisis está dada por la Ecuación 3.9 (Morales et al. 2008):

$$r_n = \frac{V_{max,n}\left[G_n - \left(\frac{G_{n-1}^2}{K_{eqn}}\right)\right]E}{K_{m,n}\left[1 + \frac{G}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \left(\sum_{j=2}^{5}\frac{G_j}{K_{m,j}}\right)\right]}; \quad 2 \leq n \leq 5 \qquad (3.9)$$

Dónde:
r_n: Velocidad de hidrólisis

n: Indica el grado de polimerización del oligosacárido (GP)

G_n: Concentración del oligosacárido con GP=n

$K_{m,n}$: Constante de Michaelis-Menten

K_I y K_s: Constantes de inhibición por glucosa y sustrato, respectivamente

V_{max}: Velocidad máxima de producción del producto

E: Concentración de enzima

K_{eqn}: Constante de equilibrio

El término de condensación $\left(G_{n-1}^2/K_{eqn}\right)$ es válido solo para maltosa y maltotriosa, donde el numerador cambia a G_{n-1}^2 cambia a $G\ G_2$. El término de inhibición debido al sustrato es sólo válido en las fracciones susceptible y resistente de la maltopentosa (Morales et al. 2008).

De acuerdo con las consideraciones antes mencionadas, las velocidades de reacción de hidrólisis de los oligosacáridos susceptibles r_4, oligosacáridos resistentes r_6, maltotriosa r_3 y maltosa r_2 están representadas por las Ecuaciones 3.10 a 3.12.

$$r_5 = \frac{V_{max,5}\ G_5\ E}{K_{m,5}\left[1 + \frac{G}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{G_2}{K_{m,2}} + \frac{G_3}{K_{m,3}} + \frac{G_5}{K_{m,5}}\right]} \qquad (3.10)$$

$$r_3 = \frac{V_{max,3}\left[G_3 - \left(\frac{G\,G_2}{K_{eq3}}\right)\right]E}{K_{m,3}\left[1 + \frac{G}{K_I} + \frac{G_2}{K_{m,2}} + \frac{G_3}{K_{m,3}} + \frac{G_5}{K_{m,5}}\right]} \qquad (3.11)$$

$$r_2 = \frac{V_{max,2}\left[G_2 - \left(\frac{G^2}{K_{eq2}}\right)\right]E}{K_{m,2}\left[1 + \frac{G}{K_I} + \frac{G_2}{K_{m,2}} + \frac{G_3}{K_{m,3}} + \frac{G_5}{K_{m,5}}\right]} \qquad (3.12)$$

Los balances de masa que describen la variación de la concentración de cada oligosacárido en el tiempo se presentan en las Ecuaciones 3.13 a 3.16:

Maltopentosas

$$\frac{dG_5}{dt} = -r_5 \qquad (3.13)$$

Maltotriosa

$$\frac{dG_3}{dt} = r_5 - r_3 \qquad (3.14)$$

Maltosa

$$\frac{dG_2}{dt} = r_3 - r_2 \qquad (3.15)$$

Glucosa

$$\frac{dG}{dt} = 2r_5 + r_3 + 2r_2 \qquad (3.16)$$

El modelo base para el proceso de sacarificación incluye la reacción de condensación de isomaltosas (r_1) (Ecuación 3.17), siendo una reacción reversible que se genera a partir de glucosa, produciendo isomaltosas y viceversa.

$$2\ glucosa\ (GP_1) \leftrightarrow Isomaltosa\ (G_I) \qquad (3.17)$$

Para este modelo no se consideró la reacción r_1 debido a que estas reacciones se presentan cuando existe exceso de enzima amiloglucosidasa y las concentraciones de glucosa exceden 500g/L (Berensmeier & Buchholz, 2004; Roy & Gupta, 2004; Duvernay, Chinn & Yencho, 2013) y las concentraciones medidas experimentalmente no excedían dicho valor.

Las modificaciones de Morales et al. (2008) en el modelo de Zanin & De Moraes, (1996), indican una expresión para hallar la máxima velocidad de reacción (Ecuación 3.18) y la desactivación enzimática (Ecuación 3.19)

$$V_{max,n} = V_{o,max,n} exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \qquad (3.18)$$

Donde:

$V_{o,max,n}$: Constante de velocidad inicial máxima de reacción

E_a: Energía de activación

R: Constante Universal de los gases

T: Temperatura

$$E = E_o exp(-k_d t) \qquad (3.19)$$

Donde:

E_o: Concentración inicial de enzima

k_d: Constante de desactivación enzimática

t: Tiempo de reacción

El valor de la energía de activación de 50604cal/mol fue la misma reportada por Morales et al. (2008). Este modelo base que se tomó en cuenta para el proceso de sacarificación está unido con el modelo de licuefacción, ya que plantean que el oligosacárido de mayor GP se representa como GP5, siendo el principal producto de la licuefacción. Este modelo se complementó con el efecto de pH y sus parámetros se ajustaron para almidón de trigo puro y de un residuo agroindustrial presentados en la sección de resultados.

3.2.3 Validación del modelo

La validación del modelo fue realizada para los procesos de licuefacción y sacarificación independientemente. Se utilizaron dos materias primas amiláceas: Almidón de trigo y residuo agroindustrial con 81% y 56% de contenido de almidón, respectivamente. Los ensayos fueron realizados en erlenmeyer de 500mL con un peso efectivo de 100 g, 20% de sólidos y buffer fumárico a 0,1M.

Para la validación del proceso de licuefacción se realizó el proceso de gelatinización y posterior licuefacción durante 4 horas por triplicado. Para la validación del proceso de sacarificación, se realizó el proceso de gelatinización, licuefacción durante 1 hora y finalmente sacarificación durante 6 horas por triplicado. Las condiciones de cada proceso para las respectivas materias primas se mencionan a continuación.

Gelatinización

Las condiciones de la etapa de gelatinización fueron las siguientes: 20%p/p de almidón (Smrčková et al. 2013), 95ºC (Betiku, Akindolani, & Ismaila, 2013; Li et al. 2015; Zabed et al. 2016), 150rpm (Baks et al. 2008, Ruiz et al. 2011, Zabed et al. 2016), pH 5.8unidades, 10 min para el residuo agroindustrial y 30 min para el almidón de trigo.

Licuefacción

La etapa de licuefacción para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo se realizó con la enzima amilasa Spezyme®Fred con una actividad enzimática específica de 2389U/g y siguiendo las condiciones de proceso presentadas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Condiciones de licuefacción para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo

Condición	Residuo agroindustrial	Almidón de trigo
Temperatura (°C)*	72,8	74,1
Relación E/S (%)*	0,0516	0,0276
Tiempo (h)	4	4
pH constante (Johnston & McAloon, 2014)	5,8	5,8
Agitación constante(rpm) (Zabed et al. 2016)	150	150
Calcio constate(ppm) (Ficha enzima)	10	10

** Mejor tratamiento obtenido preliminarmente en el capítulo 2*
Durante las cinéticas se verificó que el pH se mantuviera constante

Las muestras se centrifugaron a 5000rpm por 10min y se congelaron para su posterior medición de oligosacáridos.

Sacarificación

La etapa de sacarificación para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo se realizó con la enzima glucoamilasa Optidex® L-400 con una actividad enzimática específica de 3064,46 AUG/g y siguiendo las condiciones de proceso presentadas en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Condiciones de sacarificación para el residuo agroindustrial y el almidón de trigo

Condición	Residuo agroindustrial	Almidón de trigo
Temperatura (°C)*	73,5	73,5
Relación E/S (%)*	0,5399	0,6364
Tiempo (h)	6	6
pH *	4,2	4,7
Agitación constante (rpm) (Zabed et al. 2016)	150	150

** Mejor tratamiento obtenidas preliminarmente*
Durante las cinéticas se verificó que el pH se mantuviera constante

Las muestras se centrifugaron a 5000rpm por 10min y se desactivó la enzima en baño maría 95°C durante 5 minutos para posteriormente congelarse.

La concentración de los diferentes grados de polimerización para las cinéticas de licuefacción y sacarificación se determinaron por HPLC utilizando la columna SUPELCOGEL™ C-610H a 30°C con un flux de 0,5 mL/min, ácido fosfórico al 0,1% como fase móvil y 20ul de muestra con detector RID.

La identificación de los parámetros para el ajuste del modelo con los datos experimentales se realizó en Matlab-Simulink® (2015a) mediante el uso del toolbox de simulink de identificación de parámetros. Al ingresar los datos experimentales de entrada y salida, y construir un bloque con las dinámicas del modelo, el toolbox utiliza diferentes métodos de identificación para calcular los parámetros con los cuales la respuesta del modelo se ajusta con menor error a los datos tomados experimentalmente.

Con el fin de verificar el ajuste de los datos experimentales con los resultados de la simulación, se encontraron los errores promedio para cada oligosacárido como se presenta en la Ecuación 3.20 (Morales Vélez, 2004).

$$Error_n(\%) = \frac{\dfrac{G_{n,experimental} - G_{n,simulación}}{G_{n,máxima\ experimental} - G_{n,mínima\ experimental}}}{número\ de\ datos\ experimentales} * 100 \qquad (3.20)$$

Donde:
n: Indica el grado de polimerización del oligosacárido (GP)

3.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.3.1 Modificación del modelo de licuefacción y sacarificación

El modelo planteado por Morales et al. (2008) no tiene en cuenta los efectos de pH. Para ello, se tomó como base el artículo de Tijskens et al. (2001) para complementar el modelo de licuefacción y sacarificación. Tijskens et al. (2001) desarrollaron un modelo que describe el comportamiento de la actividad enzimática, siendo una medida de la velocidad de reacción, como función del pH. La formulación incluye los efectos de protonación e hidroxilación sobre la actividad enzimática a varios niveles de pH.

El efecto de los iones ácidos H^+ o iones básicos OH^- sobre la actividad de una enzima es probablemente causado por un cambio en la configuración en o cerca de los sitios activos. Como en casi todas las reacciones de protonación, estas reacciones ocurren muy rápidamente y las diferentes configuraciones están instantáneamente en equilibrio. Esto puede ser representado por los siguientes mecanismos:

$$En + H^+ \overset{K_{EH}}{\Longleftrightarrow} En\mathrm{H}^+ \quad (3.21)$$

$$En + OH^- \overset{K_{EOH}}{\Longleftrightarrow} En\mathrm{OH}^- \quad (3.22)$$

Donde: K_{EH} y K_{EOH} son las constantes de equilibrio de las reacciones.

La disociación del agua es definida como la Ecuación 3.23.

$$\frac{K_w}{H^+} = OH^- \quad (3.23)$$

Las cantidades de $En\mathrm{H}^+$ y $En\mathrm{OH}^-$ pueden ser expresadas en términos de la cantidad actual de enzima activa y pH como las siguientes ecuaciones.

$$EnOH^- = \frac{K_w . En}{K_{EOH} . H^+} \quad (3.24)$$

$$EnH^+ = \frac{En . H^+}{K_{EH}} \quad (3.25)$$

La cantidad total de enzima en cualquier configuración debe permanecer constante:

$$En_{total} = EnH^+ + EnOH^- + En \quad (3.26)$$

Combinando las Ecuaciones 3.25 y 3.26 y obteniendo la cantidad de enzima En, se obtiene la expresión para la enzima activa a cualquier concentración de iones H^+ o pH:

$$En = \frac{En_{total}}{1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}} . \frac{1}{H^+}} \quad (3.27)$$

La cantidad de enzima activa disponible se puede analizar como una actividad aparente, sin embargo, la actividad enzimática también es representada como la velocidad de reacción en la primera etapa, donde la velocidad es lineal como también lo presenta Prieto et al. (2012). Por lo tanto, el efecto del pH se observa en la velocidad de reacción para la producción de oligosacáridos en la etapa de licuefacción y sacarificación representadas en la Ecuación 3.28 y 3.29, respectivamente.

$$V_f(n) = \frac{k_n\left(x_n(S_o - \sum_{i=m}^{\infty} C_i) - \sum_{i=m}^{\infty} C_{i,lim}\right)}{1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}} . \frac{1}{H^+}}; \ 1 \leq n \leq 5 \quad (3.28)$$

$$r_n = \frac{\dfrac{V_{max,n}\left[G_n - \left(\dfrac{G_{n-1}^2}{K_{eqn}}\right)\right]E}{K_{m,n}\left[1 + \dfrac{G}{K_I} + \dfrac{1}{K_s} + \left(\sum_{j=2}^{6}\dfrac{G_j}{K_{m,j}}\right)\right]}}{1 + \dfrac{H^+}{K_{EH}} + \dfrac{K_w}{K_{EOH}}\cdot\dfrac{1}{H^+}}; \quad 2 \leq n \leq 5 \qquad (3.29)$$

Los parámetros K_{EH} y K_{EOH} se asumieron fijos como 2,707086x10^{-4} y 4,288763x10^{8}, respectivamente. Estos parámetros se obtuvieron de Tijskens et al. (2001) estimados para temperaturas de 60°C.

3.3.2 Validación del modelo con almidón de trigo y residuo agroindustrial

Modelo de licuefacción

La Tabla 3.4 presenta los parámetros para la etapa de licuefacción y la Figura 3.1 y 3.2 muestran la simulación (línea constante) comparada con los resultados experimentales (puntos) para almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente. La programación utilizada para la simulación de esta etapa se encuentra en el Anexo 8 y los resultados en el Anexo 9 y 10.

Tabla 3.4 Parámetros de licuefacción para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Parámetro	Unidades	Almidón de trigo puro	Residuo agroindustrial
x_1	Adimensional	0,2	0,25
x_2	Adimensional	0,2	0,2
x_3	Adimensional	0,28	0,25
x_5	Adimensional	0,32	0,23
h_1	Adimensional	0,29	0,25
h_2	Adimensional	0,33	0,33
h_3	Adimensional	0,30	0,36
h_5	Adimensional	0,22	0,30
p_1	g/mL h	51	51
p_2	g/mL h	89	89
p_3	g/mL h	89	89
p_5	g/mL h	167	167
q_1	L/mL h	0,089	0,089
q_2	L/mL h	0,145	0,145
q_3	L/mL h	0,066	0,066
q_5	L/mL h	0,26	0,428
k_d	h^{-1}	0,017	1,06*10^{-4}

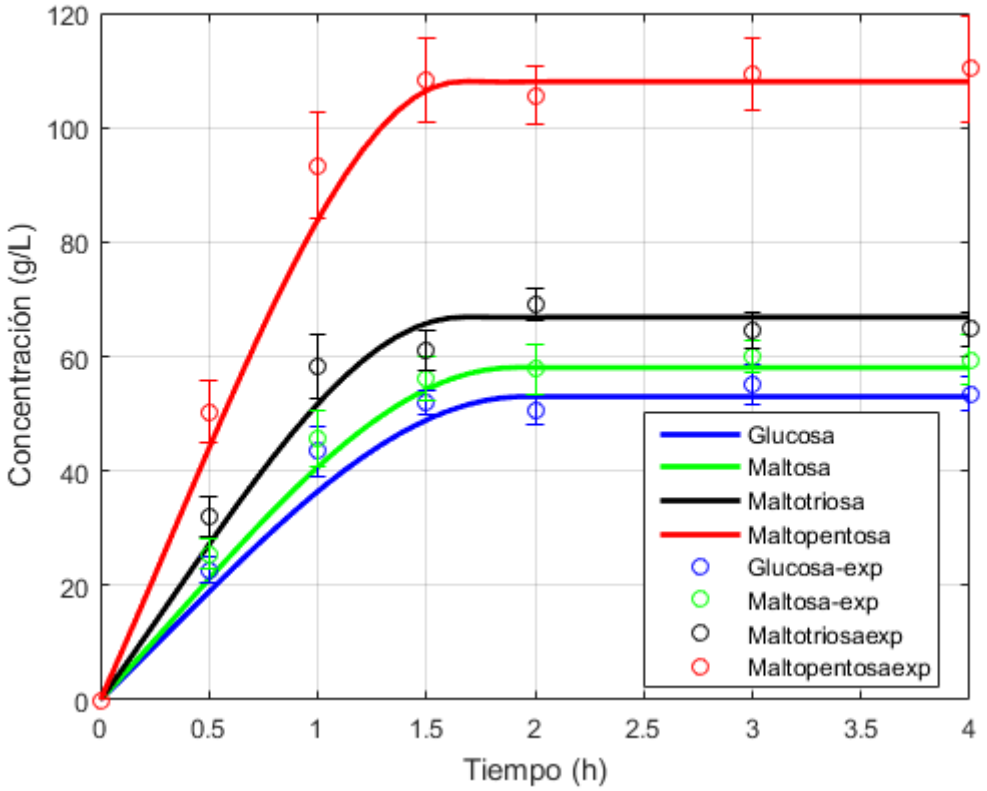


Figura 3.1 Resultados de simulación para licuefacción con el almidón de trigo puro

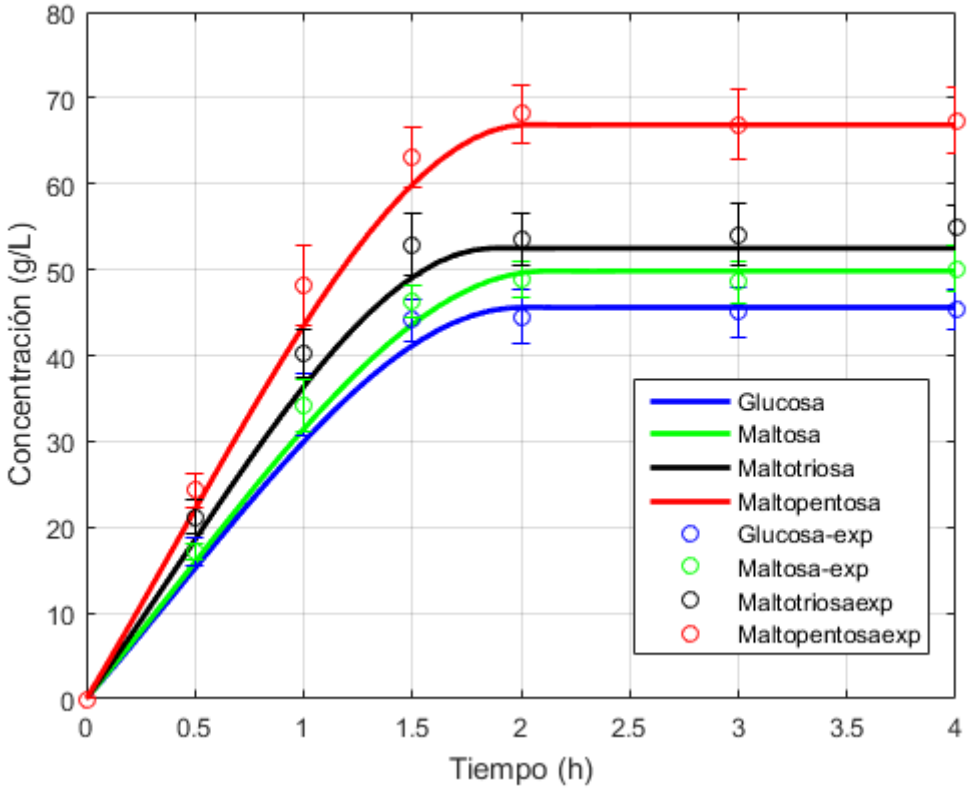


Figura 3.2 Resultados de simulación para licuefacción con el residuo agroindustrial

Los errores del modelo utilizado para el proceso de licuefacción comparado con los datos experimentales se presentan en la Tabla 3.5 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial.

Tabla 3.5 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Oligosacárido	**Errores promedio para Almidón de trigo puro (%)**	**Errores promedio para Residuo agroindustrial (%)**
Maltopentosa	6,6	5,6
Maltotriosa	7,2	7,0
Maltosa	7,0	5,4
Glucosa	8,3	6,4

De acuerdo con la Tabla 3.4 para el almidón de trigo puro, las constantes *h* fueron cambiadas para *n*=3 (0,36 por 0,30) y *n*=5 (0,32 por 0,22), lo que indica que existe menos sustrato disponible para producir los oligosacáridos 3 y 5. Las constantes *x* que indican que solo una cantidad determinada de sustrato está disponible para la producción de cada oligosacárido, fueron cambiadas de *n*=3 (0,25 por 0,28) y *n*=5 (0,27 por 0,32), incrementándose este valor para maltotriosas y maltopentosas (Morales et al. 2008).

Para el residuo agroindustrial las constantes *h* fueron cambiadas para *n*=1 (0,29 por 0,25) y *n*=5 (0,32 por 0,30), lo que indica que existe menos sustrato disponible para producir los oligosacáridos 1 y 5. Las constantes *x* también fueron cambiadas de *n*=1 (0,2 por 0,25) y *n*=5 (0,29 por 0,23), incrementándose para la glucosa y disminuyendo para la maltopentosa (Morales et al. 2008). Existió otro cambio en la constante *q* para *n*=5 (0,26 por 0,43), indicando que la velocidad de producción de la maltopentosa es más rápida para este residuo agroindustrial.

Modelo de sacarificación

La Tabla 3.6 presenta los parámetros para la etapa de sacarificación y la Figura 3.3 y 3.4 muestran la simulación (línea constante) comparada con los resultados experimentales (puntos) para almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente. La programación utilizada para la simulación de esta etapa se encuentra en el Anexo 11 y los datos de la cinética en el Anexo 12 y 13.

Tabla 3.6 Parámetros de sacarificación para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Parámetro	Unidades	Almidón de trigo puro	Residuo agroindustrial
$V_{omax,2}$	mol/mL h	$6.7097*10^{31}$	$5,1676*10^{32}$
$V_{omax,3}$	mol/mL h	$3,4101*10^{33}$	$4,6183*10^{33}$
$V_{omax,5}$	mol/mL h	$4,8010*10^{31}$	$1,6753*10^{32}$
$K_{m,2}$	mol/L	0,0050	0,0150
$K_{m,3}$	mol/L	0,0553	0,1300
$K_{m,5}$	mol/L	0,0140	0,0130
$K_{eq,1}$	mol/L	0,054	0,054
$K_{eq,2}$	mol/L	200	200
$K_{eq,3}$	mol/L	2,8105	2,8105
K_s	mol/L	0,1499	0,1528
K_I	mol/L	0,0472	0,0385
K_d	h^{-1}	0,5136	0,8799

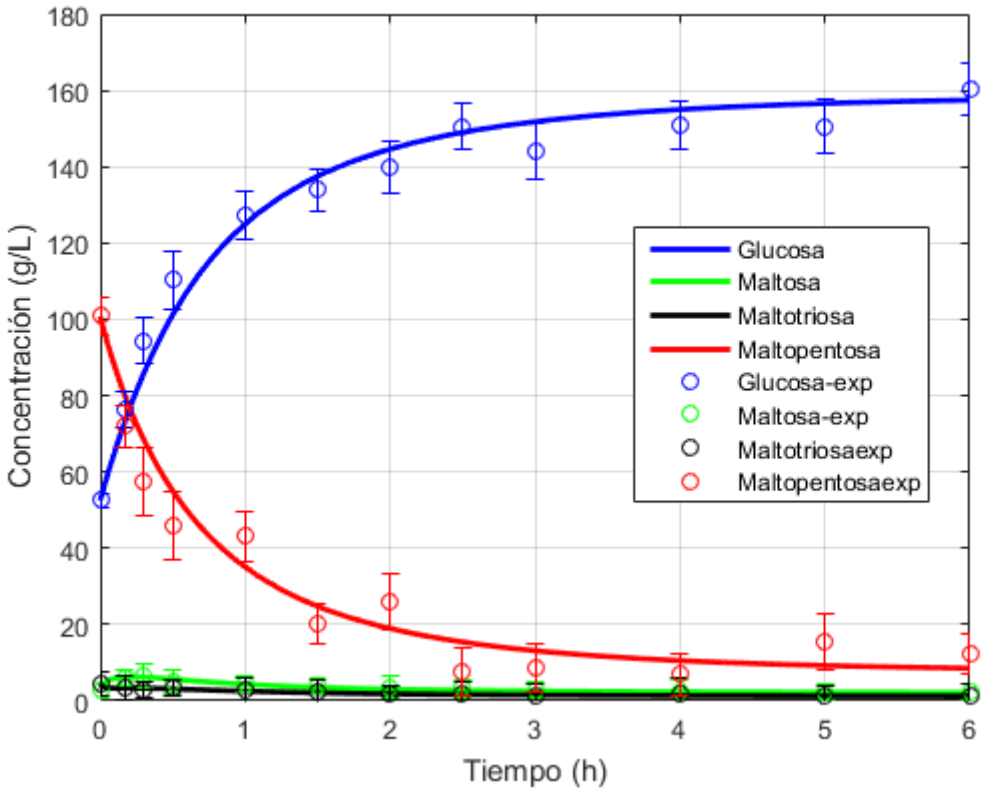


Figura 3.3 Resultados de simulación para sacarificación con el almidón de trigo puro

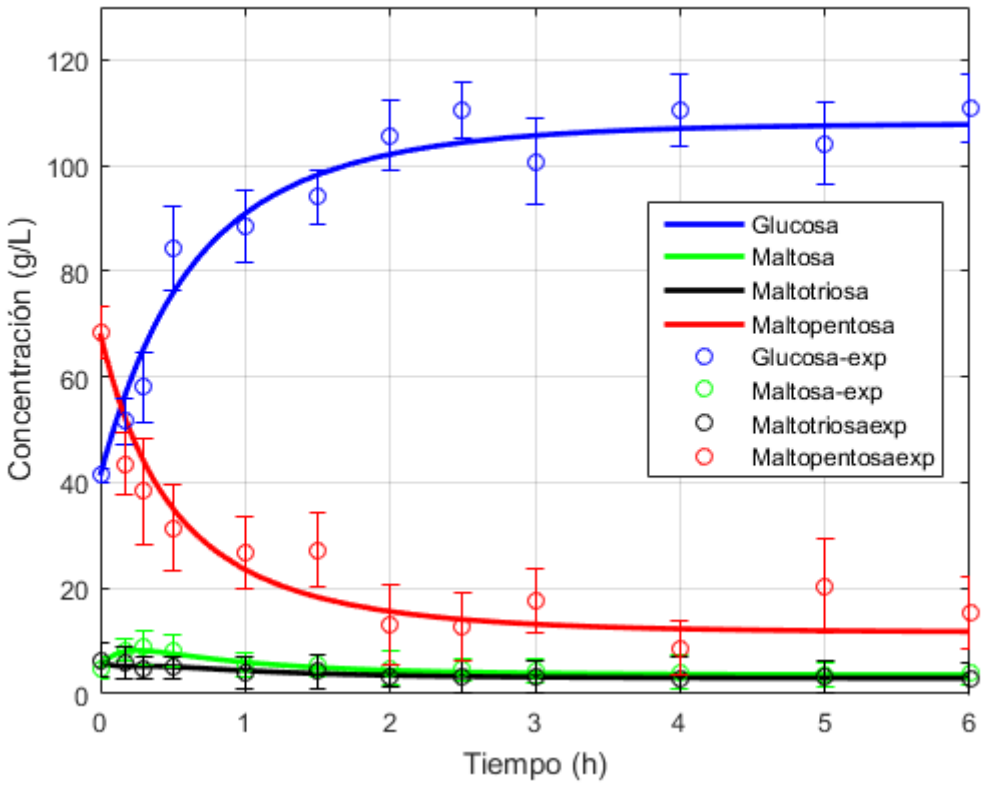


Figura 3.4 Resultados de simulación para sacarificación con el residuo agroindustrial

Los errores del modelo utilizado para el proceso de sacarificación comparado con los datos experimentales se presentan en la Tabla 3.7 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial.

Tabla 3.7 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Oligosacárido	**Errores promedio para Almidón de trigo puro (%)**	**Errores promedio para Residuo agroindustrial (%)**
Maltopentosa	6,3	8,3
Maltotriosa	5,9	7,2
Maltosa	5,9	7,3
Glucosa	3,9	6,7

De acuerdo con la Tabla 3.6 se variaron todos los parámetros del artículo de Morales et al. (2008) con excepción de las constantes de equilibrio debido a que la materia prima de ese modelo era yuca. Sin embargo, el comportamiento de los parámetros no varió mucho a los originales y su análisis ha sido similar para diferentes biomasas a partir de almidón. El proceso de sacarificación para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial presenta mayor afinidad a la maltosa debido a su menor valor de Km como lo presentan Åkerberg et al. (2000) y Cruz (2012). La velocidad inicial indica que se promueve la formación de maltotriosas con la enzima Optidex® L-400. Dicho comportamiento también se presentó en el estudio de Cruz (2012) utilizando la enzima Optimax L1000 y almidón de banano.

El comportamiento de los parámetros para maltosa y maltotriosa se observan claramente en la cinética, donde la primera media hora existe un incremento en su producción y

posteriormente son consumidos (mayor afinidad por maltosa y mayor velocidad de producción de maltotriosas). Dicho resultado es debido al mecanismo de reacción del proceso de sacarificación presentado en las Ecuaciones 3.5 a 3.8, en el cual se observa como producto inicial la maltotriosa y maltosa, las cuales posteriormente son hidrolizados rápidamente a glucosa por ser oligosacáridos susceptibles a diferencia de los oligosacáridos resistentes como la maltopentos que reúne los oligosacáridos de más de 4 unidades de glucosa (Zanin & De Moraes, 1996). Los resultados de inhibición por sustrato y glucosa son similares entre biomasas y se presenta una diferencia en el parámetro de desactivación enzimática debido a la composición del residuo agroindustrial.

Debido al buen ajuste obtenido corroborado con el porcentaje de error, este modelo adaptado que incluye la producción de oligosacáridos, efecto del pH, factores de inhibición de sustrato y glucosa, para el proceso de licuefacción y sacarificación es capaz de representar la hidrólisis enzimática con almidón de trigo puro y su aplicación con un residuo agroindustrial.

3.4 CONCLUSIONES

El modelo de licuefacción puede utilizarse en simulaciones con intervalos de concentración de sustrato entre 60-400g/L y temperaturas entre 60-90°C. El modelo de sacarificación permite simulaciones con concentraciones de sustrato hasta 400g/L y temperaturas entre 45-65°C incluyendo la inactivación enzimática y efectos de temperatura. Además, se implementó el efecto de pH obteniendo buen ajuste de parámetros con la simulación.

Los modelos de licuefacción y sacarificación fueron aplicados a almidón de trigo puro y a un residuo agroindustrial, demostrando que para ambas materias primas se presenta un buen ajuste de parámetros el cual no supera un error del 10% y puede utilizarse como una herramienta en el diseño de biorreactores.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

Åkerberg, C., Zacchi, G., Torto, N., & Gorton, L. (2000). A kinetic model for enzymatic wheat starch saccharification. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 75(4), 306-314.

Apar, D. K., & Özbek, B. (2007). Estimation of kinetic parameters for rice starch hydrolysis inhibited by added materials. *Chemical Engineering Communications*, 194(3), 334-344.

Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with α-amylase from Bacillus licheniformis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 488–495.

Berensmeier, S., & Buchholz, K. (2004). Separation of isomaltose from high sugar concentrated enzyme reaction mixture by dealuminated β-zeolite. *Separation and purification technology*, 38(2), 129-138.

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 467–476.

Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidónes gelatinizados del fruto de la planta de banano.* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Dávila, J. A., Hernández, V., Castro, E., & Cardona, C. A. (2014). Economic and environmental assessment of syrup production. Colombian case. *Bioresource technology*. *Bioresource Technology*, *161*, 84–90.

Duvernay, W. H., Chinn, M. S., & Yencho, G. C. (2013). Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. *Industrial crops and products*, 42, 527-537.

Fujita, N. (2017). Starch. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second, Vol. 2, pp. 106–111). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00162-3

Govindasamy,l S, Oates CG, Wong HA. 1992. Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by thermostable a-amylase. *Carbohydr Res* 18:89–100.

Hua, X., & Ruijin, Y. (2016). Enzymes in Starch Processing. In Enzymes in Food and Beverage Processing (pp. 139–170). CRC Press Taylor & Francis Group.

Hull, P. (2010). Application Properties of Glucose Syrups. In *Glucose Syrups: Technology and Applications* (First, pp. 61–75). John Wiley & Sons Ltd.

Johnston, D. B., & McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource Technology,* 154, 18–25.

Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., & Cheng, L. (2015). The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 48, 189–196.

Morales Vélez, S. P. (2004). Capítulo 3: Un modelo para la obtención de jarabes. En: Simulación de un bioproceso para la obtención de jarabes glucosados y fructosados a partir de almidón de Yuca. Tesis de Maestría (Biotecnología), Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 26p.

Morales, S., Álvarez, H., & Sánchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1), 25–30.

Murthy, G. S., Singh, V., Rausch, K. D., Johnston, D. B., & Tumbleson, M. E. (2006). Mathematical Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Starch: Application to Fuel Ethanol Production. In 2006 ASAE Annual Meeting (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Paolucci, D., Belleville, M.P., Zakhia, N. and Rios, G.M. (2000a). Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl enzyme, *Biotechnol Bioeng*, 68(1): 71–77.

Paolucci, D., Belleville, M.P., Rios, G.M. and Zakhia, N., (2000b). Kinetics of continuous starch hydrolysis in a membrane reactor, *Biochem Eng J*, 6(3): 233–238.

Paolucci, D., Belleville, M.P. and Rios, G.M. (2001). A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor—application to starch

hydrolysis, *J Chem Technol Biotechno*l, 76(3): 273–278.

Presečki, A. V., Blažević, Z. F., & Vasić-Rački, Đ. (2013). Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by α-amylases from Bacillus licheniformis: effect of calcium, pH and temperature. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(1), 117-126.

Prieto, M. A., Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2012). Comparison of several mathematical models for describing the joint effect of temperature and ph on glucanex activity. *Biotechnology progress*, 28(2), 372-381.

Prunescu, R. M., & Sin, G. (2013). Dynamic modeling and validation of a lignocellulosic enzymatic hydrolysis process–A demonstration scale study. *Bioresource technology*, 150, 393-403.

Rodríguez Reinoso, C. E. (2011). *Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (Musa cavendish) para la obtención de jarabe de glucosa*. (Trabajo de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

Rodriguez, V. B., Alameda, E. J., Gallegos, J. F., Requena, A. R., & Lopez, A. I. (2006). Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α-Amylase from Bacillus licheniformis. *Biotechnology progress*, 22(3), 718-722.

Roy, I., & Gupta, M. N. (2004). Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology*, *34*(1), 26-32.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torrresa, R. G., & Molina, D. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2337–2343.

Smrčková, P., Horský, J., Šárka, E., Koláček, J., Netopilík, M., Walterová, Z., … Hrušková, K. (2013). Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 43–49.

Tijskens, L. M., Greiner, R., Biekman, E. S., & Konietzny, U. (2001). Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3), 323–30.

Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 467–475.

Zanin, G. M., & De Moraes, F. F. (1996). Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57–58(1), 617–625.

CAPÍTULO 4: PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA *IN SITU* A TRAVÉS DE MEMBRANAS SUMERGIDAS

4.1 INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la producción de jarabes de glucosa se ha realizado en reactores de hidrólisis enzimática operados de modo discontinuos con temperatura, agitación y pH controlados. Este tipo de operación del biorreactor presenta baja eficiencia debido a los procesos de arranque y parada de un lote. Para obtener el jarabe de glucosa libre de material no hidrolizado y enzimas, se necesita la inactivación de enzimas con incrementos de pH o temperatura y un proceso de purificación del producto (Paolucci-Jeanjean et al. 2001; Pinelo & Meyer, 2009).

Un proceso que unifica la hidrólisis enzimática con la separación del producto por medio de membranas se ha denominado "Recuperación del producto *in situ*" o ISPR por sus siglas en inglés (In Situ Product Recovery). La ISPR retiene las enzimas presentes en el sistema mientras que permite la transferencia a través de la membrana de productos de reacción de bajo peso molecular. El empleo de un reactor de membrana cuenta principalmente, con una configuración de diseño que permite la eliminación del producto sin pérdida de enzima en el permeado (Andrić et al. 2010). Sin embargo, existen dos impedimentos que reducen la productividad: ensuciamiento de la membrana, representado en la disminución del flux (Luo et al. 2014) y la disminución de producción de la glucosa (Paolucci-Jeanjean et al. 2001).

El proceso del ensuciamiento de la membrana incluye las siguientes etapas: adsorción, obstrucción y bloqueo de poros, formación de capa de gel y formación de capa de torta, de los cuales la adsorción se considera el proceso responsable de la bioincrustación grave (Zhou et al. 2012). Variables como el pH y la temperatura presentan una relación directa con la adsorción de enzimas en membranas, además de ser variables que afectan el proceso de hidrólisis enzimática por estar ligadas al rendimiento enzimático (Larsson, 1980; Marshall et al. 1993; Madaeni et al. 2012; Ike et al. 2017).

La adsorción electrostática está relacionada con el punto isoeléctrico, el cual es el pH donde la carga neta de la enzima es nula. Se debe evaluar cuál será la carga de la enzima al valor de pH del proceso para la hidrólisis enzimática, lo cual se realiza comparando el pH de operación con el punto isoeléctrico de la enzima, teniendo en cuenta que estarán cargados positivamente o negativamente a valores de pH por debajo o por encima de su punto isoeléctrico, respectivamente (Marshall et al. 1993). Rico (1990) encontró que el punto isoeléctrico de las glucoamilasas provenientes de *Aspergillus niger* es de 3,54 y autores como Zhou et al. (2012) y Ma et al. (2016) indican que las membranas PVDF (Polifluoruro de vinilideno) mantienen cargas negativas a pH desde 2 hasta 10 unidades.

Los efectos de la temperatura pueden estar relacionados con el grado de despliegue de las cadenas moleculares de la membrana polimérica donde la temperatura de la disolución con el PVDF define en qué medida las cadenas moleculares del polímero se pueden desplegar/disolver (Madaeni et al. 2012; Ike et al. 2017).

Comúnmente se han utilizado reactores de membranas con módulos externos para la recuperación del producto. Por lo general son operados en modo de flux transversal, donde la suspensión a filtrar fluye paralela a la superficie de la membrana. Estos

reactores de módulo externo presentan ventajas en el control del ensuciamiento de la membrana en comparación con módulo sumergido. Sin embargo, los módulos externos requieren adición de volúmenes de reacción, mayor energía para mantener las tasas de flux continuo a través de la membrana y bombeo de la suspensión del alimento (Carstensen et al. 2012; Malmali et al. 2015).

Stark & von Stockar (2003) y Femmer, Carstensen & Wessling (2015), señalaron que los procesos de membranas sumergidos han sido rara vez utilizados debido a la falta de disponibilidad y dificultades en el escalado a nivel comercial (Malmali et al. 2015). Sin embargo, este tipo de membranas cumplen con características comparables con las membranas externas, como bajo estrés de cizalladura, condiciones constantes de operación, baja inversión en costos adicionales por reactor, bajo consumo de energía, pues no se requiere bombear el retenido al reactor, y bajo riesgo de contaminación.

Los estudios reportados han utilizado el sistema de recuperación del producto con módulos externos y diferentes tipos de membranas, con alimentación continua de sustrato y/o enzimas, llegando a eficiencias superiores al 80% (Sims & Cheryan, 1992; Lopez-Ulibarri & Hall, 1997; Paolucci-Jeanjean et al. 2001 Grześkowiak-Przywecka & Słomińska, 2007; Sakinah et al. 2014). Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado el efecto que genera la membrana en el proceso de hidrólisis enzimática.

Por lo anterior, este capítulo se ha enfocado en evaluar la producción y recuperación del jarabe de glucosa *in situ* utilizando membranas sumergidas con material polifluoruro de vinilideno (PVDF) en modalidad de diafiltración, debido a que se utiliza para sacar del sistema los componentes de bajo peso molecular a través de las membranas (Scott & Hughes, 2012). Por medio de la modalidad de diafiltración se evaluó el efecto de la membrana, pH y temperatura en el proceso ISPR, además de los efectos de ensuciamiento en la membrana como un biorreactor debido a la posible adsorción y deposición de enzimas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente capítulo contiene 2 etapas: *i)* Identificación de las condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto *in situ* con membranas y *ii)* Verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor. A continuación se describe la metodología realizada para cada etapa. Se utilizó almidón de trigo puro marca SIGMA-ALDRICH LOTE#BCBS6624 como materia prima, su caracterización se presenta en la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Caracterización del almidón de trigo puro

Componente (%)	**Almidón de trigo puro**	**Método de análisis**
Humedad	5,7±0,1	Termogravimétrico por secado 105ºC / NREL/TP-510-42621
Sólidos	94,3±0,1	
Almidón base seca	95,1±0,1	Ficha técnica del almidón
Cenizas	0,11±0,1	
Proteína base seca	0,19±0,1	
Total	95,4	

El resultado total de la caracterización representa un 95,4% del almidón de trigo puro y el 4,6% faltante puede ser debido a material inorgánico, azúcares solubles y material nitrogenado, entre otros componentes menores (Sluiter et al. 2008).

4.2.1 Identificación de las condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas

Se utilizaron las enzimas Spezyme® Fred de *Bacillus licheniformis* para licuefacción y la enzima Optidex® L-400 de *Aspergillus niger* para sacarificación, con una actividad enzimática específica de 2389 U/g y 3064,46 AUG/g, respectivamente. Los protocolos utilizados se presentan en el Anexo 1 y 2. Las membranas fueron de fibra hueca con material PVDF, un diámetro interior de 1mm y exterior de 2mm. PVDF es un polímero hidrófobo que, debido a sus propiedades como alta resistencia mecánica, resistencia química, estabilidad térmica y resistencia a la intemperie, ha recibido una gran atención como material de membrana en comparación con otros materiales poliméricos comercializados. Por esta razón, PVDF se ha aplicado en gran medida en procesos de membranas de microfiltración y ultrafiltración (Madaeni et al. 2012; Vitola et al. 2015; Ike et al. 2017).

Investigadores como Paolucci-Jeanjean et al. (2001), Ríos et al. (2004) y Andrić et al. (2010), indican que el corte de peso molecular o MWCO por sus siglas en inglés (Molecular Weight Cut-Off) de las membranas debe ser significativamente menor que el tamaño de las macromoléculas a retener. Debido a que una gran cantidad de enzimas tienen un MWCO entre 10 y 80 kDa y para este caso la alfa-amilasa y glucoamilasa entre 60-70 kDa (Cruz, 2012), las membranas de ultrafiltración entre 1 y 100 kDa son los más utilizados (Ríos et al. 2004); sin embargo, Andrić et al. (2010), sugieren que el MWCO sea entre 10-30 kDa, ya que valores <4kDa o >50kDa puede generar fugas de las enzimas a través de la membrana, además cortes <4 kDa requerirá mayor presión para un flux adecuado. Por lo anterior, las membranas de PVDF manejaron un MWCO de 30 kDa.

El módulo de membranas fue fibras huecas sellándoles la entrada de flux en la parte inferior con resina epóxica. Se utilizaron 20 membranas con un área total superficial efectiva disponible de 38,01cm^2 y el sistema se realizó sumergido. El montaje se presenta en la Figura 4.1 y 4.2.

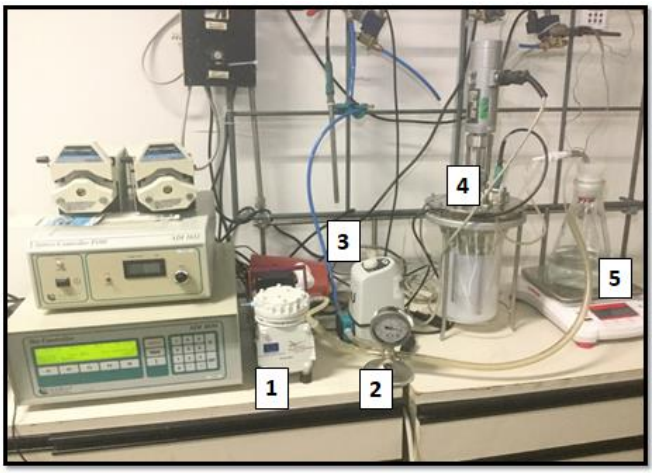


Figura 4.1 Montaje del diseño de experimentos para la maximización de glucosa con membranas sumergidas. 1) Sistema de control de temperatura, pH y bomba de vacío. 2) Manómetro para medir la presión. 3) Bomba para adición de buffer. 4) Sistema de hidrólisis enzimática con membranas sumergidas. 5) Recolección de permeado

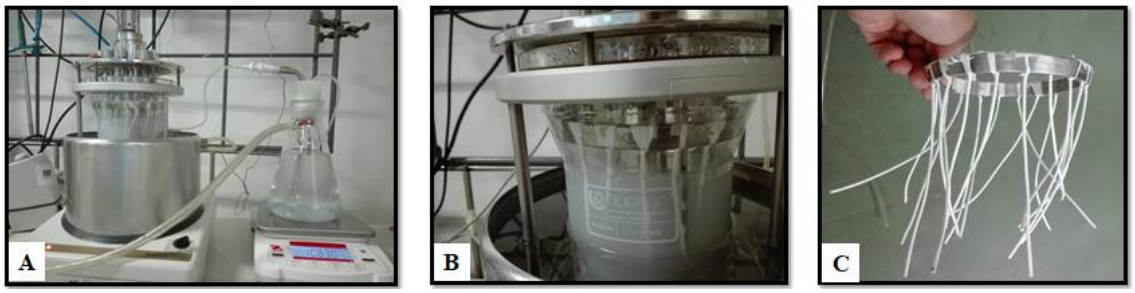


Figura 4.2 Acercamiento de la operación del ISPR. A) Reactor de hidrólisis enzimática con membranas sumergidas. B) Membranas de fibra hueca dentro del reactor ISPR. C) Membranas PVDF.

La concentración de sólidos con el que se venía trabajando fue del 20%, sin embargo esta concentración no permitió obtener flux ya que el almidón obstruía las membranas como se presenta en la Figura 4.3.

Figura 4.3 Saturación de membranas con concentración de 20% p/p de sólidos

Posteriormente, se realizaron ensayos disminuyendo la concentración de sólidos del 16%, 12% y finalmente al 10% de sólidos p/p se obtuvo flux. Este es uno de los principales inconvenientes que se ha reportado al utilizar membranas, el cual ha limitado su uso a nivel industrial (Wiesner & Aptel, 1998; Sweity et al. 2011; Zhou et al. 2012; Shi et al. 2014); sin embargo, su aplicación con la unión del procesos de hidrólisis enzimática es uno de los retos que se presenta y se analizará en el desarrollo de este capítulo evaluando una viabilidad con el flux.

El volumen de trabajo fue de 1,5L utilizando buffer fumárico a 0,1M. Los volúmenes reportados han trabajado normalmente entre 50-300ml y máximo 1L, siendo adecuado trabajar con mayor volumen para observar un comportamiento más real del proceso. Las condiciones de hidrólisis a las que se llevaron a cabo los ensayos fueron las obtenidas a partir del estudio de máxima producción de glucosa, presentadas en el Capítulo 2 para el almidón de trigo puro. Estas condiciones se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Condiciones del ensayo para maximizar la producción de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir de almidón de trigo puro

Condiciones	**Gelatinización**	**Licuefacción**	**Sacarificación**
Temperatura (°C)	95	74,1	*
Agitación (rpm)	150	150	150
pH (unidades)	5,8	5,8	*
Tiempo (min)	30	60	Pre-HE: 30 Membranas: 90
Relación E/S (%)	---	0,023	0,636
Concentración de calcio (ppm)	18	18	18

Pre-HE: Tiempo de pre-hidrólisis antes de funcionar las membranas. *Valores que dependen del diseño estadístico.

Las condiciones de sacarificación fueron evaluadas para su máxima producción de glucosa utilizando la metodología de superficie de respuesta. Para este estudio se realizó un diseño de Box-Baken evaluando los factores de pH (3 – 6 unidades) y temperatura (40 – 60°C) teniendo en cuenta estudios como Paolucci-Jeanjean et al. (2001), Hinkova et al. (2004), Grześkowiak-Przywecka & Słomińska, (2007), Słomińska & Niedbacha (2009) y Acevedo-Estupiñan et al. (2015).

Durante los ensayos se realizó la gelatinización y posterior licuefacción de acuerdo con las condiciones presentadas en la Tabla 4.2. Para la etapa de sacarificación, se definió realizar una pre-hidrólisis en modo discontinuo durante 30 minutos con el fin de disminuir la viscosidad del hidrolizado por la partición de las cadenas de oligosacáridos y evitar el rápido ensuciamiento de las membranas (Lopez-Ulibarri & Hall, 1997; Paolucci-Jeanjean et al. 2001; Malmali et al. 2015).

La fuerza impulsora la ejerció una bomba de vacío, manteniendo una presión transmembranal constante de 10psi y se midió con un manómetro. El flux de permeado (Flux) se determinó mediante el registro del tiempo cada que se incrementaba 0,5g de masa usando una balanza electrónica. El reactor se operó en modo de diafiltración en discontinuo donde se mantuvo el volumen constante adicionando buffer fumárico 0,1M ajustado al pH del ensayo, de acuerdo al volumen de permeado.

Se utilizó el modo de operación en diafiltración discontinuo, con el fin de observar el efecto de la membrana en la producción de jarabes de glucosa evitando ingresar al sistema almidón fresco y/o nuevas enzimas que influenciaran en aumentar la producción de glucosa.

Al final de cada experimento se tomó muestra y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se desactivó la enzima en baño maría 95°C durante 5 minutos para posteriormente congelarse (Ozbek & Yuceer, 2001; Betiku et al. 2013; Khawla et al. 2014). La concentración de glucosa en el sobrenadante como variable respuesta, se determinó por HPLC utilizando la columna SUPELCOGEL^{TM} C-610H a 30°C con un

flux de 0,5mL/min, ácido fosfórico al 0,1% como fase móvil y 20ul de muestra con detector RID.

El diseño estadístico arrojó 30 corridas con 10 puntos centrales, un nivel de significancia del 5% y como variable respuesta se midió glucosa. La formulación del diseño de experimentos fue realizado en el software STATGRAPHICS® Centurion XVI (Versión 16.0.09, Statpoint Technologies, Inc., Virginia, Estados Unidos) y el tratamiento estadístico de los datos fueron analizados con el software R con licencia gratuita, obteniendo las condiciones de máxima producción de glucosa. En el Anexo 14 se presentan los códigos de la programación en R.

Se validó el modelo empírico estadístico evaluando la condición de máxima producción de cada materia prima arrojada por el programa R y dos puntos por encima y por debajo por triplicado.

4.2.2 Verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor

Se llevó a cabo el proceso de producción de jarabes de glucosa con condiciones de máxima producción de glucosa con biorreactores de membranas obtenidos en la primera etapa del estudio (numeral 4.2.1) durante 6 horas. Las condiciones utilizadas se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Condiciones de máxima producción de glucosa con biorreactores de membranas a partir de almidón de trigo puro

Condiciones	Gelatinización	Licuefacción	Sacarificación
Temperatura (°C)	95	74,1	61,5
Agitación (rpm)	150	150	150
pH (unidades)	5,8	5,8	4,8
Tiempo (min)	30	60	Pre-HE: 30 Membranas: 90
Relación E/S (%)	---	0,023	0,636
Concentración de calcio (ppm)	18	18	18

Pre-HE: *Tiempo de pre-hidrólisis antes de funcionar las membranas.*

Al finalizar el proceso, se realizó un lavado de las membranas con agua destilada operando el sistema a una presión transmembranal de 10psi y agitación de 150rpm hasta que las membranas evacuaran toda el agua. Posteriormente, se siguió la metodología utilizada por Paolucci-Jeanjean et al. (2001) para la verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor. Se realizó la filtración de 1,5L de solución de maltodextrinas, que son una mezcla de polisacáridos con un equivalente de dextrosa entre 4 y 7, previamente calentado a 61,5°C con una presión transmembranal de 10psi y agitación de 150rpm. Debido a los costos del proceso para filtrar las maltodextrinas, se realizó un ensayo para validar las enzimas inmovilizadas como biorreactor.

Durante la filtración de maltodextrinas, la concentración del retenido se mantuvo igual a la composición inicial. La concentración de los diferentes azúcares se determinó por

HPLC utilizando la columna SUPELCOGEL™ C-610H a 30°C con un flux de 0,5mL/min, ácido fosfórico al 0,1% como fase móvil y 20ul de muestra con detector RID. Los azúcares medidos fueron glucosa, maltosa, maltotriosa y los azúcares de maltotetraosa, maltopentosa y maltohexosa se agruparon en el grupo "maltopentosas".

4.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.3.1 Identificación de las condiciones de máxima producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas

La concentración de glucosa de cada ensayo se presenta en la Tabla 4.4. Se obtuvieron las mayores concentraciones de glucosa entre 72,6 y 73,1g/L con temperaturas entre 50 y 70°C y pH 4,5 unidades.

Tabla 4.4 Matriz del diseño estadístico con valores experimentales para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro

Orden de corrida	Variables del diseño estadístico		Variable respuesta	Flux de permeado ($L/m^2.h$)
	pH (unidades)	Temperatura (ºC)	Glucosa (g/L)	
1	3	40	65,8	134,8
2	3	40	68,2	110,8
3	3	40	65,4	113,9
4	3	40	66,8	107,7
5	3	40	70,3	73,9
6	3	60	63,1	173,6
7	3	60	65,2	174,8
8	3	60	66,5	175,2
9	6	40	63,1	70,7
10	6	40	61,3	74,7
11	6	40	64,1	83,8
12	6	40	62,2	90,7
13	6	60	69,3	96,3
14	6	60	70,2	91,2
15	6	60	66,6	97,2
16	6	60	65,5	87,5
17	4,5	50	70,3	126,1
18	4,5	50	70,9	132,5
19	4,5	50	69,0	144,2
20	4,5	50	66,6	144,1
21	4,5	50	66,8	154,8
22	4,5	50	73,1	111,2
23	4,5	50	72,9	113,7
24	4,5	50	67,2	144,3
25	4,5	50	67,3	163,3
26	4,5	50	68,6	143,3
27	4,5	30	47,8	64,6
28	4,5	70	72,6	136,8
29	7,5	50	32,3	73,0
30	1,5	50	24,0	0,0

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para ajustar los resultados experimentales a un modelo estadístico con el software STATGRAPHICS® Centurion XVI (Versión 16.0.09, Statpoint Technologies, Inc., Virginia, Estados Unidos). La Tabla 4.5 presenta los términos del modelo, sus coeficientes y el análisis de varianza (ANAVA) que permite establecer el efecto de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Tabla 4.5 ANAVA para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro

Término	Constante	Valor P
Constante	-13,3765	0,0000000
Temperatura (°C)	0,612798	0,6142041
pH	28,628	0,0002341*
Temperatura*Temperatura	-0,011309	0,3210790
pH*pH	-4,06373	$2{,}07 \times 10^{-8}$*
Temperatura*pH	0,163443	0,1158254

*Significancia < 0,05

Los resultados de la Tabla 4.5 muestran que el pH y el efecto cuadrado del pH presentan una diferencia estadísticamente significativa (valor P≤0,05) con la variable respuesta de la glucosa para el rango evaluado. Los términos de temperatura y temperatura*pH indican estadísticamente que para el rango evaluado, cualquier valor que se seleccione generará un efecto similar en la producción de glucosa. El ajuste de los datos al modelo fue 0,75 (R^2), valor que es igual al 0,75 propuesto por Han et al. (2011), lo que indica que este modelo es apropiado para describir los datos obtenidos. El R^2 ajustado fue del 0,70 y la diferencia con el R^2 representa los términos del modelo que generan efectos significativos con la variable respuesta (Chowdhury, Sarkar, & Mitra, 2016). Hasta el momento no se han reportado estudios similares a este para poder realizar la comparación del R^2 ajustado.

La Ecuación empírica estadística 4.1 del modelo es la siguiente:

$$G = -13{,}3765 + (28{,}628 * pH) + (0{,}612798 * T) - (4{,}06373 * pH^2) + (0{,}163443 * T * pH) - (0{,}011309 * T^2) \quad (4.1)$$

Donde:
G: Concentración de glucosa, g/L
T: Temperatura, °C
pH: pH, unidades

De acuerdo con el modelo estadístico de la Ecuación 4.1 se obtuvo la Figura 4.4 la cual presenta los resultados de superficie de respuesta para la concentración de glucosa en la sacarificación con biorreactores de membranas del almidón de trigo puro.

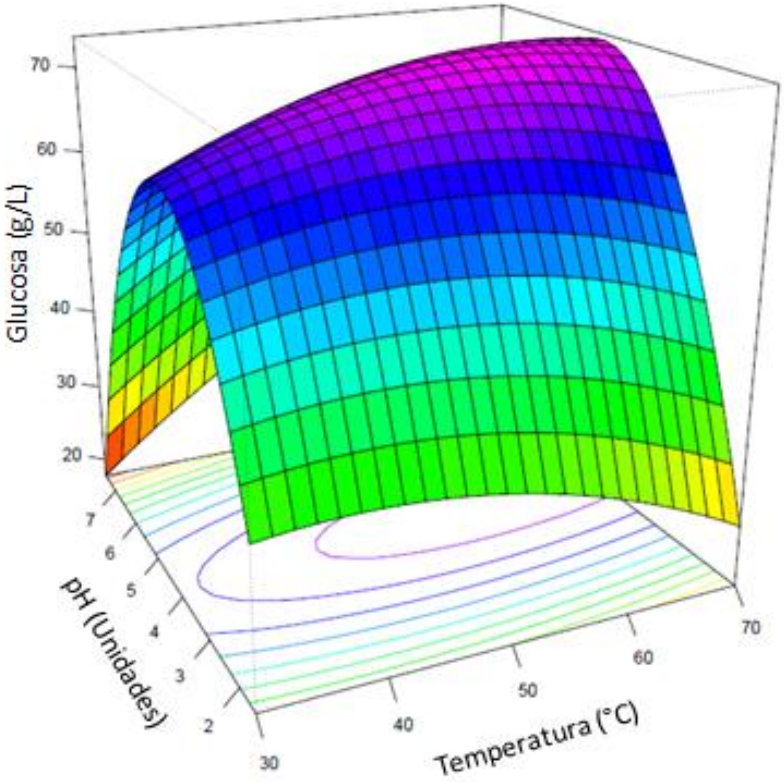


Figura 4.4 Resultados de superficie de respuesta para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro. Interacción entre la temperatura (°C) y el pH (Unidades) con glucosa (g/L) como variable respuesta.

El pH presentó una curvatura indicando que la enzima trabaja aproximadamente en 4 unidades. Este valor de pH está dentro de los rangos reportados por la literatura para la enzima (Murthy et al. 2009; Ruiz et al. 2011; Collares et al. 2012; Virunanon et al. 2013; Khawla et al. 2014, Zabed et al. 2016) y representa un óptimo para la producción de glucosa. El análisis ANAVA indica estadísticamente que la variación de la temperatura genera un efecto similar en la producción de glucosa, sin embargo, se observa que la producción de glucosa aumentó al aumentar la temperatura y después de 65°C disminuyó, lo que indica que a estas temperaturas se puede conducir a una desnaturalización de la enzima que genera una pérdida de la actividad catalítica como lo reporta Guzmán-Maldonado et al. (1993) y Vijayakumar et al. (2005).

A partir del modelo estadístico con membranas Ecuación 4.1 se obtuvo las condiciones de máxima producción de glucosa con una temperatura de 61,5°C y un pH de 4,8 unidades. La Tabla 4.6 presenta los resultados de validación del modelo estadístico.

Tabla 4.6 Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso ISPR del almidón de trigo puro

pH (und)	Temperatura (°C)	Producción Actual (g glucosa/L)	Respuesta Predicha (g glucosa/L)
4,8	**61,5**	**73,70±0,07**	**73,57**
5,5	55,0	70,16±0,10	70,09
3,5	68,0	65,22±0,40	65,32

De acuerdo con los resultados de validación se verificó que la condición obtendia por el programa R corresponde al valor de máxima producción de glucosa. La condición de máxima producción no se encuentra reportada en la literatura siendo el aporte de nuevo conocimiento en el ámbito académico. Para comprender el efecto que presentó el pH sobre el flux se presenta en la Figura 4.5.

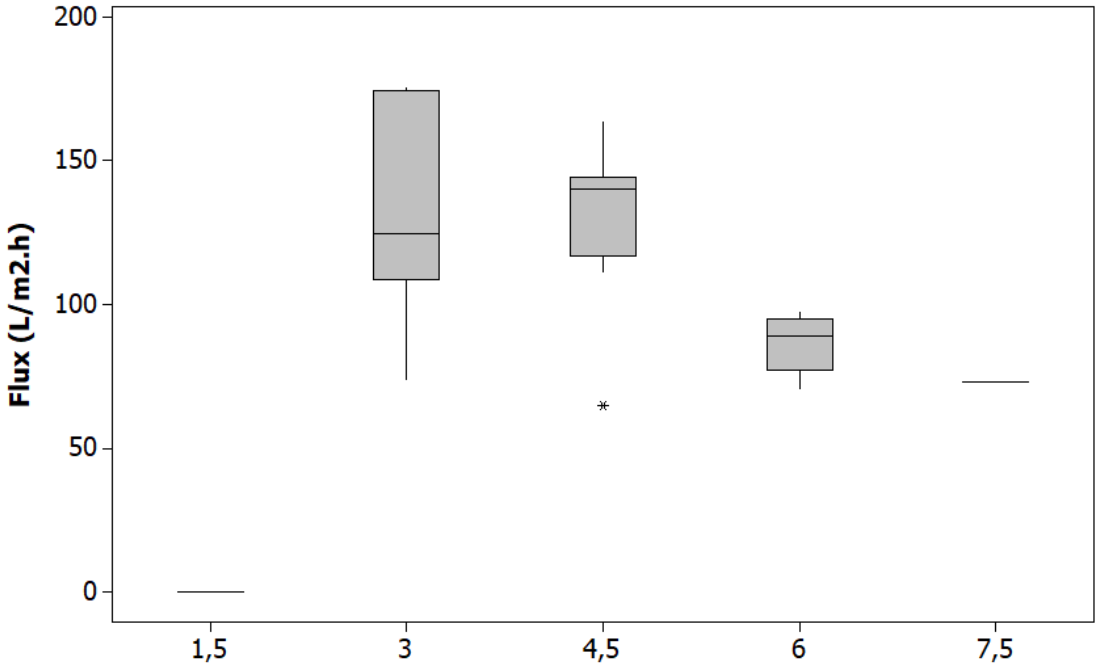


Figura 4.5 Efectos del pH (unidades) en el flux (L/m2.h) para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro
**Representa un valor atípico para el comportamiento del pH 4.5unidades*

La Figura 4.5 muestra que el pH a 1,5 no presentó flux debido a que las cargas eran opuestas y presentaron atracción electrostática, lo que pudo haber causado una adsorción irreversible de las enzimas, como lo indica Marshall et al. (1993), Zhou et al. (2012) y Ma et al. (2016). En general, la disminución del pH aumenta la interacción entre la molécula de proteína y los grupos no iónicos de los ligandos hidrofóbicos (Santa Cruz, 1997). Scopes (1987) citado por Santa Cruz (1997) propone que la nube de electrones se asocia a las proteínas en áreas cargadas positivamente que se encuentran adyacentes a las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos de la cadena polipeptídica. Como al disminuir el pH aumentan las cargas positivas y disminuyen las cargas repulsivas de signo negativo, la fuerza de la interacción se intensifica.

Para el pH 3 y 4,5 que están cercanos al punto isoeléctrico de la enzima (3,54), las enzimas tenderían a tener una carga neutra y su hidrofobicidad es máxima (Santa Cruz, 1997), es decir que en este caso, existiría muy poca adsorción de enzimas en la membrana, permitiendo una mejora en el flux. Para los pH 6 y 7,5 las cargas entre las enzimas y la membrana serían iguales existiendo repulsión electrostática (Ahmad et al. 2011; Luo et al. 2014), lo que implica una baja adsorción de enzimas (Xu et al. 2015; Lee et al. 2017).

Otra de las causas para la disminución del flux pudo haberse presentado debido a los polisacáridos (en este caso el almidón) y proteínas, que son afectadas por los cambios

en los valores de pH (Sweity et al. 2011; Zhou et al. 2012). La adsorción de éstos puede verse afectada por diversos factores que incluyen la interacción entre los grupos funcionales de la superficie, la conformación, la química del agua (como el pH, los cationes multivalentes y la fuerza iónica), la temperatura, la concentración y la química de la superficie adsorbente (Sweity et al. 2011). A pH bajos, los polisacáridos y proteínas presentan características de hinchamiento y una estructura compacta que obstruye la membrana, lo cual también pudo generar el bajo flux junto con las cargas opuestas de las enzimas; para pH altos, los polisacáridos y proteínas presentan una estructura estirada y heterogénea que permiten una mejora en el flux pero no tan alto como el flux cuando el pH oscila entre 3 y 4,5 unidades (Dogsa et al. 2005; Sweity et al. 2011). Los efectos de la temperatura relacionados con el flux son presentados en la Figura 4.6.

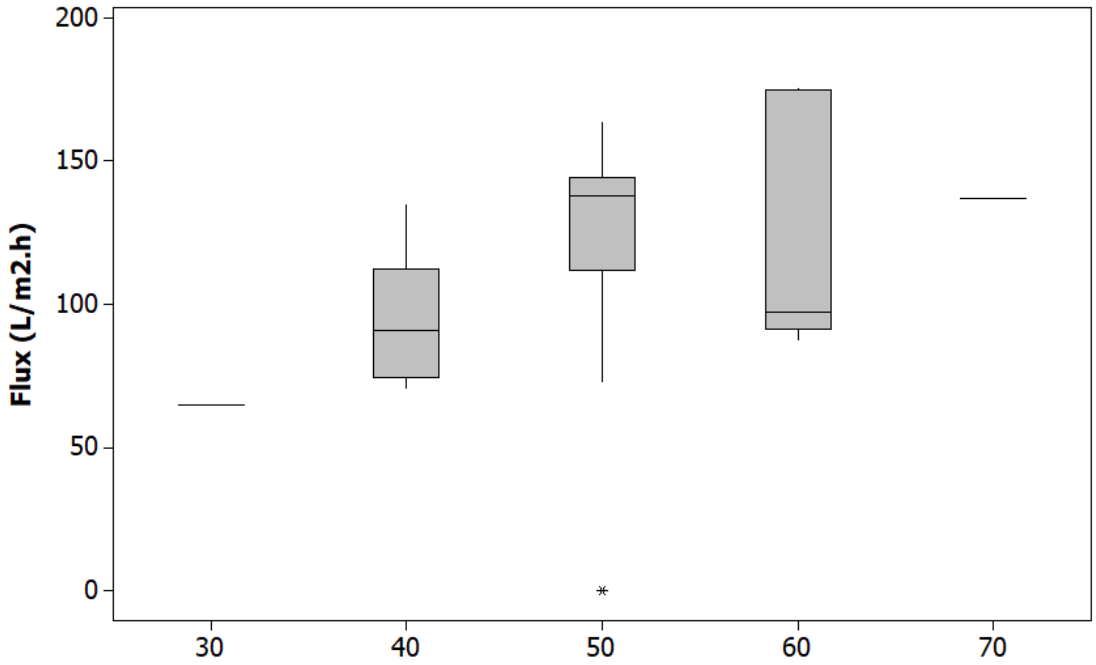


Figura 4.6 Efectos de la temperatura (°C) en el flux (L/m2.h) para la etapa de recuperación de jarabes de glucosa in situ con membranas para el almidón de trigo puro
**Representa un valor atípico para el comportamiento del pH 4.5unidades*

En la Figura 4.6 se observa una relación directa a medida que aumenta la temperatura, el flux es mayor, debido al despliegue de las cadenas moleculares del polímero que permiten el paso de mayor flux a través de las membranas (Madaeni et al. 2012; Ike et al. 2017). Además, el aumento de la temperatura reduce la viscosidad del permeado, lo que ayuda a mejorar la velocidad del flux y a aumentar la difusividad a través de la membrana (Marshall et al. 1993).

4.3.2 Verificación de inmovilización de enzimas en la membrana como biorreactor

La Figura 4.7 muestra los resultados de la filtración de maltodextrinas en las membranas después de una cinética de 6 horas con almidón de trigo puro. La concentración de oligosacáridos 1 a 3 en el permeado son más altos que en el retenido, mientras que se observa una tendencia inversa para los oligosacáridos de >5. Este comportamiento va ligado al mecanismo que presentan las amiloglucosidasas reportado por Zanin & De Morales (1996) y Morales et al. (2008).

La diferencia de concentraciones observadas durante la filtración es debido a que al atravesar la solución de maltodextrinas existe una formación de oligosacáridos de 1 a 3 a partir de la hidrólisis de oligosacáridos >5, por las enzimas inmovilizadas en la membrana debido a la operación del sistema como también lo observaron Paolucci-Jeanjean et al. (2001). La Figura 4.8 muestra la relación entre la membrana, las enzimas y los oligosacáridos que se transportan a través del sistema, donde existe la reacción y la separación simultánea del producto.

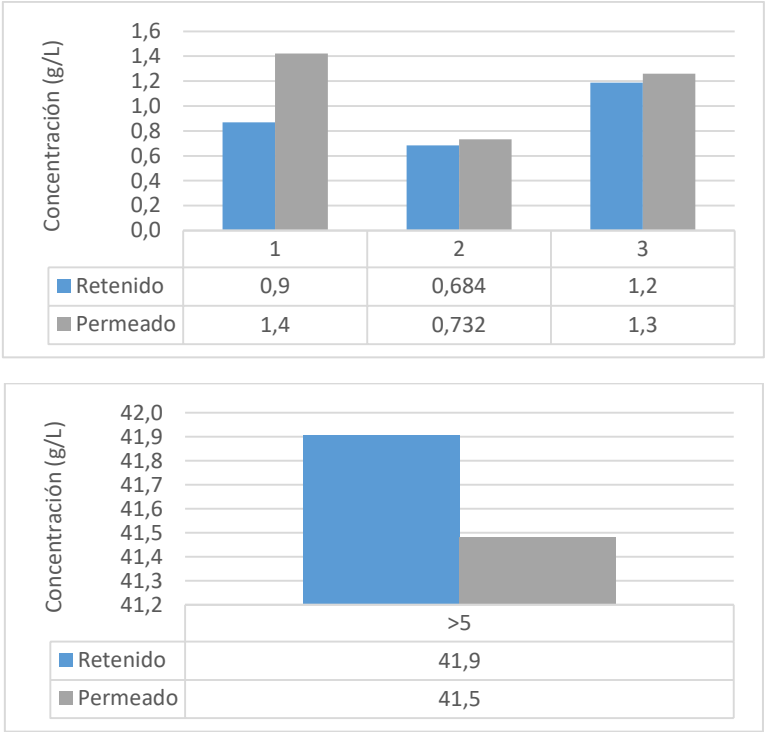


Figura 4.7 Concentración de oligosacáridos de grado de polimerización 1 a 5 obtenidos durante la filtración de maltodextrinas.

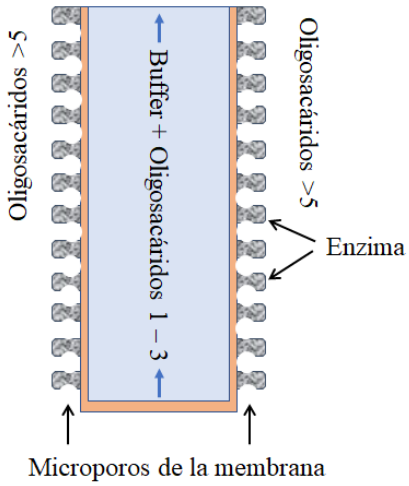


Figura 4.8 Producción y separación del jarabe de glucosa en biorreactores de membrana

Para este caso, la membrana actúa como un biorreactor, así como separador de fases. Los oligosacáridos de >5 unidades de glucosa presentes en el hidrolizado de licuefacción se difunden a través de la membrana con enzimas adsorbidas y depositadas, las cuales hidrolizan oligosacáridos hasta 1 a 3, saliendo del sistema a medida que se forman.

El mecanismo de unión de proteínas para las membranas poliméricas depende en gran medida de la fuerza electrostática que ejerza la membrana de PVDF en la molécula de proteína. El polímero PVDF, que es por naturaleza electronegativo, atraerá a los grupos amino cargados positivamente de la proteína, promoviendo una fuerte interacción entre la membrana PVDF y la proteína. Para las membranas PVDF se han reportado formas primarias α y β, siendo β la forma polar del PVDF. En esta conformación, las cadenas se empaquetan en la celda unitaria de tal manera que los dipolos moleculares son paralelos y no simétricos. La falta de un centro de simetría hace que la tensión externa desplace la distribución de carga y se desarrolla una polarización neta (Gregorio & Capitao, 2000; Manion, 2005). La alta polaridad hace que un lado de la molécula tenga una alta electro-negatividad; por lo tanto, se produce una fuerza electrostática. Sin embargo, como se discutió anteriormente, el pH óptimo de 4,8 unidades representaría una carga negativa para la enzima glucoamilasa al compararse con el punto isoeléctrico de 3,54, presentando una repulsión electrostática que no permitiría la adsorción de enzimas en las membranas PVDF (Rico, 1990; Marshall et al. 1993; Ma et al. 2016).

Ahmad et al. (2011) evaluaron la adsorción de albúmina de suero bovino (BSA) en membranas PVDF y observaron que a temperaturas >40°C, la fuerza electrostática no influye en la adsorción de proteínas, sino que predomina el efecto de la porosidad sobre la forma del polímero. La membrana también tiene como objetivo tener la mayor porosidad posible para aumentar la interconexión entre los poros de la membrana. Una mayor interconexión entre los poros dará un mejor resultado de unión a proteínas a medida que aumenta el área de captura de la proteína, lo que explica la relación entre la porosidad y el rendimiento de unión a proteínas de membrana.

En la Figura 4.4, al ubicarse en el pH óptimo de 4,8 unidades, se observa que a temperaturas ≥40°C se presenta un incremento de la producción de glucosa indicando que la temperatura óptima de 61,5°C favorece que las enzimas estén más estables conservando su actividad catalítica a lo largo del tiempo (Pervez et al. 2017) y se puede asumir que las enzimas se adhieren en la superficie y dentro de la membrana por la porosidad más que por las fuerzas electrostáticas.

Lo anterior indica que las enzimas presentan una adsorción física probablemente en una monocapa, que se puede describir con una isoterma de tipo Langmuir la cual ha sido reportada para la proteína BSA (Albúmina de suero bovino) por Marshall et al. (1993) y Bowen & Gan (1991). Estos autores complementan que después de la adsorción física, existe una acumulación menos rápida de múltiples capas de proteína (adsorción química) junto con la monocapa, mediante la aplicación de la presión transmembranal descritas por la isoterma de adsorción de Brunauer, Emmett y Teller (BET). Esta acumulación de proteínas se presenta por medio de enlaces disulfuro intermolecular, interacciones hidrófobas o por carga de proteína. La adsorción química entre proteínas puede favorecer el proceso en general, ya que éstas se encontrarán inmovilizadas en la membrana permitiendo estar separadas del producto final y presentarán una mayor estabilidad (Bolivar et al. 2016; Chakraborty et al. 2016). En la adsorción química entre proteínas, estas no están fuertemente unidas como las proteínas adsorbidas directamente a la membrana, por lo que se pueden eliminar mediante limpieza (Marshall et al. 1993).

Para soluciones con enzimas se ha estudiado la limpieza de las membranas mediante métodos químicos, mientras que las aplicaciones de limpieza física de membranas reportadas en la literatura son aplicadas para membranas de microfiltración. Hasta el momento, estudios como Zhu & Nyström (1998), Levitsky et al. (2012), Norazman et al. (2013) y Lujan-Facundo et al. (2015), han evaluado diferentes tipos de limpieza química con agentes como hidróxido de amonio, mezcla de fosfatos, silicatos y carbonatos, hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido clorhídrico y tween, para diferentes enzimas como albúmina de suero bovino (BSA) y proteínas aisladas de una solución de suero WPI (β-lactoglobulina, glicomacropeptidos y α- lactoalbumina).

El agente químico hidróxido de sodio ha sido el que presenta mejor eliminación de enzimas, debido a que incrementa las cargas de las moléculas de enzima, aumentando la repulsión electrostática, permitiendo que el ensuciamiento sea interrumpido gradualmente y posteriormente retirado (Zhu & Nyström, 1998). Sin embargo, ninguno de los agentes químicos evaluados generó una eliminación del 100% de la enzima, lo cual confirma que en un sistema de membranas puede haber adsorción de proteínas e incluso pueden conservarse en la membrana después del lavado y operación de la misma.

Un aspecto a tener en cuenta es que las enzimas inmovilizadas son normalmente menos activas que la enzima libre, manteniendo un porcentaje de actividad retenida generalmente entre del 5 al 80% dependiendo de la forma de inmovilización de la enzima, tales como física y/o química (Mateo et al. 2007; Rodrigues et al. 2013; Luo et al. 2014; Bolivar, Eisl & Nidetzky, 2016). Esta pérdida de actividad es debido a dos factores principales: uno de estos es la consecuencia directa de distorsiones estructurales en la enzima que resulta de la unión a la superficie sólida de los poros de la membrana y el otro factor es la consecuencia indirecta de la reacción enzimática que tiene lugar en un entorno heterogéneo (Hanefeld, Gardossi & Magner, 2009; Garcia-Galan et al. 2011; Rodrigues et al. 2013; Bolivar, Eisl & Nidetzky, 2016).

Al comparar los mecanismos de ensuciamiento de las membranas con las estrategias de inmovilización de enzimas, se puede concluir que en este caso prevalece la adsorción física de las enzimas, el cual depende del tipo de membrana y la enzima (Marshall et al. 1993). Además, estos mecanismos de ensuciamietno pueden ser enfocados como una ventaja para la inmovilización, siempre y cuando las limitaciones de transferencia de masa y la disminución de flux a través de la membrana se puedan mantener en un mínimo (Luo et al. 2014).

Cabe destacar que este resultado confirma una parte de la hipótesis del tema de investigación doctoral, en la cual existe una inmovilización de enzimas a través de la operación de membranas y recuperación del producto *in situ*, observando que los mecanismos de ensuciamiento de las membranas se pueden convertir en estrategias de inmovilización de enzimas para los procesos de hidrólisis enzimática del almidón.

4.4 CONCLUSIONES

Se demostró que existe inmovilización de enzimas con las condiciones de máxima producción de glucosa operado con membranas.

Los mecanismos de ensuciamiento de las membranas se pueden convertir en estrategias de inmovilización de enzimas para la hidrólisis enzimática del almidón preservando la actividad catalítica de las enzimas.

Las membranas PVDF hidrófobas presentaron buena estabilidad frente al pH y temperatura, separando las fases del jarabe de glucosa líquido, el material no hidrolizado y las enzimas.

El efecto del pH sobre el flux y la producción de glucosa, presentan fuerzas de atracción y repulsión electrostáticas.
Los efectos de temperatura sobre el flux y la producción de glucosa indicaron que las mejores condiciones están entre 50 – 60°C.

Para el proceso de recuperación de jarabes de glucosa *in* situ con membranas para el almidón de trigo puro, se encontró un modelo cuadrático con un R^2 de 75%. La optimización de dicho modelo permitió encontrar las máximas condiciones del proceso para la producción de glucosa a una temperatura de 61,5°C y un pH de 4,8 unidades.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Estupiñan, M. V., Parra-Escudero, C. O., & Muvdi-Nova, C. J. (2015). Estudio del proceso de clarificación de hidrolizados de almidón de yuca utilizando membranas cerámicas. *Vitae*, 22(2), 121-129.

Ahmad, A. L., Ideris, N., Ooi, B. S., Low, S. C., & Ismail, A. (2011). Morphology and polymorph study of a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for protein binding: Effect of the dissolving temperature. *Desalination*, 278(1), 318-324.

Ai, Y., Hasjim, J., & Jane, J. L. (2013). Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 120-127.

Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., & Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology advances*, 28(3), 407-425.

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 467–476.

Bolivar, J. M., Eisl, I., & Nidetzky, B. (2016). Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catalysis Today*, 259, 66-80.

Bowen, W. R., & Gan, Q. (1991). Properties of microfiltration membranes: Adsorption of bovine serum albumin at polyvinylidene fluoride membranes. *Journal of colloid and interface science*, 144(1), 254-262.

Carstensen, F., Apel, A., & Wessling, M. (2012). In situ product recovery: Submerged membranes vs external loop membranes". *Journal of Membrane Science*, 394, 1-36.

Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S., & Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential

application in membrane separation: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36(1), 43-58.

Chowdhury, A., Sarkar, D., & Mitra, D. (2016). Esterification of Free Fatty Acids Derived from Waste Cooking Oil with Octanol: Process Optimization and Kinetic Modeling. *Chemical Engineering & Technology*. Recuperado a partir de http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ceat.201400745/pdf

Collares, R. M., Miklasevicius, L. V. S., Bassaco, M. M., Salau, N. P. G., Mazutti, M. a., Bisognin, D. a., & Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(7), 579–586.

Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidónes gelatinizados del fruto de la planta de banano.* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Dogsa, I., Kriechbaum, M., Stopar, D., & Laggner, P. (2005). Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS. *Biophysical journal*, 89(4), 2711-2720.

Femmer, T., Carstensen, F., & Wessling, M. (2015). A membrane stirrer for product recovery and substrate feeding. *Biotechnology and bioengineering*, 112(2), 331-338.

Gregorio, R., & Capitao, R. C. (2000). Morphology and phase transition of high melt temperature crystallized poly (vinylidene fluoride). *Journal of materials science*, 35(2), 299-306.

Grześkowiak-Przywecka, A., & Słomińska, L. (2007). Saccharification of potato starch in an ultrafiltration reactor. *Journal of food engineering*, 79(2), 539-545.

Guzmán-Maldonado, H., Paredes-Lopez, O., & Domínguez, J. (1993). Optimization of an enzymatic procedure for the hydrolytic depolymerization of amaranth starch by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 26(1), 28-33.

Hinkova, A., Bohacenko, I., Bubnik, Z., Hrstkova, M., & Jankovska, P. (2004). Mineral membrane filtration in refinement of starch hydrolysates. *Journal of food engineering*, 61(4), 521-526.

Ike, I. A., Zhang, J., Groth, A., Orbell, J. D., & Duke, M. (2017). Effects of dissolution conditions on the properties of PVDF ultrafiltration membranes. *Ultrasonics Sonochemistry*. http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.05.041

Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G., & Oumèma, N. E. (2014). Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 52, 144–149.

Larsson, K. (1980). Interfacial phenomena-bioadhesion and biocompatibility. *Desalination*, 35, 105-114.

Lee, J., Jeong, S., Ye, Y., Chen, V., Vigneswaran, S., Leiknes, T., & Liu, Z. (2017). Protein fouling in carbon nanotubes enhanced ultrafiltration membrane: Fouling

mechanism as a function of pH and ionic strength. *Separation and Purification Technology*, 176, 323-334.

Levitsky, I., Duek, A., Naim, R., Arkhangelsky, E., & Gitis, V. (2012). Cleaning UF membranes with simple and formulated solutions. *Chemical Engineering Science*, 69(1), 679–683.

Lopez-Ulibarri, R., & Hall, G. M. (1997). Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(6), 398-404.

Luján-Facundo, M. J., Mendoza-Roca, J. A., Cuartas-Uribe, B., & Álvarez-Blanco, S. (2015). Evaluation of cleaning efficiency of ultrafiltration membranes fouled by BSA using FTIR–ATR as a tool. *Journal of food Engineering*, 163, 1-8.

Luo, J., Meyer, A. S., Jonsson, G., & Pinelo, M. (2014). Enzyme immobilization by fouling in ultrafiltration membranes: impact of membrane configuration and type on flux behavior and biocatalytic conversion efficacy. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 79-89.

Ma, J., Qin, L., Zhang, X., & Huang, H. (2016). Temporal evolution of the selectivity-permeability relationship during porous membrane filtration of protein solutions. *Journal of Membrane Science*, 514, 385-397.

Madaeni, S. S., Pourghorbani, R., & Vatanpour, V. (2012). Investigation of parameters affecting the flux of microfiltration poly (vinylidenefluoride) membranes for particulate removal. *Advances in Polymer Technology*, 31(1), 29-40.

Malmali, M., Stickel, J., & Wickramasinghe, S. R. (2015). Investigation of a submerged membrane reactor for continuous biomass hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 189-197.

Manion, M. (2005). Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. *Reference & User Services Quarterly*, 44(4), 338-339.

Marshall, A. D., Munro, P. A., & Trägårdh, G. (1993). The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. *Desalination*, 91(1), 65-108.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.

Morales, S., Alvarez, H., & Sanchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and bioproducts processing*, 86(1), 25-30.

Murthy, G. S., Sall, E. D., Metz, S. G., Foster, G., & Singh, V. (2009). Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 67–72.

Norazman, N., Wu, W., Li, H., Wasinger, V., Zhang, H., & Chen, V. (2013). Evaluation of chemical cleaning of UF membranes fouled with whey protein isolates via analysis of residual protein components on membranes surface. *Separation and Purification Technology*, 103, 241–250.

Ozbek, B., & Yuceer, S. (2001). Alpha-Amylase Inactivation During Wheat Starch Hydrolysis Process. *Process Biochemistry*, 37(1), 87–95.

Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., & Rios, G. M. (2001). A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor–application to starch hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3), 273-278.

Pervez, S., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2017). Role of two polysaccharide matrices on activity, stability and recycling efficiency of immobilized fungal amyloglucosidase of GH15 family. *International Journal of biological macromolecules*, 96, 70-77.

Pinelo, M., Jonsson, G., & Meyer, A. S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 1-11.

Rico, Y. (1990). Producción, purificación y caracterización parcial de una glucoamilasa de aspergillus niger. *Revista Colombiana de Química*, 19(1), 61-71.

Ríos, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., & Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors–a review. *Journal of Membrane Science*, 242(1), 189-196.

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torrresa, R. G., & Molina, D. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2337–2343.

Sakinah, A. M., Ismail, A. F., Illias, R. M., Zularisam, A. W., Hassan, O., & Matsuura, T. (2014). Effect of substrate and enzyme concentration on cyclodextrin production in a hollow fibre membrane reactor system. *Separation and Purification Technology*, 124, 61-67.

Santa Cruz, L. F. B. (1998). Purificación de α-Amilasa de Aspergillus oryzae por adsorción. Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias químicas, 281p.

Scott, K., & Hughes, R. (2012). Chapter 3: Membrane equipment and plant design. En: Industrial membrane separation technology. Springer Science & Business Media. 61-62p.

Shi, X., Tal, G., Hankins, N. P., & Gitis, V. (2014). Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: a review. *Journal of Water Process Engineering*, 1, 121-138.

Sims, K. A., & Cheryan, M. (1992). Continuous production of glucose syrup in an ultrafiltration reactor. *Journal of food science*, 57(1), 163-166.

Słomińska, L., & Niedbacha, J. (2009). Study on the influence of the so-called filtration enzyme action on the membrane filtration process of wheat starch hydrolysates. *Desalination*, 241(1), 296-301.

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory, 9p.

Stark, D., & von Stockar, U. (2003). In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. In: Process Integration in Biochemical Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 149-175 pp.

Sweity, A., Ying, W., Belfer, S., Oron, G., & Herzberg, M. (2011). pH effects on the adherence and fouling propensity of extracellular polymeric substances in a membrane bioreactor. *Journal of membrane science*, 378(1), 186-193.

Vijayakumar, G. R., Manohar, B., & Divakar, S. (2005). Amyloglucosidase-catalyzed synthesis of n-octyl-d-glucoside—analysis using response surface methodology. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 272-277.

Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V., & Chulalaksananukul, W. (2013). Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production*, 39, 273–279.

Vitola, G., Mazzei, R., Fontananova, E., & Giorno, L. (2015). PVDF membrane biofunctionalization by chemical grafting. *Journal of Membrane Science*, 476, 483-489.

Wiesner M. R. & Aptel P. (1998). Capítulo 4: Transporte de masa, caudal de permeado y ensuciamiento en procesos impulsados por presión. En: Tratamiento del agua por procesos de membrana: Principios, procesos y aplicaciones. AWWA. McGraw Hill. 71-106p.

Xu, J., Wang, Z., Wang, J., & Wang, S. (2015). Positively charged aromatic polyamide reverse osmosis membrane with high anti-fouling property prepared by polyethylenimine grafting. *Desalination*, 365, 398-406.

Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 467–475.

Zanin, G. M., & De Moraes, F. F. (1996). Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57–58(1), 617–625.

Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, Q., Xi, X., Zhang, J., & Yang, W. (2012). Equilibrium and thermodynamic studies on adsorption of BSA using PVDF microfiltration membrane. *Desalination*, 307, 61-67.

Zhu, H., & Nyström, M. (1998). Cleaning results characterized by flux, streaming potential and FTIR measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 138(2), 309-321.

CAPÍTULO 5: CINÉTICA HETEROGÉNEA PARA LA PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE JARABES DE GLUCOSA *IN SITU* A TRAVÉS DE MEMBRANAS SUMERGIDAS

5.1 INTRODUCCIÓN

Para evaluar los efectos de enzimas inmovilizadas en la membrana al operar el proceso ISPR, debe conocerse la concentración de sustrato en cada punto del interior de las membranas con el fin de calcular la velocidad local de conversión que aportan estas enzimas. Para esto, es necesario identificar si existen efectos de transferencia de masa tanto externa como interna. En la mayoría de los casos estas concentraciones no pueden medirse, aunque afortunadamente pueden calcularse utilizando la teoría de la difusión-reacción (Doran, 2013; Du Preez et al. 2015).

La Figura 5.1 muestra una descripción gráfica de los efectos de transferencia de masa externa e interna que se pueden presentar para las enzimas inmovilizadas en la membrana.

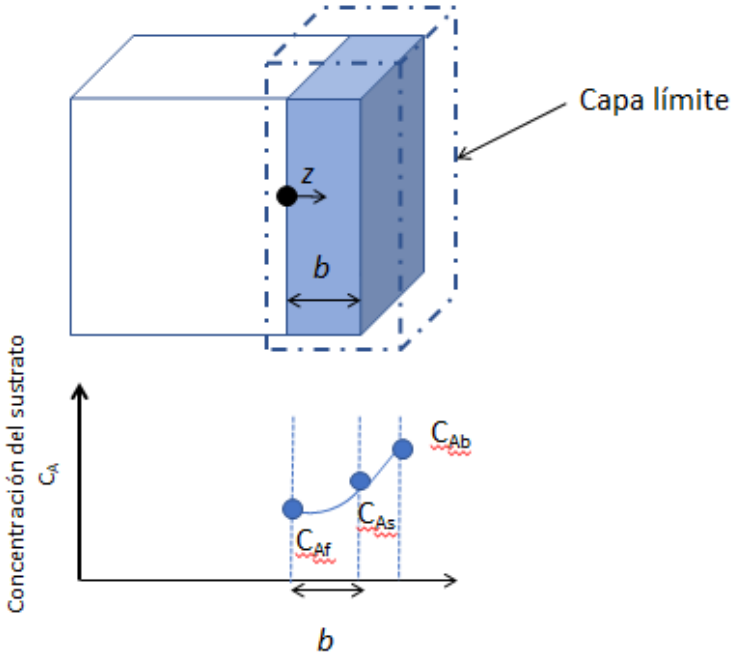


Figura 5.1 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa interna y externa
Fuente: Doran (2013)

La disminución en la concentración de sustrato desde C_{Ab} presente en el seno del líquido hasta C_{AS} presente en la superficie del catalizador (enzima) se produce a través de la capa límite que rodea al sólido. En ausencia de capa límite, $C_{AS} = C_{Ab}$, que es fácilmente medible. Cuando existe capa límite, el valor de C_{AS} es inferior a C_{Ab}, indicando que existen efectos de transferencia de masa externa. Lo mismo ocurre con la transferencia de masa interna, donde la concentración de sustrato desde C_{As} presente en la superficie del catalizador hasta que atraviese el espesor de la membrana, no presentará efectos de transferencia de masa interna cuando $C_{AS} = C_A$ y en caso contrario, existirá efectos de transferencia de masa interna cuando el valor de C_A es

inferior a C_{AS}. Finalmente, el efecto de la transferencia de masa total incluirá los efectos de transferencia de masa externa e interna (Doran, 2013).

El análisis matemático de las reacciones heterogéneas incluye una técnica denominada *balance de materia en capa.* Este capítulo presenta el balance de materia en capa a una partícula de catalizador de lámina plana de espesor b. Imagínese una fina capa de espesor Δz localizada a una distancia z como se muestra en la Figura 5.1. El sustrato que difunde hacia el interior de la lámina plana debe cruzar la capa. El balance de materia de sustrato se realiza en una capa considerando los procesos de transferencia de masa y de reacción que se producen en el espesor *z*. El sistema considerado para el balance de materia es únicamente la capa, mientras que el resto del espesor de la lámina se ignora por el momento. El sustrato se difunde a la capa a través de una superficie de espesor ($z+\Delta z$) y la abandona por una superficie de espesor *z*. Dentro de la capa, las enzimas inmovilizadas consumen el sustrato por reacción. El flujo de materia a través de la capa puede analizarse como se presenta en la Ecuación 5.1.

$$\underbrace{\textbf{Entra} - \textbf{Sale}}_{\text{Fenómenos de transferencia de materia}} + \underbrace{\textbf{Genera} - \textbf{Consumo}}_{\text{Reacción } r} = \textbf{Acumula} \qquad (5.1)$$

Las suposiciones del modelo heterogéneo para poder aplicar la Ecuación 5.1 se presentan a continuación y están basadas en los trabajos de Marshall et al. (1993), AL-Muftah & Abu-Reesh (2004), Bortone, Fidaleo & Moresi (2014), Du Preez et al. (2015) y Long, Bhatia, & Kamaruddin (2003):

1. Reactor de membranas isotérmico.
2. Estado estacionario
3. La transferencia de masa se produce únicamente por difusión.
4. La ley de Fick puede modelar la difusión de sustrato y producto dentro de la membrana catalítica. La difusividad efectiva no cambia a través del catalizador (enzima) y es independiente de la concentración, lo cual significa que no varía con la posición.
5. Propiedades de los fluidos constantes.
6. La distribución de la enzima en la membrana es uniforme, con esto se asume la conversión idéntica de sustrato a través de todo el reactor.
7. La capa de enzimas inmovilizada en la membrana es activa. Es decir que la reacción toma lugar en los poros de la membrana, donde la enzima es inmovilizada (Marshall et al. 1993; Du Preez et al. 2015).
8. La concentración de sustrato depende de una única variable espacial que para este caso será el espesor de la membrana donde se ubicarían las enzimas.
9. Debido a la falta de información sobre las propiedades de los azúcares a diferentes temperaturas, se asume que todos los azúcares tienen la misma densidad de la glucosa.

Aplicando las suposiciones anteriores en la Ecuación 5.1 se obtiene que: El sustrato es transportado dentro y fuera de la capa por difusión, por lo que el primer y segundo término se expresan mediante la ley de difusión de Fick con difusividad efectiva

constante. La ley de difusión de Fick establece que el flujo másico es proporcional al gradiente de concentración (Doran, 2013):

$$J_A = \frac{N_A}{a} = -D_{AB}\frac{dC_A}{dy} \qquad (5.2)$$

Donde:

J_A: Flujo másico del componente A. Se define como la velocidad de transferencia de masa por unidad de área perpendicular a la dirección del movimiento.

N_A: Velocidad de transferencia de masa del componente A

a: Área a través de la cual se produce la transferencia de masa

D_{AB}: Coeficiente de difusividad del componente A en una mezcla de A y B

C_A: Concentración del componente A

y: Distancia

$\frac{dC_A}{dy}$: Gradiente de concentración o variación en la concentración de A con la distancia.

La velocidad de difusión puede aumentarse según la Ecuación 5.2, aumentando el área disponible para la transferencia de masa, aumentando el gradiente de concentración en el sistema o aumentando el valor del coeficiente de difusión. El signo negativo de la Ecuación 5.2 indica que la dirección de la transferencia de masa siempre va desde regiones de alta concentración hacia regiones de baja concentración; es decir, opuesta a la del gradiente de concentración (Doran, 2013).

Continuando con la Ecuación 5.1, el tercer término es cero, no hay generación de sustrato. El sustrato es consumido por reacción en el interior de la capa a una velocidad igual a la velocidad volumétrica de reacción r_A multiplicada por el volumen de la capa. De acuerdo a que el sistema se encuentra en estado estacionario, su composición y cantidad de materia debe ser invariante y el sustrato no puede acumularse en la capa, siendo cero la parte derecha de la Ecuación 5.1.

Para el balance de materia de sustrato A en una capa de acuerdo con la Figura 5.1, los términos de la Ecuación 5.1 son los siguientes:

Velocidad de entrada por difusión: $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z+\Delta z}$

Velocidad de salida por difusión: $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z}$

Velocidad de generación: 0

Velocidad de desaparición por reacción: $r_A 6z^2\Delta z$

Velocidad de acumulación en estado estacionario: 0

$\mathcal{D}_{AB}^{o}$ es la difusividad efectiva de sustrato A, C_A la concentración de A en la interfase sólido-líquido, z la distancia medida desde la superficie interior de la lámina, Δz el espesor de la lámina infinitesimal y $r_A$la velocidad de reacción por unidad de volumen de partícula. Los dos primeros términos se derivan de la ley de Fick; el área de la capa de lámina plana disponible para la difusión es $6z^2$.

El término $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z+\Delta z}$ significa $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)$ calculado en el espesor $z+\Delta z$; $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z}$ significa $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)$ calculado en z. El volumen de la capa es $r_A 6z^2\Delta z$.

De la Ecuación 5.1 se obtiene la siguiente ecuación del balance de materia en estado estacionario:

$$\frac{\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z+\Delta z}-\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}6z^2\right)|_{z}}{\Delta z}-r_A 6z^2\Delta z=0 \qquad (5.3)$$

Dividiendo cada término por $6\Delta z$ se obtiene:

$$\frac{\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)|_{z+\Delta z}-\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)|_{z}}{\Delta z}-r_A z^2=0 \qquad (5.4)$$

La Ecuación 5.3 puede escribirse en la forma:

$$\frac{\Delta\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)}{\Delta z}-r_A z^2=0 \qquad (5.5)$$

Donde

$\Delta\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)$ Significa la variación en $\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)$ a través de Δz.

La Ecuación 5.5 es válida para una capa laminar de espesor Δz. Para desarrollar una ecuación que pueda aplicarse a cualquier punto de la lámina plana, se debe encoger Δz hasta cero. Como Δz aparece sólo en el primer término de la Ecuación 5.5, tomando el límite de la Ecuación 5.5 cuando $\Delta z \rightarrow 0$ se obtiene:

$$\lim_{\Delta z\rightarrow 0}\frac{\Delta\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)}{\Delta z}-r_A z^2=0 \qquad (5.6)$$

La Ecuación 5.6 es idéntica a la ecuación diferencial de segundo orden:

$$\frac{d}{dz}\left(\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{dC_A}{dz}z^2\right)-r_A z^2=0 \qquad (5.7)$$

De acuerdo con la hipótesis 3, $\mathcal{D}_{AB}^{o}$ es independiente de z y puede sacarse fuera de la diferencial:

$$\mathcal{D}_{AB}^{o}\frac{d}{dz}\left(\frac{dC_A}{dz}z^2\right)-r_A z^2=0 \qquad (5.8)$$

La Ecuación 5.8 es una ecuación diferencial que representa la difusión y la reacción en un biocatalizador de lámina plana. La Ecuación 5.8 es una ecuación diferencial de segundo orden y se observa más claramente si se expresa el primer término de la siguiente forma:

$$\mathcal{D}_{AB}^{o}\left(\frac{d^2C_A}{dz^2}z^2 + 2z\frac{dC_A}{dz}\right) - r_A z^2 = 0 \qquad (5.9)$$

Para determinar los efectos de transferencia de masa interna, Doran (2013) recomienda que se debe suponer que no existen efectos de transferencia de masa externa, es decir que no existe la capa límite presentada en la Figura 5.1. Por lo tanto, la concentración C_{AS} será representada por la concentración que se mide en todo el fluido. La Figura 5.2 representa los efectos de transferencia de masa interna. Para este caso, se debe determinar si existe una diferencia de concentración de C_{AS} hasta atravesar todo el ancho *b* de la membrana representado por la concentración C_A.

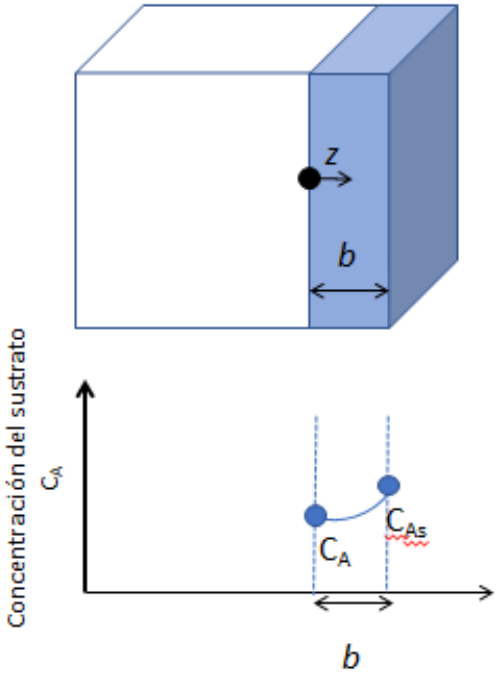


Figura 5.2 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa interna.
Fuente: Doran (2013)

Los efectos de transferencia de masa interna se expresan de acuerdo a la Ecuación 5.10.

$$\eta_{im} = \frac{r_{A,obs}}{r_{AS}^{*}} = \frac{Velocidad\ observada}{Velocidad\ que\ ocurriría\ si\ C_A = C_{AS}} \qquad (5.10)$$

En ausencia de efectos de transferencia de masa interna, $r_{A,obs} = r_{AS}^{*}$ y η_{im}=1. Cuando existen efectos de transferencia de masa interna $r_{A,obs}$ se reduce y η_{im}<1. Las limitaciones por transferencia de masa en catalizadores inmovilizados pueden ser expresadas por las siguientes propiedades del sistema (Kasche, 1983):

- Damkoholer o módulo de Thiele: Números adimensionales que son relaciones entre la máxima velocidad de conversión de sustrato y la máxima velocidad de

trasferencia de sustrato como función de la partícula y la velocidad relativa de la partícula en el solvente.

- Factores de efectividad: estacionarios y operacionales, los cuales están relacionados con el contenido del biocatalizador.

Una de las propiedades del sistema es el módulo de Thiele, el cual está representado por la Ecuación 5.11 para la geometría lamina plana.

$$\phi = b\frac{r_A|_{C_{As}}}{\sqrt{2}}\left(\int_{C_{As,eq}}^{C_{As}} D_{eff} r_A \, dC_A\right)^{-\frac{1}{2}} \qquad (5.11)$$

Donde:

ϕ: Módulo de Thiele (adimensional)

b: Espesor de la membrana y representa el tamaño del catalizador (m)

r_A: Velocidad de reacción (mol/L-h)

$r_A|_{C_{As}}$: Velocidad de reacción cuando $C_A = C_{As}$ (mol/L-h)

C_{As}: Concentración de sustrato en la superficie del catalizador (mol/m^3)

$C_{As,eq}$: Concentración de sustrato en equilibrio (mol/L). Según Doran (2013), cuando las reacciones enzimáticas son irreversibles $C_{As,eq}$ es cero. Lo cual sucede para la mayoría de las aplicaciones biológicas.

D_{eff}: Difusividad efectiva del sustrato (m^2/s)

Las velocidades de reacción también podrían ser afectadas por los efectos de la transferencia de masa externa, la cual indica que existe una capa límite que genera un cambio de las concentraciones en el seno del líquido (C_{Ab}) hasta la superficie de la membrana (C_{AS}), como se presenta en la Figura 5.3.

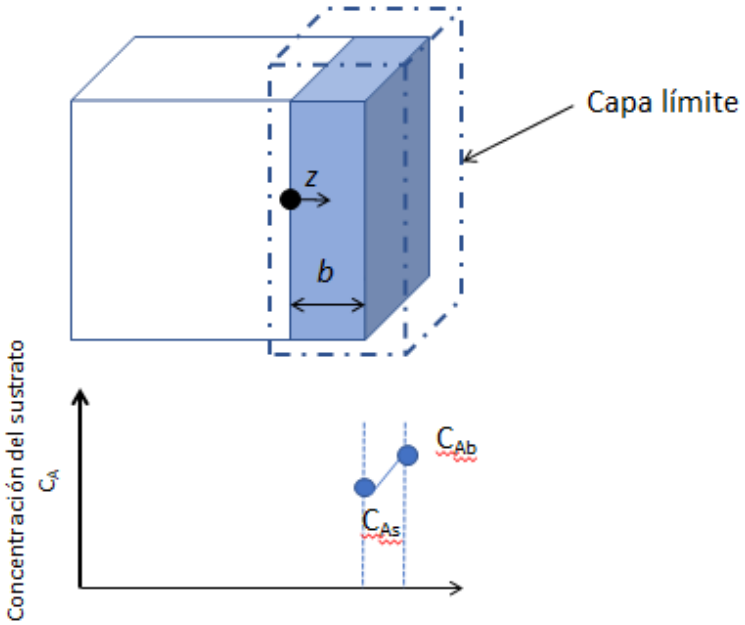


Figura 5.3 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita con efectos de transferencia de masa externa.
Fuente: Doran (2013)

Los efectos de transferencia de masa externa se expresan de acuerdo a la Ecuación 5.12

$$\eta_{em} = \frac{r_{AS}^*}{r_{Ab}^*} = \frac{Velocidad\ que\ ocurriría\ si\ C_A = C_{AS}}{Velocidad\ que\ ocurriría\ si\ C_A = C_{Ab}} \qquad (5.12)$$

En ausencia de efectos de transferencia de masa externa, r_{AS}^* = r_{Ab}^* y η_e≈1. Cuando existen efectos de transferencia de masa externa r_{AS}^* se reduce y η_e<1. Para el caso de la transferencia de masa externa es necesario calcular de nuevo las dos propiedades del sistema, el módulo observable (Ω) y el factor de efectividad externo (η_{em}). Debido a que las concentraciones en la superficie de la membrana (C_{As}) no son técnicamente medibles, Doran (2013) presenta una expresión llamada el Módulo observable para transferencia externa de materia (Ω) que calcula dichos efectos, mediante la correlación de la concentración del sustrato en el seno del fluido, el coeficiente de transferencia de masa, la velocidad de reacción observada y la geometría (Ecuación 5.13):

$$\Omega = b\frac{r_{A,obs}}{k_s C_{Ab}} = b\frac{\eta_{im} * r_{As}^*}{k_s C_{Ab}} \qquad (5.13)$$

Donde:

b: Espesor de la lámina plana (membrana) (m)

$r_{A,obs}$: Velocidad observada de reacción (mol/L h)

k_s: Coeficiente de transferencia de masa externo (m/s)

C_{Ab}: Concentración del sustrato en el seno del fluido (mol/L).

r_{AS}^*: Velocidad observada de reacción sin efectos de transferencia de masa (mol/L-h)

El presente capítulo muestra paso a paso el desarrollo de un modelo heterogéneo para los procesos catalíticos realizados en membranas y validado con los datos experimentales de la etapa de sacarificación de la hidrólisis enzimática de almidón y su aplicación en un residuo agroindustrial. Este modelo permitiría conocer la velocidad de reacción de las enzimas inmovilizadas en la membrana a partir de los efectos de transferencia de masa interna y externa junto con la velocidad de reacción de las enzimas libres.

Se plantearon las ecuaciones respectivas para identificar el efecto de la transferencia de masa de las enzimas inmovilizadas específicamente con las ecuaciones del modelo planteado en el Capítulo 3 que presenta la formación de oligosacáridos para la hidrólisis enzimática del almidón incluyendo los efectos de pH, temperatura y desactivación enzimática. Cabe resaltar que hasta la fecha no se han reportado estudios en los cuales evalúen la velocidad de reacción de las enzimas inmovilizadas en las membranas con base en la modelación completa de la producción de oligosacáridos para la hidrólisis enzimática de materiales amiláceos en el proceso ISPR.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos materias primas: almidón de trigo puro y un residuo agroindustrial, con 95% y 56% de contendido de almidón, respectivamente. Los procesos que se llevaron a cabo para la producción de jarabes de glucosa fueron gelatinización, licuefacción y sacarificación. Se utilizaron las enzimas Spezyme® Fred de *Bacillus licheniformis* para licuefacción y la enzima Optidex® L-400 de *Aspergillus niger* para sacarificación, con una actividad enzimática específica de 2389 U/g y 3064,46AUG/g, respectivamente. Los protocolos utilizados se presentan en el Anexo 1 y 2.

Este capítulo está descrito en 2 etapas: *i)* Desarrollo del modelo heterogéneo de hidrólisis enzimática en membranas y *ii)* Validación experimental del modelo con almidón y residuo agroindustrial. La etapa *i)* consta de la evaluación de los efectos de transferencia de masa interna y externa, la cual se puede aplicar a las enzimas inmovilizadas en membranas para producción de glucosa a partir de almidón. Se realizó una cinética por triplicado durante 6 horas en modo discontinuo sin membrana para obtener los parámetros del modelo presentados en el Capítulo 3 y aplicar los efectos de transferencia de masa. Los ensayos fueron realizados en un reactor de 1,5L con 10% de sólidos y buffer fumárico a 0,1M.

Las condiciones de los procesos fueron las obtenidas a partir del estudio de máxima producción de glucosa presentadas en los Capítulos 2 y 4. Estas condiciones se muestran en las Tablas 5.1 y 5.2 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente.

Tabla 5.1 Condiciones de los procesos de producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir de almidón de trigo puro

Condiciones	**Gelatinización**	**Licuefacción**	**Sacarificación**
Temperatura (°C)	95	74,1	61,5
Agitación (rpm)	150	150	150
pH (unidades)	5,8	5,8	4,8
Tiempo (hora)	0,5	1	6
Relación E/S (%)	---	0,028	0,636
Concentración de calcio (ppm)	18	18	18

Durante las cinéticas se verificó que el pH se mantuviera constante

Tabla 5.2 Condiciones de los procesos de producción de jarabes de glucosa mediante la recuperación del producto in situ con membranas a partir del residuo agroindustrial

Condiciones	**Gelatinización**	**Licuefacción**	**Sacarificación**
Temperatura (°C)	95	72,8	61,5
Agitación (rpm)	150	150	150
pH (unidades)	5,8	5,8	4,8
Tiempo (hora)	0,5	1	6
Relación E/S (%)	---	0,05	0,540
Concentración de calcio (ppm)	18	18	18

Durante las cinéticas se verificó que el pH se mantuviera constante

Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a temperatura ambiente para la medición de azúcares en el sobrenadante y se desactivó la enzima en baño maría 95°C durante 5 minutos para posteriormente congelarse. La concentración de azúcares se determinó por HPLC utilizando la columna SUPELCOGEL™ C-610H a 30°C con un flux de 0,5mL/min, ácido fosfórico al 0,1% como fase móvil y 20ul de muestra con detector RID.

La etapa *ii)* consta de la validación experimental del modelo en el cual se realizó una cinética por triplicado a las mismas condiciones de temperatura, pH, agitación y tiempo para las dos materias primas. Esta segunda cinética se realizó en modo de diafiltración discontinuo con el uso de membranas, para validar el efecto de las enzimas inmovilizadas y libres en el proceso ISPR.

5.2.1 Desarrollo del modelo heterogéneo de hidrólisis enzimática en membranas

Como se demostró en el Capítulo 4, las enzimas se encuentran adsorbidas en la membrana por atrapamiento dentro de los poros y es necesario identificar el efecto de transferencia de masa. Existen dos tipos de geometrías que se pueden asumir para la forma del catalizador inmovilizado: esferas o láminas planas. Teniendo en cuenta que la configuración de la membrana es cilíndrica por ser fibras huecas, el tipo de geometría seleccionada para el catalizador es lamina plana, ya que las dimensiones relativas del sistema pueden ser tratadas como difusión a través de esta según Moo-Young & Kobayashi (1972) y Du Preez et al. (2015). Además, Lin (2016) comparó las ecuaciones de transferencia de masa disponibles en la literatura para módulos de membranas de fibra hueca y lámina plana, concluyendo que ambos modelos obtuvieron casi exactamente los mismos valores de las propiedades de la membrana activa y por lo tanto, las ecuaciones de transferencia de masa para una lámina plana pueden ser usadas para membranas de fibras huecas.

Transferencia de masa interna

De acuerdo con el Capítulo 3, las Ecuaciones 5.14 a 5.17 representan la velocidad de reacción para la producción de oligosacáridos sin efectos de transferencia de masa.

$$r_5 = \frac{\dfrac{V_{max,5}\, C_5\, E}{K_{m,5}\left[1 + \dfrac{C_1}{K_I} + \dfrac{1}{K_s} + \dfrac{C_2}{K_{m,2}} + \dfrac{C_3}{K_{m,3}} + \dfrac{C_5}{K_{m,5}}\right]}}{1 + \dfrac{H^+}{K_{EH}} + \dfrac{K_w}{K_{EOH}} \cdot \dfrac{1}{H^+}} \qquad (5.14)$$

$$r_3 = \frac{\dfrac{V_{max,3}\left[C_3 - \left(\dfrac{C_1 C_2}{K_{eq3}}\right)\right] E}{K_{m,3}\left[1 + \dfrac{C_1}{K_I} + \dfrac{C_2}{K_{m,2}} + \dfrac{C_3}{K_{m,3}} + \dfrac{C_5}{K_{m,5}}\right]}}{1 + \dfrac{H^+}{K_{EH}} + \dfrac{K_w}{K_{EOH}} \cdot \dfrac{1}{H^+}} \qquad (5.15)$$

$$r_2 = \frac{\dfrac{V_{max,2}\left[C_2 - \left(\dfrac{{C_1}^2}{K_{eq2}}\right)\right] E}{K_{m,2}\left[1 + \dfrac{C_1}{K_I} + \dfrac{C_2}{K_{m,2}} + \dfrac{C_3}{K_{m,3}} + \dfrac{C_5}{K_{m,5}}\right]}}{1 + \dfrac{H^+}{K_{EH}} + \dfrac{K_w}{K_{EOH}} \cdot \dfrac{1}{H^+}} \qquad (5.16)$$

$$E = E_0 \exp(-k_d t) \qquad (5.17)$$

Donde:

r_n: Velocidad de hidrólisis

n: Indica el grado de polimerización del oligosacárido (GP). 1 corresponde a glucosa, 2 a maltosa, 3 a maltotriosa, 5 a maltopentosa que agrupa los azúcares de grado de polimerización mayor a 3.

C_n: Concentración del oligosacárido con GP=n

$K_{m,n}$: Constante de Michaelis-Menten

K_I y K_s: Constantes de inhibición por glucosa y sustrato, respectivamente

$V_{max,n}$: Velocidad máxima de producción del producto

E: Concentración de enzima

$K_{eq,n}$: Constante de equilibrio

H^+: Concentración de iones hidrógeno

K_w: Constante de la disociación del agua

E_0: Concentración inicial de enzima

k_d: Constante de desactivación enzimática

t: Tiempo

Los parámetros K_{EH} y K_{EOH} se asumieron fijos como $2{,}707086 \times 10^{-4}$ y $4{,}288763 \times 10^{8}$, respectivamente. Estos parámetros se obtuvieron de Tijskens et al. (2001) estimados para temperaturas de 60°C. Para obtener los efectos de transferencia de masa, la respectiva concentración de enzimas son las que se encuentran inmovilizadas en la membrana, teniendo en cuenta que las enzimas inmovilizadas son normalmente menos activas que la enzima libre, manteniendo un porcentaje de actividad retenida generalmente entre del 5 al 80%. Para este modelo se asumió que las enzimas inmovilizadas en la membrana mantienen su actividad en un 80% (Mateo et al. 2007; Rodrigues et al. 2013; Bolivar, Eisl & Nidetzky, 2016).

Resolviendo la integral de la Ecuación 5.11 que representa el módulo de Thiele para la geometría lámina plana y siguiendo las velocidades de reacción para la producción de oligosacáridos sin efectos de transferencia de masa (Ecuaciones 5.14 a 5.17), se obtienen las Ecuaciones 5.18 a 5.33.

$$\phi_{m,n} = \frac{b}{\sqrt{2 v_{max,n} D_{eff,n}}} r_n \left[\frac{E}{1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}} \cdot \frac{1}{H^+}} + \gamma_n \right]^{-1/2} \qquad (5.18)$$

Para n=2, 3, 5

$$\gamma_2 = \frac{\beta_1 C_1^2 + k_{eq,2}(\beta_2 C_1 + \beta_3 C_5 + \beta_4 C_3 + \beta_5)}{K_I k_{eq,2} K_{m,3} K_{m,5} \left(1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}} \frac{1}{H^+}\right)} ln\left(\frac{\omega_1 + \omega_2 C_5 + \omega_3 C_3 + \omega_5 C_1}{\omega_1 + \omega_2 C_5 + \omega_3 C_3 + \omega_4 C_2 + \omega_5 C_1}\right) \qquad (5.19)$$

$$\gamma_3 = \frac{\beta_6 C_1 C_2 + k_{eq,3}(\beta_7 C_2 + \beta_3 C_5 + \beta_2 C_1 + \beta_5)}{K_I k_{eq,3} K_{m,2} K_{m,5}\left(1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}}\frac{1}{H^+}\right)} ln\left(\frac{\alpha_1 + \alpha_2 C_5 + \alpha_4 C_2 + \alpha_1 C_1}{\alpha_1 + \alpha_2 C_5 + \alpha_3 C_3 + \alpha_4 C_2 + \alpha_5 C_1}\right) \quad (5.20)$$

$$\gamma_5 = \frac{\beta_5(1 + K_s) + K_s(\beta_7 C_2 + \beta_4 C_3 + \beta_2 C_1)}{K_I K_{m,2} K_{m,3} K_s\left(1 + \frac{H^+}{K_{EH}} + \frac{K_w}{K_{EOH}}\frac{1}{H^+}\right)} ln\left(\frac{\alpha_1(1 + K_s) + K_s(\alpha_3 C_3 + \alpha_4 C_2 + \alpha_5 C_1)}{\alpha_1(1 + K_s) + K_s(\alpha_2 C_5 + \alpha_3 C_3 + \alpha_4 C_2 + \alpha_5 C_1)}\right) \quad (5.21)$$

$$\alpha_1 = K_I K_{m,2} K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.22)$$

$$\alpha_2 = K_I K_{m,2} K_{m,3} \quad (5.23)$$

$$\alpha_3 = K_I K_{m,2} K_{m,5} \quad (5.24)$$

$$\alpha_4 = K_I K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.25)$$

$$\alpha_5 = K_{m,2} K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.26)$$

$$\beta_1 = E K_I K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.27)$$

$$\beta_2 = E K_{m,2} K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.28)$$

$$\beta_3 = E K_I K_{m,2} K_{m,3} \quad (5.29)$$

$$\beta_4 = E K_I K_{m,2} K_{m,5} \quad (5.30)$$

$$\beta_5 = E K_I K_{m,2} K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.31)$$

$$\beta_6 = E K_I K_{m,2} K_{m,5} \quad (5.32)$$

$$\beta_7 = E K_I K_{m,3} K_{m,5} \quad (5.33)$$

Donde:

$\phi_{m,n}$: Módulo de Thiele de Michaelis Menten para cada oligosacárido (adimensional)

Debido a que la difusión molecular está basada en la Ley de Fick, la difusividad efectiva D_{eff} está representada por la Ecuación 5.34 (Seader, 2006):

$$D_{eff} = \frac{\mathcal{D}_{AB}^{o}\,\epsilon}{\tau} \qquad (5.34)$$

Donde:

$\mathcal{D}_{AB}^{o}$: Coeficiente de difusividad de A en una solución muy diluida en el solvente B (m^2/s)

ϵ: Porosidad fraccional del sólido (adimensional) (Ecuación 5.35).

τ: Tortuosidad de los poros (adimensional) (Ecuación 5.36).

$$\epsilon = \frac{volumen\ de\ espacio\ hueco}{volumen\ total\ (huecos\ y\ sólidos)} \qquad (5.35)$$

$$\tau = \frac{distancia\ real\ que\ una\ molécula\ viaja\ entre\ dos\ puntos}{distancia\ más\ corta\ entre\ estos\ dos\ puntos} \qquad (5.36)$$

Una de las correlaciones de difusividad para soluciones acuosas binarias, es decir maltosa-agua, maltotriosa-agua y maltopentosa-agua, es la de Hayduk & Minhas (Ecuación 5.37 y 5.38) que sirve para predecir el coeficiente de difusión en líquidos no electrolitos en agua (Benitez, 2009) como es el caso de los productos de la hidrólisis enzimática. Para encontrar el coeficiente de difusividad $\mathcal{D}_{AB}^{o}$, la ecuación de Hayduk & Minhas considera que las especies involucradas en el proceso se encuentran muy diluidas en la solución, hasta 10% en peso de soluto (Alvarez, 2015), como se verificó con los datos de las cinéticas.

$$\mathcal{D}_{AB}^{o} = 1{,}25 * 10^{-8}\left(V_{bA}^{-0{,}19} - 0{,}292\right)T^{1{,}52}{\mu_B}^{\varepsilon} \qquad (5.37)$$

$$\varepsilon = \frac{9{,}58}{V_{bA}} - 1{,}12 \qquad (5.38)$$

Donde:

$\mathcal{D}_{AB}^{o}$: Difusividad de A en una solución muy diluida en el solvente B (cm^2/s)

V_{bA}: Volumen molar del soluto a su punto normal de ebullición (cm^3/mol)

T: Temperatura (°K)

μ_B: Viscosidad del solvente B (Centipoise-cP)

Continuando con los términos de la Ecuación 5.34, la porosidad es la fracción del volumen total de la membrana que son poros, para las membranas utilizadas en este estudio es en promedio 0,65. La tortuosidad refleja la longitud promedio del poro comparado con el grosor de la membrana, para la membrana utilizada en este estudio es en promedio de 0,916. Estos datos son propios de la membrana y fueron obtenidas por su fabricante.

La segunda propiedad del sistema es el factor de efectividad. Moo-Young & Kobayashi (1972) proponen la Ecuación 5.39 para el factor de efectividad en cinéticas de Michaelis Menten para geometrías de placa plana.

$$\eta_{im,n} = \frac{\eta_{i0,n} + \beta\eta_{i1,n}}{1 + \beta} \qquad (5.39)$$

Utilizando la demostración de Moo-Young & Kobayashi (1972) y las Ecuaciones 5.14 a 5.17 que representan la velocidad de reacción, se obtienen que:

$$\eta_{i0,n} = 1 \quad si \quad 0 < \phi_{m,n} \leq 1 \qquad (5.40)$$

$$\eta_{i0,n} = \frac{1}{\phi_{m,n}} \quad si\ \phi_{m,n} > 1 \qquad (5.41)$$

$$\beta = \alpha_1(1 + \omega_n\alpha_2) \qquad (5.42)$$

$$\alpha_1 = \frac{K_{m,n}}{C_{AS,n}} \qquad (5.43)$$

$$\omega_2 = K_{m,3}K_{m,5}C_1 + K_I K_{m,5}C_3 + K_I K_{m,3}C_5 \qquad (5.44)$$

$$\omega_3 = K_{m,2}K_{m,5}C_1 + K_I K_{m,5}C_2 + K_I K_{m,2}C_5 \qquad (5.45)$$

$$\omega_5 = K_s K_{m,2}K_{m,3}C_1 + K_I K_{m,2}K_{m,3} + K_I K_s K_{m,3}C_2 + K_I K_s K_{m,2}C_3 \quad (5.46)$$

$$\alpha_2 = \frac{C_{AS,n}}{q_n} \qquad (5.47)$$

$$q_2 = K_I K_{m,3}K_{m,5} \qquad (5.48)$$

$$q_3 = K_I K_{m,2}K_{m,5} \qquad (5.49)$$

$$q_5 = K_I K_s K_{m,2}K_{m,3} \qquad (5.50)$$

$$\eta_{i1} = \frac{\tanh(\phi_{m,n})}{\phi_{m,n}} \qquad (5.51)$$

Donde:

η_{im}: Factor de efectividad interna de Michaelis-Menten (adimensional)

$\phi_{m,n}$: Módulo de Thiele de Michaelis-Menten (adimensional)

Teniendo las dos propiedades del sistema, el factor de efectividad (η_{im}) que incluye el módulo de Thiele (ϕ_m), se puede identificar si existen o no efectos de transferencia de masa interna. Si el factor de efectividad interno $\eta_{im} \approx 1$ los efectos de transferencia de masa interna son despreciables. Mientras que si, η_{im} es significativamente <1 sí existen limitaciones debidas a la transferencia de masa interna (Moo-Young & Kobayashi, 1972; Doran, 2013).

Transferencia de masa externa

Para poder calcular el módulo observable (Ω) de la Ecuación 5.13 es necesario obtener el coeficiente transferencia de masa externo (k_s), el cual se calculó a partir del número de Sherwood (Sh) utilizado para membranas en operación tangencial presentado por Trusek-Holownia & Noworyta (2004) y Wickramasinghe et al (1992) (Ecuaciones 5.52 a 5.55).

$$Sh = \frac{k_s d_H}{\mathcal{D}_{AB}^o} \qquad (5.52)$$

$$Gr = \frac{b^2 Q_F}{\mathcal{D}_{AB}^o V_{mM}} \qquad (5.53)$$

$$Sh = 6.0Gr^{0.35} \qquad Gr > 11 \qquad (5.54)$$

$$Sh = 1.25Gr^{0.35} \qquad Gr < 11 \qquad (5.55)$$

Donde:

Sh: Número de Sherwood (adimensional)

d_H: Diámetro hidráulico (m)

$\mathcal{D}_{AB}^o$: Difusividad de A en una solución muy diluida en el solvente B (cm^2/s)

Gr: Número de Graetzs (adimensional)

b: Espesor de la lámina plana (cm)

Q_F: Caudal del flux. Considerado como el flux (cm^3/s) en la membrana y que varía para cada instante de tiempo i.

V_{mM}: Volumen del módulo de la membrana (cm^3)

Despejando k_s de la Ecuación 5.52 y utilizando el valor Sh de las Ecuaciones 5.54 y 5.55, se obtiene la siguiente Ecuación:

$$k_s = \frac{\mathcal{D}_{AB}^{o}\, Sh}{d_H} \qquad (5.56)$$

El diámetro hidráulico de la membrana d_H (Ecuación 5.57) fue tomado de Seader (2006).

$$d_H = 4\left(\frac{\epsilon}{A_p/V_M}\right) \qquad (5.57)$$

Donde:

ϵ: Porosidad que corresponde al volumen disponible para el flux (adimensional)

A_p: Área superficial de poro total tomada como el área de filtración de la membrana (m^2)

V_M: Volumen de la membrana (m^3)

Debido a que hay enzimas en el fluido antes de ingresar a la membrana, la concentración de sustrato en el seno del fluido también está cambiando C_{Ab} como consecuencia de la catálisis enzimática. Es por eso que se calculó el Módulo observable para transferencia externa de masa (Ω) en el tiempo correlacionando su respectiva velocidad de reacción y concentración en el seno del fluido.

Para el caso donde los efectos de transferencia de masa externa son importantes, es necesario calcular el factor de efectividad externo η_{em} (Doran, 2013).

$$\eta_{em} = \frac{r_{As}^{*}}{r_{Ab}^{*}} \qquad (5.58)$$

$$\eta_{em} = \frac{Velocidad\ de\ reacción\ si\ C_A\ =\ C_{As}\ en\ todas\ partes\ de\ la\ partícula}{Velocidad\ de\ reacción\ si\ C_A\ =\ C_{Ab}\ en\ todas\ partes\ de\ la\ partícula} \qquad (5.59)$$

Al utilizar la Ecuación 5.58 y las ecuaciones 5.14 a 5.17, se obtienen los coeficientes el factor de efectividad externo para la velocidad de reacción de cada oligosacárido.

$$n_{em5} = \frac{C_{5As}\ .\left[1 + \frac{C_{1Ab}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2Ab}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3Ab}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5Ab}}{K_{m,5}}\right]}{C_{5Ab}\ .\left[1 + \frac{C_{1As}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2As}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3As}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5As}}{K_{m,5}}\right]} \qquad (5.60)$$

$$n_{em3} = \frac{\left[C_{3As} - \left(\frac{C_{1As}C_{2As}}{K_{eq3}}\right)\right].\left[1 + \frac{C_{1Ab}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2Ab}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3Ab}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5Ab}}{K_{m,5}}\right]}{\left[C_{3Ab} - \left(\frac{C_{1Ab}C_{2Ab}}{K_{eq3}}\right)\right].\left[1 + \frac{C_{1As}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2As}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3As}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5As}}{K_{m,5}}\right]} \qquad (5.61)$$

$$n_{em2} = \frac{\left[C_{2As} - \left(\frac{C_{1As}^2}{K_{eq2}}\right)\right].\left[1 + \frac{C_{1Ab}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2Ab}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3Ab}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5Ab}}{K_{m,5}}\right]}{\left[C_{2Ab} - \left(\frac{C_{1Ab}^2}{K_{eq2}}\right)\right].\left[1 + \frac{C_{1As}}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \frac{C_{2As}}{K_{m,2}} + \frac{C_{3As}}{K_{m,3}} + \frac{C_{5As}}{K_{m,5}}\right]} \quad (5.62)$$

Debido a que las concentraciones en la superficie de la membrana (C_{nAs}) no son técnicamente medibles, se pueden estimar teniendo en cuenta:

$$\frac{C_{nAs}}{C_{nAb}} = |1 - b\frac{r_{A,obs}}{k_s C_{Ab}}| = |1 - \Omega_n| \qquad (5.63)$$

Despejando C_{As}

$$C_{nAs} = C_{nAb}|(1 - \Omega_n)| \qquad (5.64)$$

Como las ecuaciones de velocidad de reacción están dadas para r_5, r_3 y r_2 y la producción de glucosa se genera a partir de todos los oligosacáridos (maltopentosas, maltotriosas y maltosas) como se observa en las ecuaciones 5.65 a 5.68, se asumirá que la concentración C_{1As} es igual a la concentración en el seno del líquido C_{1Ab}.

Maltopentosas

$$\frac{dC_5}{dt} = -r_5 \qquad (5.65)$$

Maltotriosa

$$\frac{dC_3}{dt} = r_5 - r_3 \qquad (5.66)$$

Maltosa

$$\frac{dC_2}{dt} = r_3 - r_2 \qquad (5.67)$$

Glucosa

$$\frac{dC_1}{dt} = 2r_5 + r_3 + 2r_2 \qquad (5.68)$$

Transferencia de masa total

Cuando los efectos de transferencia de masa interna y externa son importantes se puede definir un factor de efectividad total η_T así (Doran, 2013):

$$\eta_T = \left(\frac{r_{A,obs}}{r_{As}^*}\right)\left(\frac{r_{As}^*}{r_{Ab}^*}\right) = \eta_{im} * \eta_{em} \qquad (5.69)$$

Para el caso del modelo de sacarificación de materiales amiláceos planteado en el Capítulo 3, los factores de efectividad se aplicarían de la siguiente manera a las ecuaciones diferenciales que describen la transformación de los azúcares en el tiempo para las enzimas inmovilizadas:

$$\frac{dC_5}{dt} = -\eta_{T5}.r_5 \qquad (5.70)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \eta_{T5}.r_5 - \eta_{T3}.r_3 \qquad (5.71)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \eta_{T3}.r_3 - \eta_{T2}.r_2 \qquad (5.72)$$

$$\frac{dC}{dt} = 2\eta_{T5}.r_5 + \eta_{T3}.r_3 + 2\eta_{T2}.r_2 \qquad (5.73)$$

Donde:

η_{T5}, η_{T3}, η_{T2} y η_{T1}: Factores de efectividad total, incluyen efectos internos y externos de transferencia de masa.

$C, C_2, C_3\ y\ C_5$: Concentraciones de glucosa, maltosa, maltotriosas y maltopentosas (que agrupa los azúcares de grado de polimerización mayor a 3), respectivamente (mol/L)

$r_2, r_3\ y\ r_5$: Velocidades de reacción de hidrólisis de maltosa, maltotriosas y maltopentosas (que agrupa los azúcares de grado de polimerización mayor a 3), respectivamente (mol/L-h).

La producción de oligosacáridos es debida tanto a la hidrólisis enzimática con enzimas libres e inmovilizadas en la membrana, por lo tanto, las reacciones totales del sistema se presentan en las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_5}{dt} = -\eta_{T5}.r_5 - r_5 \qquad (5.74)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \eta_{T5}.r_5 - \eta_{T3}.r_3 + r_5 - r_3 \qquad (5.75)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \eta_{T3}.r_3 - \eta_{T2}.r_2 + r_3 - r_2 \qquad (5.76)$$

$$\frac{dC}{dt} = 2\eta_{T5}.r_5 + \eta_{T3}.r_3 + 2\eta_{T2}.r_2 + 2r_5 + r_3 + 2r_2 \qquad (5.77)$$

Las velocidades de reacción deben incluir la dosis de enzima adecuada, es decir que para las velocidades que incluyen los efectos de transferencia de masa se debe ingresar el valor de las enzimas que se encuentran inmovilizadas y para las velocidades que no incluyen efectos de transferencia de masa, se debe ingresar el valor de las enzimas libres. En este estudio se determinó el valor de las enzimas libres e inmovilizadas por medio de la identificación de parámetros del modelo.

5.2.2 Validación experimental del modelo con almidón y residuo agroindustrial

Se realizaron las cinéticas por triplicado de 6 horas para la validación del modelo con dos materias primas amiláceas: Almidón de trigo puro y residuo agroindustrial. Las condiciones de los procesos se presentaron en las Tablas 5.1 y 5.2.

Durante el proceso de sacarificación se llevó a cabo una pre-hidrólisis operando en modo discontinuo durante 30 minutos con el fin de disminuir la viscosidad del hidrolizado por la partición de las cadenas de oligosacáridos y evitar el rápido ensuciamiento de las membranas (Lopez-Ulibarri & Hall, 1997; Paolucci-Jeanjean et al. 2001; Malmali et al. 2015). Posterior a la pre-hidrólisis, se utilizaron 20 membranas PVDF de fibra hueca en un sistema sumergido, sellándoles la entrada de flux en la parte inferior con resina epóxica, con un área total superficial efectiva disponible de 38,01cm^2 y 30kDa de corte de peso molecular o MWCO por sus siglas en inglés (Molecular Weight Cut-Off).

Se utilizó una concentración de sólidos del 10% p/p, debido a que un porcentaje mayor no permitía permeado, en un volumen de 1,5L utilizando buffer fumárico a 0,1M. La presión fue constante de 10psi y se calculó el flux de permeado (Flux) mediante el registro del tiempo cada que se incrementaba 0,5g de masa usando una balanza electrónica. El reactor se operó en modo de diafiltración en discontinuo donde se mantuvo el volumen constante adicionando buffer fumárico 0,1M ajustado al pH del ensayo, de acuerdo al volumen de permeado. Se utilizó el modo de operación en diafiltración discontinuo, con el fin de observar el efecto de la membrana en la producción de jarabes de glucosa evitando ingresar al sistema almidón fresco y/o nuevas enzimas.

Para cada muestra se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se desactivó la enzima en baño maría 95°C durante 5 minutos para posteriormente congelarse. La concentración de oligosacáridos en el sobrenadante se determinó por HPLC utilizando la columna SUPELCOGEL^{TM} C-610H a 30°C con un flux de 0,5mL/min, ácido fosfórico al 0,1% como fase móvil y 20ul de muestra con detector RID.

Según Du Preez et al. (2015), este tipo de reactores se pueden considerar como un reactor de tanque agitado continuo cuando la relación entre el retenido y el permeado sea mayor que 100. Para este estudio, esta relación se presentó entre 0,5 a 31. Por lo tanto, el balance del sistema está representado por la producción o consumo de oligosacáridos en el reactor más la concentración de éstos, en la salida del permeado con su respectivo volumen de acuerdo al flux en el tiempo después del tiempo 0,5h.

La identificación de los parámetros para el ajuste del modelo con los datos experimentales se realizó en Matlab-Simulink® (2015a) mediante el uso del toolbox de simulink de identificación de parámetros. Al ingresar los datos experimentales de entrada y salida, y construir un bloque con las dinámicas del modelo, el toolbox utiliza diferentes métodos de identificación para calcular los parámetros con los cuales la respuesta del modelo se ajusta con menor error a los datos tomados experimentalmente.

Con el fin de verificar el ajuste de los datos experimentales con los resultados de la simulación, se encontraron los errores promedio para cada oligosacárido como se presenta en la Ecuación 5.78 (Morales Vélez, 2004).

$$Error_n(\%) = \frac{\dfrac{G_{n,experimental} - G_{n,simulación}}{G_{n,máxima\ experimental} - G_{n,mínima\ experimental}}}{número\ de\ datos\ experimentales} * 100 \qquad (5.78)$$

Donde:
n: Indica el grado de polimerización del oligosacárido (GP)

5.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.3.1 Desarrollo del modelo heterogéneo de hidrólisis enzimática en membranas

Cinética en modo discontinuo

El resultado del ajuste de la cinética del modelo en discontinuo para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial se presentan en la Figura 5.4 y 5.5, respectivamente. Los parámetros cinéticos ajustados se presentan en la Tabla 5.3. Los resultados de la cinética se presentan en el Anexo 15 y 16.

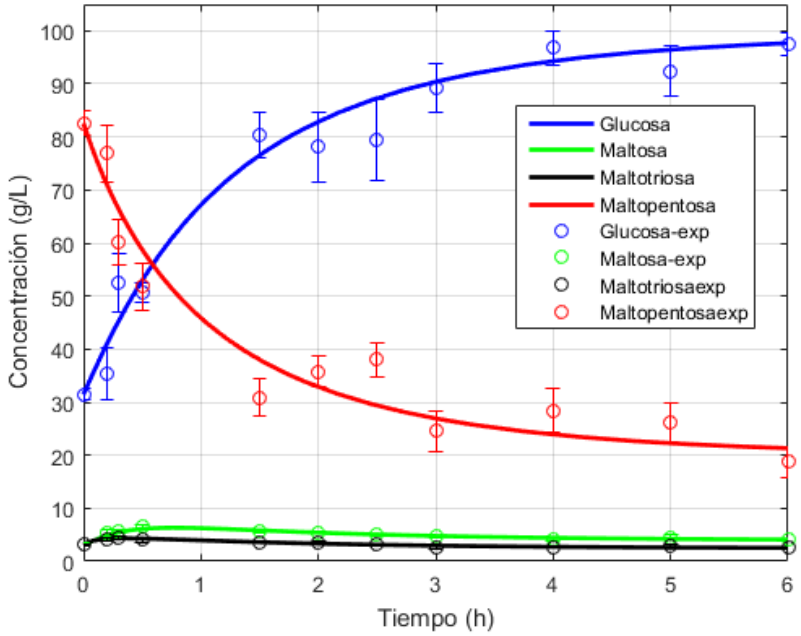


Figura 5.4 Cinética de hidrólisis enzimáticas en modo discontinuo para el almidón de trigo puro

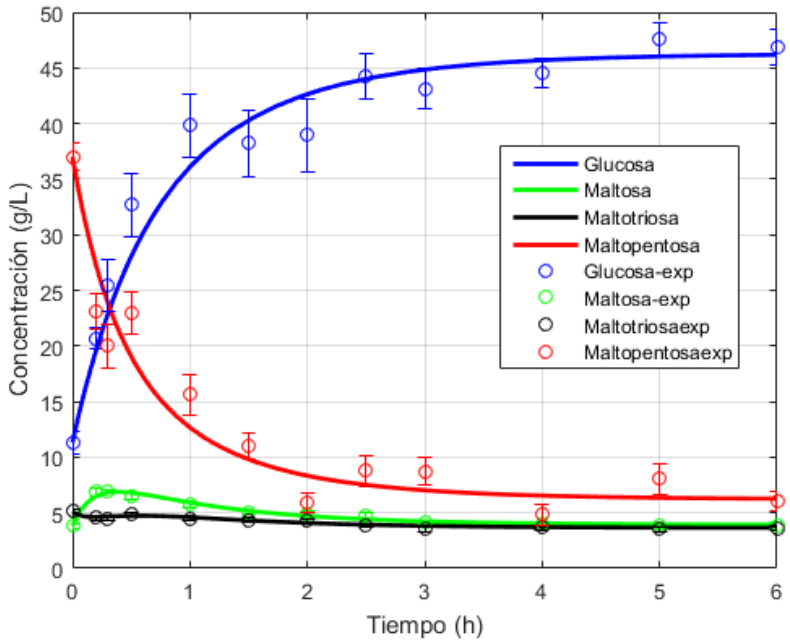


Figura 5.5 Cinética de hidrólisis enzimáticas en modo discontinuo para el residuo agroindustrial

Tabla 5.3 Parámetros ajustados del modelo de sacarificación homogéneo a los datos experimentales de hidrólisis con membranas

Parámetro	Unidades	Almidón de trigo puro	Residuo agroindustrial
K_s	mol/L	0,1499	0,1528
K_I	mol/L	0,0472	0,0385
K_d	h^{-1}	0,5136	0,8799
$V_{omax,2}$	mol/mL h	$6,7097*10^{31}$	$5,1676*10^{32}$
$V_{omax,3}$	mol/mL h	$3,4101*10^{33}$	$4,6183*10^{33}$
$V_{omax,4}$	mol/mL h	$4,8010*10^{31}$	$1,6753*10^{32}$
$K_{m,2}$	mol/L	0,0050	0,0150
$K_{m,3}$	mol/L	0,0553	0,1300
$K_{m,5}$	mol/L	0,0140	0,0130
$K_{eq,1}$	mol/L	0,054	0,054
$K_{eq,2}$	mol/L	200	200
$K_{eq,3}$	mol/L	2,8105	2,8105

Los errores del modelo de sacarificación en modo discontinuo comparado con los datos experimentales se presentan en la Tabla 5.4 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial.

Tabla 5.4 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Oligosacárido	Errores promedio para Almidón de trigo puro (%)	Errores promedio para Residuo agroindustrial (%)
Maltopentosa	7,3	7,1
Maltotriosa	6,2	6,7
Maltosa	6,0	6,0
Glucosa	5,4	5,8

Para el ajuste de parámetros de este modelo de sacarificación con 10% de sólidos, diferente pH y temperatura, se mantuvieron todos los parámetros fijos tal cual se obtuvieron con el modelo de sacarificación del Capítulo 3, identificando únicamente las velocidades iniciales con el programa de MATLAB. Aunque se presentó un cambio en los valores numéricos de las velocidades iniciales de los oligosacáridos respecto al modelo del Capítulo 3, los resultados indican el mismo comportamiento en el cual se promueve la formación de maltotriosas para la hirdólisis del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial. Estos datos obtenidos son muy similares a lo presentado por Morales et al. (2008).

Debido al buen ajuste obtenido corroborado con el porcentaje de error, este modelo adaptado que incluye la producción de oligosacáridos, efecto del pH y temperatura, desactivación enzimática y factores de inhibición de sustrato y glucosa para el proceso de sacarificación, es capaz de representar la hidrólisis enzimática con almidón de trigo puro y su aplicación con un residuo agroindustrial. Los parámetros ajustados del modelo para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, se utilizarán para los cálculos del efecto de transferencia de masa de las enzimas inmovilizadas en las membranas.

Transferencia de masa interna

Los coeficientes de difusividad y las difusividades efectivas para cada uno de los oligosacáridos que intervienen en la reacción se presentan en la Tabla 5.5. En el Anexo 17 se presentan las propiedades de los componentes de reacción.

Tabla 5.5 Coeficientes de difusividad y difusividad efectiva para los oligosacáridos del almidón de trigo puro y residuo agroindustrial

Oligosacárido	**Coeficientes de difusividad-** $\mathcal{D}_{AB}^{o}$ **(m²/s)**	**Difusividad efectiva-**D_{eff} **(m²/s)**
Maltosa-agua	$1{,}31262 * 10^{-9}$	$9{,}31443 * 10^{-10}$
Maltotriosa-agua	$8{,}16825 * 10^{-10}$	$5{,}79625 * 10^{-10}$
Maltopentosa-agua	$2{,}19148 * 10^{-10}$	$1{,}55509 * 10^{-10}$

La difusividad efectiva es normalmente menor que la correspondiente difusión molecular en agua, ya que los sólidos porosos ofrecen más resistencia a la difusión (Doran, 2013). Los resultados del módulo de Thiele (ϕ_m) y el factor de efectividad (η_{im}) se presentan en las Figuras 5.6 y 5.7 para el almidón de trigo puro y en las Figuras 5.8 y 5.9 para el residuo agroindustrial. El código de Matlab para la simulación del modelo heterogéneo se presenta en el Anexo 18.

El módulo de Thiele para los diferentes oligosacáridos a través del tiempo es mayor a tres y el factor de efectividad interno es menor a 0,3 y 0,8 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente. La diferencia entre el comportamiento de maltopentosas y maltotriosas entre el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial es debido a la constante de Michaelis-Menten para las maltotriosas (Km_3). Para el residuo agroindustrial, la Km_3 es mayor (0,13 mol/L) comparada con el almidón de trigo puro (0,0553 mol/L), indicando que la enzima presenta la menor afinidad con maltotriosas lo que afecta directamente la velocidad de producción r_3 y por ende se disminuye el módulo de Thiele. El factor de efectividad interno para ambas materias primas, muestra que la concentración de sustrato al atravesar la membrana con enzimas inmovilizadas es menor que la concentración en la superficie de esta, lo que implica que la transferencia de masa interna es lenta para suministrar el sustrato a la velocidad requerida (Doran, 2013).

Transferencia de masa externa

Los resultados del módulo observable de transferencia de masa externa (Ω) y el factor de efectividad externo del almidón de trigo puro se presentan en las Figuras 5.10 y 5.11. Para el residuo agroindustrial, los resultados del módulo observable de transferencia de masa externa y el factor de efectividad externo se presentan en las Figuras 5.12 y 5.13.

Los resultados obtenidos para ambas materias primas, evidencian que Ω inicia desde aproximadamente uno y comienza a disminuir, este resultado se puede analizar con el factor de efectividad externo durante el tiempo. En las primeras 4 horas, existe efectos de transferencia de masa externa, por lo tanto la concentración en el seno del fluido es mayor a la concentración en la capa límite, como se observa en la Figura 5.14.A Posteriormente, la concentración en la capa límite se incrementa respecto a la concentración en el seno del fluido (Figura 5.14.B) y la transferencia de masa externa es rápida para suministrar lo que demanda la reacción. En este caso, la velocidad observada estaría determinada más por el proceso de reacción que por la transferencia de masa (Doran, 2013).

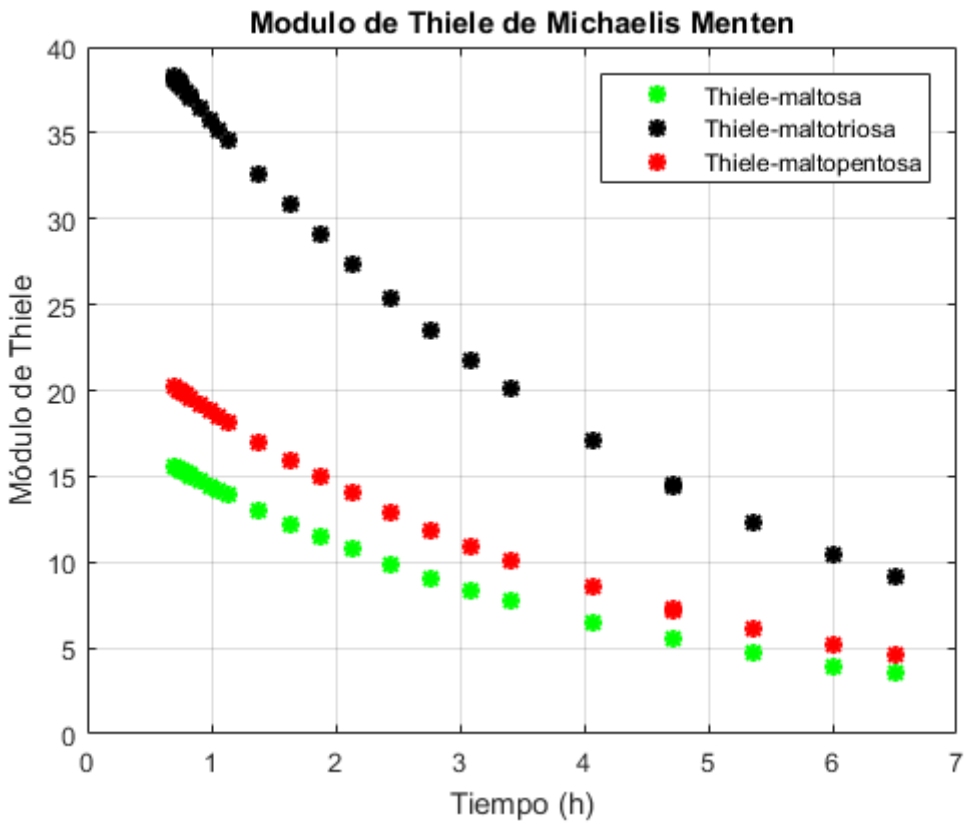


Figura 5.6 Módulo de Thiele (ϕm) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del almidón de trigo puro

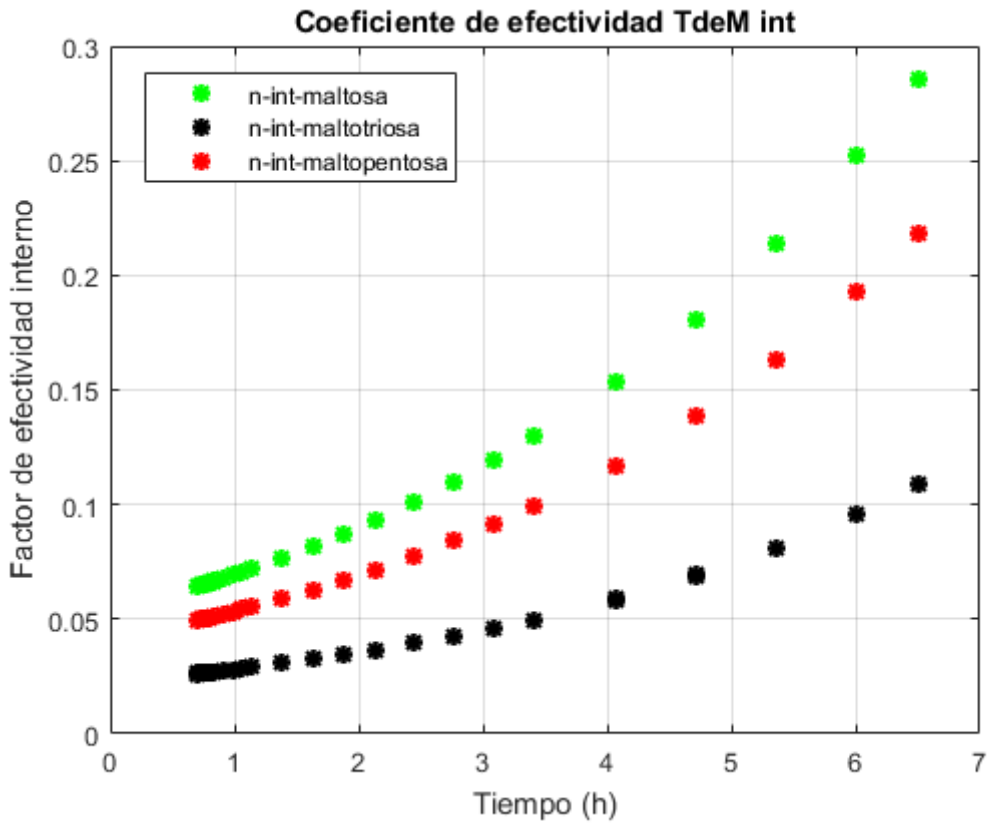


Figura 5.7 Factor de efectividad interna (ηim) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del almidón de trigo puro

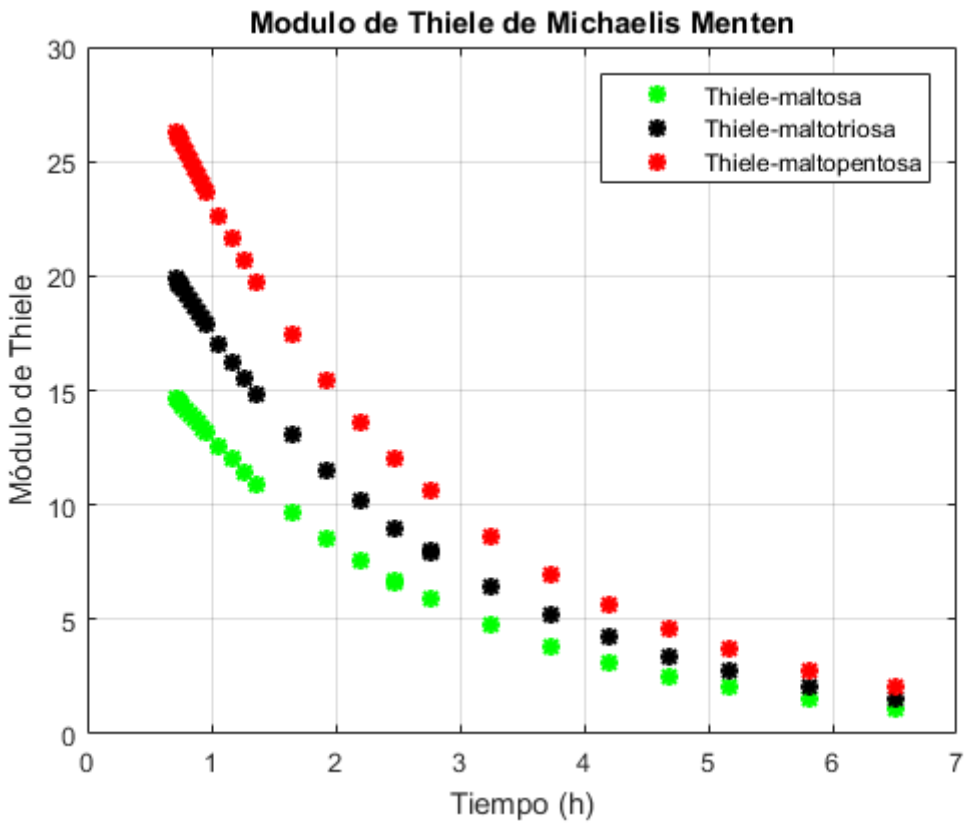


Figura 5.8 Módulo de Thiele (ϕm) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del residuo agroindustrial

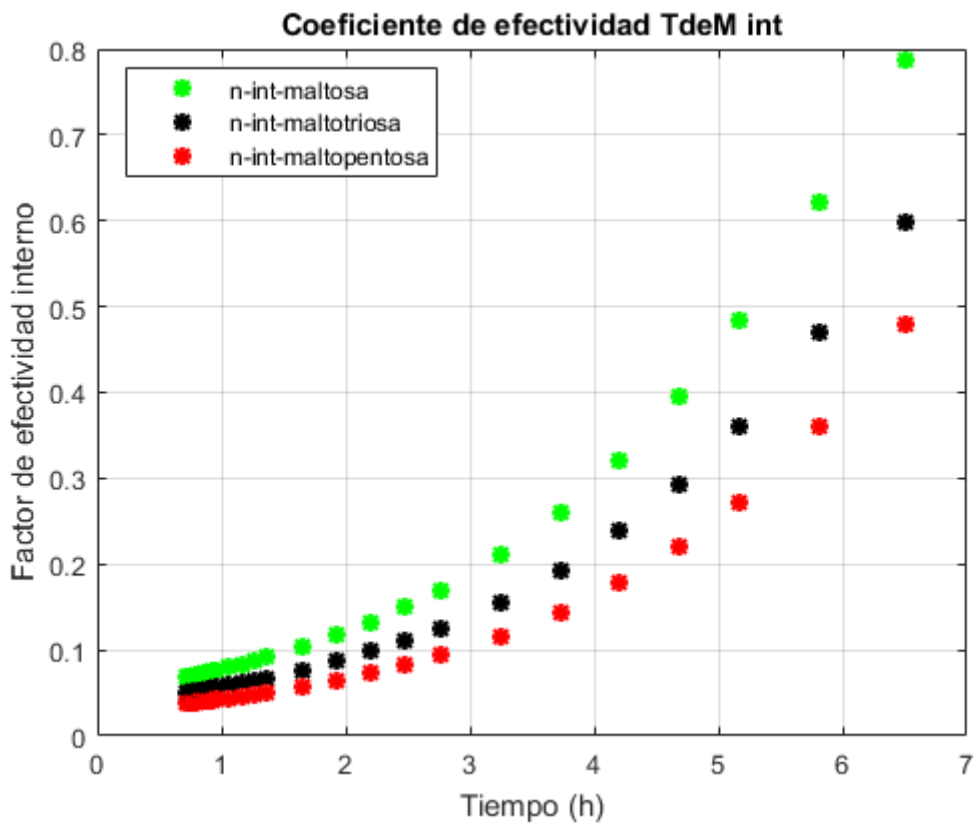


Figura 5.9 Factor de efectividad interna (ηim) para maltosa, maltotriosa y maltopentosa del residuo agroindustrial

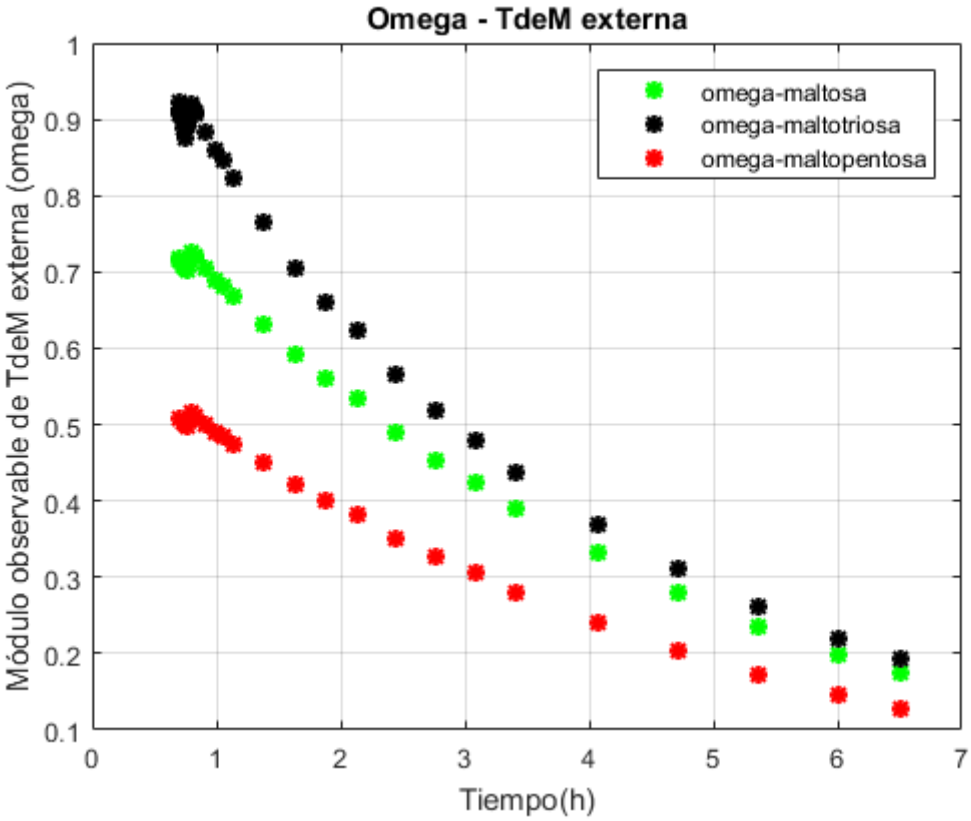


Figura 5.10 Módulo observable de transferencia de masa externa para el almidón de trigo puro

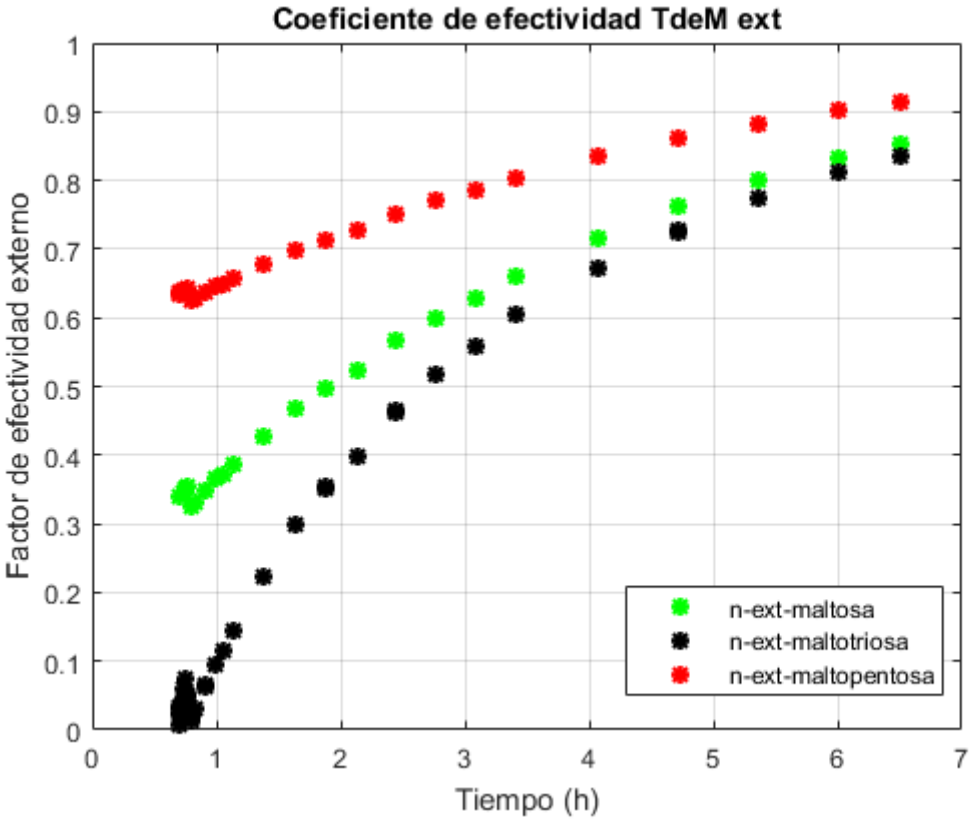


Figura 5.11 Factor de efectividad externo para el almidón de trigo puro

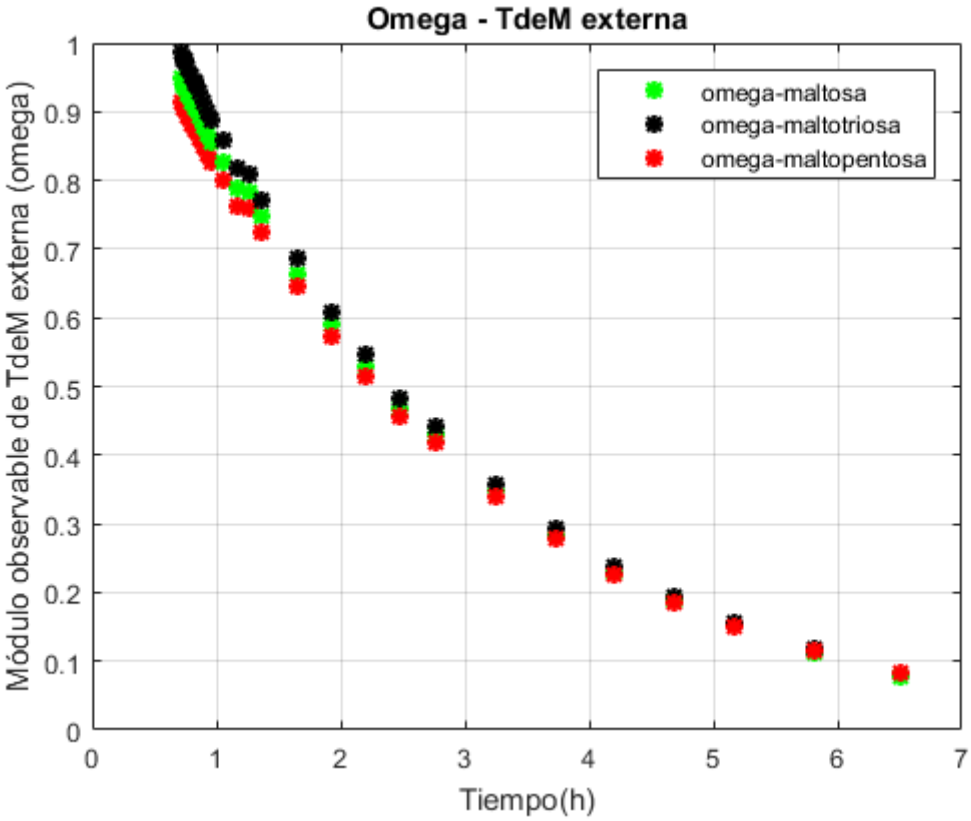


Figura 5.12 Módulo observable de transferencia de masa externa para el residuo agroindustrial

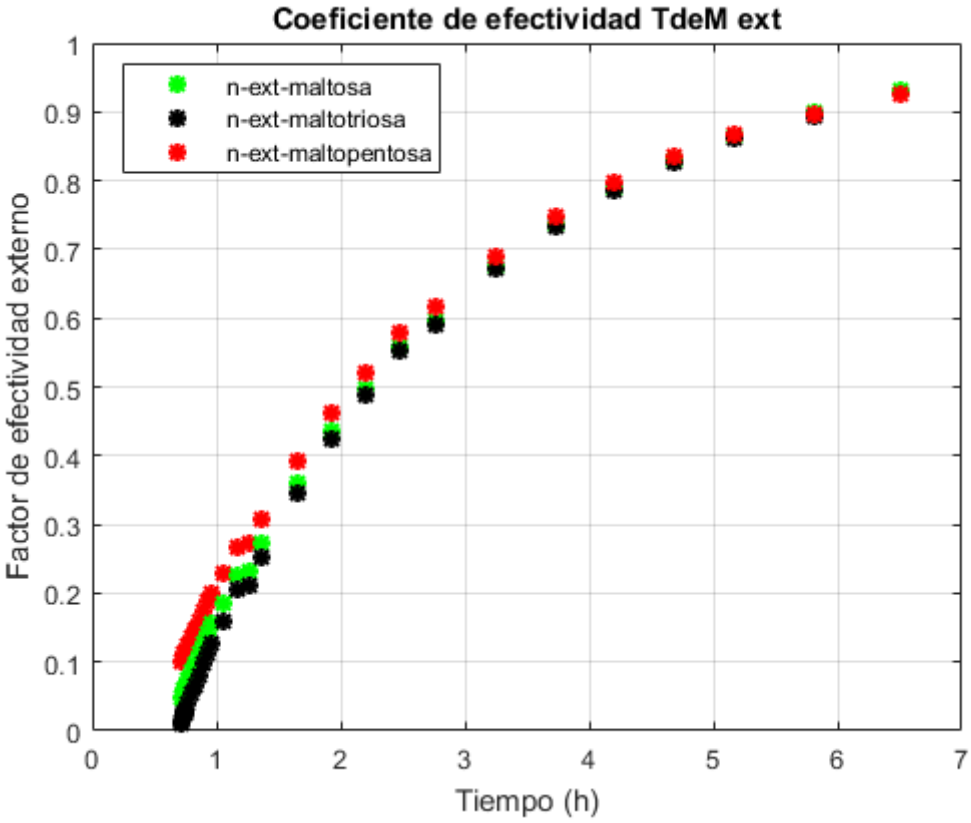


Figura 5.13 Factor de efectividad externo para el residuo agroindustrial

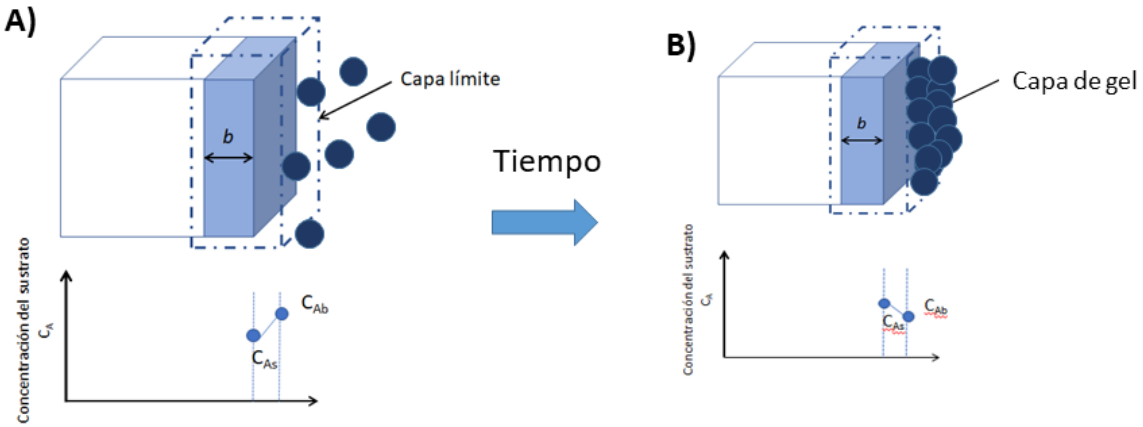


Figura 5.14 Perfil de concentración de sustrato en una lámina plana infinita para efectos de transf. De masa externa A) con efectos B)Sin efectos.

Debido a que la concentración en la superficie de la membrana es mayor a la del seno del fluido, se puede suponer que existe la formación de la capa de gel la cual se refleja en la disminución del flux en el tiempo (Raventós & Duarte, 2005), como se observa en la Figura 5.15 y 5.16. Esta capa de gel no interfiere en la reacción de acuerdo con el factor de efectividad externa, además de ser un ensuciamiento reversible que puede desaparecer espontáneamente cuando se deje de actuar la fuerza impulsora, siendo la presión aplicada o incluso con un lavado de agua (Shi et al. 2014).

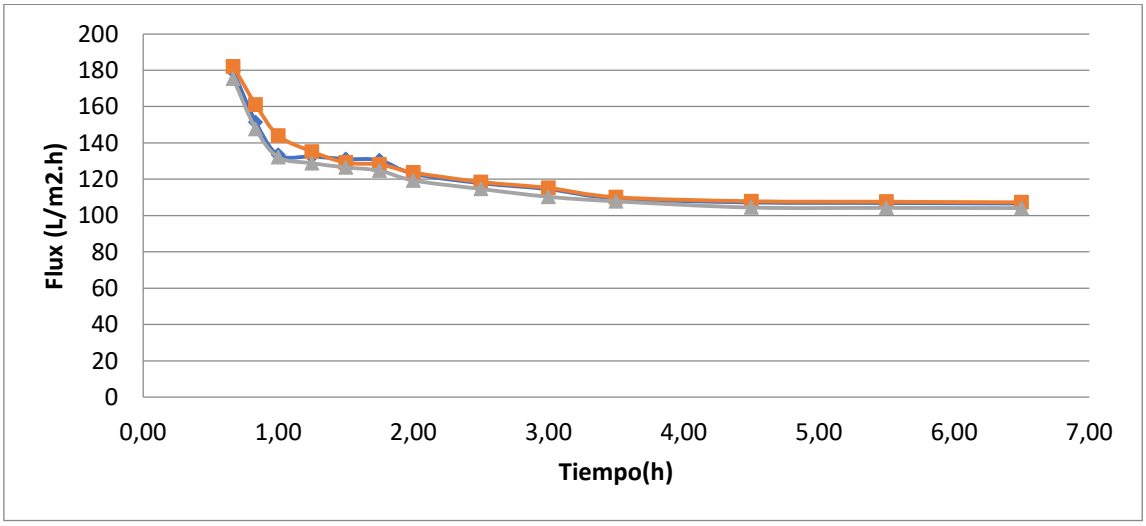


Figura 5.15 Comportamiento del flux durante la operación del ISPR con almidón de trigo puro

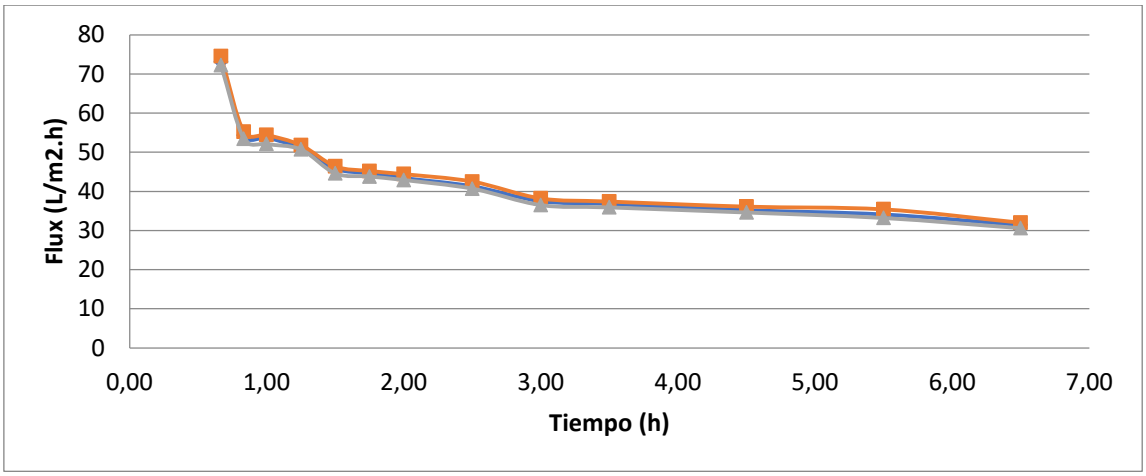


Figura 5.16 Comportamiento del flux durante la operación del ISPR con residuo agroindustrial.

5.3.2 Validación experimental del modelo con almidón y residuo agroindustrial

La Figura 5.17 y 5.18 representan las cinéticas de hidrólisis enzimática con efectos de trasferencia de materia para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial, respectivamente. Los resultados de la cinética se presentan en los Anexos 19 y 20.

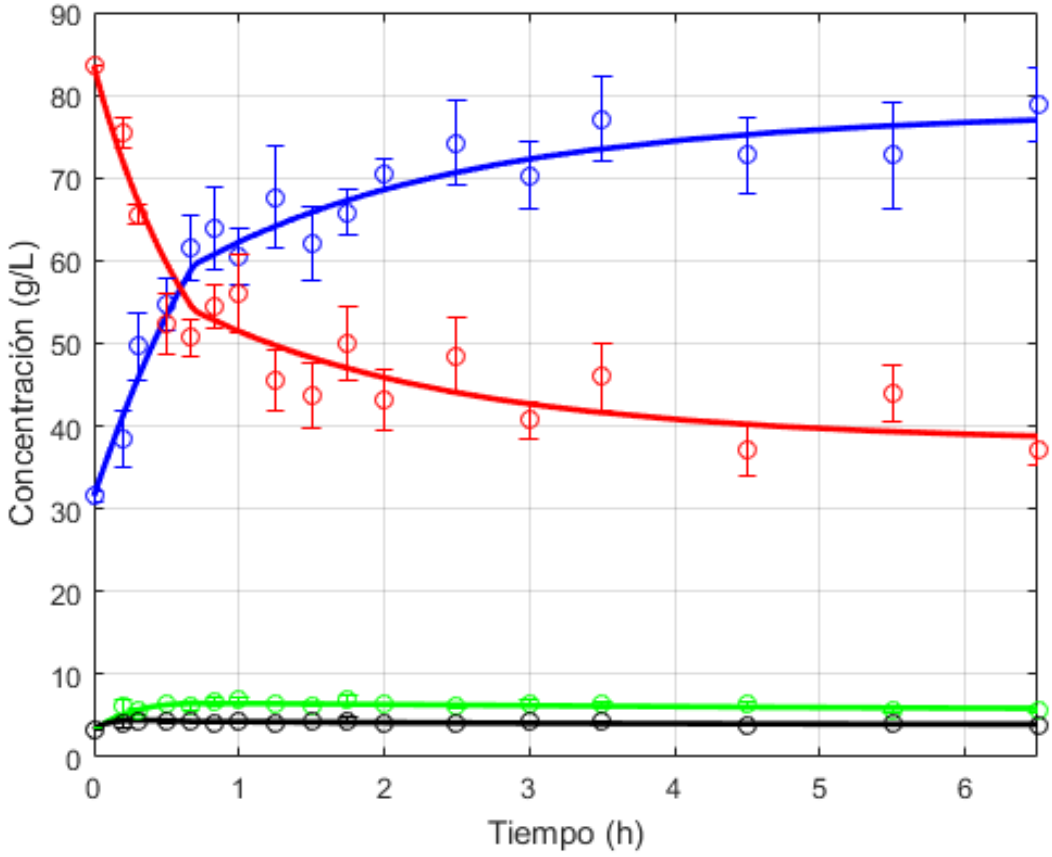


Figura 5.17 Cinética de hidrólisis enzimáticas con efectos de transferencia de masa para el almidón de trigo puro

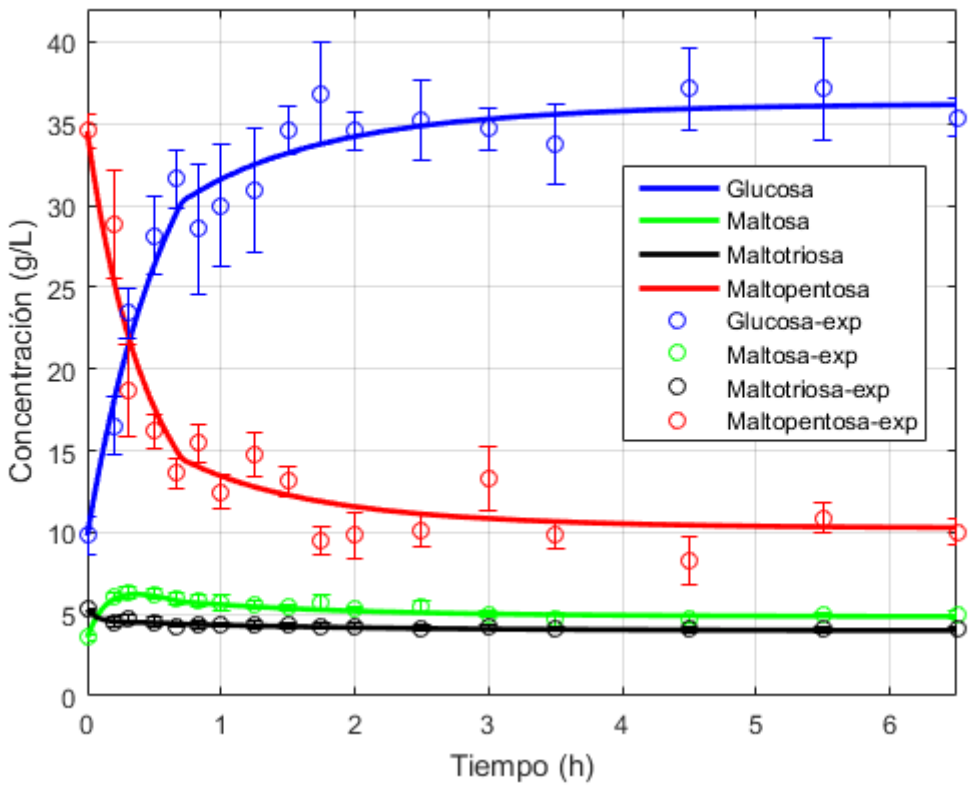


Figura 5.18 Cinética de hidrólisis enzimáticas con efectos de transferencia de masa para el residuo agroindustrial

Los errores del modelo utilizado para el modelo heterogéneo comparado con los datos experimentales se presentan en la Tabla 5.6 para el almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial.

Tabla 5.6 Errores promedio para el proceso de licuefacción del almidón de trigo puro y el residuo agroindustrial

Oligosacárido	**Errores promedio para Almidón de trigo puro (%)**	**Errores promedio para Residuo agroindustrial (%)**
Maltopentosa	6,9	5,7
Maltotriosa	7,8	5,9
Maltosa	7,5	5,2
Glucosa	4,9	4,7

Las Figuras 5.17 y 5.18 evidencian los efectos que generan la transferencia de masa en el proceso de sacarificación dentro de las membranas con las enzimas inmovilizadas y las enzimas libres. Los resultados de la simulación dieron como resultados que la proporción de enzimas inmovilizadas para el residuo agroindustrial fueron de 66,4% mientras que para el almidón de trigo puro fueron de 68,5%. Los resultados de inmovilización de enzimas para el almidón de trigo son mayores, lo cual puede ser debido a que los parámetros de operación fueron los máximos adecuados para la producción de glucosa, presentados en el Capítulo 4. También, las dos materias primas mantuvieron una actividad en la membrana del 80%.

Debido al buen ajuste obtenido corroborado con el porcentaje de error, este modelo adaptado es capaz de representar los efectos de la transferencia de masa de las

membranas utilizadas en la hidrólisis enzimática con almidón de trigo puro y su aplicación con un residuo agroindustrial.

5.4 CONCLUSIONES

Se propone un modelo heterogéneo que contempla los efectos de transferencia de masa interna y externa para un sistema de enzimas inmovilizadas en membranas sumergidas de fibras huecas y la reacción de enzima libre. El modelo permite la cuantificación de los factores de efectividad internos y externos en el tiempo, a medida que la concentración de sustrato cambia en el sistema incluyendo la producción de los oligosacáridos, efectos de pH y temperatura, inactivación enzimática y cambio del flux.

Después de realizar y evaluar un modelo heterogéneo para la hidrólisis enzimática de almidón con enzimas inmovilizadas en una membrana, se concluye que en el sistema existen limitaciones por transferencia de masa interna y que las limitaciones por transferencia de masa externa son despreciables para almidón de trigo puro y su aplicación a un residuo agroindustrial.

El modelo se validó frente a datos experimentales y se confirmó un buen ajuste. Aunque el modelo matemático ha sido desarrollado y validado para la hidrólisis enzimática del almidón de trigo, éste puede usarse de manera similar para diversos procesos utilizando enzimas inmovilizadas bajo condiciones donde la limitación de transferencia de masa es significativa.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

AL-Muftah, A. E., & Abu-Reesh, I. M. (2004). Effects of External Mass Transfer and Product Inhibition on a Simulated Immobilized Enzyme-Catalyzed Reactor for Lactose Hydrolysis. *Engineering in life sciences*, 4(4), 326-340.

Baker, R. W. (2004). Overview of membrane science and technology. In: Membrane Technology and Applications, Second Edition, 1-14.

Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with a-amylase from Bacillus licheniformis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 488–495.

Benitez, J. (2009). Mass Transfer Operations. (Wiley, Ed.) (Second Edi).

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 467–476.

Bolivar, J. M., Eisl, I., & Nidetzky, B. (2016). Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catalysis Today*, 259, 66-80.

Bortone, N., Fidaleo, M., & Moresi, M. (2014). Internal and external mass transfer limitations on the activity of immobilised acid urease derivatives differing in enzyme loading. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 22-33.

Doran, P. (2013). Chapter 13: Heterogeneous Reactions. In: *Bioprocess Engineering Principles* (Second Edi). Elsevier Ltd, 705-759p. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00016-2

Du Preez, R., Clarke, K. G., Callanan, L. H., & Burton, S. G. (2015). Modelling of immobilised enzyme biocatalytic membrane reactor performance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 48-53.

Fogler, H. S. (2005). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas* (Cuarta edi). Pearson Educación, México.

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904.

Govindasamy S, Oates CG, Wong HA. 1992. Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by thermostable a-amylase. *Carbohydr Res* 18:89–100.

Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453-468.

Johnston, D. B., & McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource technology*, 154, 18-25.

Kasche, V. (1983). Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(1), 2-13.

Lin, S. (2016). Mass transfer in forward osmosis with hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 514, 176-185.

Long, W. S., Bhatia, S., & Kamaruddin, A. (2003). Modeling and simulation of enzymatic membrane reactor for kinetic resolution of ibuprofen ester. *Journal of membrane science*, 219(1), 69-88.

Lopez-Ulibarri, R., & Hall, G. M. (1997). Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(6), 398-404.

Luo, J., Meyer, A. S., Jonsson, G., & Pinelo, M. (2014). Enzyme immobilization by fouling in ultrafiltration membranes: impact of membrane configuration and type on flux behavior and biocatalytic conversion efficacy. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 79-89.

Malmali, M., Stickel, J., & Wickramasinghe, S. R. (2015). Investigation of a submerged membrane reactor for continuous biomass hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 189-197.

Marshall, A. D., Munro, P. A., & Trägårdh, G. (1993). The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. *Desalination*, 91(1), 65-108.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.

Moo-Young, M., & Kobayashi, T. (1972). Effectiveness factors for immobilized-enzyme reactions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 50(2), 162-167.

Morales Vélez, S. (2004). Simulación de un bioproceso para la obtención de jarabes glucosados y fructosados a partir de almidón de yuca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Medellín. 137p.

Morales, S., Alvarez, H., & Sanchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and bioproducts processing*, 86(1), 25-30.

Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., & Rios, G. M. (2001). A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor–application to starch hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3), 273-278.

Raventós, M., & Duarte, S. (2005). Tecnología de membranas. Industria alimentaria tecnologías emergentes. Ediciones UPC. *Barcelona*, 173-210.

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307.

Seader, R. (2006). *Separation Porcess Principles. Chemical and Biochemical Operations*. (Wiley, Ed.) (Third Edit).

Shi, X., Tal, G., Hankins, N. P., & Gitis, V. (2014). Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: a review. *Journal of Water Process Engineering*, 1, 121-138.

Tijskens, L. M. M., Greiner, R., Biekman, E. S. A., & Konietzny, U. (2001). Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. *Biotechnology and bioengineering*, 72(3), 323-330.

Trusek-Holownia, A., & Noworyta, A. (2004). Mass transfer in the membrane phase contactor with an enzyme gel layer immobilized on a membrane. *Desalination*, 162, 335-342.

Wickramasinghe, S. R., Semmens, M. J., & Cussler, E. L. (1992). Mass transfer in various hollow fiber geometries. *Journal of Membrane Science*, 69(3), 235-250.

CONCLUSIONES GENERALES

En la hidrólisis enzimática para la producción de jarabes de glucosa es necesario evaluar los parámetros de operación de temperatura, pH y relación enzima/sustrato. Se identificaron las mejores condiciones para el almidón de trigo puro y un residuo agroindustrial junto con el modelo empírico estadístico durante los procesos de licuefacción y sacarificación, que representan el comportamiento de los resultados entre un 85 y 91%.

Se planteó una modificación de los efectos de pH en los modelos cinéticos de Morales et al. (2008) para los procesos de licuefacción y sacarificación. La validación de estos modelos presentó buenos ajustes de parámetros, permitiendo analizar la formación de los oligosacáridos producidos en la hidrólisis enzimática y la inactivación de enzimas.

Una de las principales ventajas que se reporta respecto a la unión de los procesos de hidrólisis enzimática con el uso de membranas, llamado proceso ISPR (*In Situ Product Recovery*, por sus siglas en inglés), es evitar la inhibición de las enzimas al retirar la glucosa del sistema. Estos estudios han utilizado la entrada continua de nuevo sustrato y enzimas permitiendo observar un incremento en la producción de oligosacáridos. Otros estudios utilizando diferentes enzimas, han observado que éstas se inmovilizan en las membranas. Para el proceso ISPR no se ha establecido una relación de los parámetros de operación que pueden influir en la inmovilización de enzimas. Este proyecto identificó por medio de revisión de literatura que los parámetros de operación en común entre los dos procesos que influyen en la inmovilización de enzimas son principalmente el pH y la temperatura. Estos parámetros en conjunto deben asegurar que se promueva una actividad enzimática y un flux de membranas adecuado para poder generar excelentes resultados de ambos procesos.

La evaluación de los parámetros pH y temperatura en el proceso ISPR para almidón demostraron que el efecto del pH sobre el flux de la membrana y la producción de glucosa, presentan fuerzas de atracción y repulsión electrostáticas, que dependen del punto isoeléctrico de las enzimas y las características de las membranas utilizadas. Para este estudio, el pH que presenta las mejores condiciones de producción de glucosa fue de 4,8 unidades. Los efectos de temperatura sobre el flux y la producción de glucosa indicaron que se presentan mejores condiciones entre 50 – 60°C. No obstante, a temperaturas superiores a 65°C, la producción de glucosa disminuye debido a una posible desnaturalización de la enzima que genera una pérdida de la actividad catalítica.

Las condiciones de operación que presentan la mayor producción de glucosa en el proceso ISPR del almidón con membranas PVDF son pH de 4,8 unidades y temperatura de 61,5°C. Se demostró a estas condiciones de operación que las enzimas se inmovilizan en las membranas por efecto de la porosidad más que por las fuerzas electrostáticas. Lo que indica que las enzimas presentan una adsorción física, probablemente en una monocapa, y posterior a esto existe la adsorción química entre enzimas mediante la aplicación de la presión transmembranal. Al comparar los mecanismos de ensuciamiento de las membranas con las estrategias de inmovilización de enzimas, se observa una ventaja para la inmovilización, siempre y cuando las

limitaciones de transferencia de masa y la disminución de flux a través de la membrana se pueden mantener en un mínimo.

Se propuso un modelo heterogéneo para las enzimas inmovilizadas en las membranas que permite identificar las limitaciones de transferencia de masa interna y externa a medida que la concentración de sustrato cambia en el sistema incluyendo la producción de los oligosacáridos, efectos de pH, inactivación enzimática y el cambio del flux. Este modelo planteado para el proceso ISPR de almidón, puede utilizarse de manera similar para otros procesos utilizando enzimas inmovilizadas bajo condiciones donde la limitación de transferencia de masa es significativa. Los resultados del modelo heterogéneo identificaron que el sistema presenta limitaciones por transferencia de masa interna y no por limitaciones de transferencia de masa externa, aplicados para el almidón de trigo puro y un residuo agroindustrial.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolos de medición de actividad enzimática para alfa-amilasa y glucoamilasa

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA α AMILASA

Modificado de Enzymatic Assay of α-AMYLASE (EC 3.2.1.1) de Sygma Aldrich. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html

FUNDAMENTO:

Estructuralmente, el almidón consiste en dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina, los cuales están compuestos por cadenas lineales y ramificadas de glucosa unidas por enlaces α (1-4) y α (1-6) (Hernández-Medina et al. 2008).

La hidrólisis parcial del almidón es llevado a cabo por la enzima α-amilasa (A 1,4-D-Glucan Glucano-hidrolasa), la cual producen polisacáridos de longitud intermedia (maltodextrinas con 5 a 10 unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de polisacáridos de alto peso molecular, como también algunos de bajo peso molecular (glucosa, maltosa entre otros) (Cataño & Mere, 2005; Cruz, 2012).

La actividad enzimática, es decir, la función de una enzima, se puede determinar midiendo la cantidad de sustrato que desaparece o la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Por lo tanto, es también una medida de la velocidad de reacción, que es en sí lo que estudia la cinética enzimática (Grajales, 2005).

Para el caso de la determinación de la actividad enzimática de α amilasa se define que una unidad libera 1,0mg de maltosa del almidón en 15 minutos a pH de 6,9 y 95°C.

Para poder garantizar que la enzima actúe sobre el almidón presente en una muestra se debe de garantizar que los componentes del almidón se solubilicen en el agua o en el solvente donde se encuentren. El almidón en su estado nativo forma una suspensión temporal de grandes partículas, que no se disuelven en el medio que las rodea y se depositaran en el fondo de un recipiente. Es por eso que se debe de realizar un proceso de calentamiento del almidón en presencia de agua, que conduce a la incorporación de agua en el gránulo. A medida que el calentamiento continua, los gránulos de almidón captan más agua irreversiblemente y se hinchan liberando amilosa y posiblemente amilopectina permitiendo su evacuación de los gránulos hinchados y por lo tanto su disponibilidad para la enzima (Vaclavik & Christian, 2002).

En presente ensayo se tienen dos componentes: El testigo es una solución patrón que es sometida o procesada por la enzima, es decir, donde se lleva a cabo la hidrólisis de almidón catalizado por la α amilasa. En segundo lugar está el blanco que sirve como solución de referencia para la hidrólisis.

La alfa amilasa puede presentar inhibición por sustrato (almidón) y por lo tanto se debe de someter la solución a un primer tratamiento a 20°C por 3 minutos para que haya un primer consumo del sustrato. Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de hidrólisis propiamente a una temperatura entre 80 – 90°C que es el rango óptimo para la alfa amilasa.

La determinación de los productos de la hidrólisis de almidón se realiza por medio del método DNS que mide la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra. El método se basa en la oxidación del grupo aldehído o cetona presente en el azúcar y la respectiva reducción del DNS a ácido 3-amino-5-nitrosalisílico. Esta reacción produce un complejo coloreado que presenta la mayor actividad óptica en una longitud de onda de 540 nm, lo cual permite realizar una gráfica a diferentes concentraciones de una solución patrón de maltosa, para luego identificar la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra (UNAL, 2014).

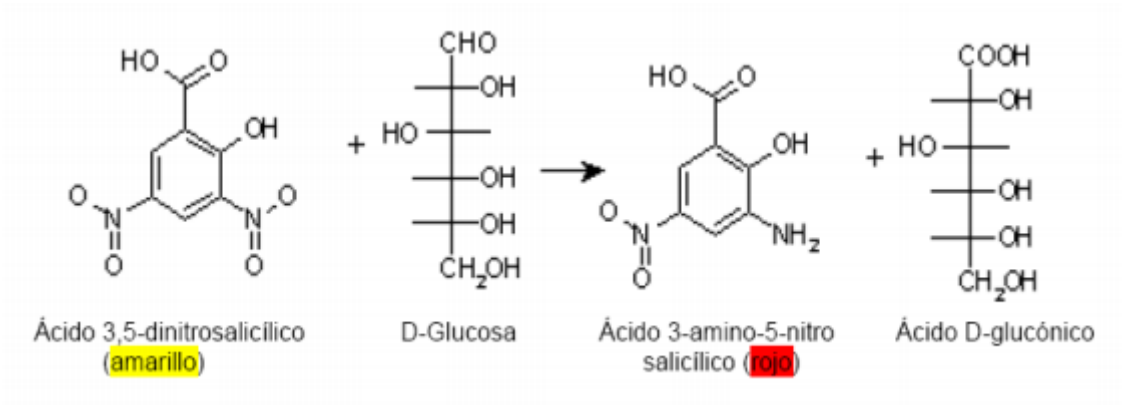


Figura A.1. *Conversión de azucares reductores mediante DNS*
Fuente: *Delgado (2009)*

Para ilustrar en la Figura A.2 se presenta un ejemplo de una curva estándar de maltosa y la ecuación que describe dicha curva.

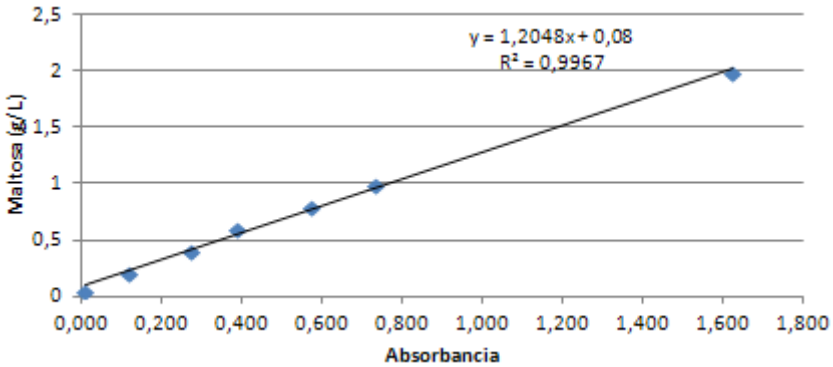


Figura A.2. *Curva estándar de maltosa*

Equipos

- Plancha calentadora
- Espectrofotómetro
- Balanza
- Votex

Materiales

- Guantes
- Tubos de ensayo
- Beakers
- Balón volumétrico 25 mL

- Balón volumétrico 10 mL
- Rejilla para tubos de ensayo
- Micropipeta 100-1000uL
- Puntas de 100-1000uL

Reactivos

- Buffer fosfato de sodio - cloruro de sodio pH: 6,9 Para 100 mL adicionar 0,2835g de NaHPO4 y 0,035g de NaCl. Ajustar el pH con HCl o NaOH dependiendo del caso.
- DNS (Ácido 3-5 dinitrosalicílico) 1% (p/v)
- Solución de almidón 1% (p/v): 0,025 g de almidón en 25 mL de buffer pH 6,9.
- Solución de maltosa 0,2% (p/v): 0,02g de maltosa monohidratada en 10 mL de agua destilada.
- Solución de enzima α amilasa; la dilución depende de la enzima y se debe evaluar hasta que se obtenga 1 mg de maltosa.

PROCEDIMIENTO:

- **Pretratamiento solución de almidón**

1. Llevar la solución de almidón a ebullición y mantener la solución a esta temperatura por 15 min con agitación mecánica como se muestra en la Figura A.3. Cuando se utiliza la plancha de calentamiento Bioweb MS7-H550-Pro fijar la temperatura en 250°C y la agitación en 100 rpm.

Figura A.3. *Solución de almidón en ebullición*

2. Dejar enfriar la solución en nevera.
3. Completar el volumen de la solución de almidón a su volumen original (25 mL) con agua destilada.

- **Ensayo**

La adición de los diferentes reactivos para el blanco y el testigo y los pasos para el ensayo se encuentran resumidos en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Tubos de ensayo y pasos para la medición de actividad de alfa-amilasa

Componente	Muestra	Blanco sustrato	Blanco enzima
Solución de almidón	1 mL	1 mL	-
Solución de α amilasa	1 mL	-	1 mL
Incubar a 20ºC durante 3 minutos			
DNS	1 mL	1 mL	1 mL
Buffer	-	1 mL	1 mL
Llevar a ebullición por 15 min Enfriar en hielo por 3 min Adicionar 9 mL de agua Leer absorbancia a 540 nm			

- **Curva estándar de maltosa**

La curva estándar de maltosa se realiza la adición de los siguientes reactivos y se siguen los pasos presentados en la Tabla A.2.

Tabla A.2. Curva estándar de maltosa

Componente	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6	Estándar 7	Blanco DNS
Solución de maltosa	0,05 mL	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	1,0 mL	2,0 mL	-
Agua destilada	1,95 mL	1,8 mL	1,6 mL	1,4 mL	1,2 mL	1,0 mL	-	2,0 mL
DNS	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Llevar a ebullición por 15 min Enfriar en hielo por 3 min Adicionar 9 mL de agua Leer absorbancia a 540 nm								

CÁLCULOS:

Inicialmente se realiza la gráfica de la curva estándar de maltosa (concentración de maltosa vs Absorbancia) y obtener la ecuación lineal que describe dicha curva. (g maltosa= m*Abs+b)

Se tiene que:

$$Abs_{ensayo} = Abs_{muestra} - Abs_{sustrato} - Abs_{enzima}$$

La actividad enzimática de la α amilasa está dada por:

$$\frac{U}{ml\ enzima} = \frac{mg\ maltosa * fd}{mL\ enzima}$$

Donde: los mg de maltosa son obtenidos a partir de la ecuación estándar de maltosa al ingresar la absorbancia del test en dicha ecuación. Fd es el factor de dilución de la enzima, y mL enzima es el volumen de enzima utilizado en la reacción.

Al menos dos diluciones deben de ser realizadas con cada una de las muestras de enzima, con una dilución liberando un poco más de 1 mg de maltosa y ligeramente inferior a 1,0 mg de maltosa. Tener como objetivo 1,2 y 0,8 mg de maltosa, respectivamente. Dependiendo de la enzima, estos objetivos pueden ser difíciles de alcanzar y deben hacerse más diluciones.

Estimar la concentración de maltosa que ha liberado exactamente 1,0 mg de maltosa por medio de una gráfica de maltosa liberada contra el logaritmo de concentración de enzima. Para encontrar la concentración de enzima requerida, se toman dos puntos de datos que estén muy cerca del punto de 1,0 mg y se dibuja una línea recta entre ellos, que servirá para interpolar entre los dos puntos para encontrar la dilución de enzima que produciría exactamente 1,0 mg de equivalentes de azúcar reductor.

BIBLIOGRAFÍA

Cataño, J. C., & Mera, I. (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca manihot sculenta. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3(1), 54-63.

Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidónes gelatinizados del fruto de la planta de banano.* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Delgado S. M. (2009). Utilización de Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), para la predicción del contenido de almidón en 18 variedades de papa nativa (Solanum tuberosum – ssp. tuberosum), Tesis pregrado, Universidad Austral de Chile, Chile.

Grajales M. O (2005). "Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica", Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology* (Campinas), 28(3), 718-726.

UNAL (2014). Determinación del contenido de azúcares reductores por el método del DNS. Grupo de Investigación Bioprocesos y Fluxs Reactivos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Vaclavik V. A & Christian E. W. (2002). "Fundamentos de ciencia de los alimentos", Acribia editorial, Acribia editorial.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUCOAMILASA

FUNDAMENTO:
La enzima glucoamilasa (α-1,4- D-Glucan glucohidrolasa) está involucrada en la producción de glucosa a partir de almidón que ha sido sometido a licuefacción. Esta enzima cataliza la hidrólisis de maltodextrinas hasta glucosa, completándose así la hidrólisis total del almidón.

La actividad enzimática, es decir, la función de una enzima, se puede determinar midiendo la cantidad de sustrato que desaparece o la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Por lo tanto, es también una medida de la velocidad de reacción, que es en sí lo que estudia la cinética enzimática (Grajales, 2005).

La actividad de la enzima glucoamilasa está definida en diferentes unidades según la casa matriz de donde proviene. Para la glucoamilasa Optidex® L 400, la actividad de la enzima está determinada en AUG o unidades de amiloglucosidasa. 1 AUG es la cantidad de enzima que libera 0,5 g de azucares reductores calculado como glucosa, a partir de almidón soluble como sustrato, en 30 min bajo condiciones específicas de ensayo.

En presente ensayo se tienen dos componentes: El testigo o muestra es una solución patrón que es sometida o procesada por la enzima, es decir, donde se lleva a cabo la hidrólisis de almidón catalizado por la α amilasa. En segundo lugar está el blanco que sirve como solución de referencia para la hidrólisis.

Equipos

- Espectrofotómetro
- Balanza
- Vortex

Materiales

- Guantes
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Rejilla para tubos de ensayo
- Rejilla para tubos eppendorf
- Beakers
- Balón volumétrico 20 mL
- Balón volumétrico 25 mL
- Balón volumétrico 10 mL
- Micropipeta 100-1000 μL
- Puntas de 100-1000 μL

Reactivos

- Kit comercial de Glucosa oxidasa, compuesto por el reactivo de color y por el estándar del reactivo.
- Buffer fosfatos pH: 7,6 und: Para 100 mL adicionar 7,75 mL de KH_2PO_4 0,4M y 42,25 mL de K_2HPO_4 0,4M. Ajustar el pH con alguna de las sales dependiendo del caso.

- Solución de maltosa 2% (p/v): 0,4210 g de maltosa monohidratada y completar a 20mL con agua destilada.
- Solución stock de glucosa 2 g/L: 0,022 g de glucosa monohidratada y completar a 10mL con agua destilada.
- Solución stock de enzima glucoamilasa 1,97 g/L: 33,75µL de la enzima y completar a 20mL con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:
La adición de los diferentes reactivos para el blanco y la muestra y los pasos para el ensayo se encuentran resumidos en la Tabla A.3.

Tabla A.3. Tubos de reacción para la determinación de actividad enzimática de enzima glucoamilasa

Componente	Muestra (mL)	Blanco sustrato (mL)	Blanco enzima (mL)
Solución de enzima	1	-	1
Buffer pH 4,3	3	7	7
Maltosa 2% p/v	1	1	-
Incubar por 30 min a temperatura ambiente			
Buffer pH 9,0	3	-	-

Después de realizar el ensayo de la reacción de la enzima sobre el sustrato, se debe de determinar cuanta glucosa fue obtenida a partir de la hidrólisis de maltosa. Para ello se utiliza el kit de la glucosa oxidasa sobre cada uno de las muestras y blancos de reacción como se presenta en la Tabla A.4.

Tabla A.4. Cantidad de reactivos para los tubos de ensayo

Componente	Muestra Glucosa (µL)	Estándar del reactivo (Kit) (µL)	Blanco reactivo (µL)
Respectiva muestra o blanco	10		
Estándar del reactivo (kit)		10	
Reactivo de color (kit)	1000	1000	1000

Se incuba por 10 min a temperatura ambiente y se lee absorbancia a 500 nm.

CÁLCULOS:

Inicialmente se realiza la corrección de absorbancia para los ensayos realizados:

$$Abs_{ensayo} = Abs_{muestra} - Abs_{blanco\ sustrato} - Abs_{blanco\ enzima}$$

Posteriormente, se halla la concentración de glucosa para todas las muestras:

$$C_{muestra} = C_{estandar\ del\ reactivo} * \frac{Abs_{ensayo}}{Abs_{estandar\ del\ reactivo}}$$

La concentración del estándar del reactivo es conocida. Por lo tanto:

$$C_{muestra} = \frac{mg}{dL}\ glucosa = \frac{Abs_{ensayo}}{Abs_{estandar\ del\ reactivo}} * 100$$

Por conversión de unidades se tiene que:

$$C_{muestra} = \frac{g}{L}\ glucosa = \frac{\left(\frac{Abs_{ensayo}}{Abs_{estandar\ del\ reactivo}} * 100\right)}{0{,}1 * 1000}$$

La actividad enzimática de la enzima glucoamilasa está dada por:

$$\frac{AMG}{g} = \frac{g\ glucosa * fd}{mL\ enzima *\ \rho\ enzima}$$

Donde: Fd es el factor de dilución de la enzima, $mL\ enzima$ es el volumen de enzima utilizado en la reacción y $\rho\ enzima$ es la densidad de la enzima.

Al menos dos diluciones deben de ser realizadas con cada una de las muestras de enzima, con una dilución liberando un poco más de 0,5 g de glucosa y ligeramente inferior a 0,5 g de glucosa. Tener como objetivo 0,4 y 0,6 g de glucosa, respectivamente. Dependiendo de la enzima, estos objetivos pueden ser difíciles de alcanzar y deben hacerse más diluciones.

Estimar la concentración de glucosa que ha liberado exactamente 0,5 g de glucosa por medio de una gráfica de glucosa liberada contra el logaritmo de concentración de enzima. Para encontrar la concentración de enzima requerida, se toman dos puntos de datos que estén muy cerca del punto de 0,5 g y se dibuja una línea recta entre ellos, que servirá para interpolar entre los dos puntos para encontrar la dilución de enzima que produciría exactamente 0,5 g de equivalentes de azúcar reductor.

BIBLIOGRAFÍA

Grajales M. O (2005). “Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica”, Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

ANEXO 2. Protocolo de medición de proteína por el método Bradford

Este instructivo se aplica para medir la concentración de proteínas presentes en un extracto enzimático o para medición de proteínas en general.

CONDICIONES GENERALES

- Antes de llevar a cabo este protocolo, prográmese conforme a la disposición de equipos del laboratorio. Comuníquese con el encargado del laboratorio y haga una solicitud a través de correo electrónico con los equipos, reactivos y materiales que requiera, especifique la fecha y duración de los ensayos.
- Tenga en cuenta las normas de bioseguridad del laboratorio, utilice siempre bata y guantes; gafas y mascarilla en caso de necesitarlos.
- Revise que los equipos que le han sido asignados funcionen de manera adecuada y estén limpios. En caso de encontrar alguna irregularidad dígaselo al encargado del laboratorio para que este haga el reporte correspondiente.
- Todos los datos y resultados que obtenga de este análisis favor reportarlos en la bitácora correspondiente a su trabajo.
- Al momento de terminar los ensayos asegúrese de hacer un buen manejo de residuos.
- Ubique todos los reactivos en el lugar donde estaban almacenados, lave los materiales que haya utilizado y entregue el registro de equipos totalmente diligenciado al encargado del laboratorio.

Interferentes

- Buffers altamente alcalinos presentan interferencia, pero puede ser contrarrestada con blancos, también los detergentes son interferentes.

DEFINICIONES

- **Proteína**: Las proteínas son macromoléculas compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. La mayoría también contienen azufre y fósforo. Las mismas están formadas por la unión de varios aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos.
- **Curva de calibración**: Se trata de una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia (por ejemplo la albúmina sérica bovina que vimos antes) que se utiliza para determinar la cantidad de esta sustancia (proteínas) presente en una muestra incógnita.
- **Estándar**: Es una disolución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario que, por su especial estabilidad, se emplea para valorar la concentración de otras soluciones, como las disoluciones valorantes.

FUNDAMENTO

Consiste en un método seguro y rápido para la estimación de la concentración de proteína, la cual es esencial en muchos campos de estudio. El método de Bradford consiste en la unión del colorante azul de coomassie G250 a los residuos arginil y lisil de las proteínas y es usualmente medido a 595nm.

MATERIALES

- Espectrofotómetro UV visible

- Celdas de vidrio y de cuarzo
- Pipetas de 10µL-100µL y de 1mL a 5mL y sus respectivas puntas
- Bomba de vacío
- Beakers
- Probeta
- Matraz aforado de 50mL, 100mL, 1L
- Agitador magnético
- Plancha de agitación
- Papel Whatman N°1
- Tubos de ensayo
- Recipiente de almacenaje del reactivo de Bradford oscuro (ámbar / forrado con aluminio)
- Balanza analítica.
- Etanol absoluto (99,9%)
- Ácido fosfórico (85%)
- Azul de coomassie G250
- Agua Destilada
- Estándar de proteína (Albúmina) 1mg/mL
- Embudo para filtración
- Erlenmeyer para la bomba de vacío

PROCEDIMIENTO

Preparación de reactivo Bradford (para 1 L, es posible preparar menos reactivo dependiendo de la cantidad de muestras)

- Adicionar en el matraz aforado de 50mL el etanol y en el matraz de 100mL adicionar el ácido fosfórico.
- Pesar en beaker 100mg de azul de Coomassie G250 (no confundir con R250).
- En un matraz de 1 L adicionar los 50mL de etanol, los 100 mL de ácido fosfórico y 100 mg de azul de Coomassie (al momento de traspasar el azul juagar con agua destilada para evitar dejar residuos en el recipiente). Aforar a 1L con agua destilada.
- Agitar en la plancha magnética por 5 minutos
- Filtrar en montaje de vacío con papel Whatman N°1 y depositar en frasco oscuro o ámbar (conservar en la nevera luego de su uso), éste es estable por máximo dos semanas, sin embargo, el colorante tiende a sedimentar, así que antes de su uso debe ser filtrado.
- Las celdas de cuarzo o las de vidrio pueden ser usadas para este método y deben estar limpias y libres de detergentes. Las celdas plásticas no deben ser usadas ya que el colorante se une a este material. Las celdas usadas se lavan con etanol.

Estándar de proteína.

Nota: Este estándar es poco estable y se degrada con facilidad con la luz, por lo tanto, debe ser usado inmediatamente se realice.

- Agregar en un beaker 15mg de proteína en 15 ml de agua destilada para preparar una solución de concentración 1mg/mL.
- Medir la absorbancia a 258nm con celda de cuarzo y debería estar cercana a 0,66 si es albúmina y si es ovoalbúmina debería ser 0,75.

Curva de calibración

- La curva es no lineal, y los valores de absorbancia dependen de la edad del reactivo, por consiguiente, es esencial hacer la curva de calibración para cada ensayo.
- **BLANCO:** Pipetear 100µL de agua destilada más 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos. Luego de la reacción pasar a una celda de cuarzo y leer a 595nm, ajustar a cero.
- Para la calibración se utiliza el estándar de proteína 1mg/mL. Adicionar en un eppendorf el estándar para diferentes concentraciones entre (0,1 µL - 1µL) como se muestra en la siguiente Tabla A.1.

Tabla A.41 Curva de calibración

Concentración (mg/mL)	**Estándar de proteína (µL)**	**Agua destilada (µL)**
0,1	100	900
0,2	200	800
0,4	400	600
0,6	600	400
0,8	800	200
1	1000	0

- Pipetear 100µL de las concentraciones en la Tabla (1) más 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos.
- Medir en espectrofotometro en una celda de cuarzo a 595nm.

Medición de la muestra.

- **BLANCO:** Pipetear 100µL de agua destilada más 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos. Luego de la reacción pasar a una celda de cuarzo y leer a 595nm, ajustar a cero.
- Pipetear 100 µL de la muestra más 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos. Luego de la reacción pasar a una celda de cuarzo y leer a 595nm. (en caso de superar 0,8 de absorbancia diluir la muestra en agua destilada), (la muestra es estable hasta por 1 hora). Hacerlo por triplicado (tomar la misma muestra tres veces)
- Con la ecuación de la recta generada, hallar la concentración de la proteína (mg/mL) del analito.

DESECHOS

Disponer los residuos en un recipiente marcado. (No echar en el lavado)

BIBLIOGRAFÍA

Kruger, N. (2002). *The Bradford Method for Protein Quantitation.* In: The protein protocols handbook. Second Edition. Humana Press, Inc. New Jersey. 15-23p. Consultado en Agosto de 2016.

ANEXO 3. Ensayos preliminares de superficie de respuesta para el proceso de licuefaccción

METODOLOGÍA

Materia prima

La optimización de la etapa de licuefacción fue realizada para dos materias primas amiláceas: Almidón de trigo con 81% de contendido de almidón y Materia de naturaleza dulce y salada (residuo agroindustrial), combinados en una proporción 40/60, respectivamente, con un 56% de contenido de almidón.

Gelatinización

La gelatinización es una etapa previa a la hidrólisis enzimática que consiste en el calentamiento de los gránulos de almidón con el objetivo de liberar la amilosa y amilopectina al medio. Estos dos compuestos son finalmente los materiales que estarán dispuestos al ataque enzimático.

Los ensayos fueron realizados en Erlenmeyer de 500 mL, un peso efectivo de 100 g con buffer fumárico. Las condiciones de la etapa de gelatinización fueron las siguientes: 20%p/p de almidón, 95ºC, 150 rpm y 10 min para el material amiláceo dulce-salado y 30 min para el almidón de trigo.

Licuefacción

La etapa de licuefacción para el almidón puro y el material amiláceo dulce-salado se realizó con la enzima amilasa Spezyme® Fred con una actividad específica de 2389 U/g. Se seleccionó la metodología de superficie de respuesta como herramienta de optimización, esta técnica estadística es empleada para describir el efecto individual y acumulado de las variables a probar y sus efectos sobre la variable de respuesta (Roberto et al. 2003; Gutiérrez & de la Vara, 2008). Se realizó un diseño central compuesto de 13 corridas y 5 puntos centrales con un nivel de significancia del 5% y azúcares reductores como variable respuesta. Tanto la formulación del diseño de experimentos como el tratamiento estadístico de los datos, fue realizado en el software MINITAB® 15.1.20.0. (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos), el rango de los factores y sus niveles se presentarán en a lo largo del informe. Los parámetros del tratamiento fueron pH 5,8 unidades, 150 rpm, 1 hora y 10 ppm de Ca^{2+}.

Al final de cada experimento se tomó muestra y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4ºC para material amiláceo dulce-salado y a 40°C para el almidón de trigo, el sobrenadante fue filtrado al vacío con papel filtro de 45 µm de poro. La concentración de azúcares reductores fue determinada por triplicado con el método de DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico) y la concentración de azúcares totales por el método de refractometría (°Brix).

Después de hacer el análisis de superficies de respuesta, se obtuvieron las condiciones óptimas o mejores condiciones para la licuefacción de cada materia prima mediante la herramienta de optimización de MINITAB® 15.1.20.0. Finalmente, con el software STATGRAPHICS® Centurion XVI (Versión 16.0.09, Statpoint Technologies, Inc., Virginia, Estados Unidos) se obtuvo el intervalo de confianza para el óptimo de licuefacción de cada materia prima y se realizó por triplicado la validación de dicho punto óptimo o de las mejores condiciones.

RESULTADOS

Materia de naturaleza dulce y salada

Para esta materia prima se desarrolló un primer diseño de experimentos teniendo en cuenta los factores presentados en la Tabla A.1. Los niveles de estos factores fueron determinados con base en revisión bibliográfica y en las condiciones de operación recomendadas por la ficha técnica de la enzima.

Tabla A.1. Factores y sus niveles para la optimización de la etapa de licuefacción para el material amiláceo dulce-salado. Primer diseño.

Factores	Niveles		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	85	90	95
Enzima (α-amilasa) (%p/p)	0,04	0,07	0,10

La Tabla A.2 y A.3 presentan los resultados de las corridas del diseño central compuesto para la etapa de licuefacción del material amiláceo dulce-salado y el análisis ANAVA, respectivamente.

Tabla A.2. Matriz del diseño central compuesto y sus correspondientes valores experimentales para la etapa de licuefacción del material amiláceo dulce-salado. Primer diseño.

Corrida	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Azúcares (°Brix)
1	95	0,10	11
2	90	0,03	22
3	90	0,07	26
4	95	0,04	16
5	90	0,07	18
6	90	0,07	74
7	82,9	0,07	38
8	90	0,07	32
9	85	0,10	35
10	90	0,11	5
11	85	0,04	51
12	97,1	0,07	136
13	90	0,07	16

Tabla A.3. ANAVA de licuefacción de residuo agroindustrial. Primer diseño.

Término	**Valor P**
Constante	0,064
Temperatura (°C)	0,424
E/S (%)	0,639
T*T	0,140
E/S*E/S	0,274
T*E/S	0,864

Con respecto a los grados Brix el valor más alto fue 136 g/L el cual corresponde a uno de los valores extremos en temperatura del diseño (97,1°C), lo cual evidencia el efecto de la temperatura en la catálisis de reacción, generando a mayores temperaturas, incrementos en la conversión. El diseño arrojó un R^2 del 45,19%.

La Figura A.1 muestra la gráfica de contorno y la superficie de respuesta del primer diseño central compuesto evaluado para la licuefacción del material amiláceo dulce-salado.

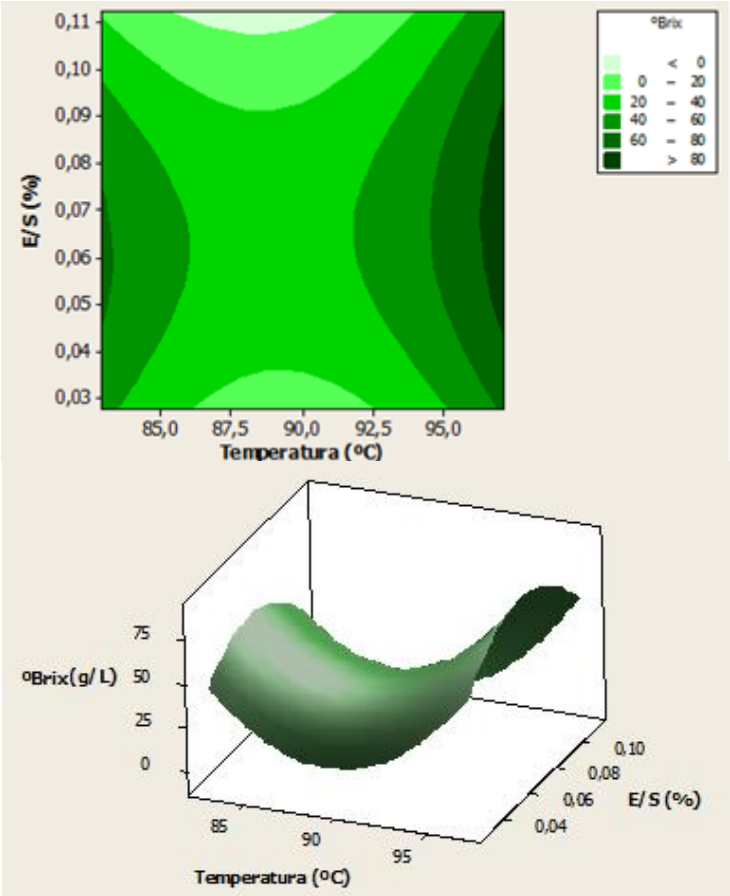


Figura A.1. Resultados de contorno y superficie de respuesta. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares totales como variable respuesta. Primer diseño.

La Figura A.1 presenta una mayor producción de azúcares en dos casos: primero, cuando la temperatura de operación supera los 95°C y segundo, cuando está por debajo de los 85°C. Cualquiera de los dos casos podría ser explorado para encontrar el punto óptimo de producción de azúcares. Según Gutiérrez & De la Vara (2008), cuando se desea determinar el punto óptimo mediante la metodología de superficies de respuesta, se requiere la posibilidad de realizar varios experimentos en forma secuencial con el objetivo de llegar a la mejor combinación de los factores estudiados en toda la región de operabilidad. Esa situación se presenta en este caso particular con dos rangos de temperatura con alta producción de azúcares, es por eso que se decide mover la región experimental y realizar un nuevo diseño de experimentos. Ahora bien, temperaturas por encima de los 97°C no son posibles de alcanzar debido a la presión atmosférica de la ciudad de Medellín-Colombia y por el rango de operabilidad del equipo de calentamiento (baño María), el cual no supera 96,4°C. Por lo anterior, se decide explorar temperaturas por debajo a 85°C con los mismos niveles de concentración de enzima, debido a que en la gráfica de contorno se visualiza que las concentraciones utilizadas generan concentraciones de azúcares reductores que se pueden encontrar dentro los niveles evaluados.

Con respecto a lo antes mencionado, se plantea un nuevo diseño central compuesto para la licuefacción del material amiláceo dulce-salado, presentado en la Tabla A.4. A partir de este diseño se siguen presentando los resultados en términos de azúcares reductores debido a que es una técnica que cuantifica directamente los azúcares liberados por la hidrólisis en comparación con la técnica refractiva que mide sólidos en una muestra líquida.

Tabla A.4 Factores y sus niveles para la optimización de la etapa de licuefacción para el material amiláceo dulce-salado. Segundo diseño

Factores	**Niveles**		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	70	75	80
Enzima (α-amilasa) (%p/p)	0,04	0,07	0,10

Almidón de trigo

Se realizó un diseño central compuesto con el objetivo de evaluar el efecto de los factores Temperatura y relación enzima sustrato sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de almidón de trigo. Los factores y sus correspondientes niveles se presentan en la Tabla A.5.

Tabla A.5. Factores y sus niveles para la optimización de la etapa de licuefacción para el almidón puro. Primer diseño

Factores	**Niveles**		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	85	89,5	94
Enzima (α-amilasa) (%p/p)	0,04	0,07	0,10

La Tabla A.6 presenta las condiciones para las diferentes corridas del diseño de experimentos, así como la concentración de azúcares reductores obtenidos por cada ensayo. Se evidencia que la mayor concentración de azúcares reductores (58,05 g/L) se obtuvo con el extremo inferior de la relación enzima sustrato (0,027%) y el nivel medio de temperatura (89,5°C) dando un primer indicativo que la relación enzima sustrato requerida para la hidrólisis del almidón es baja en la etapa de licuefacción.

Tabla A.6. Matriz del diseño central compuesto y sus correspondientes valores experimentales para la etapa de licuefacción del almidón puro. Primer diseño

Corrida	Temperatura (°C)	E/S (%)	Azúcares reductores (g/L)
1	89,5	0,11	28,81
2	89,5	0,07	33,32
3	94	0,1	32,55
4	89,5	0,07	32,69
5	94	0,04	36,90
6	89,5	0,07	32,56
7	89,5	0,07	33,16
8	89,5	0,07	31,31
9	89,5	0,028	58,05
10	95,86	0,07	28,80
11	85	0,04	40,41
12	83,14	0,07	35,42
13	85	0,1	27,22

Similar a lo analizado con el diseño de experimentos para el material amiláceo dulce-salado, el análisis de varianza ANAVA permite establecer el efecto de la temperatura y la relación enzima sustrato sobre los azúcares reductores producidos. La Tabla A.7 presenta que de acuerdo con el valor P, la relación enzima sustrato y el término cuadrático de este factor, afecta significativamente la hidrólisis en la etapa de licuefacción, es decir, variaciones en este factor genera cambios apreciables en los azúcares reductores producidos. El ajuste de los datos al modelo fue 84,61% (R^2), y como este valor es mayor a 75% indica que este modelo es apropiado para describir los datos obtenidos (Martínez, 2014). El R^2 ajustado fue del 73,62%.

Tabla A.7. ANAVA de licuefacción de almidón puro. Primer diseño.

Termino	**Valor P**
Constante	0,000
Temperatura (°C)	0,530
E/S (%)	0,001*
T*T	0,486
E/S*E/S	0,021*
T*E/S	0,309

*Significancia < 0,05

La ecuación del modelo es la siguiente:

$$AR = -248{,}752 + 8{,}57840 * T - 2416{,}39 * E/S - 0{,}0554960 * T^2 + 5038{,}35 * (E/S)^2 + 16{,}3754 * T * E/S$$

La Figura A.2 presenta la gráfica de contorno y la superficie de respuesta que describe la interacción entre los factores y la variable respuesta para la licuefacción del almidón de trigo.

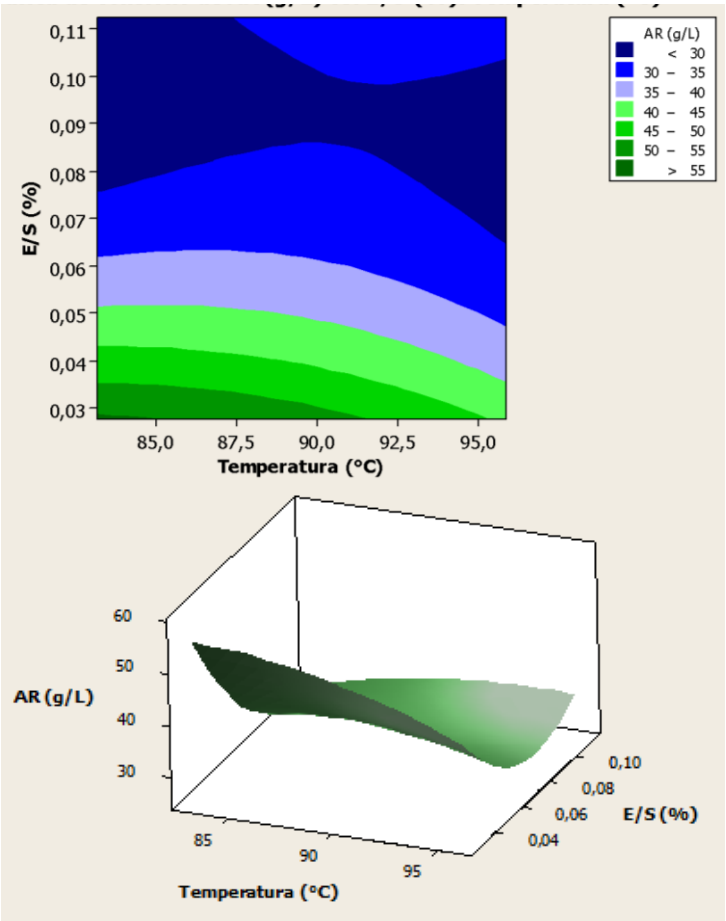


Figura A.2. Resultados de contorno y superficie de respuesta. Interacción entre la temperatura y %E/S con azúcares reductores como variable respuesta. Primer diseño

Los resultados de la Figura A.2 muestran una relación inversamente proporcional entre la enzima y la temperatura con la producción de azúcares reductores, a medida que se disminuyen se aumenta producción de azúcares. En la superficie de respuesta a simple vista se evidencia que no hay presencia de un punto óptimo, simplemente una región con condiciones que permiten obtener la máxima producción de azúcares reductores que en estos casos es llamado "mejor tratamiento" según Gutiérrez & de la Vara (2008). Con base en la teoría de superficies de respuesta mencionada previamente, se plantea un nuevo diseño central compuesto con el objetivo de hallar el óptimo de producción.

Para este nuevo diseño se disminuye la temperatura mientras que la relación enzima sustrato se mantiene en el mismo rango debido a que el volumen de enzima cuando la relación enzima sustrato es menor a 0,02% es bajo y por los rangos en la revisión bibliográfica. Los factores y los correspondientes niveles de este nuevo diseño para hidrólisis de almidón de trigo se presentan en la Tabla A.8.

Tabla A.8. Factores y sus niveles para la optimización de la etapa de licuefacción para el almidón puro. Segundo diseño

Factores	**Niveles**		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	70	75	80
Enzima (α-amilasa) (%p/p)	0,04	0,07	0,10

CONCLUSIONES

Se realizaron los diseños experimentales evaluando los rangos planteados por la revisión bibliográfica. No se encontró un óptimo y se plantearon nuevos rangos para evaluar tanto para el material dulce-salado como para el almidón de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Estupiñan, M. V., Parra-Escudero, C. O., & Muvdi-Nova, C. J. (2015). Estudio del proceso de clarificación de hidrolizados de almidón de yuca utilizando membranas cerámicas. *Vitae, Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 22(2), 121-129

Apar, D.K., & Özbek, B. (2004a). Corn, rice and wheat starch hydrolysis by using various alpha-amylase enzymes at temperature 40°C. *J Eng. Nat. Sci*, 2, 55-67.

Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with a-amylase from Bacillus licheniformis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(2), 488–495. http://doi.org/10.1021/jf072217j

Betiku, E., Akindolani, O. O., & Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (ipomoea batatas) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *30*(3), 467–476. http://doi.org/10.1590/S0104-66322013000300005

Ewa Nebesny, J. R. T. P. (1998). Enzymatic Hydrolysis of Wheat Starch into Glucose. *Starch-Stärke*, *50*(1979), 337–341. http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(199808)50:8<337::AID-STAR337>3.0.CO;2-W

Gutierrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). Capítulo 12: Optimización de procesos con metodología de superficie de respuesta. In *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda Ed, pp. 384–420). México, D. F.: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA.

Han, M., Kim, Y., Kim, Youngran, Chung, B. & Choi, G. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean J. Chem. Eng*., January, Vol. 28, No.1: 119-125.

Johnston, D. B., & McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource Technology*, *154*, 18–25. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.043

Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G., & Oumèma, N. E. (2014). Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, *52*, 144–149. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.025

Martínez, Y., & others. (2014). Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Recuperado a partir de http://www.bdigital.unal.edu.co/46389/

Murthy, G. S., Sall, E. D., Metz, S. G., Foster, G., & Singh, V. (2009). Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. *Industrial Crops and Products*, *29*(1), 67–72.

Ozbek, B., & Yuceer, S. (2001). Alpha-Amylase Inactivation During Wheat Starch Hydrolysis Process. *Process Biochemistry*, *37*(1), 87–95.

Roberto, I.C., Mussatto, I., & Rodrigues, RCLB. (2003). Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice strew in a semi pilot reactor. *Industrial Crops and Products*. 17, 171-176.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torrresa, R. G., & Molina, D. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*(12), 2337–2343.

Srisuwan, W., Techapun, C., Seesuriyachan, P., Watanabe, M., & Chaiyaso, T. (2016). Screening of oleaginous yeast for lipid production using rice residue from food waste as a carbon source. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(2), 116-126.

Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *58*, 467–475.

ANEXO 4. Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso de licuefacción para el almidón de trigo puro

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	73,3	0,0366	5,0	1,398	127,42764	127,814	0,594
			5,0	1,410	128,4978		
			5,0	1,399	127,51682		
2			5,0	1,405	128,0519	127,992	0,538
			5,0	1,398	127,42764		
			5,0	1,410	128,4978		
3			5,0	1,400	127,606	127,755	0,681
			5,0	1,410	128,4978		
			5,0	1,395	127,1601		

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	80,0	0,0150	5,0	0,141	122,62704	122,865	0,412
			5,0	0,141	122,62704		
			5,0	0,142	123,34048		
2			5,0	0,138	120,48672	121,676	1,090
			5,0	0,141	122,62704		
			5,0	0,140	121,9136		
3			5,0	0,141	122,62704	122,151	0,824
			5,0	0,139	121,20016		
			5,0	0,141	122,62704		

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	65,0	0,0500	5,0	1,365	124,4847	124,366	0,287
			5,0	1,360	124,0388		
			5,0	1,366	124,57388		
2			5,0	1,364	124,39552	124,396	0,178
			5,0	1,362	124,21716		
			5,0	1,366	124,57388		
3			5,0	1,363	124,30634	124,158	0,136
			5,0	1,360	124,0388		
			5,0	1,361	124,12798		

ANEXO 5. Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso de licuefacción para el residuo agroindustrial

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	72,8	0,0516	6,0	0,475	62,426	63,952	1,323
			6,0	0,493	64,780		
			6,0	0,492	64,649		
2			6,0	0,483	63,472	63,429	1,243
			6,0	0,473	62,164		
			6,0	0,492	64,649		
3			6,0	0,503	66,088	64,955	13,116
			6,0	0,390	51,308		
			6,0	0,590	77,467		

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	76,0	0,0350	6,0	0,463	60,856	60,028	1,323
			6,0	0,445	58,502		
			6,0	0,462	60,726		
2			6,0	0,463	60,856	60,333	0,796
			6,0	0,452	59,418		
			6,0	0,462	60,726		
3			6,0	0,463	60,856	60,856	0,000
			6,0	0,463	60,856		
			6,0	0,463	60,856		

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	Tiempo final				
			Factor dilución	Abs	AR (g/L)	AR prom (g/L)	AR desv (g/L)
1	71,0	0,0600	6,0	0,479	62,949	64,039	1,560
			6,0	0,501	65,827		
			6,0	0,482	63,342		
2			6,0	0,511	67,135	63,385	4,516
			6,0	0,444	58,371		
			6,0	0,492	64,649		
3			6,0	0,460	60,464	63,036	2,617
			6,0	0,500	65,696		
			6,0	0,479	62,949		

ANEXO 6. Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso de sacarificación para el almidón de trigo puro

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	73,5	0,636	4,7	162,421	160,801
2				158,241	
3				161,742	

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	70,0	0,6000	4,6	149,142	147,777
2				147,945	
3				146,245	

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	62,0	0,5500	4,6	134,135	133,421
2				130,985	
3				135,143	

ANEXO 7. Resultados de validación del modelo empírico estadístico para el proceso de sacarificación para el residuo agroindustrial

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	73,5	0,5399	4,2	92,145	90,60
2				89,234	
3				90,415	

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	70,0	0,4600	4,3	85,256	85,58
2				84,245	
3				87,251	

Ensayo	Temperatura (ºC)	E/S (%)	pH (unidades)	Resultados	
				Glucosa (g/L)	Glucosa promedio (g/L)
1	63,0	0,5800	4,4	81,521	82,36
2				83,135	
3				82,412	

ANEXO 8. Código de programación en Matlab para el proceso de licuefacción

```
%Instrucciones para limpiar la hoja de trabajo y la memoria en Matlab
%Cierra todos los gráficos abiertos al momento
close all
%Borra todas las variables existentes hasta el momento
clear all
%Definición de Condiciones iniciales y parámetros del sistema
param.x1=0.2;   %adimensional
param.x2=0.2;  %adimensional
param.x3=0.28;   %adimensional
param.x5=0.32;   %adimensional
param.h1=0.29;   %adimensional
param.h2=0.33;  %adimensional
param.h3=0.30;   %adimensional
param.h5=0.22;   %adimensional
param.Kd=0.017; %1/h
param.p1=51;
param.p2=89;
param.p3=89;
param.p5=167;
param.q1=0.089;
param.q2=0.145;
param.q3=0.066;
param.q5=0.26;
param.H= 10^(-5.8);
param.KEH= 2.933519e-04;
%constante de equilibrio para las reacciones de protonación
param.KEOH= 3.484279e+08;
%constantes de equilibrio para las reacciones de hidroxilación
param.Kw= 1e-14;            %constante de disociación del agua
param.E0=0.042; %ml/L dosis de enzima
param.S0=200; % g/L concentración inicial de sustrato
G10= 0;       %[g/l]
G20= 0;       %[g/l]
G30= 0;       %[g/l]
G50= 0;       %[g/l]

[t, G]= ode15s(@Liquefaction,[0 4],[G10 G20 G30 G50],[],param);
figure (1)

tiempo=[0 0.5 1 1.5 2 3 4];
Glucosaexp=[0 22.642 43.421 52.025 50.420 55.251 53.420];
Maltosaexp=[0 25.527 45.624 56.242 57.870 60.034 59.421];
Maltotriosaexp=[0 32.043 58.324 61.120 69.010 64.654 64.751];
Maltopentosaexp=[0 50.351 93.278 108.355 105.643 109.346 110.245];

plot(G1.time,G1.signals.values,'blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo
(h)'); ylabel('Concentración (g/L)'); hold on; grid on;
plot(G2.time,G2.signals.values,'green','linewidth',2); hold on;
plot(G3.time,G3.signals.values,'black','linewidth',2); hold on;
plot(G4.time,G4.signals.values,'red','linewidth',2); hold on;
plot(tiempo,Glucosaexp,'ob',tiempo,Maltosaexp,'og',tiempo,Maltotriosae
xp,'ok',tiempo,Maltopentosaexp,'or');
legend('Glucosa','Maltosa','Maltotriosa','Maltopentosa','Glucosa-
exp','Maltosa-exp','Maltotriosaexp','Maltopentosaexp')

G1_error=[0;
G1.signals.values(18,1);G1.signals.values(24,1);G1.signals.values(30,1
```

```
);G1.signals.values(37,1);G1.signals.values(49,1);G1.signals.values(62
,1)];
G2_error=[0;
G2.signals.values(18,1);G2.signals.values(24,1);G2.signals.values(30,1
);G2.signals.values(37,1);G2.signals.values(49,1);G2.signals.values(62
,1)];
G3_error=[0;
G3.signals.values(18,1);G3.signals.values(24,1);G3.signals.values(30,1
);G3.signals.values(37,1);G3.signals.values(49,1);G3.signals.values(62
,1)];
G4_error=[0;
G4.signals.values(18,1);G4.signals.values(24,1);G4.signals.values(30,1
);G4.signals.values(37,1);G4.signals.values(49,1);G4.signals.values(62
,1)];

ERROR1=(abs(Glucosaexp'-G1_error)./(max(Glucosaexp)-
min(Glucosaexp)))*100;
ERROR2=(abs(Maltosaexp'-G2_error)./(max(Maltosaexp)-
min(Maltosaexp)))*100;
ERROR3=(abs(Maltotriosaexp'-G3_error)./(max(Maltotriosaexp)-
min(Maltotriosaexp)))*100;
ERROR4=(abs(Maltopentosaexp'-G4_error)./(max(Maltopentosaexp)-
min(Maltopentosaexp)))*100;

ER1average=sum(ERROR1)/7;
ER2average=sum(ERROR2)/7;
ER3average=sum(ERROR3)/7;
ER4average=sum(ERROR4)/7;

%Definición de ecuaciones para la solución del modelo
function dGdt=Liquefaction(t,G,param)
dGdt=zeros(4,1);

y1=param.h1*param.S0;
y2=param.h2*param.S0;
y3=param.h3*param.S0;
y5=param.h5*param.S0;

E=param.E0*exp(-param.Kd*t);

pH=(1+(param.H/param.KEH)+((param.Kw/param.KEOH)*(1/param.H)));

K1=((param.p1/param.S0)-param.q1)*E;
K2=((param.p2/param.S0)-param.q2)*E;
K3=((param.p3/param.S0)-param.q3)*E;
K5=((param.p5/param.S0)-param.q5)*E;

V1=K1*(param.x1*((param.S0-(G(4)+G(3)+G(2)+G(1)))-(G(4)+G(3)+G(2)))-
y1)/pH;
V2=K2*(param.x2*((param.S0-(G(4)+G(3)+G(2)+G(1)))-(G(4)+G(3)))-y2)/pH;
V3=K3*(param.x3*((param.S0-(G(4)+G(3)+G(2)+G(1)))-(G(4)))-y3)/pH;
V4=K5*(param.x5*((param.S0-(G(4)+G(3)+G(2)+G(1)))-(G(4)))-y5)/pH;

dGdt(4)=V4;                    %Para maltopentosa
dGdt(3)=V3;                    %Para maltotriosa
dGdt(2)=V2;                    %Para maltosa
dGdt(1)=V1;                    %Para glucosa

end
```

ANEXO 9. Resultados de cinética del proceso de licuefacción para almidón de trigo puro

Tiempo (H)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	19,943	22,612	28,049	44,163
	24,001	26,914	33,554	53,245
	23,982	27,055	34,526	53,645
1	38,241	40,314	52,013	83,134
	45,623	50,009	62,442	101,242
	46,399	46,549	60,517	95,458
1,5	48,134	52,035	65,134	110,543
	52,441	57,145	58,248	100,244
	49,5	59,546	59,978	114,278
2	53,245	58,356	71,633	108,352
	48,982	53,245	69,237	99,802
	49,033	62,009	66,16	108,775
3	57,242	63,135	67,634	112,425
	51,21	58,245	61,452	102,253
	57,301	58,722	64,876	113,36
4	54,134	64,144	67,245	118,256
	50,134	55,444	61,523	100,145
	55,992	58,675	65,485	112,334

ANEXO 10. Resultados de cinética del proceso de licuefacción para el residuo agroindustrial

Tiempo (H)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	15,352	18,134	19,167	22,042
	18,251	17,133	23,145	26,145
	17,799	16,159	21,09	24,602
1	30,124	31,13	37,041	43,042
	36,134	37,152	42,313	52,134
	36,444	34,399	41,285	49,229
1,5	41,312	44,241	49,043	60,581
	46,121	47,31	56,248	67,145
	44,969	47,487	53,271	61,742
2	47,245	50,134	55,245	70,63
	45,145	46,378	50,134	64,245
	41,179	50,026	55,19	69,563
3	42,342	46,351	55,243	67,352
	48,145	51,051	50,134	62,514
	44,675	48,167	56,935	70,672
4	44,241	51,562	57,121	68,245
	48,13	47,134	52,144	63,145
	43,685	51,706	55,78	70,678

ANEXO 11. Código de programación en Matlab para el proceso de sacarificación

```
%Instrucciones para limpiar la hoja de trabajo y la memoria en Matlab
%Cierra todos los gráficos abiertos al momento
close all
%Borra todas las variables existentes hasta el momento
clear all
%Definición de Condiciones iniciales y parámetros del sistema
param.T=273.15+ 73.5;    %temperatura en Kelvin

param.Ks=0.1499;         %mol/l  Constante de inhibicion de sustrato
param.KI=0.0472;          %mol/l  Constante de inhibición de producto
param.Kd=0.5136;       %1/h    Constante de desactivación enzimática
param.Ea=50604;         %cal/mol  Constante de activación
param.R=1.9872;         %cal/mol K   Constante universal de los gases
param.E0=0.922;           %mL/L    Concentración inicial de enzima

param.V0mx2=6.7097E+31;    %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial
param.V0mx3=3.4101E+33;   %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial
param.V0mx4=4.8010E+31;    %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial

param.Km2=0.005;        %mol/l    Constante de Michaelis menten
param.Km3=0.0553;       %mol/l    Constante de Michaelis menten
param.Km4=0.014;       %mol/l    Constante de Michaelis menten

param.Keq1=0.0544;      % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación
param.Keq2=200;         % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación
param.Keq3=2.8105;           % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación

param.H= 10^(-4.7);
param.KEH=2.933519E-04;                           %constante de
equilibrio para las reacciones de protonación
param.KEOH=3.484279E+08;                      %constantes de
equilibrio para las reacciones de hidroxilación
param.Kw= 1e-14;                             %constante de disociación
del agua

%CONDICIONES INICIALES
G10= 52.537286/180.1559;%[mol/l]
G20= 3.118/(342);      %[mol/l]
G30= 4.637/(504);      %[mol/l]
G40= 100.770/(828);     %[mol/l]

%Definición de ecuaciones para la solución del modelo
[t, G]= ode15s(@saccarfication,[0 6],[G10 G20 G30 G40],[],param);

figure

tiempo=[0 0.166 0.3 0.5 1.0 1.5 2 2.5 3 4 5 6];
Glucosaexp=[52.537 76.364 94.447 110.335 127.200 133.858 140.019
150.543 143.957 150.739 150.434 160.519];
Maltosaexp=[3.118 6.017 6.508 5.142 4.380 4.000 3.671 3.205 2.821
2.407 2.291 2.245];
```

```
Maltotriosaexp=[4.637 3.481 2.996 3.254 3.001 2.573 1.990 1.818 1.549
1.721 1.053 1.184];
Maltopentosaexp=[100.770 71.918 57.536 45.946 43.101 20.136 26.088
7.786 8.510 6.864 15.450 12.338];

plot(G1.time,G1.signals.values*180.1559,'blue','linewidth',2);
xlabel('Tiempo (h)'); ylabel('Concentración (g/L)'); hold on; grid on;
plot(G2.time,G2.signals.values*342,'green','linewidth',2); hold on;
plot(G3.time,G3.signals.values*504,'black','linewidth',2); hold on;
plot(G4.time,G4.signals.values*828,'red','linewidth',2); hold on;
plot(tiempo,Glucosaexp,'ob',tiempo,Maltosaexp,'og',tiempo,Maltotriosae
xp,'ok',tiempo,Maltopentosaexp,'or');
legend('Glucosa','Maltosa','Maltotriosa','Maltopentosa','Glucosa-
exp','Maltosa-exp','Maltotriosaexp','Maltopentosaexp')

G1_error=[G1.signals.values(1,1);
G1.signals.values(18,1);G1.signals.values(22,1);G1.signals.values(26,1
);G1.signals.values(36,1);G1.signals.values(41,1);G1.signals.values(45
,1);G1.signals.values(49,1);G1.signals.values(57,1);G1.signals.values(
66,1);G1.signals.values(74,1)].*180.1559;
G2_error=[G2.signals.values(1,1);
G2.signals.values(18,1);G2.signals.values(22,1);G2.signals.values(26,1
);G2.signals.values(36,1);G2.signals.values(41,1);G2.signals.values(45
,1);G2.signals.values(49,1);G2.signals.values(57,1);G2.signals.values(
66,1);G2.signals.values(74,1)].*342;
G3_error=[G3.signals.values(1,1);
G3.signals.values(18,1);G3.signals.values(22,1);G3.signals.values(26,1
);G3.signals.values(36,1);G3.signals.values(41,1);G3.signals.values(45
,1);G3.signals.values(49,1);G3.signals.values(57,1);G3.signals.values(
66,1);G3.signals.values(74,1)].*504;
G4_error=[G4.signals.values(1,1);
G4.signals.values(18,1);G4.signals.values(22,1);G4.signals.values(26,1
);G4.signals.values(36,1);G4.signals.values(41,1);G4.signals.values(45
,1);G4.signals.values(49,1);G4.signals.values(57,1);G4.signals.values(
66,1);G4.signals.values(74,1)].*828;


ERROR1=(abs(Glucosaexp'-G1_error)./(max(Glucosaexp)-
min(Glucosaexp)))*100;
ERROR2=(abs(Maltosaexp'-G2_error)./(max(Maltosaexp)-
min(Maltosaexp)))*100;
ERROR3=(abs(Maltotriosaexp'-G3_error)./(max(Maltotriosaexp)-
min(Maltotriosaexp)))*100;
ERROR4=(abs(Maltopentosaexp'-G4_error)./(max(Maltopentosaexp)-
min(Maltopentosaexp)))*100;

ER1average=sum(ERROR1)/11;
ER2average=sum(ERROR2)/11;
ER3average=sum(ERROR3)/11;
ER4average=sum(ERROR4)/11;

function dGdt=saccarfication(t,G,param)

dGdt=zeros(4,1);

E=param.E0*exp(-param.Kd*t);

pH=(1+(param.H/param.KEH)+((param.Kw/param.KEOH)*(1/param.H)))
```

```
Vmx2= param.V0mx2*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));
Vmx3= param.V0mx3*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));
Vmx4= param.V0mx4*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));

F=((G(2)/param.Km2)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4));

r2=((Vmx2*(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2))*E)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r3=((Vmx3*(G(3)-
((G(2)*G(1))/param.Keq3))*E)/(param.Km3*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r5=((Vmx4*G(4)*E)/(param.Km4*(1+(G(1)/param.KI)+(1/param.Ks)+F)))/pH;

dGdt(4)=(-r5);                    %Para maltopentosa
dGdt(3)=(r5-r3);                  %Para maltotriosa
dGdt(2)=(r3-r2);                  %Para maltosa
dGdt(1)=(2*(r5)+r3+2*r2);         %Para glucosa

return
```

ANEXO 12. Resultados de cinética del proceso de sacarificación para almidón de trigo puro

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	53,145	3,241	4,722	101,334
	51,578	3,103	4,544	99,823
	52,888	3,01	4,645	101,153
0,2	77,362	6,244	3,513	72,341
	74,146	5,98	3,33	70,451
	77,584	5,827	3,6	72,962
0,3	95,256	6,651	3,023	55,245
	92,134	6,321	2,951	58,134
	95,951	6,552	3,014	59,229
0,5	108,543	5,244	3,402	46,425
	113,211	5,013	3,118	48,431
	109,251	5,169	3,242	42,982
1	129,234	4,423	3,01	44,234
	124,623	4,249	2,895	41,448
	127,743	4,468	3,098	43,621
1,5	132,146	4,034	2,624	21,466
	134,152	3,864	2,44	19,454
	135,276	4,102	2,655	19,488
2	138,946	3,723	2,042	27,451
	142,112	3,519	1,908	24,636
	138,999	3,771	2,02	26,177
2,5	148,705	3,151	1,912	7,924
	150,335	3,413	1,746	7,514
	152,589	3,114	1,796	7,92
3	144,224	2,924	1,642	8,724
	142,456	2,672	1,512	8,145
	145,191	2,867	1,493	8,661
4	149,788	2,541	1,646	6,912
	152,33	2,244	1,853	6,41
	150,099	2,436	1,664	7,27
5	150,234	2,314	1,078	15,245
	152,566	2,191	1,042	15,345
	148,502	2,368	1,039	15,76
6	158,984	2,331	1,175	12,414
	162,553	2,131	1,157	12,113
	160,02	2,273	1,22	12,487

ANEXO 13. Resultados de cinética del proceso de sacarificación para el residuo agroindustrial

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	42,524	4,714	6,261	67,256
	40,134	4,901	6,514	69,145
	41,350	4,872	6,467	68,547
0,2	50,134	8,102	5,783	44,414
	52,524	8,416	5,903	41,256
	52,478	8,331	5,717	44,758
0,3	58,983	8,624	4,724	37,256
	56,134	8,814	4,924	39,134
	58,883	8,809	4,833	38,693
0,5	83,413	8,152	5,145	30,156
	85,032	7,914	4,862	32,127
	84,539	8,189	5,020	31,977
1	89,135	5,624	3,861	27,256
	87,563	5,392	4,014	25,613
	88,565	5,664	3,900	26,814
1,5	95,256	5,401	4,103	28,256
	93,524	5,252	4,315	26,261
	93,322	5,496	4,194	27,263
2	106,256	4,750	3,201	13,614
	103,792	4,936	3,413	12,524
	107,139	4,897	3,301	13,450
2,5	108,098	4,414	3,285	12,562
	112,526	4,632	3,145	13,145
	110,570	4,745	3,185	12,381
3	101,612	4,251	3,013	18,622
	99,712	4,413	3,211	17,424
	101,118	4,488	3,091	16,583
4	112,452	4,018	3,052	8,621
	109,256	4,251	2,932	8,901
	109,450	4,184	3,106	8,614
5	105,143	3,673	3,252	21,345
	103,523	3,414	3,401	19,613
	103,916	3,632	3,388	20,257
6	112,014	3,783	2,978	16,145
	108,256	3,913	3,012	14,610
	112,328	3,860	3,013	14,959

ANEXO 14. Código de programación en R

```
install.packages("readxl")
install.packages("rsm")
library(readxl)
HPLC<- read_excel("HPLC.xlsx")
View(HPLC)
attach(HPLC)
library(rsm)
Model1<-rsm(Glucose ~ FO(pH,Temperature) + TWI(pH,Temperature) +
PQ(pH,Temperature), data=HPLC)
summary(Model1)
persp(Model1,c(~pH*Temperature),contours="col",col=rainbow(50,end=5/6),atpos=1,x
labs = c("pH","Temperature (°C)"),zlab=c("Glucose (g/L)"))
```

ANEXO 15. Resultados de almidón de trigo puro 10% de sólidos modo discontinuo

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	31,522	3,379	3,101	85,170
	30,422	3,103	2,921	81,972
	32,511	2,782	3,224	80,664
0,2	40,324	5,913	4,331	79,673
	35,456	5,513	3,984	70,741
	30,420	4,837	3,730	80,211
0,3	56,245	5,755	4,925	63,624
	55,250	5,456	4,342	61,426
	46,068	5,742	4,383	55,223
0,5	52,455	6,820	4,534	54,255
	48,645	6,031	3,897	54,535
	51,045	6,610	3,647	46,505
1,5	85,135	5,834	3,814	30,562
	77,566	5,713	3,524	34,526
	78,235	5,322	3,558	27,558
2	82,266	5,313	3,713	38,145
	81,512	5,513	3,313	32,644
	70,567	5,500	3,177	36,548
2,5	85,345	5,151	3,201	40,369
	82,367	4,872	3,146	34,251
	70,824	5,040	2,953	39,266
3	92,010	4,324	2,915	20,524
	91,682	4,753	2,452	25,143
	84,034	4,747	2,559	27,827
4	93,270	4,324	2,413	32,520
	97,467	4,312	2,821	28,381
	99,729	3,712	2,935	24,185
5	94,511	4,144	2,902	27,256
	95,741	4,425	2,511	22,138
	87,044	4,937	3,050	29,272
6	100,090	4,301	2,713	19,124
	96,423	3,968	2,421	15,623
	96,326	3,791	2,477	21,302

ANEXO 16. Resultados del residuo agroindustrial 10% de sólidos modo discontinuo

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0	12,315	3,724	5,013	37,256
	11,413	3,644	5,314	38,145
	10,211	4,071	5,009	35,638
0,2	21,344	6,754	4,613	24,414
	19,623	7,324	4,318	21,256
	21,109	6,667	4,662	23,693
0,3	28,134	6,724	4,714	22,256
	24,613	7,031	4,463	19,134
	23,591	7,038	4,356	18,649
0,5	30,521	6,111	4,945	25,135
	31,613	6,513	4,962	21,824
	35,852	6,744	4,649	21,864
1	42,144	5,413	4,382	16,245
	40,631	5,802	4,423	13,513
	36,700	5,963	4,725	17,084
1,5	41,513	5,141	4,103	9,864
	37,513	5,102	4,315	12,142
	35,607	4,796	4,542	11,039
2	37,613	5,214	4,032	6,336
	36,514	4,835	4,274	6,535
	42,675	4,723	4,477	4,874
2,5	46,513	4,424	3,664	7,835
	43,623	4,814	3,905	8,127
	42,515	5,018	4,047	10,321
3	45,131	4,024	3,624	8,133
	42,524	4,344	3,650	7,845
	41,738	4,178	3,262	10,155
4	44,613	4,141	3,422	5,326
	43,134	3,785	3,706	5,313
	45,819	4,107	3,825	3,800
5	46,256	3,611	3,325	6,956
	49,132	3,816	3,603	7,655
	47,475	4,048	3,698	9,635
6	47,124	4,224	3,810	6,654
	45,134	3,913	3,524	6,412
	48,268	3,638	3,559	5,120

ANEXO 17. Propiedades de componentes de reacción

Dato	Unidades	Valor
Peso molecular glucosa	g/mol	180.2
Peso molecular maltosa	g/mol	342.3
Peso molecular maltotriosa	g/mol	504.4
Peso molecular maltopentosa	g/mol	828
Viscosidad del agua a 61.5°C	cP	0.46
Densidad glucosa	g/mL	1.54

ANEXO 18. Código de programación en Matlab para modelo heterogéneo

```
function [G] =
saccarification4_residuo_ALMIDON_karen_proporcion(~,~,param)
close all;
clc;

%%%%%%% Parámetros%%%%%%%%%%%%
load est_sacca_almidon_batch7.mat
param.T=273.15+61.5;     %temperatura en Kelvin

param.Ks=0.1499;          %mol/l  Constante de inhibicion de sustrato
param.KI=0.0472;           %mol/l  Constante de inhibición de producto
param.Kd=0.5136;        %1/h    Constante de desactivación enzimática
param.Ea=50604;          %cal/mol  Constante de activación
param.R=1.9872;          %cal/mol K   Constante universal de los gases
param.E0=0.4610;            %mL/L    Concentración inicial de enzima

param.V0mx2=5.4782e+32;     %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial
param.V0mx3=1.8352e+34;    %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial
param.V0mx4=6.0045e+32;     %(mol/h mlenzyme)    Constante de velocidad
máxima inicial

param.Km2=0.0050;         %mol/l    Constante de Michaelis menten
param.Km3=0.0553;        %mol/l    Constante de Michaelis menten
param.Km4=0.014;        %mol/l    Constante de Michaelis menten

param.Keq1=0.0544;       % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación
param.Keq2=200;          % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación
param.Keq3=2.8105;            % mol/l   Constante de equilibrio de la
reacción de condensación

param.H= 10^(-4.8);
param.KEH=2.707086E-04;                            %constante de
equilibrio para las reacciones de protonación
param.KEOH=4.288763E+08;                       %constantes de
equilibrio para las reacciones de hidroxilación
param.Kw=1e-14;                             %constante de disociación
del agua

param.di=1/(10*100);     %m          Diámetro interno de la fibra
param.ri=param.di/2;     %m          radio interno de la fibra
param.de=2/(10*100);     %m          Diámetro externo de la fibra
param.re=param.de/2;     %m          radio externo de la fibra
param.b=param.re-param.ri;           %m          Espesor de la fibra

param.L=0.11;            %m          longitud del modulo
param.difefM2=9.31443e-10;  %m2/s       Difusividad efectiva maltosa
param.difM2=1.31262e-9;   %m2/s        Difusividad maltosa
param.difefM3=5.79625e-10;  %m2/s       Difusividad efectiva
maltotriosa
param.difM3=8.16825e-10;   %m2/s        Difusividad maltotriosa
param.difefM5=1.55509e-10;  %m2/s       Difusividad efectiva
maltopentosas
param.difM5=2.19148e-10;   %m2/s        Difusividad maltopentosas
```

```
param.dh=0.003545469;    %m         Diámetro hidráulico

%CONDICIONES INICIALES

G10= 31.545/180.1559;    %[mol/l]
G20= 3.392/(342.3);      %[mol/l]
G30= 3.335/(504.4);      %[mol/l]
G40= 83.6/(828);     %[mol/l]

[t, G]= ode15s(@saccarfication4,[0 6.5],[G10 G20 G30 G40],[],param);

%%GRÁFICAS

figure (3)
%datos experimentales del heterogeneo en g/L
tiempog=[0 0.2 0.3 0.5 0.666666667 0.833333333 1 1.25 1.5 1.75 2 2.5 3
3.5 4.5 5.5 6.5];
GlucosaexpgL=[31.545 38.442 49.633 54.732 61.555 63.819 60.565 67.681
62.051 65.808 70.415 74.231 70.271 77.112 72.721 72.713 78.889];
MaltosaexpgL=[3.392 6.041 5.511 6.302 6.181 6.772 6.861 6.522 6.286
6.996 6.392 6.080 6.474 6.327 6.412 5.721 5.681];
MaltotriosaexpgL=[3.335 4.057 4.344 4.384 4.296 4.141 4.272 4.136
4.202 4.422 4.159 4.144 4.209 4.213 3.902 4.017 3.885];
MaltopentosaexpgL=[83.600 75.427 65.531 52.316 50.705 54.523 56.073
45.527 43.612 50.061 43.188 48.480 40.738 45.951 37.024 44.022
37.020];

Glucosastd=[0.69 3.41 4.06 3.12 3.84 4.98 3.45 6.09 4.56 2.74 1.76
5.17 4.00 5.10 4.50 6.35 4.41];
Maltosastd=[0.04 1.04 0.42 0.15 0.42 0.55 0.32 0.20 0.16 0.58 0.13
0.29 0.38 0.36 0.33 0.36 0.25];
Maltotriosastd=[0.01 0.40 0.08 0.20 0.03 0.18 0.01 0.17 0.01 0.34 0.02
0.01 0.16 0.17 0.09 0.01 0.17];
Maltopentosastd=[0.08 1.73 1.15 3.69 2.25 2.64 4.66 3.75 3.92 4.44
3.73 4.64 2.21 4.15 3.02 3.39 1.72];

plot(t,(G(:,1)*180.1559),'blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Concentración (g/L)'); hold on; grid on;
plot(t,(G(:,2)*342.3),'green','linewidth',2); hold on;
plot(t,(G(:,3)*504.4),'black','linewidth',2); hold on;
plot(t,(G(:,4)*828),'red','linewidth',2); hold on;
plot(tiempog,GlucosaexpgL,'ob',tiempog,MaltosaexpgL,'og',tiempog,Malto
triosaexpgL,'ok',tiempog,MaltopentosaexpgL,'or');
errorbar(tiempog,GlucosaexpgL,Glucosastd,'ob'); hold on;
errorbar(tiempog,MaltosaexpgL,Maltosastd,'og'); hold on;
errorbar(tiempog,MaltotriosaexpgL,Maltotriosastd,'ok'); hold on;
errorbar(tiempog,MaltopentosaexpgL,Maltopentosastd,'or'); hold on;
legend('Glucosa','Maltosa','Maltotriosa','Maltopentosa','Glucosa-
exp','Maltosa-exp','Maltotriosa-exp','Maltopentosa-exp')
axis([0,6.5,0,90])

cont1=1;
cont2=1;
cont3=1;
cont4=1;
cont5=1;
cont6=1;
cont7=1;
cont8=1;
cont9=1;
```

```
cont10=1;
cont11=1;
cont12=1;
cont13=1;
cont14=1;
cont15=1;
cont16=1;
cont17=1;

for i=1:size(G,1)
if t(i)>=0 && t(i)<0.2
  G1_error1(cont1,1)=G(i,1);
  G2_error1(cont1,1)=G(i,2);
  G3_error1(cont1,1)=G(i,3);
  G4_error1(cont1,1)=G(i,4);
  cont1=cont1+1;
elseif t(i)>=0.2 && t(i)<0.3
  G1_error2(cont2,1)=G(i,1);
  G2_error2(cont2,1)=G(i,2);
  G3_error2(cont2,1)=G(i,3);
  G4_error2(cont2,1)=G(i,4);
  cont2=cont2+1;
elseif t(i)>=0.3 && t(i)<0.5
  G1_error3(cont3,1)=G(i,1);
  G2_error3(cont3,1)=G(i,2);
  G3_error3(cont3,1)=G(i,3);
  G4_error3(cont3,1)=G(i,4);
  cont3=cont3+1;
elseif t(i)>=0.5 && t(i) <0.7
  G1_error4(cont4,1)=G(i,1);
  G2_error4(cont4,1)=G(i,2);
  G3_error4(cont4,1)=G(i,3);
  G4_error4(cont4,1)=G(i,4);
  cont4=cont4+1;
elseif t(i)>=0.7 && t(i) <0.8
  G1_error5(cont5,1)=G(i,1);
  G2_error5(cont5,1)=G(i,2);
  G3_error5(cont5,1)=G(i,3);
  G4_error5(cont5,1)=G(i,4);
  cont5=cont5+1;
elseif t(i)>=0.8 && t(i) <1
  G1_error6(cont6,1)=G(i,1);
  G2_error6(cont6,1)=G(i,2);
  G3_error6(cont6,1)=G(i,3);
  G4_error6(cont6,1)=G(i,4);
  cont6=cont6+1;
elseif t(i)>=1 && t(i) <1.25
  G1_error7(cont7,1)=G(i,1);
  G2_error7(cont7,1)=G(i,2);
  G3_error7(cont7,1)=G(i,3);
  G4_error7(cont7,1)=G(i,4);
  cont7=cont7+1;
elseif t(i)>=1.25 && t(i) <1.5
  G1_error8(cont8,1)=G(i,1);
  G2_error8(cont8,1)=G(i,2);
  G3_error8(cont8,1)=G(i,3);
  G4_error8(cont8,1)=G(i,4);
  cont8=cont8+1;
elseif t(i)>=1.5 && t(i) <1.75
  G1_error9(cont9,1)=G(i,1);
  G2_error9(cont9,1)=G(i,2);
```

```
  G3_error9(cont9,1)=G(i,3);
  G4_error9(cont9,1)=G(i,4);
  cont9=cont9+1;
elseif t(i)>=1.75 && t(i) <2
  G1_error10(cont10,1)=G(i,1);
  G2_error10(cont10,1)=G(i,2);
  G3_error10(cont10,1)=G(i,3);
  G4_error10(cont10,1)=G(i,4);
  cont10=cont10+1;
elseif t(i)>=2 && t(i) <2.25
  G1_error11(cont11,1)=G(i,1);
  G2_error11(cont11,1)=G(i,2);
  G3_error11(cont11,1)=G(i,3);
  G4_error11(cont11,1)=G(i,4);
  cont11=cont11+1;
elseif t(i)>=2.25 && t(i) <2.56
  G1_error12(cont12,1)=G(i,1);
  G2_error12(cont12,1)=G(i,2);
  G3_error12(cont12,1)=G(i,3);
  G4_error12(cont12,1)=G(i,4);
  cont12=cont12+1;
elseif t(i)>=2.6 && t(i) <3
  G1_error13(cont13,1)=G(i,1);
  G2_error13(cont13,1)=G(i,2);
  G3_error13(cont13,1)=G(i,3);
  G4_error13(cont13,1)=G(i,4);
  cont13=cont13+1;
elseif t(i)>=3 && t(i) <3.5
  G1_error14(cont14,1)=G(i,1);
  G2_error14(cont14,1)=G(i,2);
  G3_error14(cont14,1)=G(i,3);
  G4_error14(cont14,1)=G(i,4);
  cont14=cont14+1;
elseif t(i)>=3.5 && t(i) <4.5
  G1_error15(cont15,1)=G(i,1);
  G2_error15(cont15,1)=G(i,2);
  G3_error15(cont15,1)=G(i,3);
  G4_error15(cont15,1)=G(i,4);
  cont15=cont15+1;
elseif t(i)>=4.5 && t(i) <5.5
  G1_error16(cont16,1)=G(i,1);
  G2_error16(cont16,1)=G(i,2);
  G3_error16(cont16,1)=G(i,3);
  G4_error16(cont16,1)=G(i,4);
  cont16=cont16+1;
elseif t(i)>=5.5 && t(i) <6.5
  G1_error17(cont17,1)=G(i,1);
  G2_error17(cont17,1)=G(i,2);
  G3_error17(cont17,1)=G(i,3);
  G4_error17(cont17,1)=G(i,4);
  cont17=cont17+1;
end
end

G1_error=[G1_error1(1,1);G1_error2(1,1);G1_error3(1,1);G1_error4(1,1);
G1_error5(1,1);G1_error6(1,1);G1_error7(1,1);G1_error8(1,1);G1_error9(
1,1);G1_error10(1,1);G1_error11(1,1);G1_error12(1,1);G1_error13(1,1);G
1_error14(1,1);G1_error15(1,1);G1_error16(1,1);G1_error17(1,1)]*180.15
59;
G2_error=[G2_error1(1,1);G2_error2(1,1);G2_error3(1,1);G2_error4(1,1);
G2_error5(1,1);G2_error6(1,1);G2_error7(1,1);G2_error8(1,1);G2_error9(
```

```
1,1);G2_error10(1,1);G2_error11(1,1);G2_error12(1,1);G2_error13(1,1);G
2_error14(1,1);G2_error15(1,1);G2_error16(1,1);G2_error17(1,1)]*342;
G3_error=[G3_error1(1,1);G3_error2(1,1);G3_error3(1,1);G3_error4(1,1);
G3_error5(1,1);G3_error6(1,1);G3_error7(1,1);G3_error8(1,1);G3_error9(
1,1);G3_error10(1,1);G3_error11(1,1);G3_error12(1,1);G3_error13(1,1);G
3_error14(1,1);G3_error15(1,1);G3_error16(1,1);G3_error17(1,1)]*504;
G4_error=[G4_error1(1,1);G4_error2(1,1);G4_error3(1,1);G4_error4(1,1);
G4_error5(1,1);G4_error6(1,1);G4_error7(1,1);G4_error8(1,1);G4_error9(
1,1);G4_error10(1,1);G4_error11(1,1);G4_error12(1,1);G4_error13(1,1);G
4_error14(1,1);G4_error15(1,1);G4_error16(1,1);G4_error17(1,1)]*828;

ERROR1=(abs(GlucosaexpgL'-G1_error)./(max(GlucosaexpgL)-
min(GlucosaexpgL)))*100;
ERROR2=(abs(MaltosaexpgL'-G2_error)./(max(MaltosaexpgL)-
min(MaltosaexpgL)))*100;
ERROR3=(abs(MaltotriosaexpgL'-G3_error)./(max(MaltotriosaexpgL)-
min(MaltotriosaexpgL)))*100;
ERROR4=(abs(MaltopentosaexpgL'-G4_error)./(max(MaltopentosaexpgL)-
min(MaltopentosaexpgL)))*100;

ER1average=sum(ERROR1)/17
ER2average=sum(ERROR2)/17
ER3average=sum(ERROR3)/17
ER4average=sum(ERROR4)/17
return

function [dGdt]=saccarfication4(t,G,param)

dGdt=zeros(4,1);

alpha=0.3191; % PROPORCION DE ENZIMAS
activas=0.8; %PROPORCIÓN DE ENZIMAS INMOVILIZADAS Y ACTIVAS SEGÚN
REFERENCIAS Y AJUSTE DEL MODELO

E=param.E0*exp(-param.Kd*t);
if t<0.7  % antes de 30 min se usan todas la enzimas
    E1=E;
    E2=0;
else
    E1=alpha*E; %LIBRES
    E2=(1-alpha)*activas*E; %EN LA MEMBRANA

end

pH=(1+(param.H/param.KEH)+((param.Kw/param.KEOH)*(1/param.H)));

Vmx2= param.V0mx2*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));
Vmx3= param.V0mx3*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));
Vmx4= param.V0mx4*exp(-param.Ea/(param.R*param.T));

F=((G(2)/param.Km2)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4));

r2L=((Vmx2*(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2))*E1)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r3L=((Vmx3*(G(3)-
((G(2)*G(1))/param.Keq3))*E1)/(param.Km3*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r5L=((Vmx4*G(4)*E1)/(param.Km4*(1+(G(1)/param.KI)+(1/param.Ks)+F)))/pH
;
if t>=0.7
```

```
r2m=((Vmx2*(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2))*E2)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r3m=((Vmx3*(G(3)-
((G(2)*G(1))/param.Keq3))*E2)/(param.Km3*(1+(G(1)/param.KI)+F)))/pH;
r5m=((Vmx4*G(4)*E2)/(param.Km4*(1+(G(1)/param.KI)+(1/param.Ks)+F)))/pH
;
end

%%%TRANFERENCIA DE MASA INTERNA%%%

%MALTOSA
if t >= 0.7
w2=param.Km3*param.Km4*G(1)+param.KI*param.Km4*G(3)+param.KI*param.Km3
*G(4);
q2=param.KI*param.Km3*param.Km4;
alpha11=param.Km2/G(2);
alpha21=G(2)/q2;
betaM2=alpha11*(1+w2*alpha21);

fun1 = @(x1) param.difefM2*((Vmx2*(x1-
(G(1)^2/param.Keq2))*E2)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+((x1/param.Km2)
+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4)))))/pH;
I1=integral(fun1,0,G(2),'ArrayValued',true);

ThielemmM2=(param.b/sqrt(2))*((Vmx2*(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2))*E2)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+((G(2)/param.Km
2)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4)))))/pH*(1/sqrt(I1));
if (ThielemmM2>0 && ThielemmM2<=1)
N0M2=1;
else
   N0M2=1/ThielemmM2;                        %Factor de efectividad
para orden cero
end

N1M2=tanh(ThielemmM2)/ThielemmM2  ;          %Factor de efectividad
para orden uno

NmintM2=(N0M2+(betaM2*N1M2))/(1+betaM2);      %Factor de efectividad
para Michaelis Menten

%% comprobar integral
%
ThielemmM2=(param.b/sqrt(2))*(sqrt(Vmx2/(param.difefM2*G(2))))*(1/(1+b
etaM2))*((1+(betaM2*log(betaM2/(1+betaM2))))^(-1/2))

% funp=@(x1) param.difefM2*((Vmx2*x1)/(param.Km2+x1));
% Ip=integral(funp,0,G(2),'ArrayValued',true);
%
% phi=(param.b/sqrt(2))*((Vmx2*G(2))/(param.Km2+G(2)))*(1/sqrt(Ip));
% a1=param.KI*param.Km2*param.Km3*param.Km4;
% a2=param.KI*param.Km2*param.Km3;
% a3=param.KI*param.Km2*param.Km4;
% a4=param.KI*param.Km3*param.Km4;
% a5=param.Km2*param.Km3*param.Km4;
%
% b1=E*param.KI*param.Km3*param.Km4;
% b2=E*param.Keq2*param.Km2*param.Km3*param.Km4;
% b3=E*param.KI*param.Keq2*param.Km2*param.Km3;
% b4=E*param.KI*param.Keq2*param.Km2*param.Km4;
% b5=E*param.KI*param.Keq2*param.Km2*param.Km3*param.Km4;
```

```
%
% c1=param.KI*param.Keq2*param.Km3*param.Km4*pH;
% d1=E/pH;
%

% l=(b1*G(1)^2+b2*G(1)+b3*G(4)+b4*G(3)+b5)/c1;
% l1=a1+a2*G(4)+a3*G(3)+a5*G(1);
% l2=a1+a2*G(4)+a3*G(3)+a4*G(2)+a5*G(1);
% alpha2=l*log(l1/l2);
% Ip=d1*G(2)+alpha2;
%
% phi2=(param.b/sqrt(2*param.difefM2*Vmx2))*((Vmx2*(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2))*E)/(param.Km2*(1+(G(1)/param.KI)+((G(2)/param.Km2
)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4)))))/pH*(1/sqrt(Ip));

%%

%MALTOTRIOSA

w3=param.Km2*param.Km4*G(1)+param.KI*param.Km4*G(2)+param.KI*param.Km2
*G(4);
q3=param.KI*param.Km2*param.Km4;
alpha12=param.Km3/G(3);
alpha22=G(3)/q3;
betaM3=alpha12*(1+w3*alpha22);
fun2 = @(x2) param.difefM3*((Vmx3*(x2-
((G(2)*G(1))/param.Keq3))*E2)/(param.Km3*(1+(G(1)/param.KI)+((G(2)/par
am.Km2)+(x2/param.Km3)+(G(4)/param.Km4)))))/pH;
I2=integral(fun2,0,G(3),'ArrayValued',true);
ThielemmM3=(param.b/sqrt(2))*((Vmx3*(G(3)-
((G(2)*G(1))/param.Keq3))*E2)/(param.Km3*(1+(G(1)/param.KI)+((G(2)/par
am.Km2)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4)))))/pH*(1/sqrt(I2));

if (ThielemmM3>0 && ThielemmM3<=1)
N0M3=1;
else
   N0M3=1/ThielemmM3;                        %Factor de efectividad
para orden cero
end

N1M3=tanh(ThielemmM3)/ThielemmM3  ;          %Factor de efectividad
para orden uno

NmintM3=(N0M3+(betaM3*N1M3))/(1+betaM3);         %Factor de
efectividad para Michaelis Menten

%MALTOPENTOSA

w5=param.Ks*param.Km2*param.Km3*G(1)+param.Ks*param.KI*param.Km3*G(2)+
param.KI*param.Km2*param.Km3;
q5=param.KI*param.Ks*param.Km2*param.Km3;
alpha13=param.Km4/G(4);
alpha23=G(4)/q5;
betaM5=alpha13*(1+w5*alpha23);
fun3 = @(x3)
param.difefM5*((Vmx4*x3*E2)/(param.Km4*(1+(G(1)/param.KI)+(1/param.Ks)
+((G(2)/param.Km2)+(G(3)/param.Km3)+(x3/param.Km4)))))/pH;
I3=integral(fun3,0,G(4),'ArrayValued',true);
```

```
ThielemmM5=(param.b/sqrt(2))*((Vmx4*G(4)*E2)/(param.Km4*(1+(G(1)/param
.KI)+(1/param.Ks)+((G(2)/param.Km2)+(G(3)/param.Km3)+(G(4)/param.Km4))
)))/pH*(1/sqrt(I3));

if (ThielemmM5>0 && ThielemmM5<=1)
N0M5=1;
else
   N0M5=1/ThielemmM5;                        %Factor de efectividad
para orden cero
end

N1M5=tanh(ThielemmM5)/ThielemmM5  ;          %Factor de efectividad
para orden uno

NmintM5=(N0M5+(betaM5*N1M5))/(1+betaM5);         %Factor de
efectividad para Michaelis Menten

end
%%%% TRANSFERENCIA DE MASA EXTERNA %%%

% Caudal proveniente del Flux variable en el tiempo:
if (0<=t && t<=0.5)
Caudal=0;
elseif(0.5<t && t<=0.7)
Caudal=1.89E-07;
elseif(0.7<t && t<=0.8)
Caudal=1.62E-07;
elseif(0.8<t && t<=1)
Caudal=1.44E-07;
elseif(1<t && t<=1.25)
Caudal=1.40E-07;
elseif(1.25<t && t<=1.5)
Caudal=1.36E-07;
elseif(1.5<t && t<=1.75)
Caudal=1.35E-07;
elseif(1.75<t && t<=2)
Caudal=1.29E-07;
elseif(2<t && t<=2.5)
Caudal=1.23E-07;
elseif(2.5<t && t<=3)
Caudal=1.20E-07;
elseif(3<t && t<=3.5)
Caudal=1.15E-07;
elseif(3.5<t && t<=4.5)
Caudal=1.12E-07;
elseif(4.5<t && t<=5.5)
Caudal=1.12E-07;
elseif(5.5<t && t<=6.5)
Caudal=1.12E-07;
end

%%
if t>=0.7
Gr2=((param.b^2*Caudal)/(param.difM2*2.59182E-07));

if  Gr2 > 11
    ShiM2=(6.0*Gr2^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood

elseif Gr2 < 11
```

```
    ShiM2=(1.25*Gr2^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood
end
KsiM2=(ShiM2*param.difM2)/param.dh;                                 %m/s
Coeficiente de trasnferencia de masa
omegaM2=(param.b*r2m*NmintM2*1000/(60*60))/(KsiM2*G(2));
%modulo observable de transferencia de masa externa

CasM2=G(2)*(1-omegaM2);

Gr3=((param.b^2*Caudal)/(param.difM3*2.59182E-07));

if  Gr3 > 11
    ShiM3=(6.0*Gr3^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood

elseif Gr3 < 11
    ShiM3=(1.25*Gr3^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood
end
KsiM3=(ShiM3*param.difM3)/param.dh;                                 %m/s
Coeficiente de trasnferencia de masa
omegaM3=(param.b*r3m*NmintM3*1000/(60*60))/(KsiM3*G(3));
%modulo observable de transferencia de masa externa

if omegaM3>1
   CasM3=0;
elseif omegaM3<=1
    CasM3=G(3)*abs((1-omegaM3));
end

Gr5=((param.b^2*Caudal)/(param.difM5*2.59182E-07));

if  Gr5 > 11
    ShiM5=(6.0*Gr5^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood

elseif Gr5 < 11
    ShiM5=(1.25*Gr5^0.35);                                          %
Adimensional  Número de Sherwood
end
KsiM5=(ShiM5*param.difM5)/param.dh;                                 %m/s
Coeficiente de trasnferencia de masa
omegaM5=(param.b*r5m*NmintM5*1000/(60*60))/(KsiM5*G(4));
%modulo observable de transferencia de masa externa

CasM5=G(4)*(1-omegaM5);

D1=1+G(1)/param.KI+1/param.Ks+G(2)/param.Km2+G(3)/param.Km3+G(4)/param
.Km4;
D2=1+G(1)/param.KI+1/param.Ks+CasM2/param.Km2+CasM3/param.Km3+CasM5/pa
ram.Km4;
%%
%MALTOSA

NmextM2=((CasM2-(G(1)^2/param.Keq2))/(G(2)-
(G(1)^2/param.Keq2)))*(D1/D2);
```

```
    if (NmintM2 <0 || NmintM2>=0.71) && (NmextM2<0 || NmextM2>=0.71)
%Condicional cuando no influye externa ni interna
        NtotalM2=1;

    elseif (0< NmintM2)&&(NmintM2 <0.7) && (0< NmextM2)&&(NmextM2
<0.7) %Condicional cuando influyen externa e interna
        NtotalM2=NmintM2*NmextM2;

    elseif (NmintM2<0 || NmintM2>=0.71) && (0<NmextM2) &&
(NmextM2<0.7)  %Condicional cuando influye externa
        NtotalM2=NmextM2;

    elseif (0<NmintM2)&& (NmintM2<0.7) && (NmextM2<0 || NmextM2>=0.71)
%Condicional cuando influye interna
        NtotalM2=NmintM2;

    end


%MALTOTRIOSA

NmextM3=((CasM3-(G(1)*CasM2/param.Keq3))/(G(3)-
(G(1)*G(2)/param.Keq3)))*(D1/D2);


    if (NmintM3 <0 || NmintM3>=0.71) && (NmextM3<0 || NmextM3>=0.71)
%Condicional cuando no influye externa ni interna
        NtotalM3=1;

    elseif (0< NmintM3)&&(NmintM3 <0.7) && (0< NmextM3)&&(NmextM3
<0.7) %Condicional cuando influyen externa e interna

        NtotalM3=NmintM3*NmextM3;

    elseif (NmintM3<0 || NmintM3>=0.71) && (0<NmextM3) &&
(NmextM3<0.7)  %Condicional cuando influye externa
        NtotalM3=NmextM3;

    elseif (0<NmintM3)&& (NmintM3<0.7) && (NmextM3<0 || NmextM3>=0.71)
%Condicional cuando influye interna
        NtotalM3=NmintM3;

    end


%MALTOPENTOSA

NmextM5=((CasM5)/G(4))*(D1/D2);

    if (NmintM5 <0 || NmintM5>=0.71) && (NmextM5<0 || NmextM5>=0.71)
%Condicional cuando no influye externa ni interna
        NtotalM5=1;

    elseif (0< NmintM5)&&(NmintM5 <0.7) && (0< NmextM5)&&(NmextM5
<0.7) %Condicional cuando influyen externa e interna

        NtotalM5=NmintM5*NmextM5;
```

```
    elseif (NmintM5<0 || NmintM5>=0.71) && (0<NmextM5) &&
(NmextM5<0.7)  %Condicional cuando influye externa
        NtotalM5=NmextM5;

    elseif (0<NmintM5)&& (NmintM5<0.7) && (NmextM5<0 || NmextM5>=0.7)
%Condicional cuando influye interna
        NtotalM5=NmintM5;

    end
end
%%%% Ecuaciones diferenciales%%%%%
if (t>=0 && t<0.7)
dGdt(4)=(-r5L);                    %For Maltopentose
dGdt(3)=(r5L-r3L);                    %For Maltoriose
dGdt(2)=(r3L-r2L);                   %For Maltose
dGdt(1)=(2*r5L+r3L+2*r2L);           %For Glucose
else
        dGdt(4)=-(NtotalM5*r5m)-r5L;                   %For Maltopentose
        dGdt(3)=(NtotalM5*r5m)-(r3m*NtotalM3)+r5L-r3L; %For Maltoriose
        dGdt(2)=(r3m*NtotalM3)-(NtotalM2*r2m)+r3L-r2L; %For Maltose
dGdt(1)=(2*NtotalM5*r5m)+(r3m*NtotalM3)+(2*r2m*NtotalM2)+(2*r5L)+r3L+(
2*r2L);          %For Glucose
end

% %%%PLOTS%%%
if t>=0.7
figure(5)
plot(t, NmintM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad interno'); hold on; grid on;
plot(t, NmintM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad interno'); hold on; grid on;
plot(t, NmintM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad interno'); hold on; grid on;
legend('n-int-maltosa','n-int-maltotriosa','n-int-maltopentosa')
title('Coeficiente de efectividad TdeM int')
figure(6)
if (ThielemmM2 >3 && ThielemmM3 > 3 && ThielemmM5 > 3)
plot(t, ThielemmM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
plot(t, ThielemmM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
plot(t, ThielemmM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
legend('Thiele-maltosa','Thiele-maltotriosa','Thiele-maltopentosa')
title('Modulo de Thiele de Michaelis Menten')
else
figure(7)
plot(t, ThielemmM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
plot(t, ThielemmM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
plot(t, ThielemmM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo de Thiele'); hold on; grid on;
legend('Thiele-maltosa','Thiele-maltotriosa','Thiele-maltopentosa')
title('Modulo de Thiele de Michaelis Menten')
end
if (omegaM2 >1 && omegaM3 > 1 && omegaM5 > 1)
figure (8)
plot(t, omegaM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
```

```
plot(t, omegaM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
plot(t, omegaM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo(h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
legend('omega-maltosa','omega-maltotriosa','omega-maltopentosa')
title('Omega - TdeM externa')
else
figure (9)
plot(t, omegaM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
plot(t, omegaM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
plot(t, omegaM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo(h)');
ylabel('Módulo observable de TdeM externa (omega)'); hold on; grid on;
legend('omega-maltosa','omega-maltotriosa','omega-maltopentosa')
title('Omega - TdeM externa')
end
figure (10)
plot(t, NmextM2,'*blue','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad externo'); hold on; grid on;
plot(t, NmextM3,'*green','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad externo'); hold on; grid on;
plot(t, NmextM5,'*red','linewidth',2); xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Factor de efectividad externo'); hold on; grid on;
legend('n-ext-maltosa','n-ext-maltotriosa','n-ext-maltopentosa')
title('Coeficiente de efectividad TdeM ext')
end

return
```

ANEXO 19. Resultados de almidón de trigo puro 10% de sólidos con membranas

RETENIDO

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0,0	32,345	3,351	3,341	83,513
	31,123	3,412	3,321	84,443
	31,167	3,413	3,343	82,844
0,2	41,167	7,141	4,463	73,427
	34,623	5,086	4,041	76,444
	39,536	5,896	3,667	76,410
0,3	46,267	5,924	4,353	66,145
	54,147	5,523	4,423	66,244
	48,485	5,086	4,256	64,204
0,5	52,262	6,443	4,591	55,144
	53,693	6,313	4,372	48,144
	58,241	6,150	4,189	53,660
0,7	56,142	6,046	3,976	46,295
	53,717	5,841	3,933	49,115
	61,559	5,205	4,010	45,267
0,8	55,698	5,906	3,713	46,244
	50,839	5,409	3,659	45,706
	61,964	6,531	3,411	51,621
1,0	53,021	5,497	3,573	48,500
	50,425	5,707	3,497	41,271
	46,965	6,078	3,566	52,065
1,3	48,629	4,945	3,188	38,086
	46,743	4,740	3,140	32,786
	58,969	5,075	2,906	31,830
1,5	45,597	4,370	2,832	34,156
	40,469	4,210	2,829	25,705
	40,795	4,108	2,857	29,039
1,8	40,506	3,845	2,495	27,686
	39,535	4,438	2,500	29,546
	38,493	5,067	3,180	36,021
2,0	38,573	3,469	2,232	25,418
	35,285	3,375	2,188	22,881
	39,431	3,568	2,294	21,359
2,5	29,681	2,541	1,680	23,788
	26,742	2,499	1,657	17,935
	40,427	2,589	1,747	26,198
3,0	21,114	1,785	1,219	13,031
	21,413	1,696	1,157	12,582
	19,511	2,791	1,592	11,692
3,5	20,218	1,085	0,960	10,958

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
	17,060	0,981	0,840	16,453
	20,979	1,979	1,132	19,884
4,5	6,681	0,357	1,213	6,610
	3,526	0,690	1,257	3,243
	0,694	1,342	0,843	2,764
5,5	2,358	0,389	0,212	0,740
	2,536	0,087	0,145	9,151
	1,450	0,015	0,298	7,560
6,5	0,900	0,204	0,078	0,411
	0,252	0,130	0,039	4,160
	0,496	0,300	0,163	2,989

PERMEADO

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)	Volumen (L)	Flux ($L/m^2.h$)
0,7	59,402	6,312	4,283	52,130	0,114	179,4
	58,943	6,123	4,261	52,413	0,115	182,1
	56,861	6,771	4,272	46,663	0,111	175,4
0,8	58,985	6,412	4,210	54,130	0,192	151,4
	61,123	6,123	4,231	52,413	0,204	161
	56,901	6,551	4,225	47,663	0,187	147,7
1,0	62,123	6,312	4,201	54,130	0,253	133,3
	60,226	6,123	4,203	52,413	0,274	144
	58,560	6,681	4,202	45,863	0,251	132,1
1,3	65,953	6,312	4,210	45,134	0,378	132,5
	64,023	6,123	4,201	48,134	0,385	135,2
	63,890	6,711	4,225	41,438	0,367	128,8
1,5	65,133	6,312	4,164	41,254	0,498	131,1
	60,451	6,123	4,181	44,134	0,491	129,1
	55,754	6,456	4,171	43,018	0,481	126,5
1,8	67,246	6,312	4,210	47,134	0,62	130,4
	65,896	6,123	4,231	45,134	0,609	128,1
	61,699	6,444	4,138	48,465	0,593	124,7
2,0	70,407	6,312	4,151	45,013	0,701	123
	70,411	6,123	4,154	44,862	0,705	123,7
	70,422	6,471	4,121	39,185	0,68	119,3
2,5	71,654	6,312	4,143	44,135	0,896	117,8
	72,334	6,123	4,121	42,134	0,901	118,5
	68,226	5,451	4,132	44,537	0,871	114,6
3,0	71,879	6,312	4,014	40,134	1,088	114,5
	69,103	6,123	4,031	40,146	1,094	115,2
	66,129	5,871	4,015	37,926	1,048	110,3
3,5	67,421	6,211	3,813	37,135	1,248	109,4
	66,223	6,015	3,901	35,157	1,255	110,1
	75,147	5,780	3,992	36,914	1,229	107,8
4,5	64,122	5,342	3,312	31,134	1,63	107,2
	64,549	5,115	3,333	29,864	1,64	107,9

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)	Volumen (L)	Flux ($L/m^2.h$)
	63,312	5,149	3,921	30,208	1,587	104,4
5,5	55,123	4,153	2,814	29,214	2,032	106,9
	53,675	4,210	2,831	26,142	2,044	107,6
	48,451	4,021	2,821	29,850	1,98	104,2
6,5	45,723	3,522	2,414	22,155	2,431	106,6
	47,645	3,423	2,411	21,345	2,447	107,3
	52,561	3,233	2,230	20,706	2,374	104,1

ANEXO 20. Resultados del residuo agroindustrial 10% de sólidos con membranas

RETENIDO

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0,0	8,735	3,451	5,341	33,513
	9,625	3,412	5,321	34,443
	11,043	3,829	5,187	35,658
0,2	18,453	6,341	4,363	26,427
	16,144	5,986	4,341	27,444
	14,912	5,910	4,871	32,577
0,3	25,145	5,924	4,453	21,145
	22,856	6,523	4,723	19,244
	22,283	6,456	4,990	15,651
0,5	26,135	6,443	4,391	15,144
	27,536	6,313	4,372	17,144
	30,737	5,850	4,827	16,258
0,7	28,673	5,360	4,169	14,109
	31,309	6,135	4,127	13,155
	32,052	5,772	4,040	12,274
0,8	30,912	5,278	4,058	15,166
	27,701	5,956	4,037	15,902
	23,112	5,413	4,494	13,684
1,0	31,532	5,202	3,997	12,886
	28,537	4,936	3,974	11,047
	24,130	5,799	4,250	11,066
1,3	32,335	5,020	3,840	12,373
	26,633	4,809	3,806	15,059
	25,414	5,267	4,220	13,762
1,5	29,623	4,850	3,732	11,602
	30,314	4,611	3,705	12,952
	32,449	4,951	4,080	11,015
1,8	28,869	4,702	3,839	8,922
	34,135	4,589	3,611	8,653
	33,198	5,531	3,537	7,255
2,0	28,312	4,544	3,488	9,698
	28,577	4,388	3,440	8,852
	29,856	4,545	3,770	6,893
2,5	25,837	4,198	3,487	9,227
	29,209	4,071	3,243	7,266
	30,011	4,769	3,140	7,759
3,0	25,682	3,792	3,177	9,500
	28,791	3,973	3,122	9,376
	28,214	3,780	3,371	12,725
3,5	28,622	3,073	3,220	8,568
	25,166	3,572	3,052	7,953
	23,442	4,007	2,988	6,688
4,5	23,542	3,072	2,730	7,540
	22,991	3,477	2,781	7,653
	29,754	3,125	3,057	5,275
5,5	21,576	3,220	2,878	6,331
	23,729	2,937	2,555	5,833

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
	27,630	3,178	2,512	8,226
6,5	21,298	3,231	2,552	6,928
	21,751	3,047	2,506	6,400
	20,712	3,430	2,776	5,844

PERMEADO

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltotriosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)	Volumen (L)	Flux ($L/m^2.h$)
0,7	31,402	5,312	4,283	14,130	0,046	73,1
	29,943	5,623	4,261	12,413	0,047	74,5
	29,861	5,871	4,272	13,663	0,046	72,2
0,8	28,985	5,412	4,210	10,930	0,069	54,3
	31,123	6,123	4,231	11,413	0,070	55,2
	26,901	5,325	4,225	11,863	0,068	53,4
1,0	29,123	5,312	4,201	11,130	0,102	53,7
	27,226	5,623	4,203	11,413	0,103	54,4
	28,560	6,225	4,202	12,863	0,099	52,1
1,3	29,953	5,312	4,210	11,134	0,145	51
	26,023	5,123	4,201	11,134	0,148	51,8
	29,890	5,711	4,225	11,038	0,145	50,7
1,5	31,133	5,312	4,164	10,854	0,174	45,8
	33,451	5,123	4,181	10,134	0,176	46,4
	32,754	5,456	4,171	11,418	0,170	44,6
1,8	31,246	5,312	4,210	8,734	0,212	44,6
	35,896	5,123	4,231	8,434	0,215	45,2
	34,699	5,444	4,138	9,565	0,208	43,8
2,0	31,407	5,312	4,151	8,013	0,247	43,4
	34,411	5,123	4,154	7,862	0,253	44,4
	36,023	5,471	4,121	8,185	0,245	42,9
2,5	31,654	5,312	4,143	9,135	0,314	41,3
	32,334	5,123	4,121	9,134	0,323	42,5
	34,226	5,081	4,132	10,537	0,309	40,7
3,0	31,879	4,512	4,014	11,134	0,356	37,5
	29,103	4,923	4,031	11,146	0,363	38,2
	29,129	4,971	4,015	11,926	0,347	36,5
3,5	27,421	4,211	3,613	8,135	0,420	36,8
	29,223	4,015	3,701	8,157	0,427	37,4
	29,147	3,780	3,492	8,914	0,409	35,9
4,5	33,122	4,342	3,312	8,134	0,535	35,2
	35,549	4,115	3,333	8,864	0,549	36,1
	29,252	4,149	3,321	8,208	0,526	34,6
5,5	31,123	4,153	3,114	9,214	0,648	34,1
	26,675	4,210	3,231	10,142	0,673	35,4
	31,131	4,243	3,315	8,850	0,631	33,2
6,5	28,723	3,522	3,014	8,155	0,716	31,4
	30,645	3,423	3,011	7,345	0,730	32
	29,561	3,681	3,041	7,306	0,698	30,6