

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE FRUCTOSA
A PARTIR DE JARABES DE GLUCOSA PROVENIENTES DE ALMIDÓN DE
YUCA**

**LEYDY GISELA ALZATE REY
MARIO ALBERTO MARTÍNEZ MANRIQUE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2005

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE FRUCTOSA
A PARTIR DE JARABES DE GLUCOSA PROVENIENTES DE ALMIDÓN DE
YUCA**

**LEYDY GISELA ALZATE REY
MARIO ALBERTO MARTÍNEZ MANRIQUE**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de Ingeniero Químico.**

Director

M. Sc. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

Co-Director

M. Sc. DANIEL RICARDO MOLINA VELASCO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2005

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	25
1.1 JARABE DE GLUCOSA	25
1.2 JARABE DE FRUCTOSA	26
1.2.1 Producción de jarabes de fructosa	27
1.3 ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA	29
1.3.1 Actividad enzimática	30
1.3.2 Cinética enzimática	31
1.4 REACTOR ENZIMÁTICO	33
1.4.1 Modelamiento del reactor enzimático	35
1.4.2 Efecto de los parámetros ambientales	39
▪ Temperatura	39

▪ Potencial de hidrógeno (pH)	39
1.4.3 Estabilidad del reactor de enzima inmovilizada	41
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	43
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.1.1 Enzima	43
2.1.2 Reactivos	44
2.1.3 Preparación de Soluciones	45
▪ Solución Buffer	45
▪ Sustrato A	45
2.1.4 Técnicas Analíticas	46
▪ Determinación de azúcares reductores	46
▪ Cuantificación de iones calcio	46
▪ Determinación de la concentración de glucosa	46
▪ Determinación de la conversión de glucosa a fructosa	47
2.1.5 Determinación de la actividad enzimática en un reactor de lecho empacado	47

2.1.6 Determinación de la actividad enzimática en un reactor batch	47
2.1.7 Operación del reactor de lecho empacado de glucosa isomerasa inmovilizada	48
2.2 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE ISOMERIZACIÓN	49
2.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA REACCIÓN DE ISOMERIZACIÓN	50
2.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE CINÉTICO DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA	51
2.5 VALIDACIÓN DEL MODELO DE REACTOR DE ISOMERIZACIÓN	52
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	54
3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA ISOMERASA INMOVILIZADA EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO	54
3.2 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE ISOMERIZACIÓN	55
3.2.1 Evaluación de la influencia de las variables sobre la conversión	55
3.2.2 Evaluación de la influencia de las variables sobre la productividad	59

3.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA REACCIÓN DE ISOMERIZACIÓN	64
3.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE CINÉTICO DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA	68
3.5 MODELAMIENTO MATEMÁTICO Y VALIDACIÓN DEL REACTOR ENZIMÁTICO DE LECHO EMPACADO	70
4. CONCLUSIONES	74
5. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición típica de un jarabe glucosado obtenido mediante hidrólisis enzimática del almidón	25
Tabla 2. Composición de los diversos jarabes fructosados existentes en el mercado	29
Tabla 3. Aspectos que influyen el diseño y la elección de un reactor enzimático	34
Tabla 4. Características relevantes del reactor de lecho empacado	35
Tabla 5. Características de la enzima glucosa isomerasa Sweetzyme IT [®]	44
Tabla 6. Reactivos	44
Tabla 7. Niveles experimentales de las variables seleccionadas	49
Tabla 8. Actividad enzimática de la glucosa isomerasa en un reactor de lecho empacado	54
Tabla 9. Parámetros cinéticos de la glucosa isomerasa a diferentes temperaturas	65
Tabla 10. Valores de k_o y E_a/R para los parámetros cinéticos de la reacción de isomerización (60 - 80°C)	67

Tabla 11. Parámetros de inactivación térmica de la enzima glucosa isomerasa
inmovilizada a diferentes temperaturas 68

Tabla 12. Producción total de fructosa usando perfiles de temperatura a
diferentes tiempos de residencia dados para una concentración inicial de
glucosa 2 M 72

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Reacción de isomerización	26
Figura 2. Esquema de diseño y evaluación de comportamiento de reactores enzimáticos	35
Figura 3. Interrelación entre los parámetros del proceso para la glucosa isomerasa	40
Figura 4. Esquema del montaje del sistema de isomerización	48
Figura 5. Gráfico de los efectos estandarizados para la conversión	56
Figura 6. Gráfico de los efectos principales para la conversión	56
Figura 7. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Temperatura para la conversión	58
Figura 8. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Tiempo de Residencia para la conversión	58
Figura 9. Contornos de la superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo de Residencia para la conversión	59

Figura 10. Gráfico de los efectos estandarizados para la productividad	60
Figura 11. Gráfico de los efectos principales para la productividad	60
Figura 12. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Temperatura para la productividad	62
Figura 13. Contornos de la superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo de Residencia para la productividad	62
Figura 14. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Tiempo de Residencia para la productividad	63

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Poder endulzante de diversos edulcorantes	80
Anexo B. Producción de jarabes de glucosa y fructosa provenientes del almidón	82
Anexo C. Método analítico para la determinación de la actividad de la glucosa isomerasa inmovilizada Sweetzyme IT [®] recomendado por Novo Nordisk	83
Anexo D. Método analítico para la determinación de azúcares reductores	86
Anexo E. Método analítico para la determinación de Ca ⁺²	88
Anexo F. Método analítico para la determinación de la concentración de glucosa	89
Anexo G. Método analítico para la determinación de la conversión de glucosa en fructosa	91
Anexo H. Corridas preliminares de estabilización del reactor de lecho empacado	93

Anexo I. Matriz del diseño experimental factorial 2^4 y resultados de conversión y productividad	94
Anexo J. Análisis estadístico de la influencia de las variables sobre la conversión	96
Anexo K. Análisis estadístico de la influencia de las variables sobre la productividad	100
Anexo L. Corridos preliminares para establecer la duración de cada experimento cinético según la porción recta de la curva Producto vs. Tiempo	103
Anexo M. Determinación de la velocidad inicial de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato a diferentes temperaturas para las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás	104
Anexo N. Graficas de Velocidad Inicial de Reacción vs. Concentración de Sustrato para las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás a diferentes temperaturas y su respectiva linealización Lineweaver-Burk	108
Anexo O. Parámetros Cinéticos vs. Temperatura	111
Anexo P. Determinación de la actividad residual de la glucosa isomerasa inmovilizada	112
Anexo Q. Validación del modelo matemático usando los valores de conversión obtenidos experimentalmente para el jarabe glucosado de maíz y para el jarabe glucosado de yuca en condiciones de desnaturalización despreciable (8 horas de operación)	114

Anexo R. Resultados de la caracterización del jarabe glucosado proveniente del almidón de yuca	116
Anexo S. Validación del modelo matemático usando los valores de conversión obtenidos experimentalmente para el jarabe glucosado de maíz, para un tiempo de operación de 560 horas	117
Anexo T. Estimación del error relativo del modelo matemático	118
Anexo U. Perfiles de temperatura, de inactivación de la enzima y de velocidad de reacción para mantener la conversión constante ($x = 0,45$) para una concentración inicial de glucosa 2 M y un tiempo de residencia dado	122
Anexo V. Perfiles de tiempo de residencia y inactivación de la enzima para mantener la conversión constante ($x = 0,45$) para una concentración inicial de glucosa 2 M y una temperatura dada	124
Anexo W. Estimación preliminar de costos para la operación usando perfiles de temperatura y un tiempo de residencia dado	126

LISTA DE ABREVIATURAS

a : actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min g enzima}$)

a/a_0 : actividad residual de la enzima (adimensional)

a_0 : actividad inicial de la enzima ($\mu\text{mol} / \text{min g enzima}$)

RCTA : Reactor continuo de tanque agitado

E : enzima o concentración inicial de la enzima activa ($\text{mol} / \text{h g enzima}$)

E_a : energía de activación (J / mol)

E_{fa} : energía de activación del proceso de inactivación enzimática (J / mol)

ES : complejo enzima-sustrato o concentración de complejo enzima-sustrato (M)

F : velocidad de flujo volumétrico de la alimentación (L / h)

HPLC : cromatografía líquida de alta presión

IGIU : unidad internacional de actividad de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada ($\mu\text{mol} / \text{min}$)

k_{+1} : constante de velocidad de la formación del complejo ES a partir de S y E

(M^{-1})

k_{+1}/k_{-1} : constante de equilibrio para la asociación de ES a partir de E y S (M^{-1})

k_{+2} : constante de velocidad del consumo del complejo ES para formar P y E

k_{+2}/k_{-2} : constante de equilibrio para la disociación de ES en E y P (M)

k_{-1} : constante de velocidad del consumo del complejo ES para formar S y E

k_{-1}/k_{+1} : constante de equilibrio para la disociación de ES en E y S (M)

k_{-2} : constante de velocidad de la formación del complejo ES a partir de P y E
(M^{-1})

k_{-2}/k_{+2} : constante de equilibrio para la asociación de ES a partir de E y P (M^{-1})

k_d : constante cinética de inactivación de primer orden (h^{-1})

K_e : constante de equilibrio (adimensional)

k_f : constante de inactivación de la enzima en ausencia de protección por sustrato (h^{-1})

k_{fo} : constante de Arrhenius del proceso de inactivación enzimática

k_i : constante de velocidad, $i = +1, -1, +2, -2$

K_m : constante de Michaelis (M)

K_{ma} : constante de Michaelis de la reacción hacia delante (M)

K_{mr} : constante de Michaelis de la reacción hacia atrás (M)

k_o : constante de Arrhenius

n : factor relacionado con la eficiencia de la protección por sustrato (adimensional)

P : producto o concentración de producto (M)

P_e : concentración de producto en el equilibrio (M)

R : constante universal de los gases (J / mol K)

R^2 : coeficiente de correlación R cuadrado

S : sustrato o concentración de sustrato (M)

\bar{S} : concentración reducida de sustrato (M)

S_e : concentración de sustrato en el equilibrio (M)

S_o : concentración inicial de sustrato (M)

T : temperatura absoluta (K)

t : tiempo (h)

$t_{1/2}$: tiempo de vida media de la enzima (h)

t_r : tiempo de operación total del reactor (h)

UI : unidad internacional de actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min}$)

v : velocidad de reacción inherente (M / h)

V : Volumen del reactor (L)

V_m : Velocidad máxima de reacción (mol / h g enzima)

V_{ma} : velocidad máxima de la reacción hacia delante (mol / h g enzima)

V_{mr} : velocidad máxima de la reacción hacia atrás (mol / h g enzima)

x : conversión de sustrato a producto (adimensional)

x_e : conversión de sustrato a producto en el equilibrio (adimensional)

ε : fracción hueca en el lecho empacado (adimensional)

τ : tiempo de residencia en el reactor (h)

ρ : densidad (g / mL)

η : factor de eficacia (adimensional)

σ : factor de protección de la enzima por el sustrato (adimensional)

θ : tiempo de operación (adimensional)

π : productividad (M / h)

π' : producción total del reactor (M)

RESUMEN

TITULO*:

ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE FRUCTOSA A PARTIR DE JARABES DE GLUCOSA PROVENIENTES DEL ALMIDÓN DE YUCA

ALZATE REY, Leydy Gisela y MARTÍNEZ MANRIQUE, Mario Alberto**

Palabras Clave: jarabe de fructosa, isomerización de glucosa, glucosa isomerasa inmovilizada, reactor de lecho empacado

Se evaluó la influencia de las variables (concentración inicial de glucosa, temperatura, pH y tiempo de residencia) sobre la conversión y la productividad en el proceso de isomerización de glucosa para producir jarabe de fructosa, en un reactor de lecho empacado usando glucosa isomerasa inmovilizada comercial (Sweetzyme IT[®], Novo Nordisk), aplicando un diseño factorial de experimentos del tipo 2⁴.

Se determinaron los parámetros cinéticos inherentes de las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás, mediante mediciones de velocidad inicial de reacción a 60, 70 y 80 °C. Se estimaron las constantes de inactivación térmica de primer orden de la glucosa isomerasa inmovilizada en ausencia y en presencia de protección por sustrato en pruebas de tiempo prolongado en reactores discontinuos a 60, 70 y 80 °C. Se propuso un modelo basado en las consideraciones del mecanismo cinético de Briggs-Haldane y el modelo de desactivación de primer orden para un reactor de lecho empacado ideal. Para la validación del modelo obtenido del reactor de lecho empacado se realizaron corridas experimentales a diferentes condiciones, en principio, con jarabe glucosado de maíz y posteriormente con jarabe glucosado de yuca previamente caracterizado.

A partir del modelo generado, suponiendo una concentración inicial de glucosa 2 M, se plantearon las estrategias de operación considerando perfiles de temperatura y perfiles de tiempo de residencia para mantener la conversión constante ($x = 0,45$) a medida que la enzima pierde actividad.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director Crisóstomo Barajas Ferreira, Codirector Daniel Ricardo Molina Velasco

SUMMARY

TITLE*:

PRODUCTION PROCESS STUDY OF FRUCTOSE SYRUP STARTING FROM GLUCOSE SYRUP COMING FROM THE STARCH OF YUCCA

ALZATE REY, Leydy Gisela and MARTÍNEZ MANRIQUE, Mario Alberto * *

Key words: fructose syrup, glucose isomerization, immobilized glucose isomerase, packed bed reactor

The influence of the variables (initial concentration of glucose, temperature, pH and residence time) was evaluated about the conversion and the productivity in the glucose isomerization process to produce fructose syrup, in a packed bed reactor using a commercial immobilized glucose isomerase (Sweetzyme IT[®], Novo Nordisk), applying a factorial experimental design 2⁴.

The inherent kinetic parameters of the forward and the reverse isomerization reactions were determined by means of the starting reaction rate mensurations at 60, 70 and 80 °C. The first-order thermal inactivation constant of the immobilized glucose isomerase in the absence and in the presence of substrate protection was determined by means of long-term tests in batch reactors at 60, 70 and 80 °C. A model based on Briggs-Haldane kinetic mechanism and first-order inactivation model for a ideal packed-bed reactor was proposed. Runs carried out at different conditions were made to validate packed-bed reactor model runs carried out at different conditions were made to validate packed-bed reactor model, starting with a glucose corn syrup and later with glucose yucca syrup previously characterized.

Operation strategies considering temperature profiles and residence time profiles to maintain constant conversion ($x = 0,45$) as the enzyme loses activity were outlined using model proposed for an initial substrate concentration 2 M.

* Thesis to undergraduate

** Physical-chemical Engineerings Faculty, Chemical Engineering School, Thesis Advisor Crisóstomo Shuffles Ferreira, Thesis Co-Advisor Daniel Ricardo Molina Velasco

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha creado una gran expectativa respecto a la producción de jarabe de fructosa, el cual ocupa una participación importante en el mercado como sustituto del azúcar, gracias a su mayor poder edulcorante y a las ventajas que presenta sobre la salud del consumidor en comparación con la sacarosa y los edulcorantes artificiales.

Los jarabes de fructosa son el producto de la isomerización de jarabes de glucosa, llevada a cabo en reactores de lecho fijo donde la enzima inmovilizada glucosa isomerasa se encuentra empacada. Los jarabes de glucosa se obtienen mediante hidrólisis enzimática del almidón. Entre los diferentes productos agrícolas utilizados como fuente de almidón, la yuca presenta los costos más bajos de producción, por lo que se constituye en una alternativa para la producción de jarabes glucosados y fructosados.

Actualmente los países desarrollados están a la cabeza en la producción de jarabes de fructosa a partir de almidón de maíz. La demanda interna de estos jarabes ha crecido significativamente en los últimos años y en su gran mayoría es cubierta por proveedores internacionales. El desarrollo de un bioproceso para producir jarabes fructosados usando materias primas nacionales no solo proveerá un producto de alto valor comercial, sino que contribuirá al avance de la industria biotecnológica en nuestro país.

Con el propósito de estudiar el proceso de producción de jarabes de fructosa a partir de jarabes de glucosa se determinaron a diferentes temperaturas los parámetros cinéticos y de inactivación de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada, necesarios en el desarrollo del modelo matemático del reactor de lecho empacado y el planteamiento posterior de las estrategias de operación.

El modelo propuesto, basado en las consideraciones del mecanismo cinético de Briggs-Haldane y el modelo de inactivación de primer orden para un reactor de lecho empacado ideal, predice satisfactoriamente el comportamiento del reactor de isomerización usando jarabe glucosado de maíz, confirmando así la validez del procedimiento empleado para la estimación de estos parámetros. Sin embargo, no se ajusta favorablemente cuando se usa el jarabe de glucosa obtenido a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

Este proyecto de grado culmina la línea de investigación en el aprovechamiento del cultivo de yuca que viene realizando el Grupo de Investigación Aplicada y Adaptativa y de Desarrollo Agroindustrial de la Universidad Industrial de Santander, con el apoyo del Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, Pronatta, adscrito al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

1. CONCEPTOS TEÓRICOS

1.1 JARABE DE GLUCOSA

El jarabe de glucosa es el producto obtenido mediante hidrólisis ácida o enzimática del almidón (usualmente almidón de maíz), es una solución acuosa de glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas. Es empleado como edulcorante en la elaboración de diversos productos, confitería y alimentos procesados.

La hidrólisis enzimática consta de dos etapas: licuefacción y sacarificación, durante las cuales el almidón, mezcla de dos glucanos, amilosa y amilopectina, debe ser desdoblado hasta azúcares simples mediante las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa^(1, 2, 3, 4, 5). En la Tabla 1 se presenta la composición típica de un jarabe de glucosa.

Tabla 1. Composición típica de un jarabe glucosado obtenido mediante hidrólisis enzimática del almidón

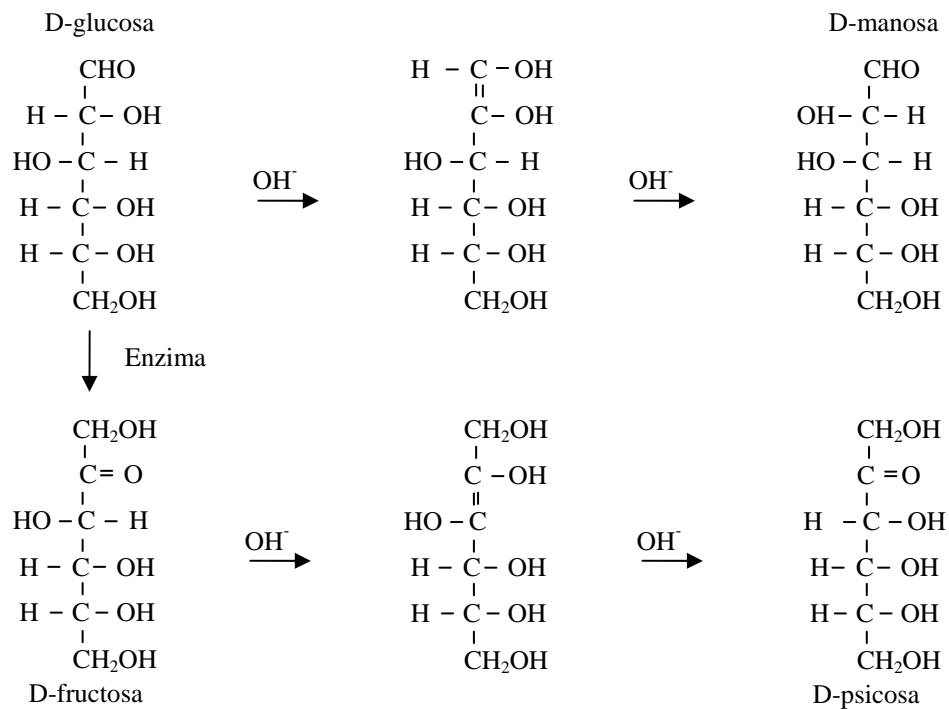
Componentes	% en base seca
Glucosa	94,0 – 96,0
Maltosa	2,0 – 3,0
Maltotriosa	0,3 – 0,5
Oligosacáridos	1,0 – 2,0
Sólidos totales en jarabe	35,0 – 37,0

Fuente: García, M.; Quintero, R. y López, A., 1993⁽¹⁾

1.2 JARABE DE FRUCTOSA

El jarabe de fructosa se obtiene por isomerización del jarabe de glucosa; esta reacción se puede realizar químicamente en medio alcalino o usando la enzima glucosa isomerasa como catalizador. La reacción se esquematiza en la Figura 1, incluyendo la isomerización espontánea que sufre la fructosa en medio alcalino: como resultado se obtiene la psicosa, un azúcar no metabolizable^(1, 3).

Figura 1. Reacción de isomerización



Fuente: Crueger, A. y Crueger, W., 1990⁽³⁾

Entre los edulcorantes naturales la fructosa no solo tiene el más alto poder endulzante^(1, 10) (ver Anexo A), también tiene la ventaja de ser metabolizada por

el hígado y no por la ruta dependiente de la insulina, permitiendo así su uso en alimentos para diabéticos pues no afecta el nivel de glucosa en la sangre⁽³⁾.

Otra propiedad de la fructosa, es el efecto sinérgico sobre el poder endulzante que ocurre cuando se mezcla con otro edulcorante. Dependiendo de la proporción y el tipo de edulcorante utilizado, el dulzor obtenido en la mezcla es mayor que el de los edulcorantes en forma individual. Esta característica es utilizada en la aplicación que sea requerida a fin de proporcionar a los productos finales niveles de dulzor similares o mayores que la sacarosa^(6, 7).

Entre otras ventajas que hacen preferir industrialmente el jarabe de fructosa, están: disminución en el punto de congelación y estabilización de espuma en lácteos; agente de caramelización en repostería; alta higroscopicidad en confitería; alta presión osmótica que inhibe el crecimiento de microorganismos y aumenta la vida de anaquel en productos como jugos, néctares y conservas. Además, resalta los aromas frutales generando la sensación de mayor contenido de fruta en las bebidas de sabores; no presenta problemas de cristalización como la sacarosa y es 100 % fermentable por levaduras, lo cual hace posible su uso en procesos de panificación como sustituto de la sacarosa^(6, 7).

1.2.1 Producción de jarabes de fructosa

La isomerización del jarabe de glucosa se lleva a cabo, por lo general, en reactores continuos, de preferencia de lecho fijo, donde la enzima inmovilizada glucosa isomerasa se encuentra empacada.

Previamente el jarabe crudo, alto en glucosa, es filtrado, decolorizado con carbón activado y desionizado con resinas ácidas y básicas debido al contenido

de iones e impurezas en la solución, como aminoácidos y lípidos que pueden causar taponamiento en la columna^(1, 2, 3). Es importante remover los iones calcio adicionados en el proceso de licuefacción por su efecto inhibitor en la glucosa isomerasa^(2, 4, 5). Luego la solución es concentrada generalmente a 40 ó 50 % de sólidos^(1, 2, 7).

Antes de la isomerización se añade Mg^{+2} requerido como cofactor por la gran mayoría de glucosas isomerasas usadas actualmente^(1, 2, 3, 5). La alimentación es igualmente desgasificada por los efectos desnaturalizantes del oxígeno sobre la enzima mediante deaeración al vacío o adicionando bajas concentraciones de $Na_2S_2O_5$ ^(1, 2, 3). El pH de esta solución de glucosa cruda es ajustado a débilmente alcalino usando carbonato de sodio; el pH exacto depende de la enzima y el tipo de reactor^(2, 3, 7).

El jarabe glucosado obtenido es el sustrato empleado en la isomerización. Esta reacción catalizada por la glucosa isomerasa es completamente reversible, de modo que en el equilibrio se obtiene una mezcla aproximadamente equimolar de fructosa y glucosa^(4, 5, 7). No obstante, a causa del excesivo tiempo que toma alcanzar el equilibrio y la presencia de oligosacáridos en la corriente de alimentación, la temperatura y la velocidad de flujo se ajustan para producir un jarabe con un mínimo del 42 % de fructosa, 51 % de glucosa y no más de 6 % de oligosacáridos^(4, 5, 7). Las contaminaciones de oligosacáridos como maltosa o isomaltosa no interfieren con la reacción de isomerización⁽⁷⁾.

Después de la isomerización el jarabe es tratado con carbón activado y desionizado con una resina de intercambio iónico para remover sales y trazas de componentes que producen color^(2, 6, 7). Este proceso debe llevarse a cabo tan rápido como sea posible debido a que los valores de pH alcanzados con la resina pueden variar desde 2 hasta 8, induciendo la descomposición química de los componentes del jarabe⁽⁷⁾. Algunas veces es preciso filtrar el jarabe si

existen partículas de enzima inmovilizada suspendidas, como ocurre en el proceso por lotes⁽⁷⁾. El pH del producto final usualmente es ajustado de 4 a 5 para garantizar máxima estabilidad^(3, 7). Entonces el jarabe es concentrado por evaporación hasta 71 % de sólidos manteniendo un estricto control del pH^(2, 3, 6). En el Anexo B se presenta un esquema del proceso^(3, 4, 5).

El jarabe con 42 % de fructosa es ampliamente utilizado como edulcorante en la industria de alimentos, sin embargo, algunas aplicaciones requieren jarabes de mayor contenido de fructosa^(3, 4, 5, 7). La Tabla 2 presenta la composición de los jarabes de fructosa existentes en el mercado^(1, 2, 6, 8).

Tabla 2. Composición de los diversos jarabes fructosados existentes en el mercado

Jarabe	Fructosa (%)	Glucosa (%)	Oligosacáridos (%)	Sólidos Totales (%)
Primera generación	42	51	7	71
Segunda generación	55	42-40	3-5	77
Tercera generación	90	9-7	1-3	77-80

Fuente: García, M.; Quintero, R. y López, A., 1993⁽¹⁾

1.3 ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA

La glucosa isomerasa (D-xilosa quetol-isomerasa, E.C. 5.3.3.1) es una proteína con actividad catalítica, específicamente aumenta la velocidad de la reacción de isomerización de glucosa a fructosa. Es una oxidoreductasa intramolecular, es decir, altera la estructura pero no la composición atómica del sustrato al cambiar un grupo de una posición a otra en la molécula^(9, 10).

Esta enzima intracelular puede obtenerse por fermentación con xilosa de los géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Actinoplanes*, *Artobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*^(3, 5, 10). Se puede encontrar en forma soluble, cuando queda suspendida en el sustrato, o inmovilizada, cuando se somete a un confinamiento artificial. La enzima inmovilizada puede separarse fácilmente de una suspensión permitiendo a su vez recuperarla en forma reutilizable^(9, 11).

1.3.1 Actividad enzimática

Desde un punto de vista termodinámico la enzima actúa selectivamente disminuyendo la energía de activación requerida para lograr un complejo de transición activado que dará origen al producto. Desde un punto de vista cinético, la actividad enzimática (a), que corresponde a la capacidad catalítica de la enzima, se traduce en un incremento en la velocidad de reacción catalizada. De este modo, en la reacción $S \rightarrow P$, se tiene⁽⁴⁾:

$$a = v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} \quad [1]$$

La actividad enzimática depende de la concentración de proteína enzimática y su cuantificación se basa en la medición de la velocidad inicial de reacción. La actividad enzimática se expresa en términos de UI (unidades internacionales). Se define una UI como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de S por minuto en condiciones ambientales definidas (concentración de reactivos, productos, inhibidores y activadores, pH y temperatura)^(2, 4, 10).

1.3.2 Cinética enzimática

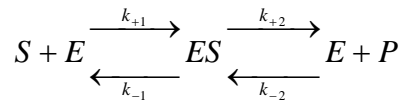
El mecanismo de acción enzimática ha sido explicado basándose en diferentes hipótesis, de las cuales las más relevantes son las de Michaelis-Menten o de equilibrio rápido y la de Briggs-Haldane o de estado estacionario. Ambas se basan en los postulados de Henri y Brown, quienes observaron que la velocidad inicial de una reacción enzimática es proporcional a la concentración de enzima y que su dependencia de la concentración de sustrato es la característica de un fenómeno de saturación, análoga a la observada en una reacción química reversible^(2, 4, 5, 12).

Basándose en esta observación, se postuló que la transformación enzimática $S \rightarrow P$ transcurre a través de la formación de un complejo enzima-sustrato (ES) en equilibrio con la enzima (E) y el sustrato (S), que se descompone dando origen a los productos de reacción (P)^(2, 4, 5, 12):



La hipótesis de equilibrio rápido supone el establecimiento de un equilibrio entre S, E y ES, lo que implica que las velocidades de formación de ES a partir de E y S, y de descomposición en E y S son mucho mayores que la velocidad de descomposición de ES en E y P. La hipótesis de estado estacionario supone que la velocidad neta de cambio en la concentración del complejo ES es cero, es decir, su velocidad de formación es igual a su velocidad de descomposición y por tanto, el sistema está en estado estacionario.

Para el caso de reacciones reversibles del tipo $S \rightleftharpoons P$, la hipótesis de equilibrio rápido no es aplicable ya que se llega a una contradicción y debe recurrirse a un análisis de estado estacionario^(1, 2, 4, 8, 11):



$$\frac{dES}{dt} = k_{+1} \cdot E \cdot S + k_{-2} \cdot E \cdot P - ES \cdot (k_{-1} + k_{+2}) = 0 \quad [2]$$

$$v = k_{+2} \cdot ES - k_{-2} \cdot E \cdot P \quad [3]$$

De [2] y [3]:

$$v = \frac{\frac{V_{ma} \cdot S}{K_{ma}} - \frac{V_{mr} \cdot P}{K_{mr}}}{1 + \frac{S}{K_{ma}} + \frac{P}{K_{mr}}} \quad [4]$$

donde K_{ma} , K_{mr} , V_{ma} y V_{mr} son las constantes de Michaelis y las velocidades máximas de las reacciones hacia delante y hacia atrás, respectivamente:

$$K_{ma} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad [5]$$

$$K_{mr} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-2}} \quad [6]$$

$$V_{ma} = k_{+2} \cdot E \quad [7]$$

$$V_{mr} = k_{-1} \cdot E \quad [8]$$

La constante de equilibrio global de la reacción (K_e) es el cociente entre S y P en el equilibrio, esto es, cuando la velocidad neta de reacción es cero:

$$K_e = \frac{P_e}{S_e} = \frac{V_{ma} \cdot K_{mr}}{V_{mr} \cdot K_{ma}} = \frac{S_0}{S_e} - 1 \quad [9]$$

donde P_e y S_e son las concentraciones en el equilibrio de producto y sustrato, respectivamente, y S_o es la concentración inicial de sustrato.

De [4] y [9]:

$$v = \frac{V_m \cdot \bar{S}}{K_m + \bar{S}} \quad [10]$$

donde K_m es la constante de Michaelis y V_m es la velocidad máxima de la reacción de isomerización global:

$$V_m = \frac{V_{ma} \cdot K_{mr}}{K_{mr} - K_{ma}} \cdot \left[1 + \frac{1}{K_e} \right] \quad [11]$$

$$K_m = \frac{K_{ma} \cdot K_{mr}}{K_{mr} - K_{ma}} \cdot \left[1 + \left(\frac{1}{K_{ma}} + \frac{K_e}{K_{mr}} \right) \cdot S_e \right] \quad [12]$$

$$\bar{S} = S - S_e \quad [13]$$

1.4 REACTOR ENZIMÁTICO

El diseño y selección de un reactor enzimático debe considerar varios aspectos esenciales presentados en la Tabla 3^(13, 12).

Tabla 3. Aspectos que influyen el diseño y la elección de un reactor enzimático

Naturaleza del biocatalizador	Libre o inmovilizado
Cinética de la reacción	Unisustrato, multisustrato, reversible o irreversible, con o sin inhibición, sujeta o no a limitaciones de transferencia de masa
Naturaleza de sustratos y productos de la reacción	Solubles, insolubles, de alto o bajo peso molecular
Propiedades del biocatalizador	Actividad específica, densidad, tamaño de partícula
Requerimientos de control	Variabes operacionales como pH, temperatura, presión, fuerza iónica, esterilidad

Fuente: Wingard, L., 1976⁽¹³⁾

Todas las glucosas isomerasas son usadas en forma inmovilizada. La operación continua en columnas de enzima inmovilizada permite manejar menor cantidad de biocatalizador y menor tiempo de reacción comparado con el proceso por lotes. De esta forma se minimizan a su vez los costos de enzima y de refinación, pues también se reduce la formación de productos indeseables que se obtendrían en la operación por lotes, donde las condiciones alcalinas deben ser mantenidas durante considerables periodos hasta alcanzar la isomerización completa^(2, 5).

En la Tabla 4 se muestran las características relevantes del reactor de lecho empacado. En este arreglo existe un compromiso entre el tamaño de la partícula y la caída de presión. El uso de partículas pequeñas permite que el área expuesta al líquido sea mayor, lo que contribuye a reducir los problemas externos de transferencia de masa⁽¹²⁾.

Tabla 4. Características relevantes del reactor de lecho empacado

Tendencia a régimen de flujo	Pistón
Eficiencia de conversión	Mayor que el RCTA*, excepto modelos de inhibición por sustrato
Razón enzima: volumen de reactor	Alta
Control de parámetros ambientales	Difícil
Tratamiento de sustratos insolubles o de alto peso molecular	No adecuado
Costo de operación	Intermedio
Costo de fabricación	Intermedio

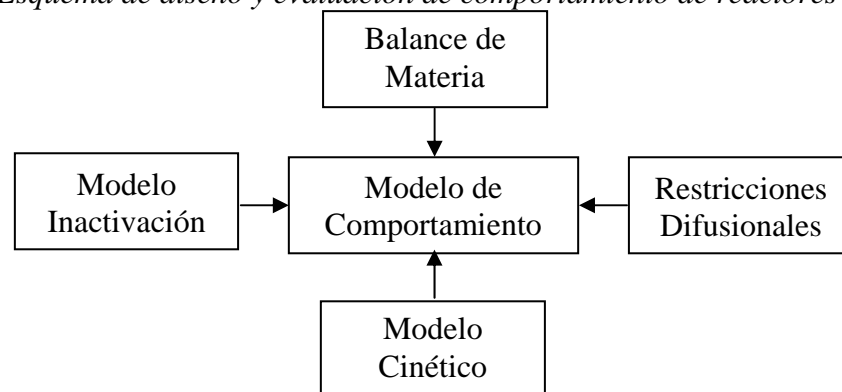
*RCTA: Reactor continuo de tanque agitado

Fuente: Illanes, A., 1994⁽⁴⁾

1.4.1 Modelamiento del reactor enzimático

La Figura 2 presenta, en forma esquemática, los diferentes módulos que intervienen en la formulación de un modelo de comportamiento de un reactor enzimático.

Figura 2. Esquema de diseño y evaluación de comportamiento de reactores enzimáticos



Fuente: Illanes, A., 1994⁽⁴⁾

Los componentes esenciales en este esquema son el balance de materia y el modelo cinético, sin embargo, debe necesariamente considerarse otros aspectos que, calificados como factores de no-idealidad, resultan determinantes en el comportamiento del reactor.

Las características de un reactor no ideal de enzima inmovilizada son^(4, 12):

- Operación no isotérmica: existen perfiles de temperatura por limitaciones en la transferencia de calor.
- Régimen de flujo no ideal: permanecen zonas muertas y mezclado en dirección axial y radial debido a los gradientes de concentración (de sustratos y productos) y a la distribución irregular de las partículas que causa acanalamientos y, en consecuencia, una distribución de tiempos de residencia para el fluido.
- Presencia de efectos de partición entre fases, en caso de soportes cargados positiva o negativamente.
- Presencia de restricciones difusionales que limitan la transferencia de masa externa o interna en el soporte de la enzima inmovilizada debido a bajas velocidades de flujo o partículas grandes.
- Inestabilidad de la actividad catalítica durante la operación del reactor causada por la inactivación térmica del catalizador o la elución de la enzima desde el soporte.

Del balance de materia en estado estacionario para el reactor de lecho empacado ideal se obtiene:

$$\int_0^x \frac{dx}{\eta \cdot \frac{a}{a_0} \cdot v} = \frac{\tau}{S_0} \quad [14]$$

donde a/a_0 es la actividad residual de la enzima, x es la conversión a la salida del reactor y τ es el tiempo de residencia definido como:

$$\tau = \frac{V \cdot \varepsilon}{F} \quad [15]$$

donde V es el volumen del reactor, F es el flujo volumétrico del líquido y ε es la fracción hueca en el lecho empacado dado por:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{granel}}{\rho_{absoluta}} \quad [16]$$

donde ρ_{granel} y $\rho_{absoluta}$ son las densidades a granel y absoluta del catalizador, respectivamente.

En la ecuación [14], η es el factor de eficacia y se define como la relación entre la velocidad de reacción aparente o efectiva, esto es, en presencia de restricciones difusionales, y la velocidad de reacción inherente (v) donde no existe limitación por difusión. En general, en sistemas ideales, η es igual a la unidad^(2, 4, 5, 11, 12).

Combinando las ecuaciones [14] y [10] se obtiene:

$$x = x_e \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{S_0 \cdot x}{K_m}\right) \exp\left(-\frac{V_m \cdot \tau \cdot \frac{a}{a_0}}{K_m}\right) \right) \quad [17]$$

donde x_e es la conversión en el equilibrio.

La ecuación anterior permite obtener el valor de la conversión para un reactor de lecho empacado en un tiempo dado (t), en función de la concentración de sustrato en el alimento, el tiempo de residencia y la temperatura, para el caso de reacciones reversibles que cumplen el mecanismo de Briggs-Haldane.

La productividad (π) es un parámetro de ingeniería de gran importancia, representa la cantidad de producto producido por unidad de tiempo y unidad de volumen de reacción^(4, 5):

$$\pi = \frac{P}{\tau} = \frac{S_0 \cdot x}{\tau} \quad [18]$$

donde x esta definida por:

$$x = 1 - \frac{S}{S_0} \quad [19]$$

La estrategia de operación puede establecerse considerando la producción total del reactor (π')^(5, 11):

$$\pi' = \int_0^{t_f} \frac{S_0 \cdot x}{\tau} dt = \int_0^1 \frac{S_0 \cdot x}{\tau} d\theta \quad [20]$$

donde t_f es el tiempo de operación del reactor y θ es el tiempo de operación adimensional definido como:

$$\theta = \frac{t}{t_f} \quad [21]$$

1.4.2 Efecto de los parámetros ambientales

▪ *Temperatura*

Este parámetro ejerce dos efectos contrapuestos sobre la expresión de la actividad enzimática, incrementando por un lado la reactividad del complejo activo ES, y por otro, aumentando la velocidad de inactivación del biocatalizador como consecuencia de la alteración de la estructura tridimensional activa de la proteína enzimática. Mientras el primer efecto es esencialmente independiente del tiempo, el segundo es fuertemente dependiente del tiempo, por lo tanto, la temperatura óptima para un proceso enzimático depende del tiempo de operación. Ambos fenómenos pueden ser convenientemente modelados de acuerdo a relaciones del tipo Arrhenius, que pueden expresarse en forma generalizada como^(2, 4, 5, 11, 12):

$$k_i = k_o \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) \quad [22]$$

donde E_a representa el valor de la energía de activación, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, k_o es la constante de Arrhenius y k_i es la constante de velocidad de reacción.

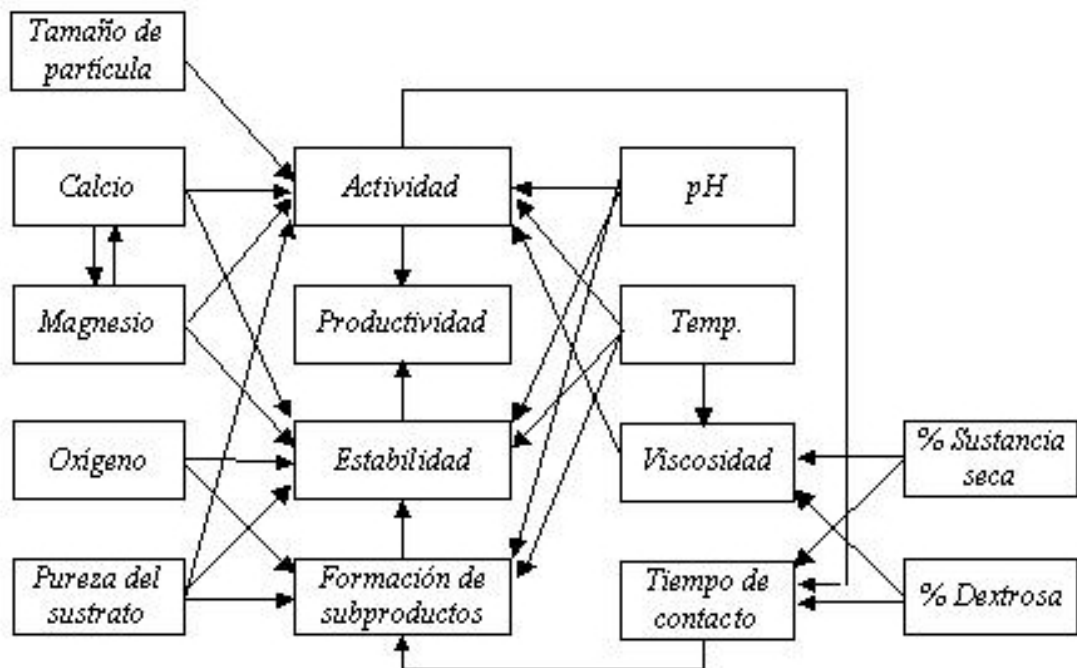
▪ *Potencial de hidrógeno (pH)*

Su influencia sobre la actividad de la enzima se debe a un cambio de la carga de la proteína anfótera, que tiene como consecuencia un cambio de conformación de la cadena. Para cada enzima existe un valor de pH óptimo en el cual su acción catalítica es máxima. Por otro lado, cambios drásticos de pH

pueden dar lugar a la inactivación de las enzimas al ocasionar una desnaturalización (cambio de conformación) irreversible. También la estabilidad de las enzimas es función de la concentración de hidrogeniones y no siempre el pH óptimo para la estabilidad coincide con el pH óptimo para la actividad^(10, 11, 12).

Entre otros factores ambientales que pueden afectar la actividad enzimática están: la fuerza iónica del medio, la presión (especialmente si uno de los reactivos es gaseoso), los *buffers* empleados, la pureza de los reactivos y de la enzima, etc. Todos ellos deben determinarse experimentalmente, o por lo menos escogerse arbitrariamente y mantenerlos constantes durante cualquier estudio enzimático⁽¹¹⁾. En la Figura 3 se observa la interrelación entre las diferentes variables del proceso en el caso de la glucosa isomerasa^(5, 14).

Figura 3. Interrelación entre los parámetros del proceso para la glucosa isomerasa



Fuente: Carasik, W. y Carrol, J., 1983⁽¹⁴⁾

1.4.3 Estabilidad del reactor de enzima inmovilizada

La pérdida de actividad de la enzima inmovilizada se manifiesta por una reducción en la conversión a la salida de los reactores de flujo conforme transcurre el tiempo de operación, se debe principalmente a^(5, 11, 12):

- Pérdida de la enzima por elución, ya sea por desgaste del soporte o por una solubilización continua en el caso de las enzimas inmovilizadas por absorción. Al arrancar el sistema es común que la actividad disminuya rápidamente debido a la pérdida de enzima débilmente inmovilizada.
- Pérdida de la actividad de la enzima inmovilizada debido a la inhibición irreversible por desnaturalización térmica, pH, ataque microbiano o proteólisis.
- Pérdida de área de soporte de las enzimas inmovilizadas causada por el acanalamiento en los reactores de lecho empacado o por depósitos de proteína debido al crecimiento microbiano.

El modelamiento de la inactivación es sumamente útil porque se puede simular el comportamiento real del reactor y optimizar la estrategia de operación.

Los modelos más frecuentes que describen la inactivación de la enzima inmovilizada se dan a partir del cambio de actividad de la enzima respecto al tiempo; el más simple es el modelo de inactivación de primer orden (la velocidad de pérdida de actividad es proporcional a la cantidad de enzima activa presente)^(4, 12):

$$-\frac{da}{dt} = k_d \cdot a \quad [23]$$

$$a = a_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad [24]$$

$$k_d = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad [25]$$

donde a es la actividad enzimática en el tiempo t , a_0 es la actividad enzimática inicial, $t_{1/2}$ es el tiempo de vida media enzimático, y k_d es la constante cinética de inactivación de primer orden definida como:

$$k_d = k_f \cdot (1 - \sigma) \quad [26]$$

donde σ es el factor de protección de la enzima por el sustrato:

$$\sigma = \frac{n \cdot \left[k_{mr} \cdot \left(1 + \frac{S}{S_e} \right) + k_{ma} \cdot \left(K_e - \frac{S}{S_e} \right) \right]}{\frac{k_{ma} \cdot k_{mr}}{S_e} + \left[k_{mr} \cdot \left(1 + \frac{S}{S_e} \right) + k_{mf} \cdot \left(K_e - \frac{S}{S_e} \right) \right]} \quad [27]$$

n es un factor relacionado con la eficacia de la protección del sustrato; Chen y Wu demostraron que este factor es 0,5 para la inactivación de la glucosa isomerasa inmovilizada⁽¹⁵⁾.

En la ecuación [26], k_f es la constante de inactivación en ausencia de protección por sustrato que puede expresarse como una función tipo Arrhenius:

$$k_f = k_{f0} \cdot \exp\left(-\frac{E_{fa}}{R \cdot T}\right) \quad [28]$$

donde k_{f0} es la constante de Arrhenius y E_{fa} representa el valor de la energía de activación del proceso de inactivación enzimática.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Inicialmente se determinó la actividad enzimática de la glucosa isomerasa inmovilizada; a continuación se evaluó, a escala de laboratorio, la influencia de las variables (concentración de glucosa, temperatura, pH y tiempo de residencia) en el proceso de isomerización del jarabe de glucosa, en un reactor empacado con enzima glucosa isomerasa inmovilizada; luego se determinaron los coeficientes cinéticos de reacción y de inactivación de la enzima, necesarios para el modelamiento del reactor de lecho empacado. Seguidamente se validó la reproducibilidad del modelo anterior con los datos experimentales obtenidos, en principio, con jarabe glucosado de maíz y posteriormente con jarabe glucosado de yuca previamente caracterizado.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Enzima

La enzima comercial *Sweetzyme IT*[®] elaborada por Novo Nordisk, es una glucosa isomerasa inmovilizada (E.C. 5.3.1.5, D-xilosa quetol-isomerasa) producida de una cepa seleccionada de *Streptomyces Murinus*. Las características más importantes de la preparación comercial usada se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de la enzima glucosa isomerasa Sweetzyme IT[®]

Apariencia	gránulos secos, color marrón, de forma cilíndrica
Actividad típica (seca)	400 IGIU/g
Densidad	0,33 g/mL (a granel), 1,43 g/mL (absoluta)
Tamaño de partícula	0,40 – 1,00 mm

Fuente: Novo Nordisk, 2002⁽¹⁶⁾

2.1.2 Reactivos

Tabla 6. Reactivos

Glucosa monohidratada de maíz	C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O comercial (99,5 % de glucosa) Cerelese PRODUCTOS DE MAÍZ
Glucosa anhidra	C ₆ H ₁₂ O ₆ grado analítico MERCK
Fructosa	C ₆ H ₁₂ O ₆ comercial Frutolight [®]
Fructosa anhidra	C ₆ H ₁₂ O ₆ grado analítico MERCK
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O grado analítico CARLO ERBA
Bisulfito de sodio	Na ₂ SO ₅ grado analítico CARLO ERBA
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃ grado analítico MALLINCKRODT
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄ grado analítico CARLO ERBA
Hidróxido de sodio	NaOH grado analítico CARLO ERBA
Ácido clorhídrico	HCl grado analítico MALLINCKRODT
Cloruro de calcio	CaCl ₂ comercial
Calcio	Estandar Titrisol [®] MERCK
Tartrato de sodio	C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ .2H ₂ O grado analítico MERCK
Tartrato de potasio	C ₄ H ₄ K ₂ O ₆ .0,5H ₂ O grado analítico MERCK
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	C ₇ H ₄ H ₂ O ₇ grado analítico MERCK
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl grado analítico MERCK

EDTA	$C_{10}H_{14}K_2N_2O_8 \cdot 2H_2O$ grado analítico MERCK
Cromoazurol S	$C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$ Indicador MERCK
Glucosa oxidasa – Peroxidasa	Reactivo Sera-Pak [®] Plus BAYER
Glucosa	Estándar Sera-Pak [®] Plus BAYER

2.1.3 Preparación de Soluciones

Las soluciones fueron preparadas adaptando el método recomendado por Novo Nordisk (ver Anexo C):

▪ *Solución Buffer*

Usando agua desmineralizada se preparó una solución 2 mM de Na_2CO_3 conteniendo 1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,18 g/L de Na_2SO_5 a un pH de $7,50 \pm 0,03$.

▪ *Sustrato A*

Según la concentración inicial seleccionada, se disolvió el azúcar comercial (glucosa o fructosa) en una solución 2 mM de Na_2CO_3 conteniendo 1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,18 g/L de Na_2SO_5 . El pH se ajustó al valor deseado.

2.1.4 Técnicas Analíticas

▪ *Determinación de azúcares reductores*

Para la determinación de los azúcares reductores del jarabe glucosado proveniente del almidón de yuca se usó el método colorimétrico DNS⁽¹⁷⁾ utilizando un espectrofotómetro (Espectroquant[®] Nova 400 - MERCK). Ver Anexo D.

▪ *Cuantificación de iones calcio*

La concentración de iones Ca^{+2} , presentes en el jarabe de glucosa resultante del proceso de hidrólisis del almidón de yuca, se determinó usando el método complexométrico con EDTA⁽¹⁸⁾. Ver Anexo E.

▪ *Determinación de la concentración de glucosa*

Para estimar la concentración de glucosa del jarabe derivado del almidón de yuca se usó el método enzimático usando glucosa oxidasa^(19, 17) (Sera-Pak[®] Plus BAYER) mediante un espectrofotómetro (Espectroquant[®] Nova 400 MERCK). Ver Anexo F.

▪ *Determinación de la conversión de glucosa a fructosa*

Para calcular la conversión de glucosa a fructosa durante la reacción de isomerización se midió el ángulo de rotación óptica de las muestras mediante un polarímetro⁽²⁰⁾ (STEEG & REUTER-6). Ver Anexo G.

2.1.5 Determinación de la actividad enzimática en un reactor de lecho empacado

Para cuantificar la actividad de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada se utilizó la metodología desarrollada por Novo Nordisk⁽²⁰⁾, basada en la medida de la velocidad de conversión de glucosa a fructosa, en un reactor de lecho empacado, bajo condiciones estándar (45 % p/p glucosa; pH 7,50; 60 °C; 99 mg/L Mg²⁺; 100 ppm SO₂⁻²; 2 mM Na₂CO₃; 0,40 < x < 0,45). Las muestras se analizaron por polarimetría. Ver Anexo C.

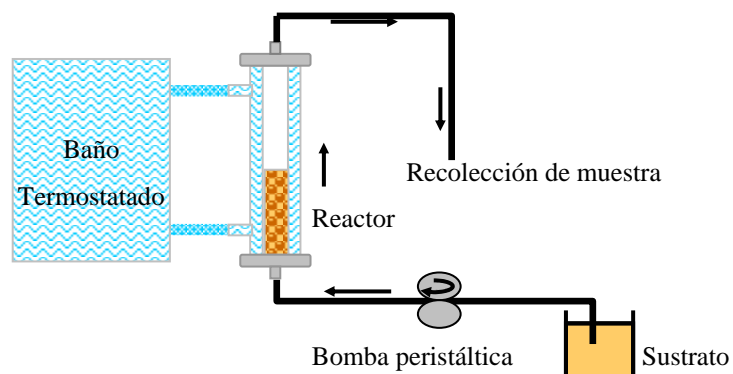
2.1.6 Determinación de la actividad enzimática en un reactor batch

La actividad de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada en un reactor batch se calculó por el método de velocidad inicial de reacción^(4, 9, 11, 21, 12). Para las pruebas de actividad, se añadieron 0,6 g de enzima fresca a 50 mL de sustrato A (glucosa 1 M), contenido en un reactor de 200 mL con agitación constante. La temperatura se mantuvo a 60 °C usando un baño termostatado. Las muestras retiradas del reactor a intervalos de 5 minutos fueron enfriadas en un crióstato (MK 70 - MLW) para detener la reacción. Las muestras se analizaron por polarimetría.

2.1.7 Operación del reactor de lecho empacado de glucosa isomerasa inmovilizada

La isomerización del jarabe de glucosa se llevó a cabo en un reactor de lecho empacado adoptando la metodología recomendada por Novo Nordisk para la determinación de la actividad enzimática⁽²⁰⁾. El sistema de reacción consistió en una columna de vidrio enchaquetada de 2,5 x 15 cm. La enzima inmovilizada fue inmersa previamente en el sustrato de glucosa durante una hora para su incubación. Posteriormente la enzima se trasladó al reactor hasta alcanzar una relación altura a diámetro de lecho (L/D) de 1/3, según lo recomendado por la literatura⁽²²⁾. Para garantizar una operación isotérmica se usó un baño termostataado. El sustrato fue alimentado a la columna a una velocidad de flujo constante utilizando una bomba peristáltica variable (Master-Flex[®] L/S[®] COLE-PARMER[®]). El esquema del montaje se presenta en la Figura 4.

Figura 4. Esquema del montaje del sistema de isomerización



2.2 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE ISOMERIZACIÓN

Para la evaluación de la influencia de las variables en el proceso de isomerización se utilizó un diseño factorial de experimentos (tamizado) del tipo 2^4 . La selección de las variables y los niveles de los factores se establecieron siguiendo las recomendaciones de la literatura^(2, 3, 7, 19, 16) como se muestra en la Tabla 7. Los niveles de todas las variables se normalizaron para evitar perturbaciones en la estimación del efecto de cada uno de los factores.

Tabla 7. Niveles experimentales de las variables seleccionadas

Factor	Nivel	
	+1	-1
Concentración inicial de glucosa (M)	3,90	1,80
pH	8,00	7,00
Temperatura (°C)	70,00	50,00
Tiempo de residencia (h)	0,77	0,38

El jarabe utilizado se elaboró siguiendo la metodología de preparación del sustrato A usando glucosa comercial. Para establecer el tiempo de residencia se mantuvo constante el volumen de lecho empacado correspondiente a 11,88 g de enzima y se varió el flujo volumétrico de sustrato usando una bomba peristáltica. Las corridas experimentales se llevaron a cabo en la columna de isomerización siguiendo la metodología descrita en la operación del reactor.

De las pruebas preliminares de estabilización del sistema de reacción se encontró el periodo requerido para operar en estado estacionario. Como se

trata de comparar los efectos relativos de las variables, las muestras se tomaron para los mismos tiempos. Las muestras se analizaron por polarimetría.

Las variables utilizadas como respuesta fueron la conversión y la productividad del reactor calculadas según las ecuaciones [19] y [18], respectivamente. La distribución para el diseño factorial del tipo 2^4 junto con la respuesta de cada experimento se reportan en el Anexo I. Cada corrida se realizó por duplicado y completamente al azar para prevenir tendencias sistemáticas por variables no controlables o desconocidas. La matriz del diseño experimental y el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se realizó por medio del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

2.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA REACCIÓN DE ISOMERIZACIÓN

Para determinar los parámetros cinéticos inherentes, esto es, en ausencia de restricciones difusionales, se llevaron a cabo corridas experimentales en un reactor discontinuo^(4, 21). Los parámetros cinéticos se determinaron mediante mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato. Para la reacción reversible de isomerización se determinaron a partir de datos de velocidad inicial de la reacción glucosa \rightarrow fructosa a distintas concentraciones iniciales de glucosa, y de datos de velocidad inicial de la reacción fructosa \rightarrow glucosa a distintas concentraciones iniciales de fructosa. Según las recomendaciones de la literatura⁽⁹⁾, se escogió un amplio intervalo de concentraciones iniciales de sustrato para determinar con precisión las constantes cinéticas de la enzima.

Previamente se llevaron a cabo corridas batch a tres temperaturas (60, 70 y 80 °C), para observar el progreso de la formación de producto con el tiempo, con el fin de establecer la duración de cada experimento cinético dependiendo de la porción lineal de la curva Concentración de Producto vs. Tiempo.

Los parámetros cinéticos fueron estimados a 60, 70 y 80 °C, usando 150 mL de sustrato A a un pH de 7,5 bajo condiciones de inactivación despreciable, es decir, utilizando la misma concentración alta de enzima como en las pruebas de actividad en un reactor batch (1,8 g de enzima). Los experimentos cinéticos se realizaron en un reactor discontinuo con agitación constante sumergido en un baño termostatado. Las muestras retiradas del reactor a intervalos cortos fueron enfriadas en un crióstato para detener el avance de la reacción. Las muestras se analizaron por polarimetría. Cada corrida se realizó por duplicado.

De las gráficas de Concentración de Producto vs. Tiempo se determinaron las velocidades iniciales de reacción para cada concentración inicial de sustrato. Las constantes de Michaelis y las velocidades máximas de las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás, se estimaron a partir de la representación gráfica de los inversos de velocidad inicial de reacción frente a los inversos de concentración de sustrato (linealización de Lineweaver-Burk^(4, 9, 10, 11, 12)). Mediante las ecuaciones [5], [6], [7], [8], y [9] se calcularon los valores de las constantes cinéticas y la constante de equilibrio, respectivamente.

2.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE CINÉTICO DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

Los parámetros de inactivación térmica fueron evaluados en pruebas de tiempo prolongado^(11, 15). Con el fin de estimar la constante de inactivación de primer orden en ausencia de protección por sustrato, se distribuyeron 4,8 g de enzima

inmovilizada fresca en ocho reactores batch provistos de agitación continua, que contenían la solución buffer mencionada anteriormente. Los ocho reactores fueron sumergidos en un baño termostatado que mantenía la temperatura en el valor requerido. La disminución en el coeficiente de actividad fue monitoreada retirando un reactor a la vez en intervalos regulares de tiempo. La enzima contenida en el reactor fue inmediatamente lavada (dos veces) con una solución buffer fresca y sometida a la prueba de actividad en un reactor batch descrita previamente, para determinar su actividad residual. Los experimentos se llevaron a cabo a 60, 70 y 80 °C. Cada corrida se realizó por duplicado.

Los estudios de inactivación en presencia de protección por sustrato se llevaron a cabo siguiendo la misma metodología cambiando la solución buffer contenida en los reactores por sustrato A (glucosa 3 M).

Las constantes de inactivación de primer orden en ausencia y presencia de protección por sustrato se determinaron de las pendientes de las líneas rectas obtenidas al graficar el logaritmo natural de los datos experimentales a/a_0 versus tiempo.

2.5 VALIDACIÓN DEL MODELO DE REACTOR DE ISOMERIZACIÓN

Para la validación del modelo del reactor de lecho empacado se compararon los resultados obtenidos en las corridas experimentales, con los resultados predichos por el modelo propuesto, bajo las mismas condiciones.

Las corridas experimentales se efectuaron en la columna de isomerización siguiendo la metodología descrita en la operación del reactor. Las pruebas se realizaron con diferentes concentraciones de sustrato A (glucosa 0,5; 1,1; 1,7; 2,5; 3,2 y 3,8 M a un pH de 7,5), diferentes tiempos de residencia (0,19; 0,38;

0,58; 0,77 y 0,96 h) y temperaturas de 60, 70 y 80 °C. Las muestras se tomaron cuando el sistema operaba en estado estacionario y se analizaron por polarimetría. Cada corrida se realizó por duplicado.

Para constatar la validez del modelo en condiciones de inactivación se sometió el sistema de reacción a 560 horas de operación continua, utilizando una concentración inicial de glucosa 3,9 M, acondicionada según la metodología de preparación del sustrato A, un tiempo de residencia de 0,38 h y una temperatura de 60 °C.

Igualmente se evaluó el modelo anterior con los resultados de la isomerización del jarabe de glucosa proveniente del almidón de yuca proporcionado por la investigación “Estudio a escala piloto del proceso de obtención de jarabes glucosados por hidrólisis enzimática del almidón de yuca” (Carreño, Y. y Rugeles, C., 2005). El jarabe glucosado de yuca inicialmente se sometió a un proceso de filtración, evaporación y limpieza con carbón activado para su posterior caracterización usando las técnicas analíticas mencionadas previamente.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la experimentación que concurren en el planteamiento del modelo del reactor de isomerización y su posterior validación, así como en el planteamiento de la estrategia de operación.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA ISOMERASA INMOVILIZADA EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO

Los resultados obtenidos para la determinación de la actividad enzimática en un reactor de lecho empacado se observan en la Tabla 8. La enzima *Sweetzyme IT*[®] presentó una actividad 16% menor a la publicada por el fabricante.

Tabla 8. Actividad enzimática de la glucosa isomerasa en un reactor de lecho empacado

Actividad declarada por el fabricante	400 IGIU/g
Actividad experimental (48 horas)*	338 IGIU/g

* ver ecuación en Anexo C

3.2 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE ISOMERIZACIÓN

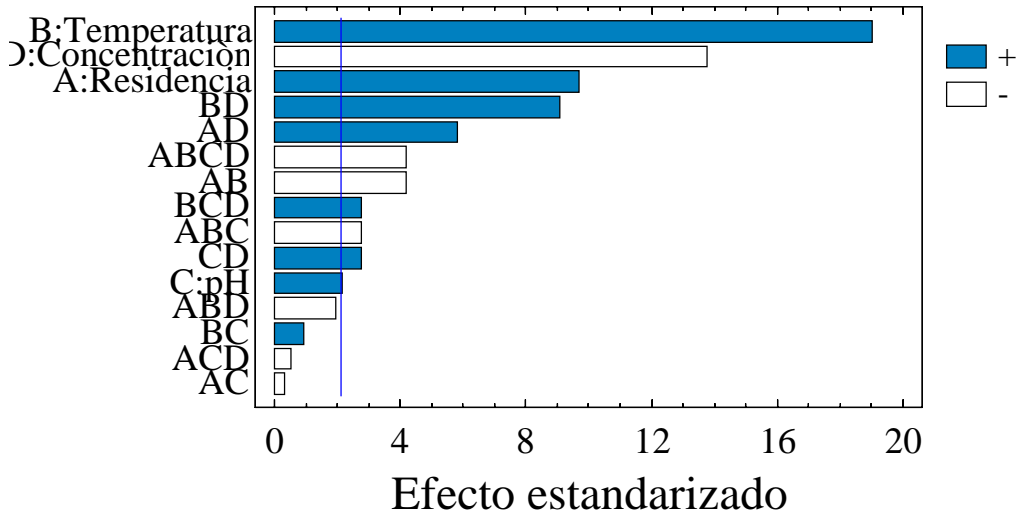
De las corridas preliminares en la columna de isomerización (ver Anexo H) se observó que aproximadamente después de 8 horas de operación el sistema alcanzaba la condición de estado estable para las diferentes condiciones establecidas.

La distribución para el diseño factorial del tipo 2^4 junto con las respuestas obtenidas se muestran en el Anexo I. Usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1, se calcularon los efectos principales e interacciones de las variables, cuyo análisis se presenta a continuación.

3.2.1 Evaluación de la influencia de las variables sobre la conversión

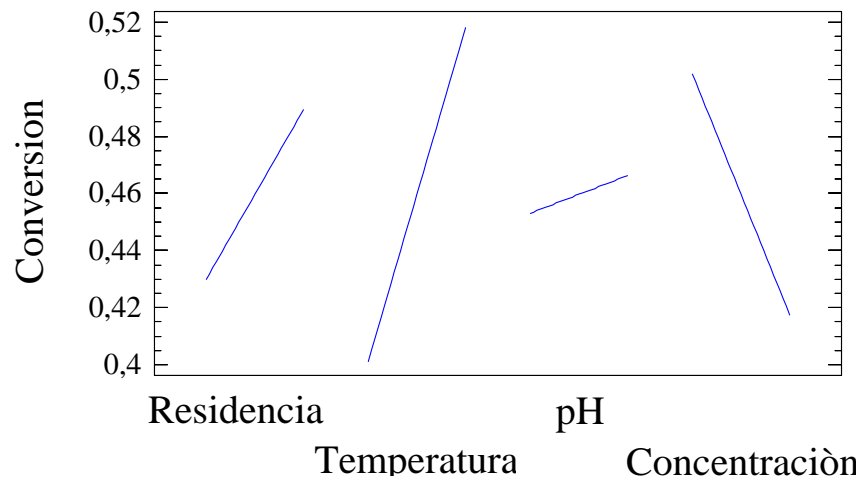
Tomando como variable dependiente la conversión del jarabe de glucosa en fructosa, se presenta en la Figura 5 cada uno de los efectos estimados e interacciones de las variables en orden de magnitud descendente. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado que es análogo al valor de distribución estadística de Student (t), se calcula dividiendo el efecto estimado en su error estándar. Las barras que se extienden más allá de la línea vertical o valor de distribución estadística de Student (t) corresponden a los efectos que son estadísticamente significativos en un nivel de confianza de 95 %. Los valores de los efectos estimados junto con el error estándar de cada uno se detallan en el Anexo J. En este caso 11 efectos son significativos estadísticamente.

Figura 5. Gráfico de los efectos estandarizados para la conversión



En la Figura 6 se individualizan los efectos principales para la conversión del sustrato. En cada recta el factor de interés se varía desde su nivel bajo a alto, mientras todos los demás factores se mantienen constantes en su valor medio.

Figura 6. Gráfico de los efectos principales para la conversión



Como se observa en la Figura 5, la temperatura es el factor de mayor efecto en la conversión del sustrato y su influencia es positiva, como en la mayoría de las reacciones químicas, donde la velocidad de reacción aumenta con la temperatura. Este efecto también se advierte en la Figura 6, donde al modificar la temperatura de 50 a 70 °C se eleva un 30 % la conversión del sustrato.

Por otro lado, la concentración del sustrato es el segundo factor en importancia para la conversión y, a diferencia de la temperatura, su efecto es negativo como se aprecia en las figuras anteriores: al incrementar la concentración de jarabe de 1,8 a 3,9 M se disminuye un 20 % la conversión. Tal efecto probablemente se debe a la mayor resistencia a la difusión en los poros del catalizador causado por las altas viscosidades alcanzadas cuando hay mayor concentración de sólidos en el jarabe^(2, 12).

Como se esperaba, el tiempo de residencia también tiene un efecto notable sobre la conversión, un aumento del tiempo de residencia de 0,38 a 0,77 horas eleva un 14 % la conversión; mientras que el efecto del pH es de poca relevancia comparado con los anteriores, para un cambio del pH de 7 a 8 simplemente se obtiene una conversión 3 % mayor.

La Figura 7, la Figura 8 y la Figura 9 representan las interacciones de parejas de factores que muestran los efectos más sobresalientes: Concentración-Temperatura, Concentración-Tiempo de Residencia y Temperatura-Tiempo de Residencia, respectivamente. Las curvas de superficie de respuesta se trazaron a partir del modelo generado por el análisis estadístico de los datos (ver Anexo J). Cada línea de contorno representa combinaciones de la pareja de factores para un valor seleccionado de conversión. Los otros factores se han mantenido constantes en su valor medio.

Figura 7. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Temperatura para la conversión

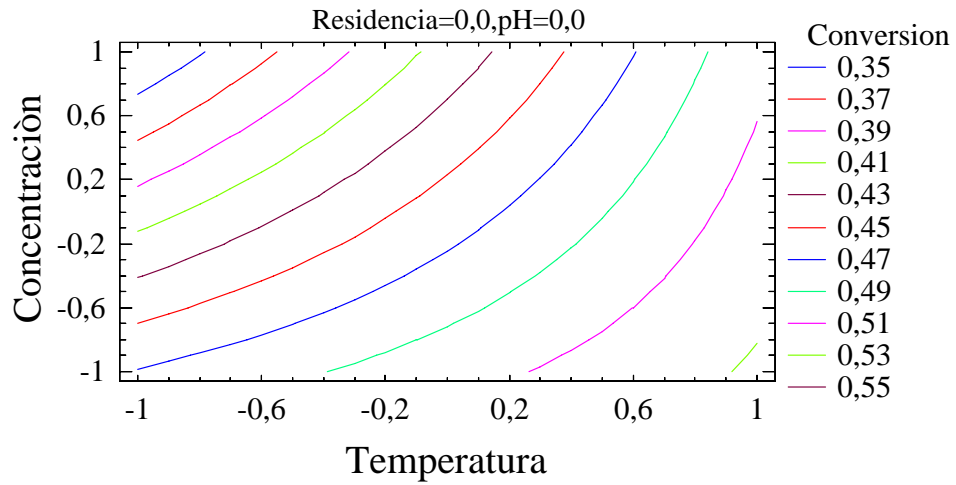
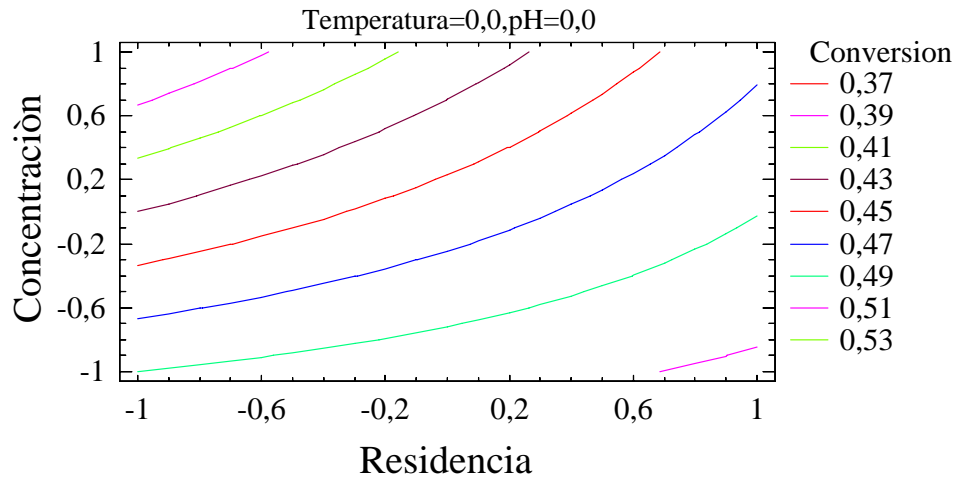


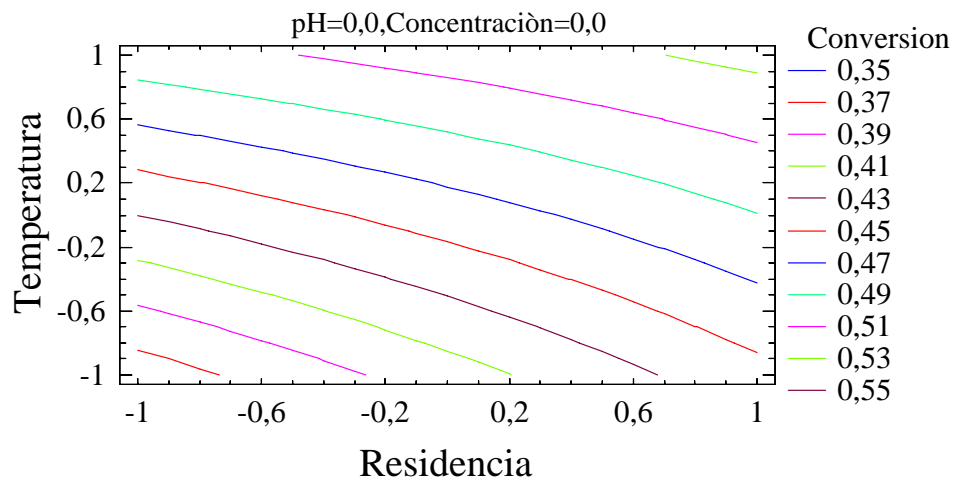
Figura 8. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Tiempo de Residencia para la conversión



Como se observa en la Figura 7, la conversión incrementa su valor de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, es decir, al aumentar la temperatura y disminuir la concentración de sustrato. Para el caso de la Figura 8, la

conversión se favorece a bajas concentraciones de sustrato y altos tiempos de residencia. Así mismo, en la Figura 9, para obtener altas conversiones de sustrato se requiere nuevamente altas temperaturas y altos tiempos de residencia.

Figura 9. Contornos de la superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo de Residencia para la conversión



3.2.2 Evaluación de la influencia de las variables sobre la productividad

Tomando como variable dependiente la productividad, en la Figura 10 se observan 13 efectos extendidos más allá de la línea vertical o valor de distribución estadística de Student (t), es decir, son estadísticamente significativos en un nivel de confianza de 95 %. Los valores de los efectos estimados se especifican en el Anexo K. Los efectos principales para la productividad se detallan en la Figura 11.

Figura 10. Gráfico de los efectos estandarizados para la productividad

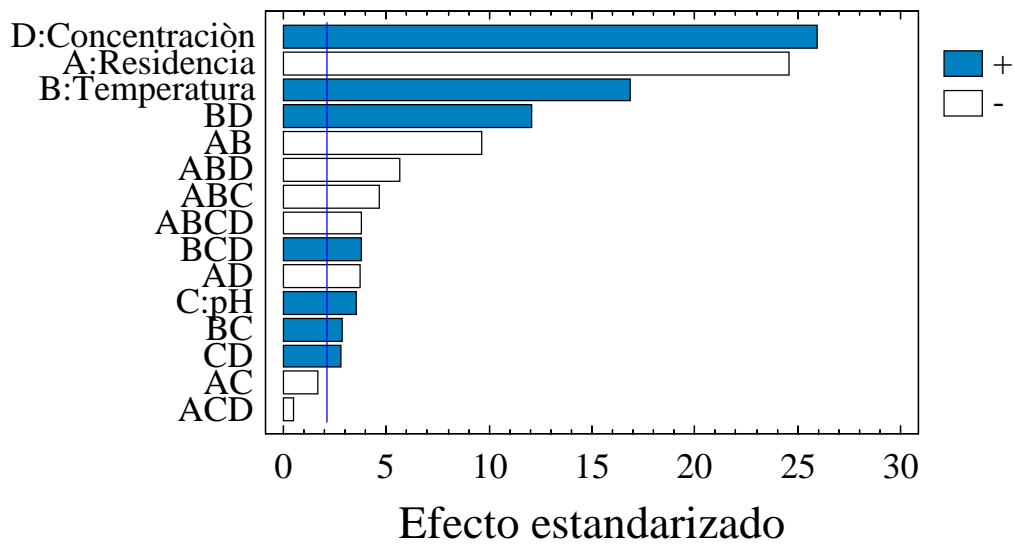
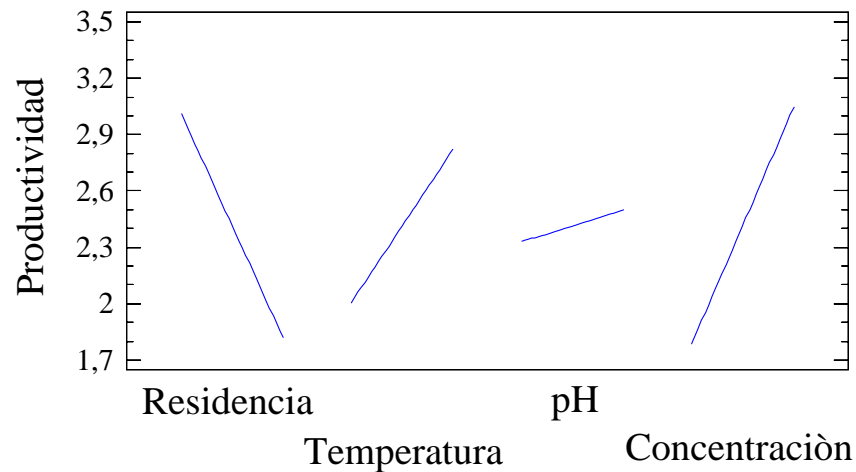


Figura 11. Gráfico de los efectos principales para la productividad



Como se observa en la Figura 10 la concentración es el factor de mayor efecto en la productividad y su influencia es positiva como se esperaba. Este efecto se advierte mas claramente en la Figura 11 donde al modificar la concentración de 1,8 a 3,9 M se eleva un 67 % la productividad.

Por otro lado, el tiempo de residencia es el segundo factor en importancia para la productividad y, a diferencia de la concentración, su efecto es negativo como se aprecia en las figuras anteriores: al incrementar el tiempo de residencia de 0,38 a 0,77 horas se disminuye un 66 % la productividad.

La temperatura también tiene un efecto notable sobre la productividad, un aumento de la temperatura de 50 a 70 °C eleva un 41 % la productividad; mientras que el efecto del pH es de poca relevancia comparado con los anteriores, para un cambio del pH de 7 a 8 simplemente se obtiene una productividad 6 % mayor.

La Figura 12, la Figura 13 y la Figura 14 representan las interacciones de parejas de factores que muestran los efectos más sobresalientes como son Concentración-Temperatura, Temperatura-Tiempo de Residencia y Concentración-Tiempo de Residencia, respectivamente. Las curvas de superficie de respuesta se trazaron a partir del modelo generado por el análisis estadístico de los datos (ver Anexo K).

Como se observa en la Figura 12, la productividad incrementa su valor de izquierda a derecha y de abajo hacia arriba, es decir, al aumentar la temperatura y la concentración de jarabe. En el caso de la Figura 13, para obtener altas productividades se requiere altas temperaturas y bajos tiempos de residencia. En la Figura 14 la productividad se favorece nuevamente a altas concentraciones de sustrato y bajos tiempos de residencia.

Figura 12. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Temperatura para la productividad

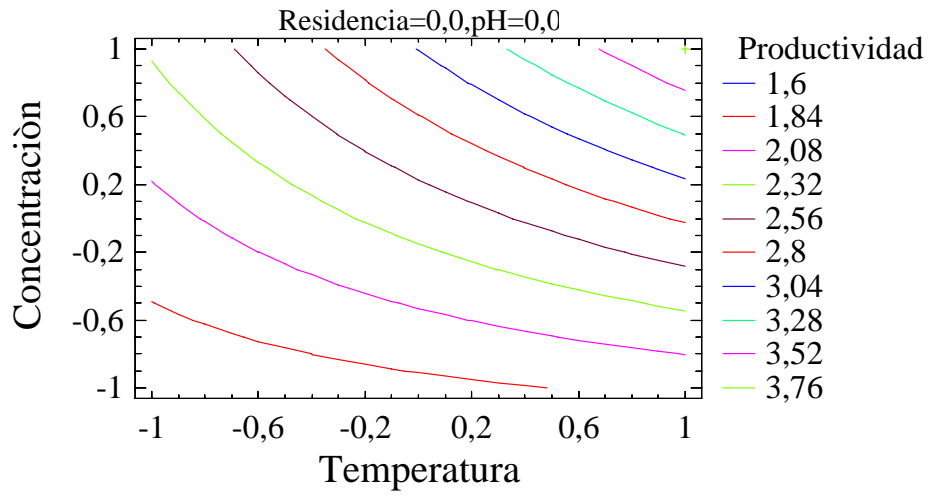


Figura 13. Contornos de la superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo de Residencia para la productividad

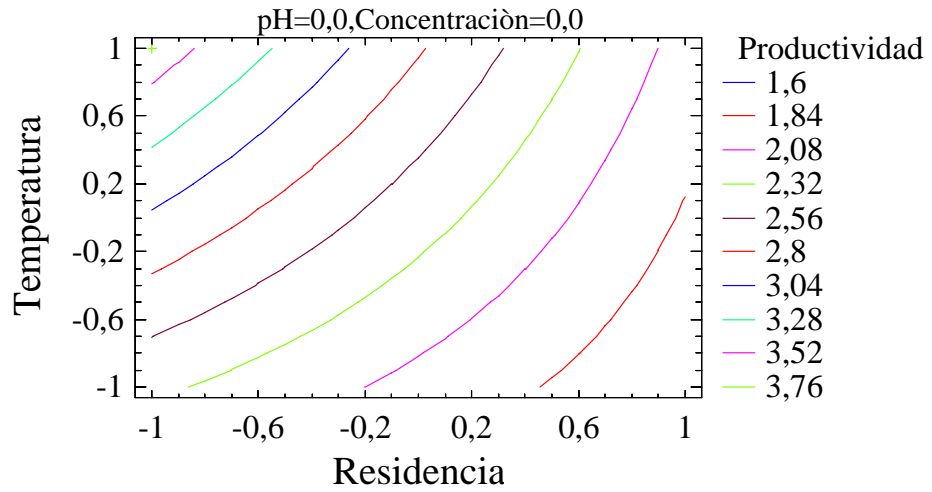
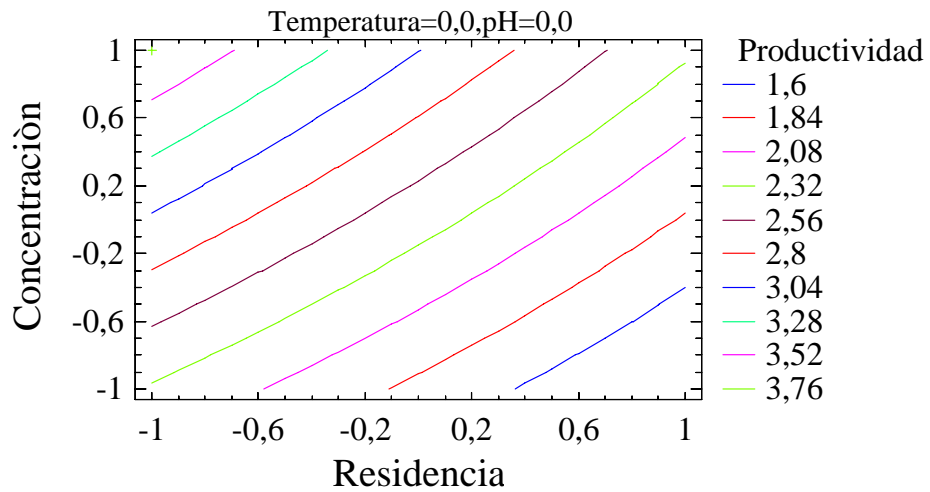


Figura 14. Contornos de la superficie de respuesta Concentración vs. Tiempo de Residencia para la productividad



La estimación de los efectos permitió constatar las tendencias de las variables dentro de los intervalos escogidos. Examinando la ecuación [18] se advierte que la productividad se beneficia a altas concentraciones de sustrato, a altas conversiones y a bajos tiempos de residencia, como se indicó en el análisis anterior. En contraste, la conversión se favorece a bajas concentraciones iniciales de sustrato (menor resistencia a la transferencia de masa) y altos tiempos de residencia.

No obstante, bajas concentraciones iniciales de sustrato y altos tiempos de residencia aumentan el riesgo de contaminación microbiana^(2, 5), así como altas concentraciones de sustrato incrementan notablemente la viscosidad del jarabe afectando la difusión en los poros de las partículas de la enzima y la caída de presión en el reactor. Igualmente, el tiempo de residencia (ecuación [15]) también dependerá de la altura máxima permisible en el reactor, la cual a su vez es función de las resistencias mecánicas del catalizador⁽¹⁾.

Por otra parte, la conversión, y en consecuencia, la productividad se benefician a temperaturas elevadas (mayor velocidad de reacción). Sin embargo, a mayor temperatura también aumenta la velocidad de inactivación térmica y la formación de subproductos. Asimismo, bajas temperaturas pueden incrementar el riesgo de contaminación microbiana^(2, 5).

Teniendo en cuenta estas restricciones, las condiciones para la isomerización en el reactor de lecho empacado son un compromiso económico entre el tiempo de uso de la enzima y la concentración de fructosa deseada. La estrategia de operación puede seleccionarse a partir de la curva de operación del reactor (x vs. t) donde se relacione la conversión con los parámetros cinéticos de la enzima, así como, la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción y en la inactivación de la enzima.

3.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA REACCIÓN DE ISOMERIZACIÓN

De las corridas batch llevadas a cabo previamente, para seguir el curso de la reacción, se establecieron intervalos de tiempo menores a 1,5; 1 y 0,75 h para las reacciones a 60, 70 y 80 °C, respectivamente (ver Anexo L).

Con los resultados obtenidos de los experimentos cinéticos realizados siguiendo la metodología descrita anteriormente, se trazaron las curvas Concentración de Producto vs. Tiempo para cada concentración inicial de sustrato (ver Anexo M) con el fin de determinar la velocidad inicial de reacción.

En el Anexo N se presentan las curvas de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de sustrato, a diferentes temperaturas, para las reacciones hacia delante y hacia atrás, respectivamente.

Usando el método de linealización Lineweaver-Burk (ver Anexo N) se determinaron, para el sistema en consideración, las constantes de Michaelis (K_m) y las velocidades máximas (V_m) de las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la glucosa isomerasa a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	60	70	80
V_{ma} (mol / h · g enzima)	0,025	0,042	0,077
K_{ma} (M)	0,74	0,83	1,01
R^{2*}	0,9987	0,9999	0,9958
V_{mr} (mol / h · g enzima)	0,016	0,037	0,087
K_{mr} (M)	0,49	0,84	1,60
R^{2*}	0,9991	0,9796	0,9935
k_{+1} (M^{-1})	2,70	4,76	8,07
k_{-1}	0,80	1,84	4,31
k_{+2}	1,22	2,09	3,81
k_{-2} (M^{-1})	4,11	4,69	5,08
k_{+1}/k_{-1} (M^{-1})	3,40	2,59	1,87
k_{-1}/k_{+1} (M)	0,29	0,39	0,53
k_{+2}/k_{-2} (M)	0,30	0,45	0,75
k_{-2}/k_{+2} (M^{-1})	3,37	2,25	1,33
K_e	1,01	1,15	1,40
x_e^{**}	0,50	0,54	0,58

*Coeficientes de determinación R cuadrado obtenidos para las reacciones hacia delante y hacia atrás por interpolación lineal de las gráficas Lineweaver-Burk

**Conversión en el equilibrio

V_{ma} y V_{mr} , son las velocidades máximas de las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás, definidas por las ecuaciones [7] y [8], respectivamente, donde k_{-1} y k_{+2} son constantes de primer orden (ver Tabla 9). En este caso, incrementan continuamente en el intervalo de temperatura ensayado. A 60 °C, V_{ma} es mayor que V_{mr} , luego $k_{+2} > k_{-1}$ y a 80 °C, V_{ma} es menor que V_{mr} , por tanto, $k_{-1} > k_{+2}$. En particular, cuando la temperatura es aproximadamente 74 °C se verifica la condición $V_{ma} = V_{mr}$, esto es, $k_{-1} = k_{+2}$ (ver Anexo O).

K_{ma} y K_{mr} , son las relaciones de constantes de velocidad de las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás, definidas por las ecuaciones [5] y [6], respectivamente, donde k_{+1} y k_{-2} son constantes de segundo orden (ver Tabla 9). En este caso, incrementan continuamente en el intervalo de temperatura examinado. A 60 °C, K_{ma} es mayor que K_{mr} , luego $k_{+1} < k_{-2}$ y a 80 °C, K_{ma} es menor que K_{mr} , por tanto, $k_{+1} > k_{-2}$. En particular, cuando la temperatura es aproximadamente 70 °C se verifica la condición $K_{ma} = K_{mr}$, esto es, $k_{+1} = k_{-2}$ (ver Anexo O).

En el intervalo de temperatura estudiado, tanto k_{-1}/k_{+1} , la constante de equilibrio para la disociación de ES en E y S, como k_{+2}/k_{-2} , la constante de equilibrio para la disociación de ES en E y P, son de poco valor, indicando de esta forma una gran afinidad de la enzima por el sustrato, es decir, la formación del complejo ES se ve favorecida. No obstante, los valores de estas constantes de disociación aumentan con la temperatura, luego la descomposición del complejo se favorece al incrementar la temperatura.

Simultáneamente, k_{+2}/k_{-2} es siempre mayor que k_{-1}/k_{+1} , lo que señala una notable tendencia del complejo ES a desdoblarse en E y P, además, esta diferencia aumenta con la temperatura, por consiguiente, altas temperaturas benefician aún más la conversión a producto.

Esto se confirma al observar los valores de k_{+2} y k_{-1} , los cuales son parámetros homogéneos que corresponden a eventos monomoleculares. Inicialmente a temperaturas menores a 70°C, k_{+2} excede a k_{-1} , es decir, la velocidad de descomposición de ES en E y P es mucho mayor que la velocidad de descomposición en E y S, corroborando a su vez la imposibilidad de manejar la enzima glucosa isomerasa con la hipótesis de equilibrio rápido de Michaelis-Menten y validando la aproximación de estado estacionario de Briggs-Haldane. Pero a temperaturas mas allá de 70 °C, k_{+2} es menor que k_{-1} , por lo tanto, se esperaría que un incremento en la temperatura desplace el equilibrio hacia la reacción reversa de fructosa a glucosa.

Sin embargo, las constantes de segundo orden, k_{+1} y k_{-2} , también incrementan con la temperatura. Para temperaturas cercanas a 70 °C, k_{+1} supera a k_{-2} influyendo así la posición de equilibrio. Debido a la mayor trascendencia de este ultimo efecto en comparación al anterior, las constantes de disociación y la constante de equilibrio (K_e , ver Tabla 9) se incrementan continuamente dentro del intervalo de temperatura estudiado.

Del ajuste de los datos anteriores se generaron las expresiones de dependencia térmica para todos los parámetros cinéticos, que concurren en el modelo de comportamiento del reactor enzimático, de acuerdo con la ecuación [22], resumidas en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de k_o y E_a/R para los parámetros cinéticos de la reacción de isomerización (60 - 80°C)

Parámetro	k_o	E_a/R (K)	R^{2*}
K_{ma} (M)	143,65	1758,5	0,9626
K_{mr} (M)	5,43E+08	6946,1	0,995

k_{-1}	6,93E+12	9929,4	0,9996
k_{+2}	6,43E+08	6695,8	0,9978

* Coeficientes de determinación R cuadrado obtenidos para los parámetros cinéticos por interpolación lineal de las gráficas de Arrhenius

3.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE CINÉTICO DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

En el Anexo P se presentan los resultados experimentales de inactivación obtenidos en un reactor batch: la actividad residual está graficada contra el tiempo de desnaturalización para tres temperaturas (60, 70 y 80 °C).

La Tabla 11 resume los valores de las constantes de inactivación de primer orden, en ausencia (k_f) y en presencia de protección por sustrato (k_d), a diferentes temperaturas, estimados de las pendientes de las gráficas del logaritmo natural de los datos experimentales a/a_0 versus tiempo (ver Anexo P).

Tabla 11. Parámetros de inactivación térmica de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	60	70	80
k_f (h ⁻¹)*	0,0016	0,0071	0,0365
k_d (h ⁻¹)**	0,0009	0,0043	0,0229
k_d (n = 0,5) (h ⁻¹)***	0,001	0,0043	0,023
$t_{1/2}$ (h)*	433,2	97,6	19,0
$t_{1/2}$ (h)**	770,2	161,2	30,3

*Para $S_0 = 0$ M

**Para $S_0 = 3$ M

***Constante de inactivación para $S_0 = 3 \text{ M}$, calculada a partir de las ecuaciones [26] y [27], con $n = 0,5$ y usando la constante de inactivación experimental en ausencia de protección por sustrato (k_f)

En la Tabla 11 se observa cómo los valores de las constantes de inactivación de la enzima aumentan progresivamente con la temperatura, indicando así el descenso rápido de la actividad enzimática a temperaturas altas. De igual forma, se percibe claramente el efecto adicional de la protección por el sustrato contra la inactivación de la glucosa isomerasa para las temperaturas estudiadas.

Además, el efecto de la protección por sustrato adquiere su importancia en la prolongación del tiempo de vida media de la enzima: para las tres temperaturas estudiadas se observa que el tiempo de vida media incrementa aproximadamente un 60 % cuando la enzima está protegida por el sustrato.

Por otro lado, comparando la constante de inactivación experimental en presencia de protección por sustrato y la calculada a partir de las ecuaciones [26] y [27], se confirma que el factor $n = 0,5$ representa una aproximación aceptable de los datos empíricos.

A partir de la gráfica del logaritmo natural de los datos experimentales k_f vs. $1/T$ se obtiene la siguiente relación tipo Arrhenius para la constante de inactivación en ausencia de protección por sustrato:

$$k_f = 1,42E + 21 \cdot \exp\left(\frac{-18383}{T}\right) \quad [28]$$

3.5 MODELAMIENTO MATEMÁTICO Y VALIDACIÓN DEL REACTOR ENZIMÁTICO DE LECHO EMPACADO

Para el modelamiento del reactor de lecho empacado de enzima inmovilizada, se consideraron las siguientes suposiciones con el fin de simplificar el modelo:

- ❑ La dispersión axial y radial es despreciable, es decir, el flujo de sustrato a través del reactor es flujo tapón.
- ❑ No existen limitaciones difusionales, esto es, el factor de eficacia (η) es igual a la unidad.
- ❑ Proceso isotérmico.
- ❑ Condición de estado pseudo-estacionario.
- ❑ La actividad residual de la enzima es una función débil de la concentración del sustrato.
- ❑ El mecanismo cinético de la reacción de isomerización cumple la hipótesis de Briggs-Haldane.

Bajo estas condiciones asumidas, la ecuación de diseño del lecho empacado puede expresarse de acuerdo con la ecuación [17].

En el Anexo Q se observa la comparación entre los valores de conversión calculados usando el modelo matemático anterior y aquellos obtenidos experimentalmente para el jarabe glucosado de maíz y para el jarabe glucosado de yuca, en condiciones de desnaturalización despreciable. Los resultados de la caracterización del jarabe obtenido por hidrólisis enzimática del almidón de yuca se presentan en el Anexo R. En el Anexo S se muestra la comparación entre los valores de conversión calculados usando el modelo matemático y aquellos obtenidos experimentalmente con jarabe glucosado de maíz, para un tiempo de operación de 560 horas.

El error relativo medio estimado en la validación del modelo con los datos experimentales del jarabe glucosado de maíz es igual a 4 % (ver Anexo T), posiblemente debido a las restricciones de idealidad del modelo, a pesar de ello, el modelo generado representa un ajuste aceptable del comportamiento del reactor de lecho empacado en el intervalo de condiciones establecidas.

Por otra parte, en el caso del jarabe de glucosa proveniente del almidón de yuca, el error estimado es considerable (ver Anexo T), probablemente por el mayor porcentaje de otros oligosacáridos en el sustrato que pueden disminuir la actividad enzimática al bloquear la superficie activa de la enzima; por el alto contenido de iones Ca^{+2} en el jarabe que compiten exitosamente con el Mg^{+2} por el sitio activo de la enzima, aunque dicho efecto inhibitorio trató de contrarrestarse manteniendo un exceso de magnesio en el alimento recomendado por la literatura^(2, 3, 5); y por la presencia de otras impurezas que posiblemente no fueron removidas de manera eficiente en el proceso de refinación y pueden causar la inactivación de la enzima.

A partir del modelo matemático anterior puede establecerse la política de operación del reactor que maximiza la producción total y logra un jarabe de calidad uniforme, esto es, conversión constante a medida que el catalizador pierde actividad. Entre las estrategias para compensar esta pérdida se consideran reemplazos periódicos del catalizador, perfiles de temperatura y perfiles de flujo^(1, 3, 4, 5, 11). Generalmente el catalizador se emplea de dos a tres tiempos de vida media, es decir, cuando solo queda del 20 al 10 % de la actividad inicial.

Para una conversión de 45 % a la salida del reactor, se puede perfilar la temperatura con el tiempo con el fin de incrementar la velocidad de reacción y compensar de esta forma el descenso en la conversión debido a la pérdida de actividad de la enzima (ver Anexo U). En la Tabla 12 se presenta la producción

total del reactor para cada tiempo de residencia dado. Se aprecia que a tiempos de residencia altos se alcanzan tiempos de operación (t_f) mayores, sin embargo, los gramos de fructosa producidos por hora se reducen.

Para el caso analizado con propósitos comparativos (11,88 g de enzima, ver Anexo W), la diferencia entre el costo de producción para los tiempos de residencia estudiados depende básicamente del costo de enzima y el costo del servicio industrial (electricidad), que a su vez es función del tiempo de operación. Para el menor tiempo de residencia (0,38 h), que representa el menor tiempo de operación y la producción de fructosa por hora más alta, se tiene el más bajo costo total por gramo de fructosa producido, debido al menor costo del servicio industrial a pesar de que el costo de enzima por gramo de fructosa producido (0,46 \$/g) es el mayor. Cabe anotar que para los tiempos de residencia restantes (0,5; 0,77 y 1 h), el costo de enzima fue similar (0,36; 0,35 y 0,33 \$/g). La elección del tiempo de operación del reactor dependerá en gran medida de los costos de limpieza y recarga del reactor.

Tabla 12. Producción total de fructosa usando perfiles de temperatura a diferentes tiempos de residencia dados para una concentración inicial de glucosa 2 M

τ (h)	t_f (h)	g de fructosa producidos	Costo / g* (\$/g)	Costo E / g** (\$/g)	g / g E***
1,00	1430	6421	85,78	0,33	540,46
0,77	1040	6064	68,99	0,35	510,47
0,50	650	5837	49,29	0,36	491,33
0,38	390	4608	40,62	0,46	387,89

*Costo total por g de fructosa producido

**Costo de la enzima por g de fructosa producido

***g de fructosa producidos por gramo de enzima

Manteniendo la temperatura y la conversión constantes durante la operación del reactor, también se puede perfilar el tiempo de residencia para contrarrestar la pérdida de actividad de la enzima (ver Anexo V). Se observa que bajas temperaturas de operación requieren mayores tiempos de residencia para mantener la conversión constante.

El incremento del tiempo de residencia puede lograrse reduciendo el flujo de alimentación al reactor y por lo tanto, obtener una velocidad de producción variable y decreciente, lo cual resulta inadecuado para las etapas de post-reacción; o mediante el uso de varios reactores en serie o paralelo que operan desfasados para contrarrestar la disminución de la actividad enzimática, permitiendo a su vez que el proceso no se interrumpa al detener un reactor para su regeneración, sin embargo, los costos por tubería, válvulas e instrumentación se incrementan. Igualmente, combinando estas estrategias puede atenuarse la variación del flujo a la salida de la etapa de reacción mediante el uso del sistema de reactores desfasados. A partir de la capacidad de la planta y la máxima carga de enzima permisible en el reactor puede calcularse los cambios en la velocidad de producción o los periodos de reemplazo de la enzima.

4. CONCLUSIONES

La estimación de los efectos de las variables (concentración de glucosa, temperatura, pH y tiempo de residencia) en el proceso permitió constatar las tendencias de las mismas dentro de los intervalos escogidos. Se encontró que la conversión se favorece a bajas concentraciones iniciales de sustrato (menor resistencia a la transferencia de masa) y altos tiempos de residencia, en contraposición a la productividad.

La determinación de los parámetros cinéticos de la glucosa isomerasa inmovilizada a diferentes temperaturas confirmó la influencia positiva de la temperatura sobre la velocidad de reacción beneficiando la conversión y en consecuencia, la productividad.

La determinación de la constante de inactivación térmica a diferentes temperaturas comprobó el efecto negativo de la temperatura sobre la actividad de la glucosa isomerasa inmovilizada reflejado en los diferentes tiempos de vida media alcanzados. Así mismo, se verificó la protección que ejerce el sustrato contra la inactivación térmica de la enzima.

El modelo propuesto, basado en las consideraciones del mecanismo cinético de Briggs-Haldane y el modelo de inactivación de primer orden para un reactor de lecho empacado ideal, predice satisfactoriamente el comportamiento del reactor de isomerización usando jarabe glucosado de maíz, confirmando así la validez del procedimiento empleado para la estimación de los parámetros. Sin embargo, no se ajusta favorablemente cuando se usa el jarabe de glucosa obtenido a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

A partir del modelo generado y las diferentes estrategias de operación se puede seleccionar las condiciones de operación adecuadas que maximizan la producción total de jarabe y minimizan los costos de operación manteniendo la conversión constante a medida que la enzima pierde actividad.

5. RECOMENDACIONES

Entre las futuras investigaciones que contribuirían con el modelamiento en condiciones reales del proceso están:

Evaluar las resistencias difusionales internas y externas en el proceso de isomerización enzimática de glucosa.

Evaluar la dispersión del flujo en el reactor empacado con glucosa isomerasa inmovilizada.

Caracterizar el jarabe de glucosa obtenido a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de yuca utilizando técnicas analíticas de mayor resolución tales como HPLC con detector de índice de refracción y la posterior evaluación del proceso de purificación mediante resinas de intercambio iónico y carbón activado.

BIBLIOGRAFÍA

1. GARCÍA, Mariano; QUINTERO, Rodolfo y LÓPEZ, Agustín. Biotecnología alimentaria. México : Limusa, 1993. p. 526-536
2. NAGODAWITHANG, Tilak and REED, Gerald. Enzymes in food processing. 3 ed. London : Academic Press, 1993. p. 20-115, 330-339
3. CRUEGER, Anneliese and CRUEGER, Wulf. Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. 2 ed. Sunderland : Sinauer, 1990. p.191-220.
4. ILLANES, Andrés. Biotecnología de enzimas. Valparaíso : Universidad Católica de Valparaíso, 1994. p.103-193, 202-206
5. CHEETHAM, P. Handbook of Enzymes. London : Wiley, 1984. p. 61-193, 322-335.
6. INGLETT, G. Sweeteners-a review. En: Food Technology. (mar. 1981); p. 37
7. HULTIN, H. Current and potential uses of immobilized enzymes. En: Food Technology. (oct. 1983); p. 66-82, 176
8. BENAIGES, Dolores y SOLA, Carlos. Isomerización de glucosa mediante enzima inmovilizado. En: Ingeniería Química. (may. 1985); p. 131-135

9. TREVAN, Michael D. Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology. New York : Wiley, 1980. p. 93-118
10. BRUCHMANN, Ernest-Erich. Bioquímica técnica. Zaragoza : Acribia, 1980. p. 34-44, 73-79, 118-119
11. QUINTERO, Rodolfo. Ingeniería bioquímica. México : Alhambra, 1981. p. 95-219, 233-246
12. LOPEZ-MUNGUÍA, A. y Quintero, R. Tecnología Enzimática. Universidad Autónoma de México. 1987.
13. WINGRAD, L. Applied biochemistry and bioengineering. New York : Academic Press, 1976. p. 223-341
14. CARASIK, William y CARROLL, John. Development of immobilized enzymes for production of high fructose corn syrup. En: Food Technology. (oct. 1983); p. 85-91
15. PALAZZI, Emilio y CONVERTI, Attilio. Generalized Linearization of kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 63, No. 3 (may 1999); p. 273-284
16. NOVO NORDISK. Ficha técnica : Sweetzyme® IT. 2002
17. SÁNCHEZ, Alberto. Obtención de jarabes de D-glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga,

armenia y chile) cultivadas en la región de guanentá (Santander). Bucaramanga, 2002, 89 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

18. PEDRAZA, Juan Francisco y CAMARGO, Jaime. Prácticas de química analítica cuantitativa. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 1989. p. 77-79

19. BLANCO, Juan Carlos. Producción de jarabes especiales de alta fructosa a partir de jarabes de glucosa obtenidos de tres variedades de yucca (Armenia, amarga y chile) cultivadas en la región guanenta (Santander). Bucaramanga, 2002, 81 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

20. NOVO NORDISK. Analytical method : immobilized glucose isomerase Sweetzyme® IT

21. LEVENSPIEL, Octave. Ingeniería de las reacciones químicas. México : Reverte, 1997. p. 531-556.

22. ROJAS, Luisa Fernanda y Mazo, Juan Camilo. Isomerización de glucosa a fructosa a nivel de laboratorio, a partir de glucosa isomerasa inmovilizada. Medellín, 2002, 109 p. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

Anexo A. Poder endulzante de diversos edulcorantes

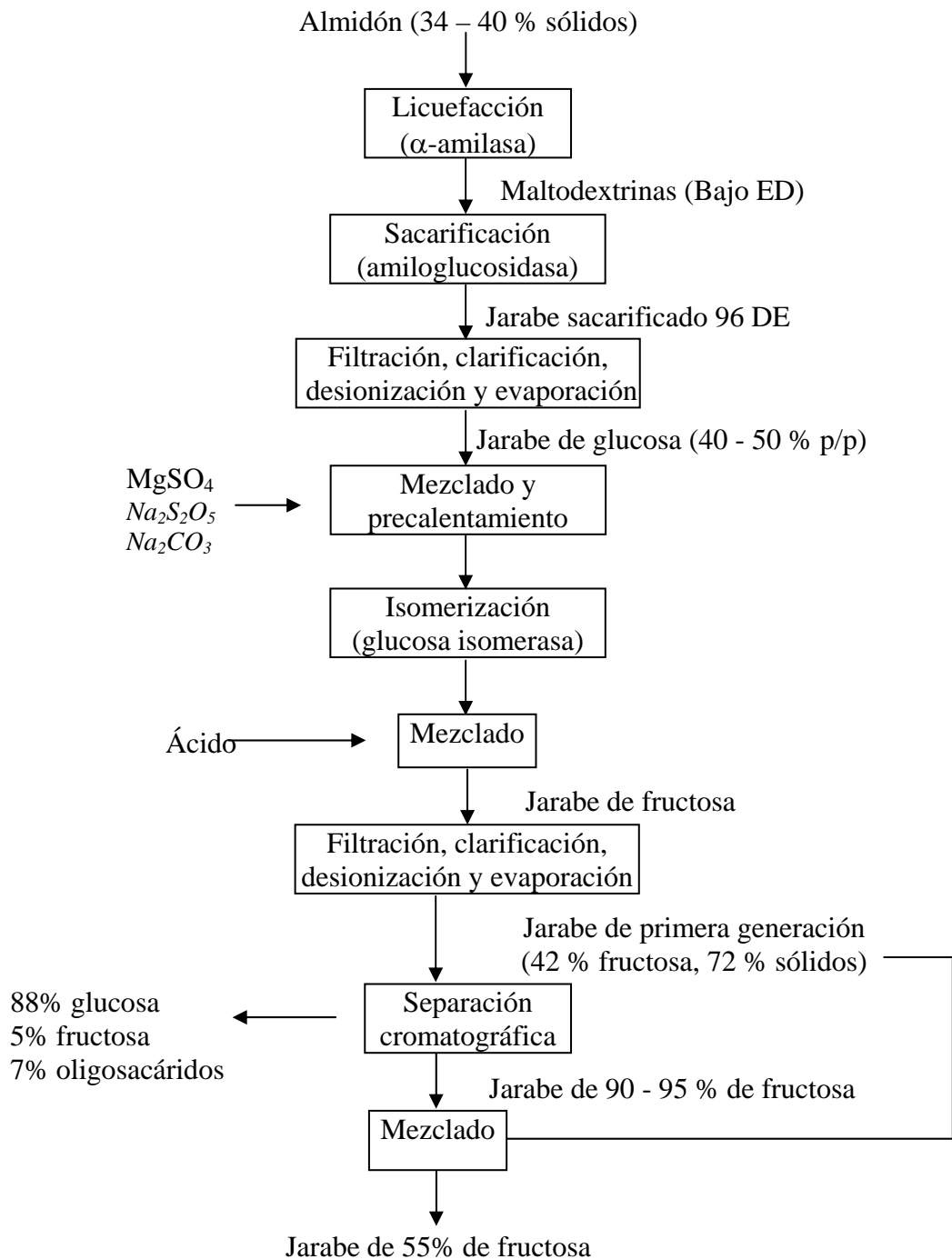
Edulcorante	Poder endulzante*
Sacarosa	1,00
Glucosa	0,70
Fructosa	1,40
Galactosa	0,70
Xilosa	0,40
Maltosa	0,30
Lactosa	0,20
Azúcar invertido	1,00
Rafinosa	0,22
Sacarosa hidrolizada	1,10
Lactosa hidrolizada	0,70
Jarabes glucosados (11 %)	< 0,10
Jarabes glucosados (42 %)	0,30
Jarabes glucosados (97 %)	0,70
Jarabes fructosados (42 %)	1,00
Jarabes fructosados (55 %)	1,10
Jarabes fructosados (90 %)	1,50
Jarabes maltosados (45 - 60 %)	0,40
Jarabes maltosados (70 - 85 %)	0,60
Sorbitol	0,60
Manitol	0,50
Xilitol	1,00
Aspartame (Nutra Sweet®)	180,00
Acesulfame-K (Sunsett®)	200,00

Sacarina	300,00
Ciclamato	30,00
Alitamo (Aclame®)	2160,00
Monelina (proteína)	2500,00
Taumatina (proteína)	3000,00
Miraculina (proteína)	15000,00

*Poder endulzante relativo a la sacarosa

Fuente: García, M.; Quintero, R. y López, A, 1993⁽¹⁾

Anexo B. Producción de jarabes de glucosa y fructosa provenientes del almidón



Fuente: Cheetham, P., 1984⁽³⁾

Anexo C. Método analítico para la determinación de la actividad de la glucosa isomerasa inmovilizada Sweetzyme IT[®] recomendado por Novo Nordisk

Principio: la enzima es empacada dentro de una columna donde cataliza la reacción de isomerización del jarabe de glucosa bajo condiciones estándar. La conversión de glucosa a fructosa se mide usando un polarímetro y la actividad de la enzima se calcula basándose en la velocidad de conversión del proceso.

Condiciones estándar

Sustrato	: glucosa, 45% p/p
pH	: 7,5
Temperatura	: 60 °C
Mg ⁺²	: 99 mg/L (1 g/L de MgSO ₄ .7H ₂ O)
SO ₂	: 100 ppm (0,18 g/L de Na ₂ S ₂ O ₅)
Ca ⁺²	: < 2 ppm
Conversión	: 0,40 < x < 0,45
Buffer	: 2 mM Na ₂ CO ₃

Equipos

Baño de agua termostataado

Columna de vidrio de 2,5 x 20 cm

Bomba peristáltica variable

Polarímetro

pHmetro

Reactivos

Solución de ácido sulfúrico 0,5 M

Solución de hidróxido de sodio 1 N

Solución de hidróxido de sodio 4 N

Preparación del sustrato de glucosa 45 % p/p, pH 7,5

539 g de glucosa anhidra, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,21 g de Na_2CO_3 y 0,18 g/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ se disuelven completamente en 700 mL de agua desmineralizada con agitación y calentamiento (máximo 70 °C). Después de enfriarse a 25 °C, el pH se ajusta a 7,5 usando H_2SO_4 0,5 M. Finalmente se afora a 1 L con agua desmineralizada.

Procedimiento

A la enzima pesada en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregan 45 mL de sustrato y se agita suavemente cada 5 minutos durante los primeros 15 minutos y después ocasionalmente por 45 minutos. Previamente se ajusta la temperatura a 60 °C en la columna de vidrio mediante un baño de agua termostatado. Luego se transfiere cuantitativamente la enzima incubada a la columna de vidrio usando la solución de sulfato de magnesio y procurando evitar que la enzima entre en contacto con el aire. Después de asentarse la enzima se ajusta el flujo de entrada a la columna de tal forma que el grado de conversión esté entre 0,40 y 0,45. Entre las 20 y 24 horas después de iniciado el proceso se colecta la primera muestra de jarabe a la salida de la columna para controlar la conversión de glucosa a fructosa. Se ajusta el flujo de tal forma que la conversión este en el intervalo señalado. El pH debe ajustarse si es necesario. Las muestras siguientes son colectadas entre las 42 y 48 horas después de iniciado el proceso. Estas muestras son usadas para determinar la actividad enzimática. 0,1 mL de NaOH 4N se añaden a las muestras colectadas

para acelerar el equilibrio de mutarotación. La rotación óptica de la muestra se puede medir durante los 45 minutos siguientes a la recolección de la muestra.

La actividad enzimática es expresada en IGIU/g, calculada por la fórmula:

$$\frac{IGIU}{g} = 0,926 \cdot \frac{F}{W} \cdot x_e \cdot DS \cdot \ln\left(\frac{x_e}{x_e - x}\right)$$

donde:

0,926 : factor de conversión de unidades (g/h a $\mu\text{mol}/\text{min}$)

F : flujo de jarabe (g/h)

W : peso de la enzima (g)

x_e : conversión en el equilibrio (0,507 a 60 °C)

DS : sustrato de glucosa (% p/p)

x : conversión final del jarabe

1 IGIU es la cantidad de enzima que en condiciones estándar convierte un μmol de glucosa en fructosa por minuto.

Anexo D. Método analítico para la determinación de azúcares reductores

Principio: los azúcares reductores reaccionan con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) dando como producto el compuesto coloreado 3-amino-5-nitrosalicilato. La absorbancia del compuesto guarda una relación directamente proporcional a la concentración molar de los azúcares reductores, se mide usando un espectrofotómetro. La concentración de azúcares reductores se determina de una gráfica de absorbancia en función de la concentración de glucosa

Equipos

Baño termostataado

Criostato

Espectrofotometro

Preparación del reactivo DNS

Se mezclaron y se disolvieron 8 g de NaOH y 15 g de tartrato de sodio y potasio en 250 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 5 g de DNS bajo calentamiento. Se aforó a 500 mL con agua desionizada y se almacenó a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.

Preparación de las soluciones de glucosa

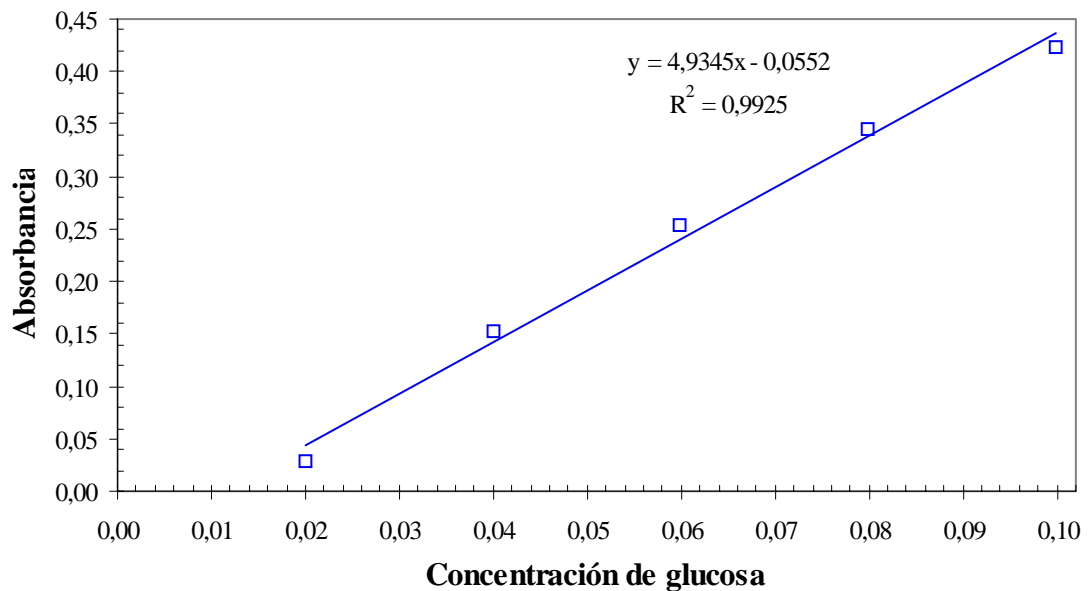
Para la elaboración de la curva estándar de glucosa se preparó una solución de glucosa (grado analítico MERCK) de concentración 1000 ppm. Por dilución de

ésta se prepararon cuatro soluciones, de concentraciones , 200, 400, 600, y 800 ppm, respectivamente.

Procedimiento

Para obtener los datos de la curva de calibración se mezcló 1 mL de solución de glucosa con 1 mL de reactivo DNS en un tubo de ensayo con tapa. Se dejó reaccionar en un baño con agua en ebullición por 5 minutos. La reacción se detuvo introduciendo el tubo de ensayo en un crióstato por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 10 mL de agua desionizada y se dejó reposar durante 10 minutos. Finalmente se midió su absorbancia a 540 nm. Se preparó el blanco depositando 1 mL de agua desionizada en el tubo de ensayo en lugar de la solución de glucosa y se siguió el procedimiento anterior.

Curva de calibración Absorbancia (540 nm) vs Concentración de glucosa



Anexo E. Método analítico para la determinación de Ca^{+2}

Reactivos

Solución Buffer: se disuelven 3,4 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 29 mL de hidróxido de amonio concentrado. Se disuelven separadamente 0,2358 g de EDTA, sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético, y 0,1560 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 0,1288 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua destilada. Se agrega esta solución a la preparada inicialmente, agita bien y diluye con agua destilada hasta obtener un volumen de 50 mL.

Indicador de negro de ericromo.

Solución EDTA 0,01 F: se pesa exactamente 3,7230 g de EDTA, reactivo analítico, se disuelve con agua destilada y diluye hasta completar 1 L.

Hidróxido de sodio 1 N

Procedimiento

Se toma exactamente 50 mL de muestra en un erlenmeyer o vaso de precipitados, se agrega 2 mL de solución buffer y agita. Se comprueba que la solución tenga un pH de 10 y luego se agrega una pequeña cantidad de negro de ericromo, se agita y se titula con solución EDTA hasta que la solución cambie de color violeta a azul.

Anexo F. Método analítico para la determinación de la concentración de glucosa

Principio: la glucosa se convierte por la acción de la glucosa oxidasa (β -D-glucosa: oxidoreductasa de oxígeno, E.C. 1.1.3.4) en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno en un compuesto de color rojo.

Reactivos

Reactivo Glucosa oxidasa – Peroxidasa (Sera-Pak[®] Plus BAYER)

Estándar Glucosa 1 g/L (Sera-Pak[®] Plus BAYER)

Equipos

Baño termostático

Espectrofotómetro

Procedimiento

Para la determinación de la concentración de glucosa en una muestra problema (< 400 mg/dL) se mezclaron 2 mL de reactivo glucosa oxidasa – peroxidasa con 0,02 mL de la muestra en un tubo de ensayo con tapa. Se dejó reaccionar en un baño con agua a 37 °C por 10 minutos. Finalmente se midió su absorbancia a 500 nm. Se preparó el blanco y el patrón depositando 0,02 mL de agua desionizada ó 0,02 mL de estándar de glucosa, respectivamente, en el tubo de ensayo en lugar de la muestra problema y se siguió el procedimiento anterior.

La concentración de glucosa (g/ L) se determina por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración}_{\text{glucosa}} = \frac{\text{Absorbancia}_{500\text{nm}} \text{Muestra} - \text{Absorbancia}_{500\text{nm}} \text{Blanco}}{\text{Absorbancia}_{500\text{nm}} \text{Estándar} - \text{Absorbancia}_{500\text{nm}} \text{Blanco}} \text{ (g/L)}$$

Anexo G. Método analítico para la determinación de la conversión de glucosa en fructosa

Principio: la polarimetría mide la desviación de un plano de luz polarizada cuando pasa a través de una sustancia ópticamente activa. Un compuesto es considerado ópticamente activo si la luz polarizada es rotada cuando pasa a través de este.

La ecuación empleada para determinar la concentración en función de la rotación óptica esta dada por la ley de Biot:

$$[\alpha]_{\lambda}^{20} = \frac{\alpha}{C \cdot l}$$

Siendo:

$[\alpha]_{\lambda}^{20}$: rotación específica del compuesto (°)

l : longitud del camino óptico (dm)

α : rotación óptica de la muestra del compuesto (°)

C : concentración del compuesto (g/ml)

La conversión de glucosa a fructosa está dada por la siguiente ecuación:

$$x = \frac{[\alpha]_G}{[\alpha]_G - [\alpha]_F} \cdot \left(1 - \frac{[\alpha]_S \cdot 100}{[\alpha]_G \cdot l \cdot DS \cdot \rho} \right)$$

donde:

$[\alpha]_G$: rotación específica de la glucosa (53,5 ° a 20°C)

$[\alpha]_F$: rotación específica de la fructosa (-95,9 ° a 20°C)

$[\alpha]_S$: rotación óptica de la muestra (°)

DS : sustrato (% p/p)

l : longitud de la celda (dm)

ρ : densidad del sustrato (g/mL)

La concentración del sustrato ($x = 0$) esta dada por:

$$\frac{[\alpha]_{sub} \cdot 100}{[\alpha]_G \cdot l} = DS \cdot \rho$$

Siendo $[\alpha]_{Sub}$ la rotación óptica del sustrato (°).

La densidad del sustrato de glucosa esta dada por la siguiente ecuación:

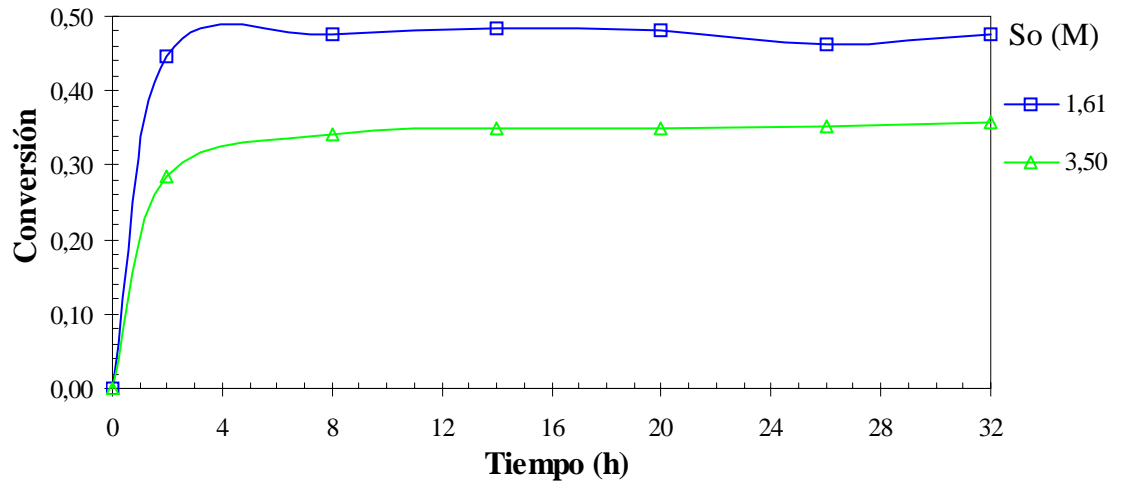
$$\rho = 0,00516 \cdot DS + 0,9663$$

La densidad del sustrato de fructosa esta dada por la siguiente ecuación:

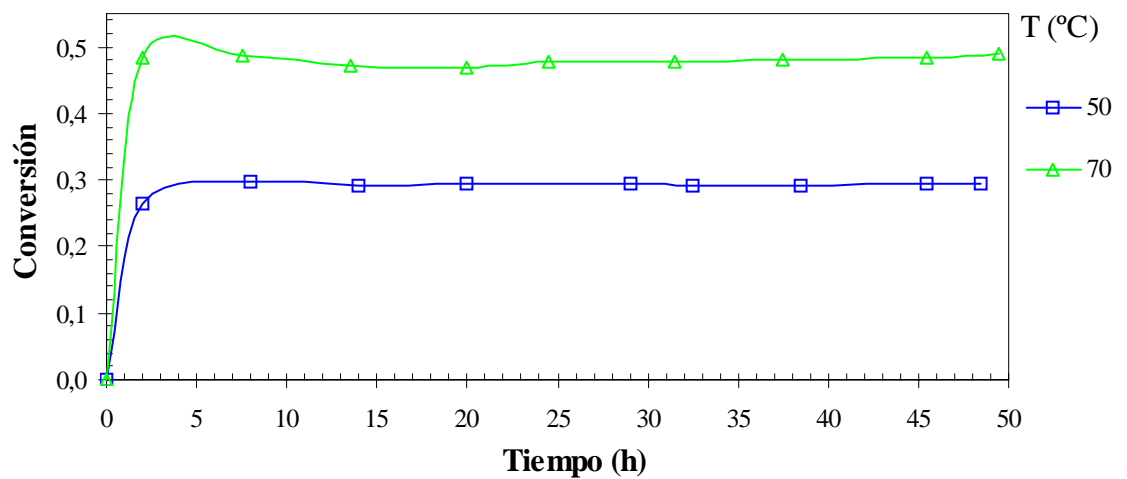
$$\rho = 0,0047 \cdot DS + 0,9481$$

Anexo H. Corridas preliminares de estabilización del reactor de lecho empacado

Curso de la conversión en el tiempo para diferentes concentraciones iniciales de glucosa a 60 °C



Curso de la conversión en el tiempo a diferentes temperaturas para una concentración inicial de glucosa 2,1 M



Anexo I. Matriz del diseño experimental factorial 2⁴ y resultados de conversión y productividad

Experimento	Tiempo de residencia (h)	Temperatura (°C)	pH	Concentración Inicial de glucosa (M)	Conversión	Productividad (M/h)
1	-1	-1	-1	-1	0,43	1,98
2	1	-1	-1	-1	0,5	1,15
3	-1	1	-1	-1	0,54	2,46
4	1	1	-1	-1	0,54	1,24
5	-1	-1	1	-1	0,46	2,13
6	1	-1	1	-1	0,49	1,29
7	-1	1	1	-1	0,53	2,45
8	1	1	1	-1	0,53	1,23
9	-1	-1	-1	1	0,29	2,94
10	1	-1	-1	1	0,4	2,02
11	-1	1	-1	1	0,42	4,17
12	1	1	-1	1	0,53	2,64
13	-1	-1	1	1	0,22	2,21
14	1	-1	1	1	0,42	2,18
15	-1	1	1	1	0,52	5,29
16	1	1	1	1	0,53	2,74
17	-1	-1	-1	-1	0,46	2,08
18	1	-1	-1	-1	0,48	1,3
19	-1	1	-1	-1	0,54	2,46
20	1	1	-1	-1	0,54	1,46
21	-1	-1	1	-1	0,46	2,13

22	1	-1	1	-1	0,49	1,29
23	-1	1	1	-1	0,5	2,65
24	1	1	1	-1	0,54	1,25
25	-1	-1	-1	1	0,27	2,7
26	1	-1	-1	1	0,35	1,74
27	-1	1	-1	1	0,43	4,31
28	1	1	-1	1	0,53	2,63
29	-1	-1	1	1	0,28	2,79
30	1	-1	1	1	0,42	2,17
31	-1	1	1	1	0,53	5,44
32	1	1	1	1	0,54	2,76

Anexo J. Análisis estadístico de la influencia de las variables sobre la conversión

Efecto estimado y error estándar para las variables y sus interacciones

Media	0,459688 +/- 0,00656012
A:Residencia	0,059375 +/- 0,0131202
B:Temperatura	0,116875 +/- 0,0131202
C:pH	0,013125 +/- 0,0131202
D:Concentraciòn	-0,084375 +/- 0,0131202
AB	-0,025625 +/- 0,0131202
AC	-0,001875 +/- 0,0131202
AD	0,035625 +/- 0,0131202
BC	0,005625 +/- 0,0131202
BD	0,055625 +/- 0,0131202
CD	0,016875 +/- 0,0131202
ABC	-0,016875 +/- 0,0131202
ABD	-0,011875 +/- 0,0131202
ACD	-0,003125 +/- 0,0131202
BCD	0,016875 +/- 0,0131202
ABCD	-0,025625 +/- 0,0131202
block	0,000625 +/- 0,0131202

Intervalos de confianza 95,0 se basan en el error total con 15 grados de libertad.

($t = 2,13145$)

Análisis de Varianza para la conversión

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de los cuadrados	Radio F	Valor P
A:Residencia	0,0282031	1	0,0282031	93,04	0,0000
B:Temperatura	0,109278	1	0,109278	360,51	0,0000
C:pH	0,00137813	1	0,00137813	4,55	0,0499
D:Concentración	0,0569531	1	0,0569531	187,89	0,0000
AB	0,00525312	1	0,00525312	17,33	0,0008
AC	0,000028125	1	0,000028125	0,09	0,7649
AD	0,0101531	1	0,0101531	33,49	0,0000
BC	0,000253125	1	0,000253125	0,84	0,3753
BD	0,0247531	1	0,0247531	81,66	0,0000
CD	0,00227812	1	0,00227812	7,52	0,0151
ABC	0,00227812	1	0,00227812	7,52	0,0151
ABD	0,00112812	1	0,00112812	3,72	0,0729
ACD	0,000078125	1	0,000078125	0,26	0,6191
BCD	0,00227813	1	0,00227813	7,52	0,0151
ABCD	0,00525313	1	0,00525313	17,33	0,0008
blocks	0,000003125	1	0,000003125	0,01	0,9205
Error total	0,00454687	15	0,000303125		
Total (corr.)	0,254097	31			

R-cuadrado = 98,2 %

R-cuadrado (ajustado para grado de libertad.) = 96,5 %

Error estándar de est. = 0,0174105

Error absoluto medio = 0,00789063

Estadística Durbin-Watson = 2,08393 (P = 0,3821)

Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0681057

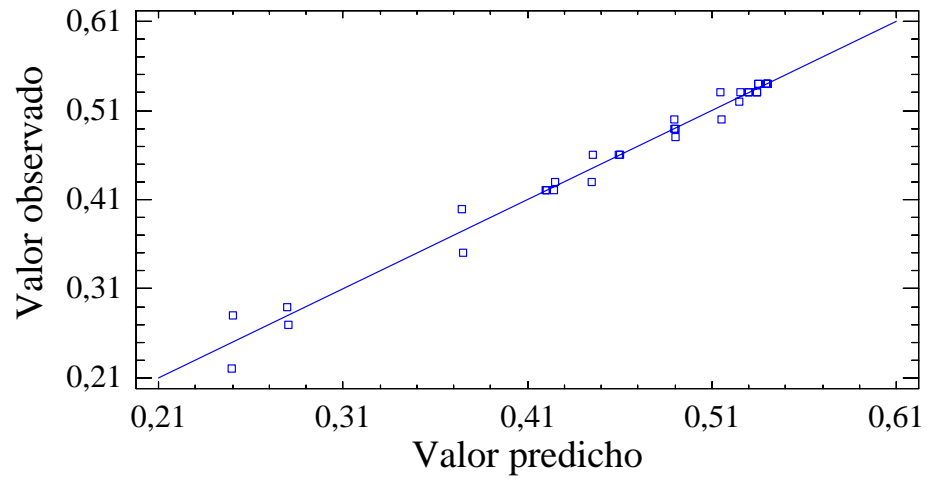
La tabla ANOVA prueba el significado estadístico de cada efecto comparando la media de los cuadrados contra el error experimental estimado. En este caso, 11 efectos tienen valores P menores que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza de 95 %. El R cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 98,2 % de la variabilidad en la conversión. El R cuadrado ajustado, más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 96,5 %. El error estándar muestra la desviación estándar de los residuales. El error absoluto medio (MAE) es el valor medio de los residuales. El estadístico Durbin-Watson (DW) determina si entre los residuales hay alguna correlación significativa basada en el orden de realización de las pruebas. Valores P mayores que 0,05 indican que no hay autocorrelación serial en los residuales.

Coefficientes de regresión para la conversión

La ecuación del modelo ajustado es (los valores de las variables se encuentran en su valor normalizado):

$$\begin{aligned}
 \text{Conversión} = & 0,459688 + 0,0296875 * \text{Residencia} + 0,0584375 * \text{Temperatura} \\
 & + 0,0065625 * \text{pH} - 0,0421875 * \text{Concentraci\`o} - 0,0128125 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} - \\
 & 0,0009375 * \text{Residencia} * \text{pH} + 0,0178125 * \text{Residencia} * \text{Concentraci\`o} + \\
 & 0,0028125 * \text{Temperatura} * \text{pH} + 0,0278125 * \text{Temperatura} * \text{Concentraci\`o} + \\
 & 0,0084375 * \text{pH} * \text{Concentraci\`o} - 0,0084375 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{pH} - \\
 & 0,0059375 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{Concentraci\`o} - \\
 & 0,0015625 * \text{Residencia} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o} \\
 & + 0,0084375 * \text{Temperatura} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o} - \\
 & 0,0128125 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o}
 \end{aligned}$$

Valores Experimentales vs. Valores Predichos por el modelo de conversión



Anexo K. Análisis estadístico de la influencia de las variables sobre la productividad

Efecto estimado y error estándar para las variables y sus interacciones

Media	2,415 +/- 0,0243413
A:Residencia	-1,19375 +/- 0,0486826
B:Temperatura	0,8175 +/- 0,0486826
C:pH	0,17 +/- 0,0486826
D:Concentraciòn	1,26125 +/- 0,0486826
AB	-0,46625 +/- 0,0486826
AC	-0,07875 +/- 0,0486826
AD	-0,1775 +/- 0,0486826
BC	0,135 +/- 0,0486826
BD	0,58625 +/- 0,0486826
CD	0,13375 +/- 0,0486826
ABC	-0,22375 +/- 0,0486826
ABD	-0,2725 +/- 0,0486826
ACD	-0,02 +/- 0,0486826
BCD	0,18125 +/- 0,0486826
ABCD	-0,1825 +/- 0,0486826
block	0,065 +/- 0,0486826

Los errores estándar se basan en el error total con 15 grados de libertad.

Análisis de Varianza para la productividad

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de los cuadrados	Radio F	Valor P
A:Residencia	11,4003	1	11,4003	601,28	0,0000
B:Temperatura	5,34645	1	5,34645	281,99	0,0000
C:pH	0,2312	1	0,2312	12,19	0,0033
D:Concentraciòn	12,726	1	12,726	671,20	0,0000
AB	1,73911	1	1,73911	91,73	0,0000
AC	0,0496125	1	0,0496125	2,62	0,1266
AD	0,25205	1	0,25205	13,29	0,0024
BC	0,1458	1	0,1458	7,69	0,0142
BD	2,74951	1	2,74951	145,02	0,0000
CD	0,143112	1	0,143112	7,55	0,0150
ABC	0,400513	1	0,400513	21,12	0,0003
ABD	0,59405	1	0,59405	31,33	0,0001
ACD	0,0032	1	0,0032	0,17	0,6870
BCD	0,262813	1	0,262813	13,86	0,0020
ABCD	0,26645	1	0,26645	14,05	0,0019
blocks	0,0338	1	0,0338	1,78	0,2017
Total error	0,2844	15	0,01896		
Total (corr.)	36,6284	31			

R-cuadrado = 99,2 %

R-cuadrado (ajustado para grado de libertad.) = 98,4 %

Error estándar de est. = 0,137695

Error absoluto medio = 0,0678125

Estadística Durbin-Watson = 2,11155 (P = 0,3604)

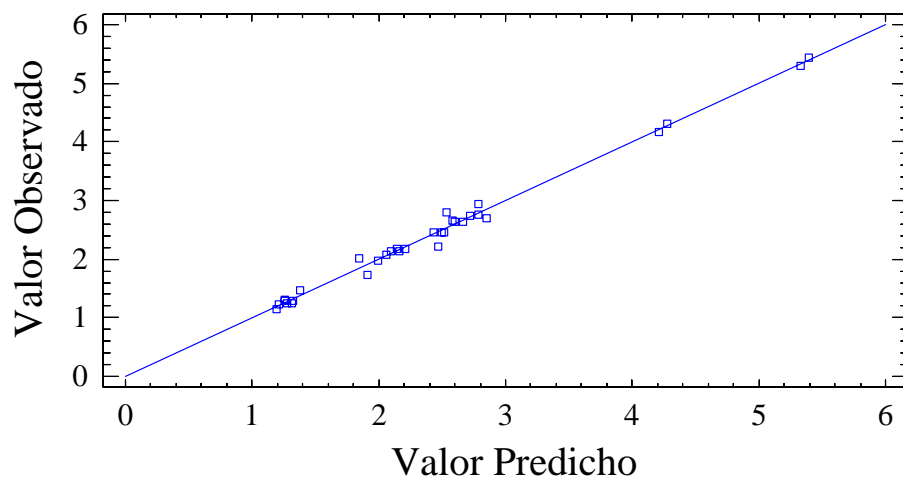
Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0572038

Coefficientes de regresión para la productividad

La ecuación del modelo ajustado es (los valores de las variables se encuentran en su valor normalizado):

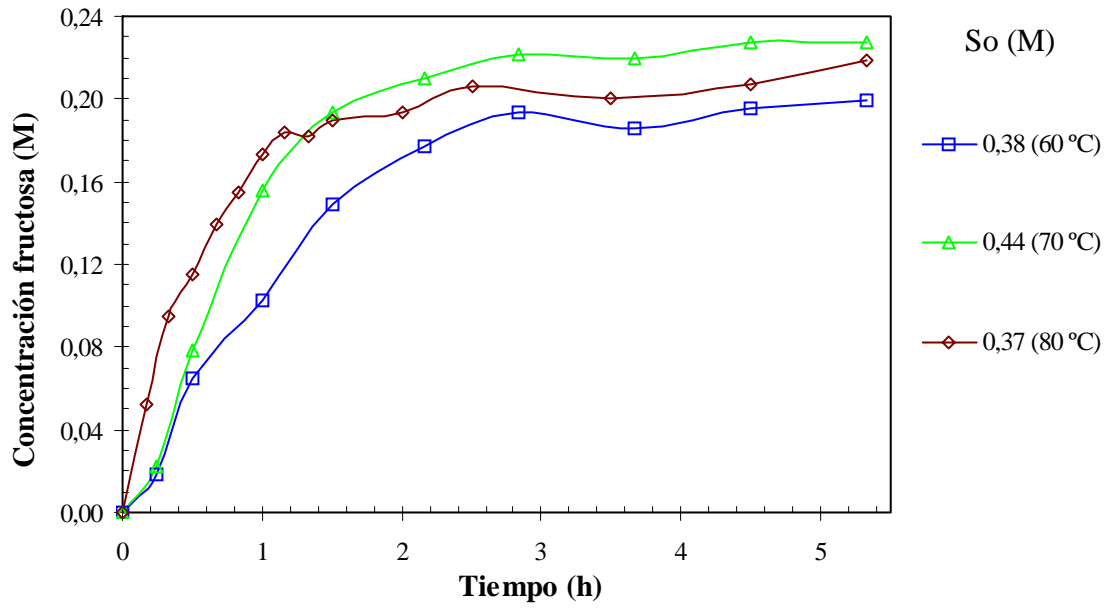
$$\begin{aligned} \text{Productividad} = & 2,415 - 0,596875 * \text{Residencia} + 0,40875 * \text{Temperatura} + \\ & 0,085 * \text{pH} + 0,630625 * \text{Concentraci\`o}n - 0,233125 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} - \\ & 0,039375 * \text{Residencia} * \text{pH} - 0,08875 * \text{Residencia} * \text{Concentraci\`o}n + \\ & 0,0675 * \text{Temperatura} * \text{pH} + 0,293125 * \text{Temperatura} * \text{Concentraci\`o}n + \\ & 0,066875 * \text{pH} * \text{Concentraci\`o}n - 0,111875 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{pH} - \\ & 0,13625 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{Concentraci\`o}n - \\ & 0,01 * \text{Residencia} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o}n + \\ & 0,090625 * \text{Temperatura} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o}n - \\ & 0,09125 * \text{Residencia} * \text{Temperatura} * \text{pH} * \text{Concentraci\`o}n \end{aligned}$$

Valores Experimentales vs. Valores Predichos por el modelo de productividad



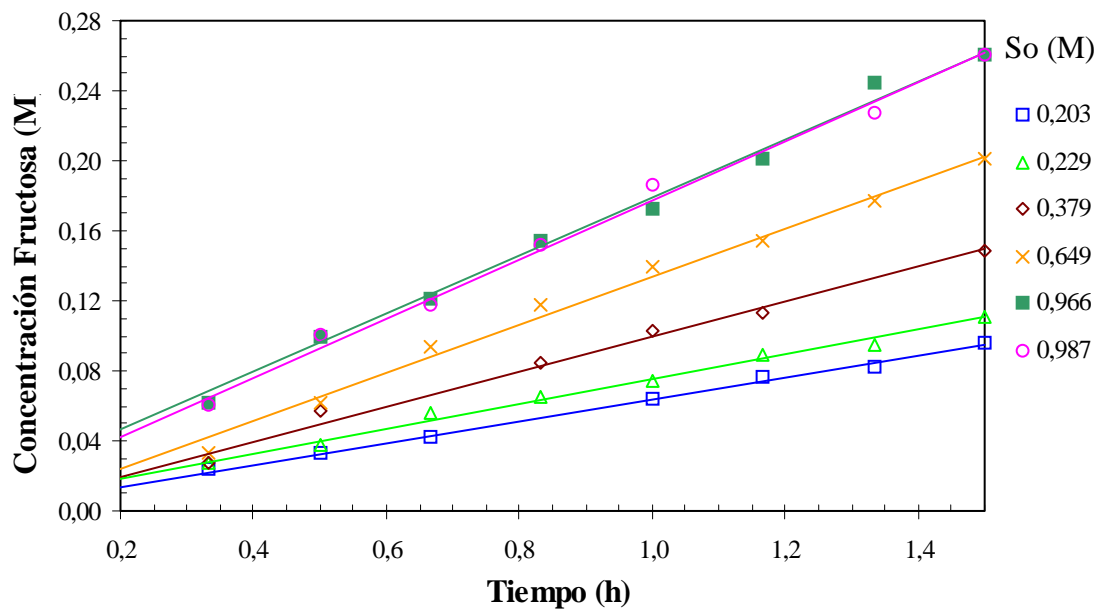
Anexo L. Corridas preliminares para establecer la duración de cada experimento cinético según la porción recta de la curva Producto vs. Tiempo

Curso de la formación de producto en el tiempo a diferentes temperaturas

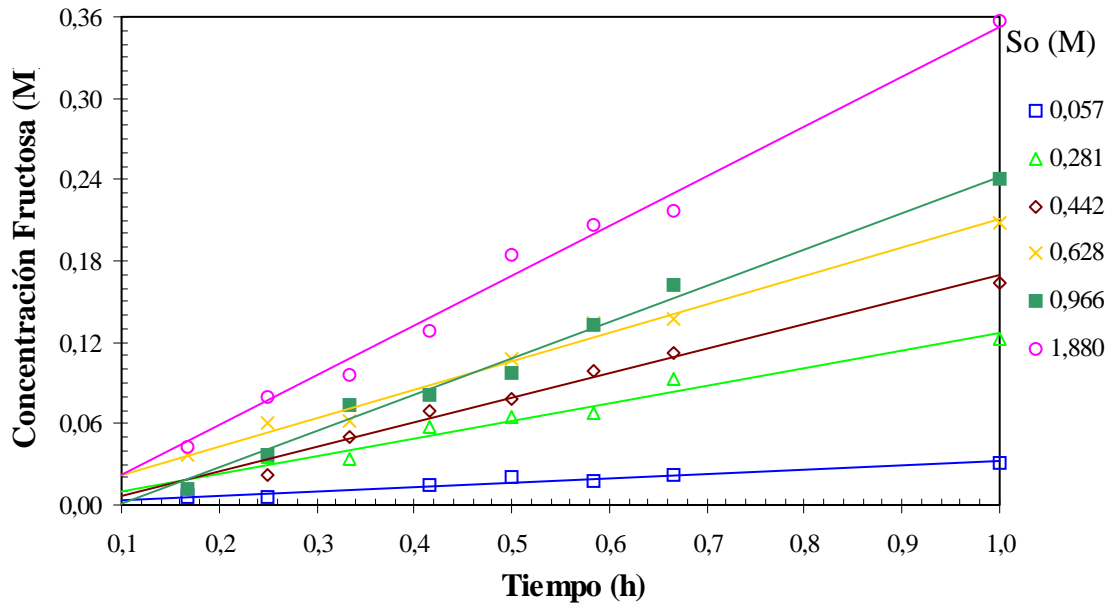


Anexo M. Determinación de la velocidad inicial de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato a diferentes temperaturas para las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás

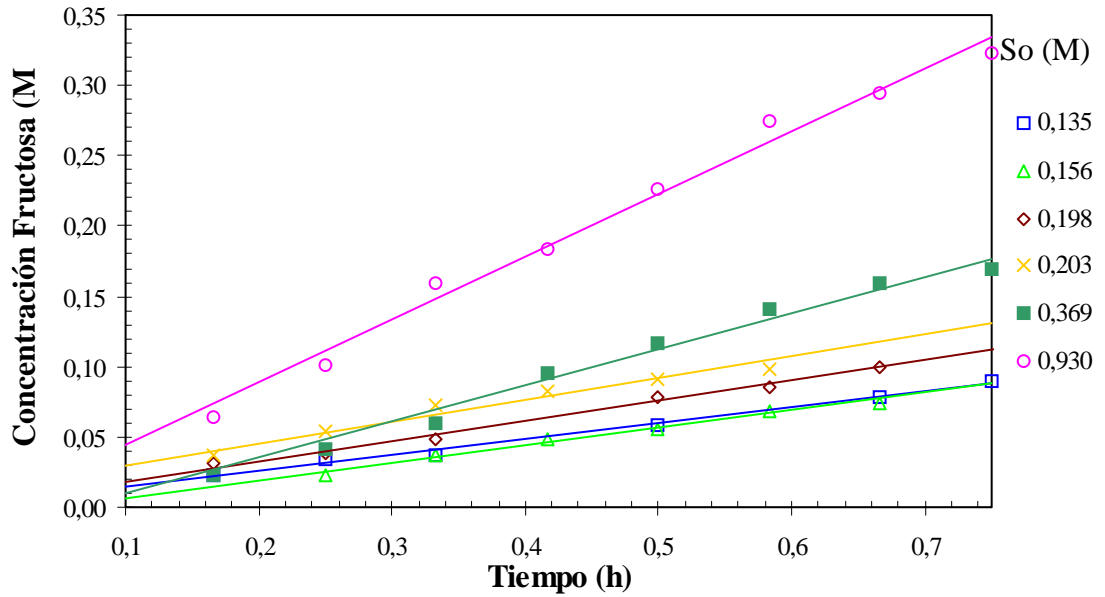
Concentración de Fructosa vs. Tiempo a 60°C para la reacción hacia delante



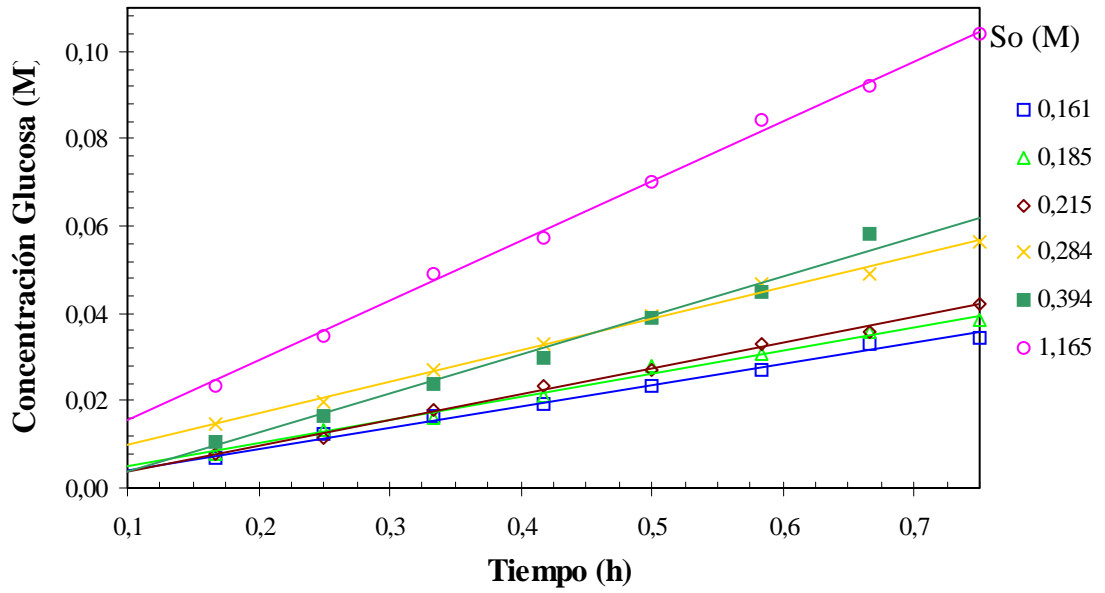
Concentración de Fructosa vs. Tiempo a 70°C para la reacción hacia delante



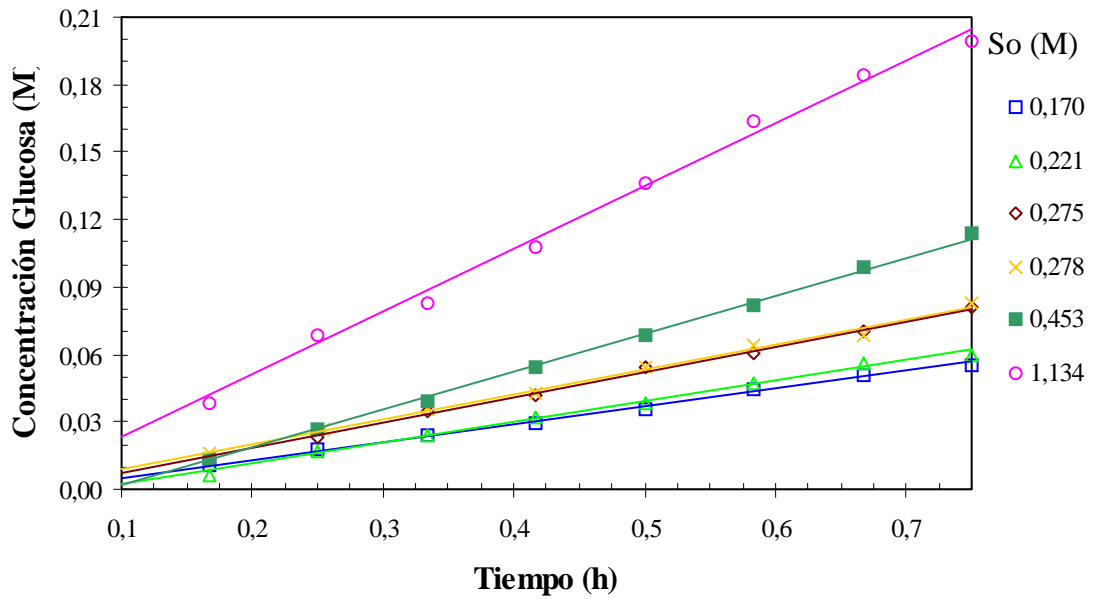
Concentración de Fructosa vs. Tiempo a 80°C para la reacción hacia delante



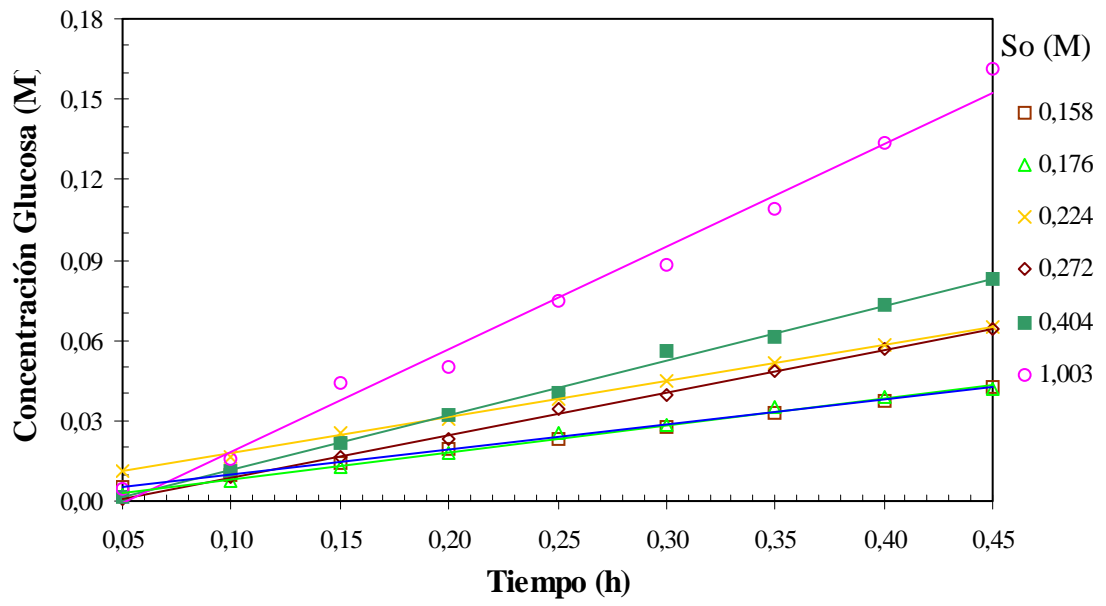
Concentración de Glucosa vs. Tiempo a 60°C para la reacción hacia atrás



Concentración de Glucosa vs. Tiempo a 70°C para la reacción hacia atrás

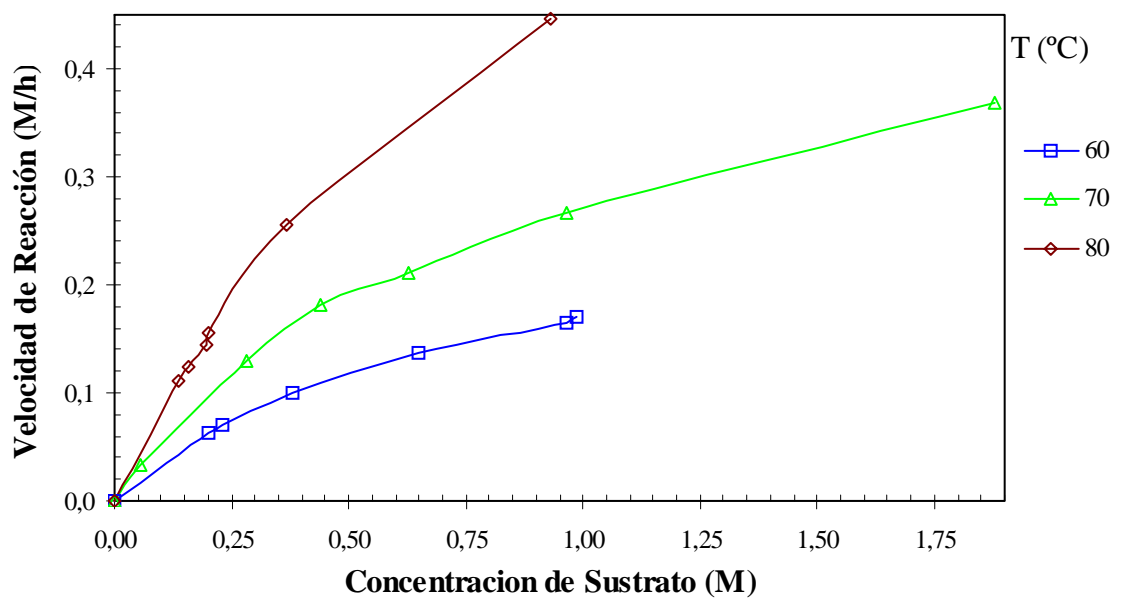


Concentración de Glucosa vs. Tiempo a 80°C para la reacción hacia atrás

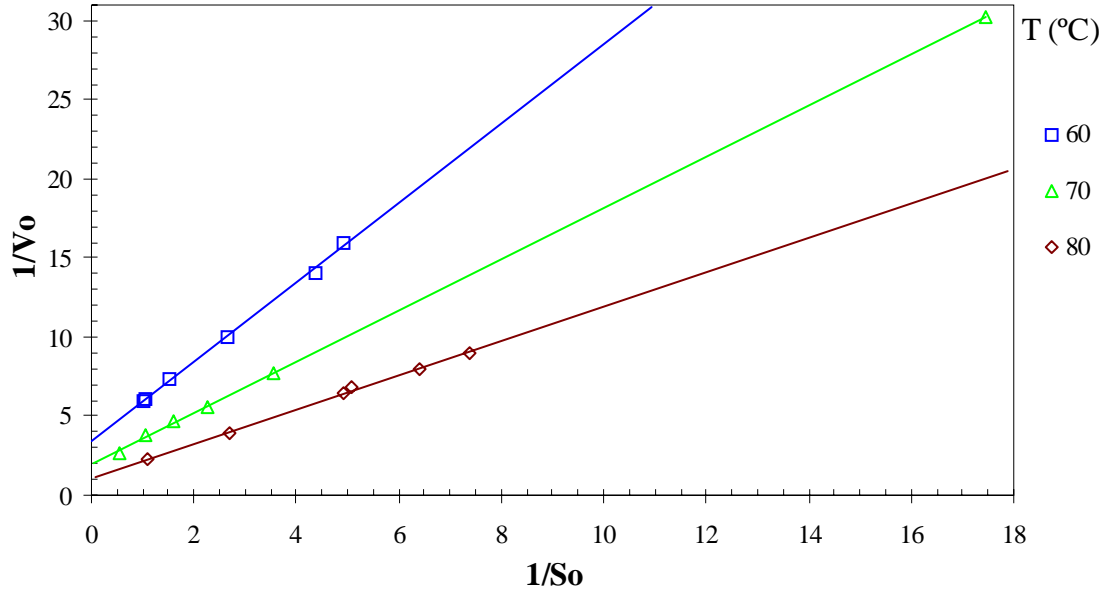


Anexo N. Graficas de Velocidad Inicial de Reacción vs. Concentración de Sustrato para las reacciones de isomerización hacia delante y hacia atrás a diferentes temperaturas y su respectiva linealización Lineweaver-Burk

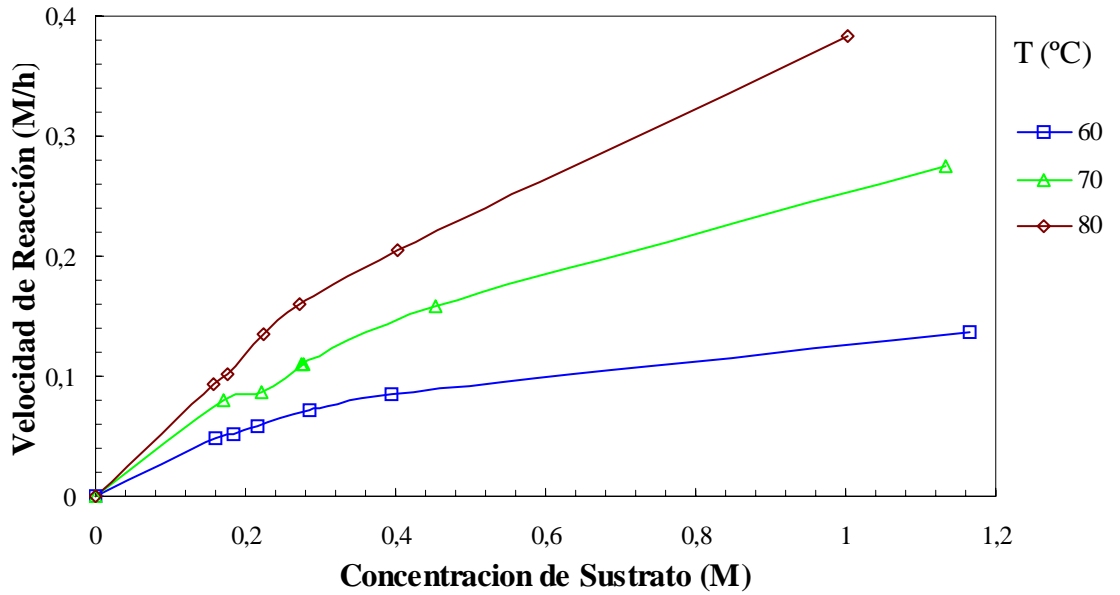
Velocidad Inicial de Reacción vs. Concentración Inicial de Glucosa a diferentes temperaturas para la reacción hacia delante



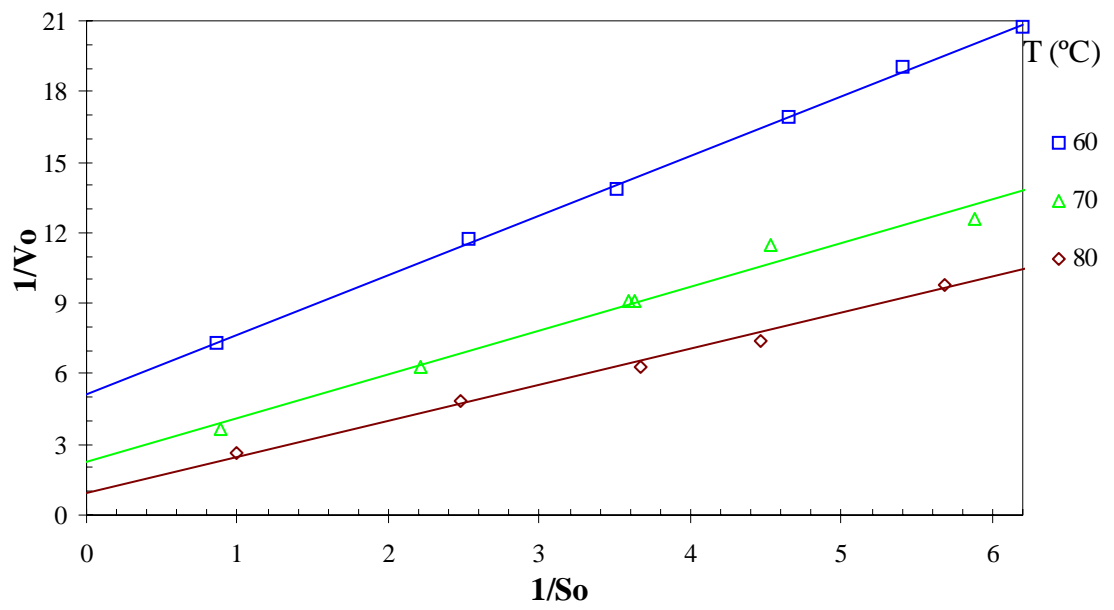
Linealización Lineweaver-Burk para la reacción hacia delante



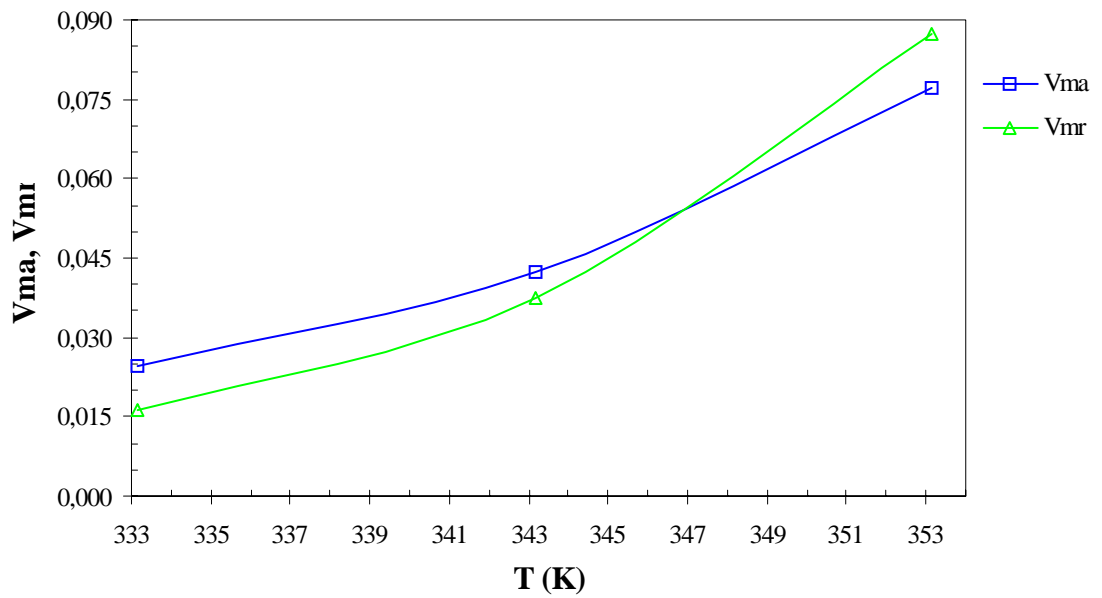
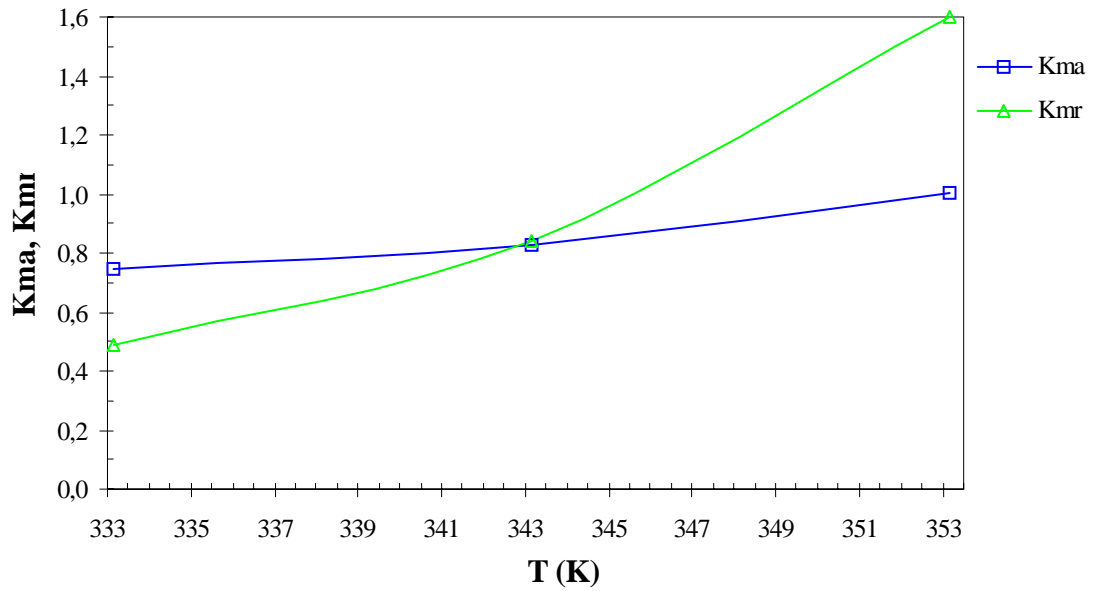
Velocidad Inicial de Reacción vs. Concentración Inicial de Fructosa a diferentes temperaturas para la reacción hacia atrás



Linealización Lineweaver-Burk para la reacción hacia atrás

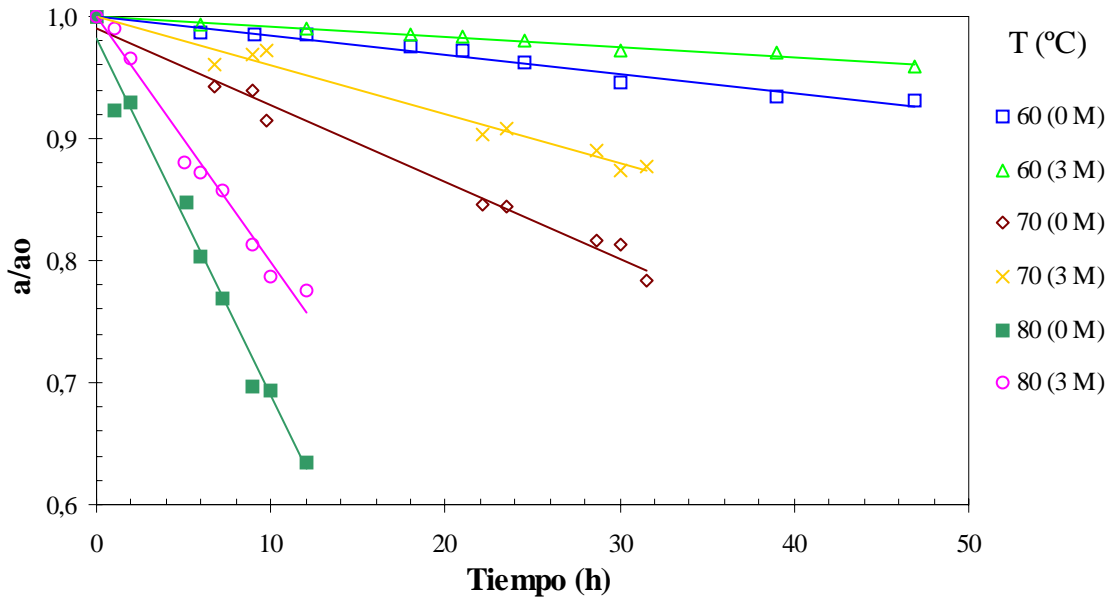


Anexo O. Parámetros Cinéticos vs. Temperatura

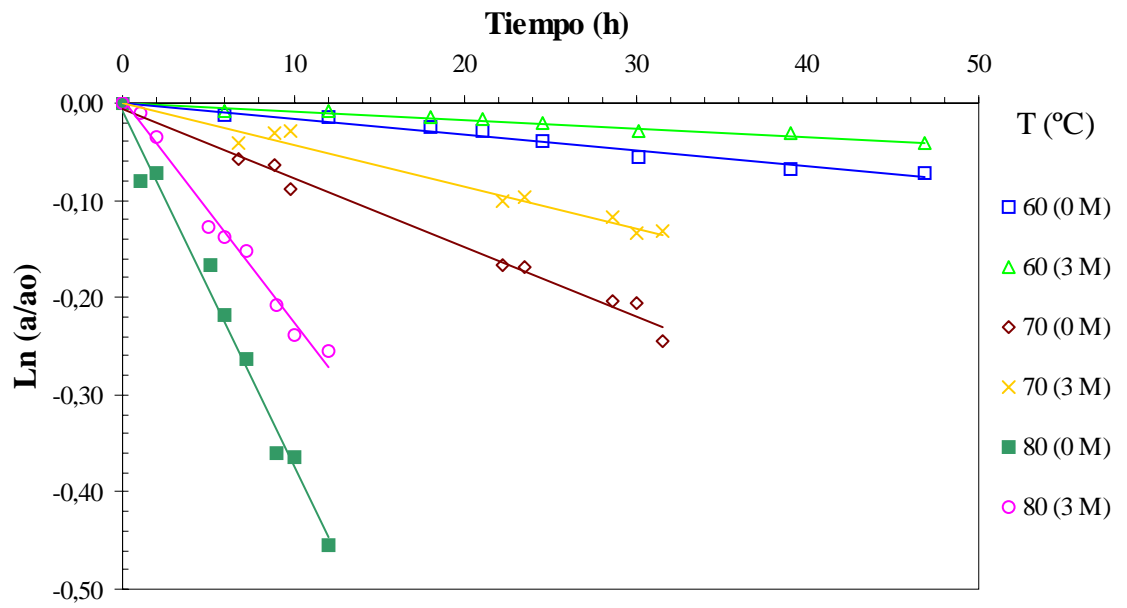


Anexo P. Determinación de la actividad residual de la glucosa isomerasa inmovilizada

Actividad Residual vs. Tiempo a diferentes temperaturas en ausencia (0 M) y en presencia de protección por sustrato (3 M).

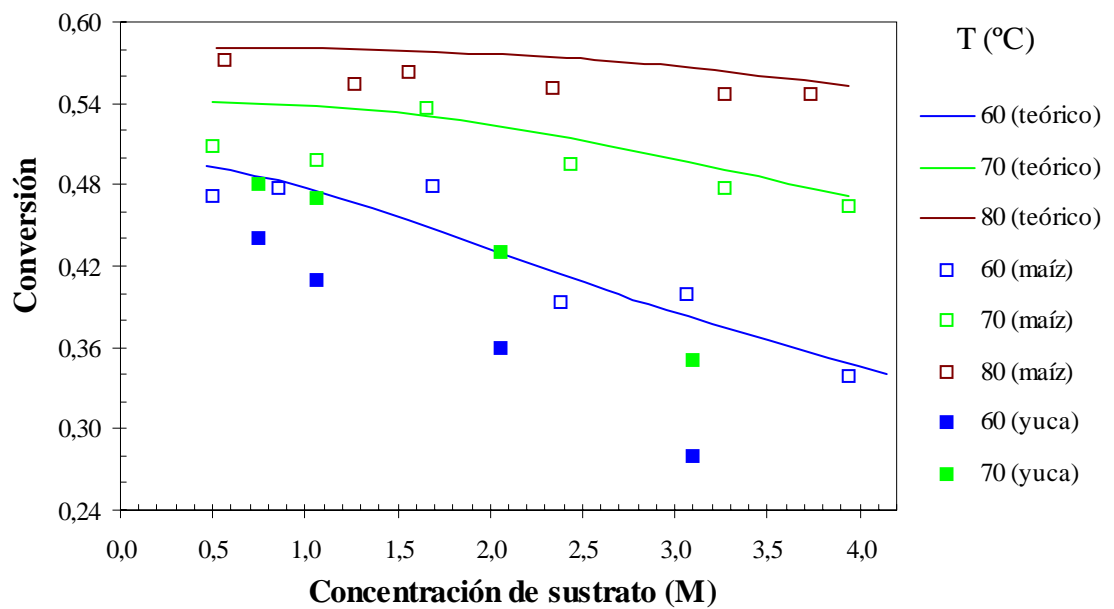


Logaritmo de Actividad Residual vs. Tiempo

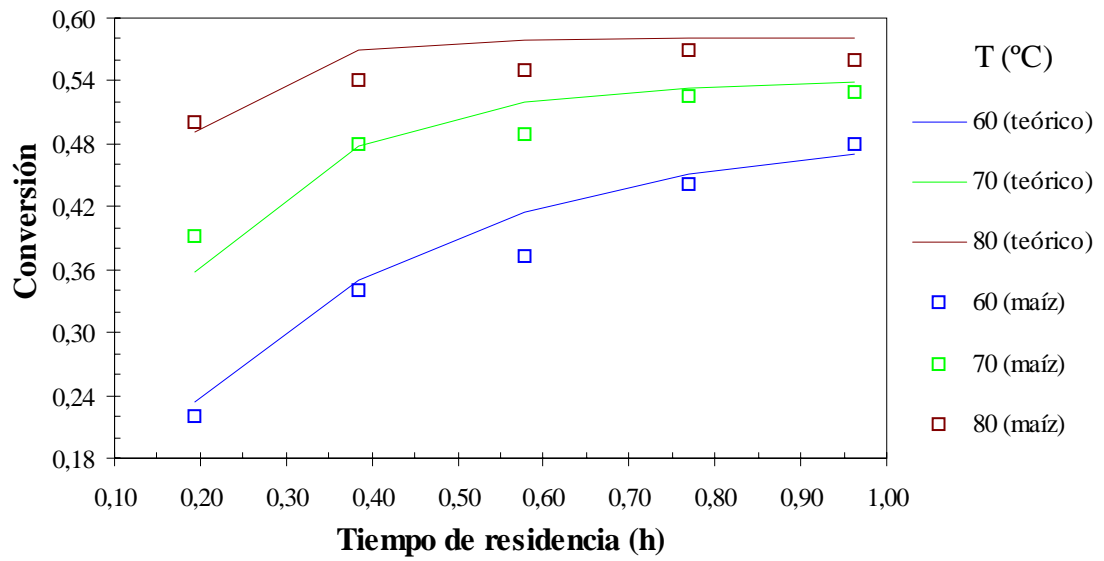


Anexo Q. Validación del modelo matemático usando los valores de conversión obtenidos experimentalmente para el jarabe glucosado de maíz y para el jarabe glucosado de yuca en condiciones de desnaturalización despreciable (8 horas de operación)

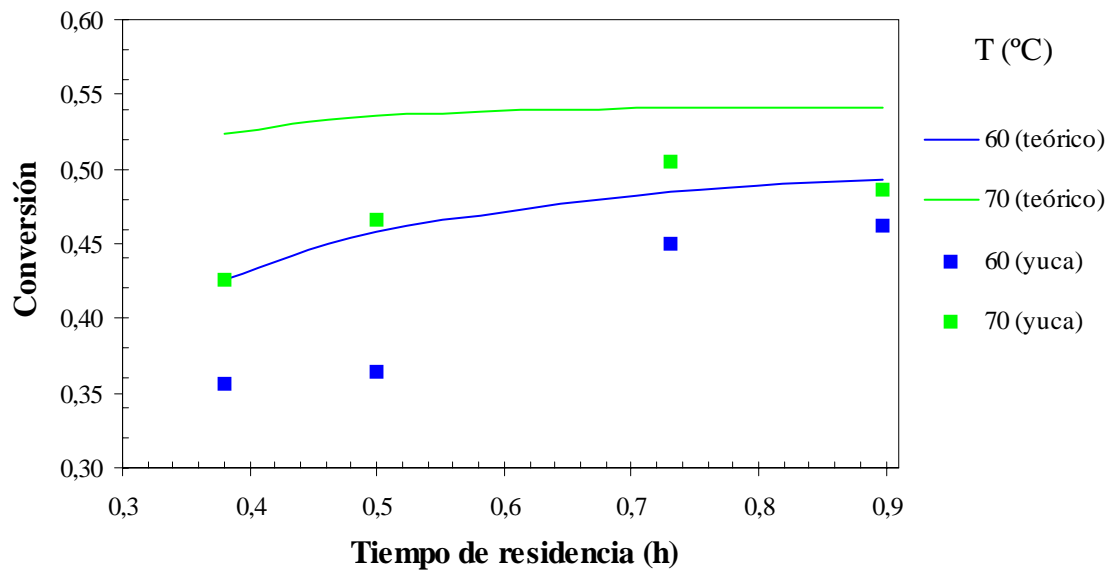
Conversión vs. Concentración de Sustrato a diferentes temperaturas para un tiempo de residencia 0,38 h



Conversión vs. Tiempo de Residencia a diferentes temperaturas para una concentración inicial de glucosa 3,9 M



Conversión vs. Tiempo de Residencia a diferentes temperaturas para una concentración inicial de glucosa 2.1 M

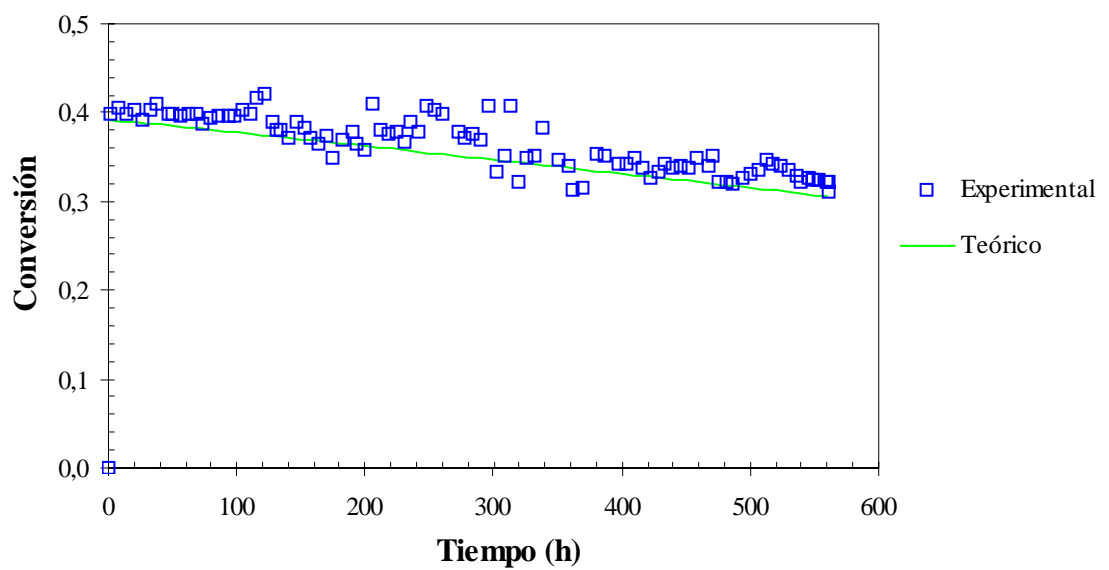


Anexo R. Resultados de la caracterización del jarabe glucosado proveniente del almidón de yuca

Contenido de sólidos (% p/p)	13,5
Glucosa (% en base seca)	93
Otros oligosacáridos (% en base seca)	7
Rotación óptica (°)	15
Ca ⁺² (ppm)	63,8

Anexo S. Validación del modelo matemático usando los valores de conversión obtenidos experimentalmente para el jarabe glucosado de maíz, para un tiempo de operación de 560 horas

Comparación entre los valores de conversión teóricos y experimentales a 60 °C para una concentración inicial de glucosa 3,9 M y un tiempo de residencia 0.38 h



Anexo T. Estimación del error relativo del modelo matemático

Jarabe glucosado de maíz, $\tau = 0.38$ h, 60 °C, en condiciones de desnaturalización despreciable

S_o	x teórico	x experimental	Error relativo
0,49	0,49	0,47	-0,05
0,86	0,48	0,48	-0,01
1,69	0,45	0,48	0,07
2,39	0,41	0,39	-0,05
3,06	0,38	0,40	0,04
3,94	0,35	0,34	-0,03

Jarabe glucosado de maíz, $\tau = 0.38$ h, 70 °C, en condiciones de desnaturalización despreciable

S_o	x teórico	x experimental	Error relativo
0,49	0,54	0,51	-0,06
1,06	0,54	0,50	-0,08
1,66	0,53	0,54	0,01
2,44	0,51	0,50	-0,04
3,27	0,49	0,48	-0,03
3,94	0,47	0,46	-0,02

Jarabe glucosado de maíz, $\tau = 0.38$ h, 80 °C, en condiciones de desnaturalización despreciable

S₀	x teórico	x experimental	Error relativo
0,57	0,58	0,57	-0,01
1,27	0,58	0,55	-0,05
1,56	0,58	0,56	-0,03
2,33	0,57	0,55	-0,04
3,27	0,56	0,55	-0,03
3,74	0,56	0,55	-0,02

Jarabe glucosado de yuca, $\tau = 0.38$ h, 60 °C, en condiciones de desnaturalización despreciable

S₀	x teórico	x experimental	Error relativo
0,74	0,49	0,44	-0,11
1,06	0,48	0,41	-0,16
2,05	0,43	0,36	-0,19
3,10	0,38	0,28	-0,36

Jarabe glucosado de yuca, $\tau = 0.38$ h, 70 °C, en condiciones de desnaturalización despreciable

S₀	x teórico	x experimental	Error relativo
0,74	0,54	0,48	-0,13
1,06	0,54	0,47	-0,14
2,05	0,52	0,43	-0,22
3,10	0,50	0,35	-0,42

Jarabe glucosado de maíz, $S_0= 3,9 M$, $60\text{ }^\circ\text{C}$, en condiciones de desnaturalización despreciable

τ	x teórico	x experimental	Error relativo
0,96	0,47	0,48	0,02
0,77	0,45	0,44	-0,02
0,58	0,41	0,37	-0,11
0,38	0,35	0,34	-0,03
0,19	0,23	0,22	-0,06

Jarabe glucosado de maíz, $S_0= 3,9 M$, $70\text{ }^\circ\text{C}$, en condiciones de desnaturalización despreciable

τ	x teórico	x experimental	Error relativo
0,96	0,54	0,53	-0,02
0,77	0,53	0,53	-0,02
0,58	0,52	0,49	-0,06
0,38	0,48	0,48	0,00
0,19	0,36	0,39	0,09

Jarabe glucosado de maíz, $S_0= 3,9 M$, $80\text{ }^\circ\text{C}$, en condiciones de desnaturalización despreciable

τ	x teórico	x experimental	Error relativo
0,96	0,58	0,56	-0,04
0,77	0,58	0,57	-0,02
0,58	0,58	0,55	-0,05
0,38	0,57	0,54	-0,05
0,19	0,49	0,50	0,02

Jarabe glucosado de yuca, $S_o = 2,1 M$, $60\text{ }^\circ C$, en condiciones de desnaturalización despreciable

τ	x teórico	x experimental	Error relativo
0,38	0,43	0,36	-0,20
0,50	0,46	0,36	-0,26
0,73	0,49	0,45	-0,08
0,90	0,49	0,46	-0,07

Jarabe glucosado de yuca, $S_o = 2,1 M$, $70\text{ }^\circ C$, en condiciones de desnaturalización despreciable

τ	x teórico	x experimental	Error relativo
0,38	0,52	0,43	-0,23
0,50	0,54	0,47	-0,15
0,73	0,54	0,50	-0,07
0,90	0,54	0,49	-0,11

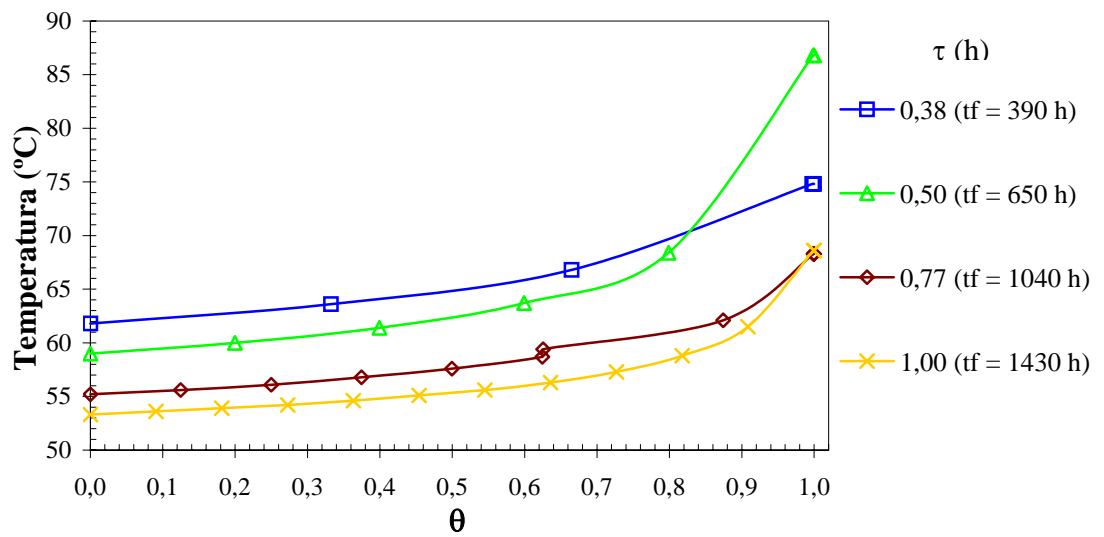
El error relativo medio estimado en la validación del modelo con los datos experimentales del jarabe glucosado de maíz en condiciones de desnaturalización enzimática despreciable es igual a 4%.

El error relativo medio estimado en la validación del modelo con los datos experimentales del jarabe glucosado de yuca en condiciones de desnaturalización enzimática despreciable es igual a 18%.

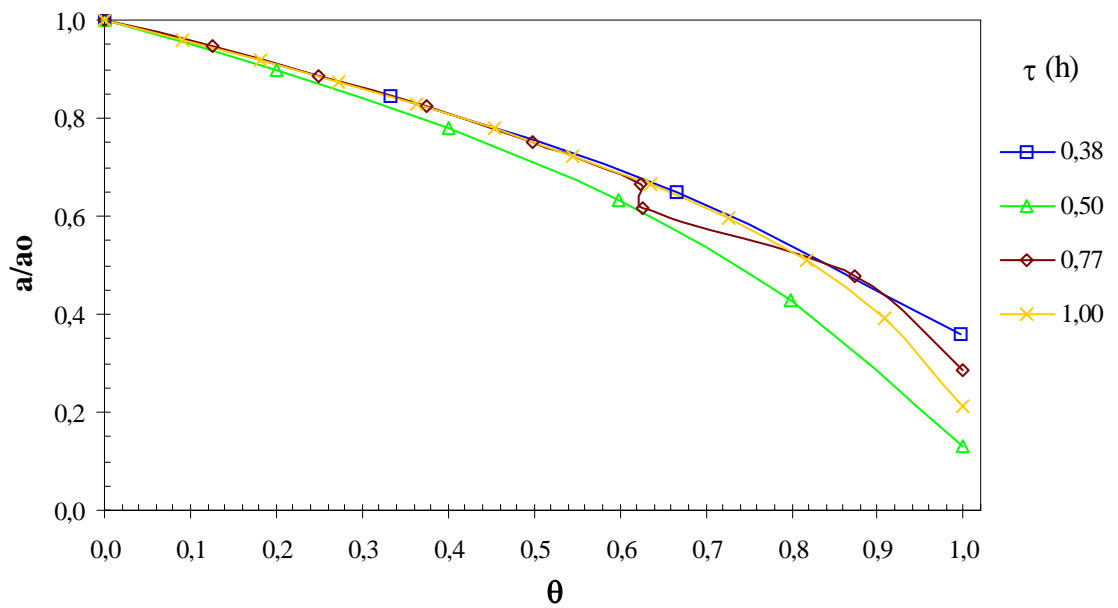
El error relativo medio estimado en la validación del modelo con los datos experimentales del jarabe glucosado de maíz en condiciones de desnaturalización enzimática es igual a 4%.

Anexo U. Perfiles de temperatura, de inactivación de la enzima y de velocidad de reacción para mantener la conversión constante ($x = 0,45$) para una concentración inicial de glucosa 2 M y un tiempo de residencia dado

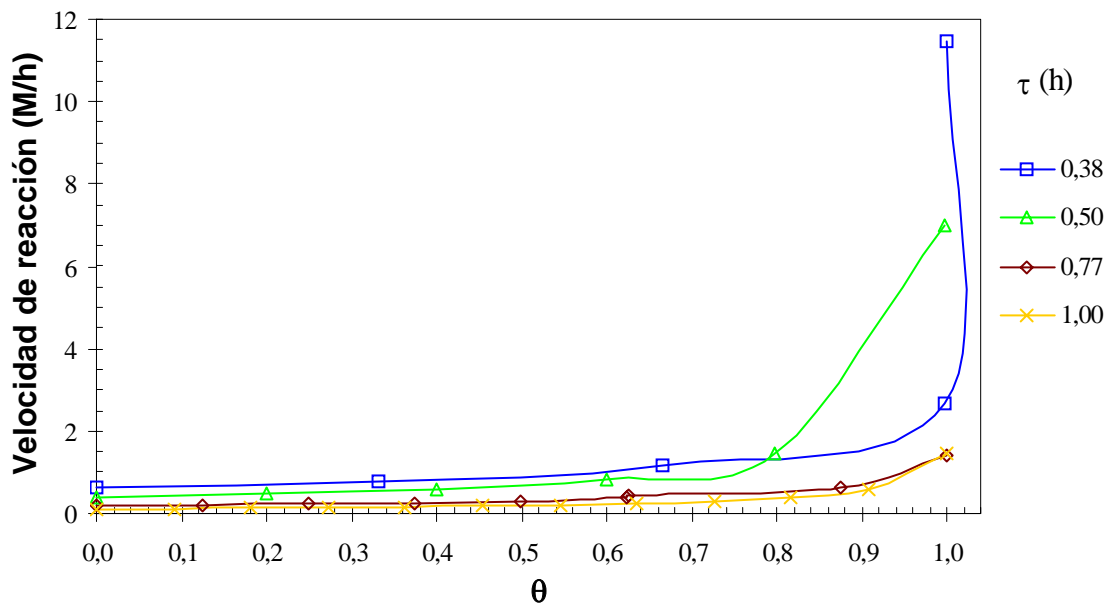
Perfiles de temperatura a una concentración inicial de glucosa 2 M



Curso de la inactivación de la enzima con el tiempo a una concentración inicial de glucosa 2 M

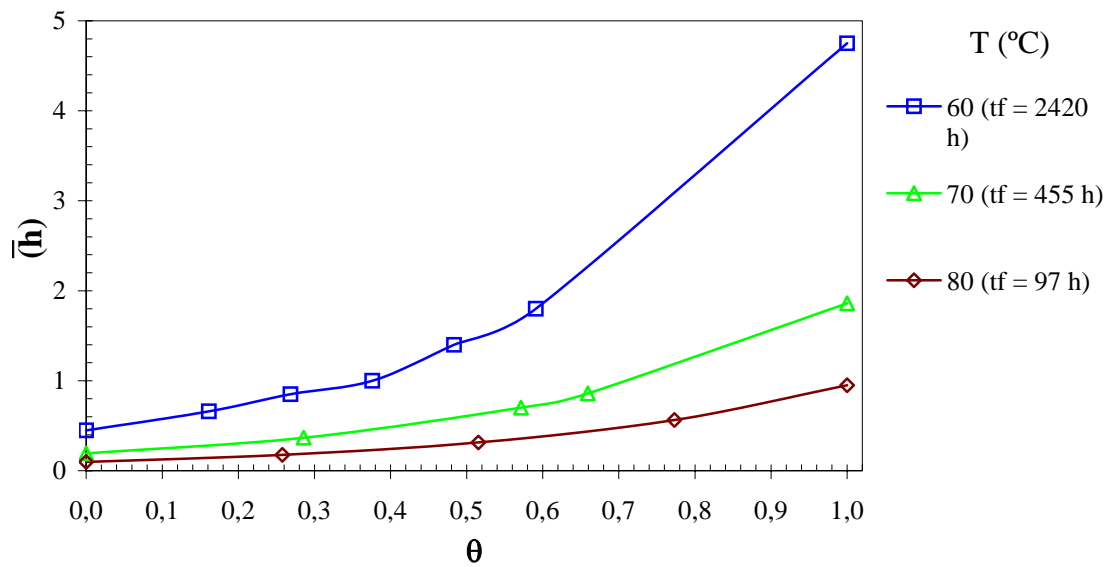


Variación de la velocidad de reacción con el tiempo a una concentración inicial de 2 M

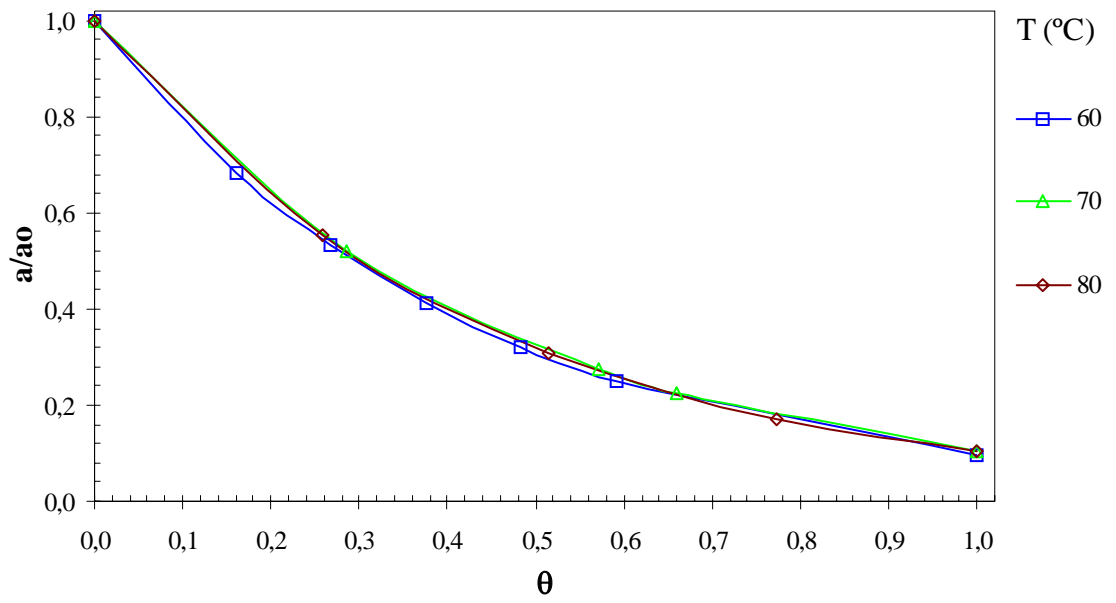


Anexo V. Perfiles de tiempo de residencia y inactivación de la enzima para mantener la conversión constante ($x = 0,45$) para una concentración inicial de glucosa 2 M y una temperatura dada

Perfil del tiempo de residencia a una concentración inicial de glucosa 2 M



Curso de la inactivación de la enzima con el tiempo a una concentración inicial de glucosa 2 M



Anexo W. Estimación preliminar de costos para la operación usando perfiles de temperatura y un tiempo de residencia dado

Con el único fin de comparar los costos en la operación del reactor usando perfiles de temperatura para diferentes tiempos de residencia, el cálculo de los costos directos de producción del jarabe de fructosa sin refinar a partir de un jarabe de glucosa purificado 2 M, consideró las mismas condiciones establecidas en la metodología de operación del reactor (11,88 g de enzima).

Considerando los perfiles de temperatura en el tiempo que mantienen la conversión constante ($x = 0,45$) se producen 4608, 5837, 6064 y 6421 g de fructosa para los tiempos de residencia de 0,38; 0,5; 0,77 y 1 h, respectivamente.

Costos directos de producción en la etapa de isomerización

	Unidad	Costo por unidad (\$)	$\tau = 0,38 \text{ h (} t_y = 390 \text{ h)}$		$\tau = 0,5 \text{ h (} t_f = 650 \text{ h)}$	
			Cant. por t_f^*	Costo/g** (\$/g)	Cant. por t_f^*	Costo/g** (\$/g)
<i>Materia Prima</i>						
Jarabe de glucosa refinado (2 M)	g	5,55	10240,38	12,33	12971,15	12,33
MgSO ₄ *7H ₂ O (1g/L)	g	2,44	28,42	0,02	36,00	0,02
Na ₂ S ₂ O ₅ (0,18 g/L)	g	3,36	5,12	0,00	6,48	0,00
Na ₂ CO ₃ (0,21 g/L)	g	6,03	6,02	0,01	7,63	0,01
H ₂ SO ₄ (0,5 M)	mL	0,81	284,21	0,05	360,00	0,05
Enzima	g	177,41	11,88	0,46	11,88	0,36
<i>Servicios</i>						
Electricidad	kwh	272,60	469,17	27,75	781,95	36,52
Costo Total por g de fructosa				40,62		49,29

* Cantidad total por tiempo de operación

** Costo por g de fructosa producido

continuación

	Unidad	Costo por unidad (\$)	$\tau = 0,77 \text{ h (} t_f = 1040 \text{ h)}$		$\tau = 1 \text{ h (} t_f = 1430 \text{ h)}$	
			Cant. por t_f^*	Costo/g** (\$/g)	Cant. por t_f^*	Costo/g** (\$/g)
<i>Materia Prima</i>						
Jarabe de glucosa refinado (2 M)	g	5,55	13476,51	12,33	14268,26	12,33
MgSO ₄ *7H ₂ O (1g/L)	g	2,44	37,40	0,02	39,60	0,02
Na ₂ S ₂ O ₅ (0,18 g/L)	g	3,36	6,73	0,00	7,13	0,00
Na ₂ CO ₃ (0,21 g/L)	g	6,03	7,93	0,01	8,39	0,01
H ₂ SO ₄ (0,5 M)	mL	0,81	374,03	0,05	396,00	0,05
Enzima	g	177,41	11,88	0,35	11,88	0,33
<i>Servicios</i>						
Electricidad	kwh	272,60	1251,12	56,24	1720,29	73,04
Costo Total por g de fructosa				68,99		85,78

* Cantidad total por tiempo de operación

** Costo por g de fructosa producido