

**ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE JUGO DE CAÑA MEDIANTE  
SÍNTESIS ENZIMÁTICA CON CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE  
*Candida apicola***

# **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
PROCESOS AGROINDUSTRIALES**

PRESENTA

**Ing. Eduardo Sharini Muñoz Equihua**

**Director: Dr. Rogelio Prado Ramírez**

**Asesor: Dr. Javier Arrizon Gaviño**

**Tutor en planta: Ing. Francisco Pérez Martínez**



Zapopan, Jalisco, México, Junio de 2016

### DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene en las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán, en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Eduardo Sharini Guiso  
Nombre y Firma



Guadalajara, Jalisco a 22 de junio de 2016

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO  
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado del estudiante **Eduardo Sharini Muñoz Equihua**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE JUGO DE CAÑA MEDIANTE SÍNTESIS ENZIMÁTICA CON CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Candida apicola*" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Procesos Agroindustriales durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 22 del mes de junio del año 2016

Guadalupe María Guatemala Morales  
*Presidente*

Melchor Arellano Plaza  
*Secretario*

Javier Placido Arrizon Gaviño  
*Vocal*

**ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE JUGO DE CAÑA MEDIANTE  
SÍNTESIS ENZIMÁTICA CON CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Candida  
apicola***

*"Commit your blunders  
on a small scale and  
make your profits  
on a large scale"*  
*-L. H. Bakeland-*

## RESUMEN

En este trabajo se estudian los métodos, técnicas y factores para realizar un escalamiento a nivel piloto del proceso de obtención de fructooligosacáridos vía síntesis enzimática. Debido a que estos compuestos han sido investigados en los últimos años, y dado el interés por su disponibilidad, estructura y propiedades funcionales, el escalamiento a nivel piloto de su producción a partir de síntesis enzimática se hace esencial para su posterior escalamiento a nivel industrial.

En el trabajo que se presenta se consideraron diversos métodos de escalamiento optando por el método empírico-híbrido basado en la similitud mecánica, térmica y química, en el cual se evaluaron dos velocidades (70 y 85 rpm) para determinar la relación de la velocidad de agitación con la transferencia de masa a través de cuatro variaciones de la ecuación del número de Sherwood, así como un análisis de la relación de la velocidad máxima de reacción con la transferencia de masa del sustrato a la enzima.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la velocidad de agitación es un factor importante en la reacción enzimática de síntesis de fructooligosacáridos que se lleva a cabo en un tanque agitado, así como que una adecuada agitación del sistema en cuestión es esencial para una transferencia favorable y así poder mejorar la reacción enzimática que se está llevando a cabo.

Finalmente, se ha mostrado la factibilidad técnica de obtener fructooligosacáridos a partir de azúcar de caña mediante una vía enzimática con *Candida apícola*, en un proceso que presenta todavía diferentes áreas de oportunidad para incrementar su eficiencia y el rendimiento global de conversión de sacarosa a fructooligosacáridos.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este momento y permitir que mis padres estuvieran para verlo.

A mis padres M.V.Z. Eduardo Muñoz Estrada y L.E.O. Felicitas Equihua Sevillano, por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado en la vida y por la educación que me han sabido dar; a mi hermana Mintzita de Jesus Muñoz Equihua, que me ha ayudado cuando lo he necesitado y a mi familia, que es la que siempre va a estar presente.

A mis asesores, Dr. Rogelio Prado Ramírez, Dr. Javier Arrizon Gaviño e Ing. Francisco Pérez, por la paciencia que me tuvieron durante el periodo de la maestría, los conocimientos adquiridos a través de ellos y por hacer de este un proceso de aprendizaje agradable.

Al personal de CIATEJ que de alguna forma me ayudaron en el proceso para la realización de este trabajo, que sin su ayuda no hubiera sido posible la terminación de este proyecto.

A todos mis compañeros del área de Biotecnología Industrial y Tecnología Alimentaria que contribuyeron a la realización del trabajo.

A mis amigos y grupo de trabajo, Mariana de los Angeles Mendoza Rivera y Noé Luiz Santos.

A mis amigos y compañeros del área de Tecnología Alimentaria, Karina Esmeralda, Alma Cecilia, Amairani Lym, Gladys Páez, Alberto Becerra, Sandra Jiménez e Isaías Cruz.

A todos ellos por hacer de mi estancia en el CIATEJ un rato agradable, compartirme parte de su tiempo, estar cuando necesité de ellos y sobre todo, permitirme ser parte de sus vidas.

*“Todo amor y toda  
amistad dejan una huella  
en tu camino.”*

*-Anónimo-*

## Índice de Contenido

1	JUSTIFICACIÓN.....	2
2	HIPÓTESIS.....	3
3	OBJETIVOS.....	4
3.1	Objetivo General.....	4
3.2	Objetivos Específicos.....	4
4	FUNDAMENTOS.....	5
4.1	Alimentos Funcionales.....	5
4.1.1	Prebióticos.....	6
4.1.2	Fructanos.....	8
4.1.3	Fructooligosacáridos (FOS) de cadena corta.....	9
4.1.4	Consumo de FOS en la dieta diaria.....	10
4.1.5	Efectos fisiológicos de los FOS.....	11
4.1.6	FOS como fibra.....	11
4.1.7	Digestibilidad de los FOS.....	12
4.1.8	Proceso de obtención de los FOS.....	13
4.1.9	Características y fuente de las enzimas.....	16
4.2	La caña de azúcar.....	20
4.3	Escalamiento.....	24
4.3.1	Definición.....	24
4.3.2	Plantas piloto.....	27
4.3.3	Similitud.....	31
4.3.4	Transferencia de masa.....	35
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1	Obtención del sustrato.....	46
5.1.1	Extracción y Concentración del jugo de caña.....	46
5.1.2	Parámetros del sustrato.....	47
5.2	Obtención del biocatalizador.....	49
5.2.1	Producción del biocatalizador.....	49

5.2.2	Concentración del biocatalizador.....	50
5.2.3	Permeabilización de células. ....	51
5.3	Reacciones de síntesis.....	51
5.3.1	Análisis mediante HPLC.....	54
5.4	Estimación de la actividad enzimática de la levadura.....	54
5.5	Análisis de transferencia de masa.....	56
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
6.1	Obtención del sustrato.....	60
6.1.1	Concentración del jugo de caña.....	60
6.1.2	Medición de la densidad del jugo concentrado. ....	64
6.1.3	Medición de la viscosidad del jugo concentrado. ....	66
6.2	Producción del biocatalizador.....	67
6.3	Reacciones de síntesis.....	70
6.4	Obtención de la actividad enzimática de la levadura. ....	77
6.5	Análisis de transferencia de masa.....	82
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	95
8	BIBLIOGRAFÍA.....	97



## Índice de Tablas y Figuras

Tabla 4.1 Prebióticos oligosacáridos (Rastall, 2006).....	7
Tabla 4.2 Composición de la caña de azúcar 4.2a (superior) y de los sólidos del jugo 4.2b (inferior).....	22
Tabla 4.3 Factores Críticos de Escalamiento de Equipos y Operaciones Unitarias (Harmsen, 2013) .....	25
Tabla 5.1 Composición del medio mineral para la inducción de la enzima. ....	50
Tabla 5.2 Valores 5.2a (superior) y aumentos 5.2b (inferior) de los diferentes parámetros según el criterio de escalado aplicado.....	52
Tabla 5.3 Concentraciones de sustrato (sacarosa) a las cuales se determinó la actividad enzimática. ....	55
Tabla 6.1 Propiedades de la mezcla líquido-vapor: Tabla de temperatura. ....	62
Tabla 6.2 Propiedades de la mezcla líquido-vapor: Tabla de temperatura. ....	63
Tabla 6.3 Resultados de viscosidad del jugo de caña. ....	66
Tabla 6.4 Condiciones de trabajo en la concentración de biomasa de <i>Candida apícola</i> . ....	67
Tabla 6.5 Condiciones de trabajo en la concentración de biomasa de <i>Candida apícola</i> . ....	68
Tabla 6.6 Concentración de carbohidratos durante la reacción de síntesis a 70 rpm.....	71
Tabla 6.7 Valores de los compuestos durante la reacción de síntesis a 85 rpm .....	73
Tabla 6.8 Valores para la determinación de la curva de calibración.....	77
Tabla 6.9 Unidades de actividad enzimática respecto a la absorbancia obtenida de la muestra. ....	78
Tabla 6.10 Velocidad de reacción de la enzima de acuerdo a la concentración de sustrato proporcionado. ....	79
Tabla 6.11 Inverso de los datos obtenidos para poder linealizar .....	80
Tabla 6.12 Valores de $K_m$ y $V_{max}$ estimados. ....	81
Tabla 6.13 Comparación de parámetros cinéticos ( $K_m$ y $V_{max}$ ).....	82
Tabla 6.14 Comparación de coeficientes de transferencia .....	90
Tabla 6.15 Composición molar del jugo de caña.....	91
Tabla 6.16 Composición molar del producto de la reacción .....	93
Figura 4.1 Estructura de los scFOS (Sungsoo, 2010).....	10
Figura 4.2 Representación esquemática del proceso de producción de oligosacáridos (Rastall, 2006) .....	14
Figura 4.3 Proceso de la producción enzimática industrial de FOS (Rastall, 2006). ....	15
Figura 4.4 Productos derivados de la reacción de transfructosilación .....	17
Figura 4.5 Representación esquemática del mecanismo de transfructosilación (Chuankhayan, 2010) .....	19
Figura 4.6 Diferencia entre escalamiento básico 4.6a (izquierda) y basado en modelos 4.6b (derecha) (Jones, 1993).....	31
Figura 4.7 Principio de similitud geométrica .....	33
Figura 5.1 Metodología empleada. ....	45
Figura 5.2 Evaporador tipo flash.....	46
Figura 5.3 Material con el cual se midió la densidad del jugo concentrado. ....	47
Figura 5.4 Equipo Anton Paar 35n. ....	48
Figura 5.5 Equipo Advance Rheometer AR 1000.....	49
Figura 5.6 Equipo de filtración por membranas “Pellicon” .....	51
Figura 5.7 Reactor en el cual se llevaron a cabo las reacciones de síntesis enzimática. ....	54
Figura 6.1 Balance de materia del proceso de obtención del sustrato. ....	65

<i>Figura 6.2 Comportamiento reológico del jugo de caña a 60°C.</i> .....	66
<i>Figura 6.3 Balance de materia de la producción de biocatalizador.</i> .....	69
<i>Figura 6.4 Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de FOS realizada a 70 rpm.</i> .....	70
<i>Figura 6.5 Cinética de la reacción de síntesis de FOS a 70 rpm.</i> .....	72
<i>Figura 6.6 Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de FOS realizada a 85 rpm.</i> .....	73
<i>Figura 6.7 Cinética de la reacción de síntesis de FOS a 85 rpm.</i> .....	74
<i>Figura 6.8 Balance de materia de la reacción de síntesis (85 rpm) de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña</i> .....	76
<i>Figura 6.9 Curva de calibración para la medición de la actividad enzimática</i> .....	77
<i>Figura 6.10 Gráfica de la concentración del sustrato (mM) vs la velocidad de la enzima (U/ml)</i> .....	80
<i>Figura 6.11 Datos linealizados para estimar los valores de Km y Vmax</i> .....	81

*“Un poco de ciencia aleja  
de Dios, pero mucha  
ciencia devuelve a Él.”*

*-Louis Pasteur-*

## NOTACIÓN

$a$	Área interfacial por unidad de volumen ( $m^{-1}$ )
$C_s$	Concentración del sustrato ( $Kmol/m^3$ )
$C_{sb}$	Concentración del sustrato en el interior de la solución ( $Kmol/m^3$ )
$D$	Diámetro del impelente (m)
$D_{(s)}$	Coefficiente de difusión (m/s)
$Da$	Número de Damköhler
$D_{AB}$	Difusividad de A en B ( $m^2/s$ )
$d_{CA}$	Diferencia de concentración de A ( $mol/m^3$ )
$D_i$	Diámetro del impelente (m)
$d_p$	Diámetro de partícula (m)
$D_t$	Diámetro del reactor (m)
$dz$	Diferencia de distancia en la dirección z (m)
$G$	Velocidad de masa ( $Kg/m*s$ )
$J_{AZ}$	Flujo difusivo de A en la dirección Z ( $mol/m^2*s$ )
$K_L$	Coefficiente de transferencia de masa (m/s)
$K_M$	Constante de Michaelis ( $Kmol/m$ )
$L$	Longitud (m)
$N$	Velocidad de agitación (rps)
$N_p$	Número de potencia
$N_s$	Velocidad de transferencia del sustrato (mol/s)
$P$	Potencia (W)
$Re$	Número de Reynolds
$r_{max}$	Máxima velocidad de reacción por unidad de volumen ( $Kmol/m^3s$ )
$r_p$	Velocidad de reacción por unidad de volumen ( $Kmol/m^3s$ )
$r_{pm}$	revoluciones por minuto
$RTD$	Distribución del tiempo de residencia (por sus siglas en inglés)
$Sh$	Número de Sherwood
$U$	Unidades de actividad enzimática ( $\mu g/mL*min$ )
$V$	Velocidad (m/s)
$\nu$	Viscosidad cinemática ( $m^2/s$ )
$X_s$	Fracción molar del sustrato

### Letras griegas

$\rho$	Densidad ( $kg/m^3$ )
$\epsilon$	Potencia por unidad de masa (W/g)
$\gamma$	Viscosidad cinemática ( $m^2/s$ )
$\mu$	Viscosidad dinámica ( $Pa*s$ )

## 1 JUSTIFICACIÓN.

Actualmente la producción y consumo de ingredientes con actividad prebiótica, como los *fructooligosacáridos* o FOS, ha cobrado un gran interés en la industria alimentaria y de suplementos debido a su potencial, ya comprobado, para mejorar la salud humana. Ya que estos compuestos químicos pueden ser obtenidos a partir de la sacarosa de caña de azúcar empleando técnicas enzimáticas, se considera que el proceso aquí descrito podría influir potencialmente en el sector cañero al darse un valor agregado a la caña de azúcar y una opción novedosa para este sector, mismo que por años ha demandado de forma imperante el desarrollo de alternativas de aprovechamiento que le representen oportunidades de negocio y que a la vez representen una oportunidad para el consumidor de alimentos y suplementos, el cual se ha tornado más exigente y cuidadoso en la selección de sus alimentos.

Este trabajo orientado al escalamiento a nivel piloto del proceso de síntesis de FOS utilizando sacarosa, específicamente jugo de caña concentrado como sustrato para la realización de pruebas de producción de FOS empleando células permeabilizadas de levadura *Candida apicola*, tiene la finalidad de contribuir a la ampliación de alternativas de aprovechamiento novedoso de la caña de azúcar producida en nuestro país. Este trabajo se coloca de manera estratégica en la ruta de desarrollo biotecnológico, previo a una posible producción a nivel industrial de FOS, por lo que el diseño y análisis de los procesos que se involucran a nivel piloto, son indispensables para poder realizar un escalamiento con bases firmes que se pueda dar a una escala mayor de la tecnología de síntesis.

A la fecha no se tiene conocimiento de que se haya realizado un estudio como el que comprende esta tesis y se considera que los resultados aquí presentados representan un avance en la aplicación de la biotecnología en el sector de la caña de azúcar.

## 2 HIPÓTESIS.

A partir de los parámetros seleccionados de escalamiento, obtenidos a nivel laboratorio, como son la relación actividad de la enzima/sustrato (7 unidades/g de sacarosa), la temperatura (60°C), el tiempo de residencia (12 h), la velocidad de agitación (150 rpm) y de las reacciones de síntesis enzimática llevadas a cabo a nivel laboratorio, es factible realizar el escalamiento del proceso de síntesis de FOS al nivel piloto.

### 3 OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo General.

Escalar a nivel piloto el proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apicola*.

#### 3.2 Objetivos Específicos.

1. Obtener el sustrato a nivel piloto a partir de jugo de caña puro.
2. Obtener células permeabilizadas de *Candida apicola* a nivel piloto para su uso en la reacción de síntesis, misma que comprende:
  - a. Producir biomasa de *Candida apicola* a nivel piloto
  - b. Concentrar la cepa *Candida apicola* mediante tecnología de membranas.
3. Realizar la reacción de síntesis de fructooligosacáridos a nivel piloto a partir de jugo de caña.
4. Realizar el balance de materia
5. Analizar la transferencia de masa.

## 4 FUNDAMENTOS.

### 4.1 Alimentos Funcionales.

La Convención en Diversidad Biológica (CBD, por sus siglas en inglés), define la biotecnología como "cualquier aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de ellos, para hacer o modificar productos o procesos para un uso específico" (CBD, 2000).

Un concepto reciente para describir el amplio beneficio para la salud que proporciona un alimento es "Alimento Funcional". La Tabla de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias describe un alimento funcional como "Cualquier alimento modificado o ingrediente alimenticio que puede proveer un beneficio a la salud más allá de lo que contiene un nutriente tradicional" (Tabla de Alimentos y Nutrición 1994) (Fernandez 2007). Debido a que este trabajo se enfoca en la síntesis de fructooligosacáridos, se da un breve preámbulo sobre este tipo de moléculas.

El concepto de alimento funcional fue creado en Japón, de la necesidad de nombrar de una manera especial a los Alimentos para Uso Específico de la Salud (FOSHU, por sus siglas en inglés). Más de 270 alimentos tienen etiqueta de FOSHU en Japón. Los alimentos que califican como "alimentos funcionales" contienen sustancias no esenciales con un potencial benéfico para la salud; por ejemplo: alimentos de soya (isoflavonas), jugo de uva morada (resveratrol), jitomate (licopeno), entre otros. De acuerdo al Documento de Consenso de los Conceptos Científicos de Alimentos Funcionales en Europa, un alimento puede ser llamado "funcional" si se demuestra satisfactoriamente que afecta benéficamente una o más funciones en el cuerpo, más allá de los efectos de una nutrición adecuada, en un modo que es relevante ya sea para una mejora del estado de salud y el bienestar y/o la reducción de riesgos de enfermedades (Ross & Preedy 2010).

Gran parte de la población ha tomado conciencia sobre los beneficios de los alimentos, por lo que ha habido un gran incremento en la demanda de nutracéuticos y alimentos funcionales (Bagchi Lau et al. 2010). La agricultura moderna y las prácticas de manufactura de alimentos están orientadas hacia la producción de cultivos con valor agregado y los productos

alimentos manufacturados ya no son solamente nutritivos ni de sabor agradable y también tienen propiedades para el mejoramiento de la salud y prevención de enfermedades (Hsieh, 2007). Sin embargo, más allá de la demanda por los productos con calidad mejorada, los consumidores buscan productos naturales; no obstante, no solamente los ingredientes por sí mismos hacen que el alimento sea natural, sino también el proceso del cual deriva. Por ello, la biotecnología tiene un gran potencial para producir todos los tipos de materiales alimenticios deseados y que satisfagan el criterio para ser considerados naturales (Senorans, 2003). Los alimentos funcionales por si solos no hacen frente a un problema tan serio como la desnutrición mundial, pero proveen a los consumidores de un amplio rango de opciones de alimentos agradables para el tratamiento o prevención de algunos padecimientos.

#### 4.1.1 Prebióticos.

Los oligosacáridos de bajo peso molecular (Tabla 4.1) han cobrado reciente interés debido a que se presentan como una fuente importante de carbono para las bacterias del colon. Cuando son ingeridos, estos carbohidratos alcanzan la región ileocecal relativamente intactos. En el colon, actúan como fuente de carbono para la microflora residente, contribuyen a que disminuya el pH y a la producción de ácidos grasos de cadena corta; uno de sus principales efectos es la reducción de microorganismos patógenos (Rastall & Gibson 2006).

Por este tipo de propiedades que poseen, se busca incrementar su uso en diferentes alimentos, ya que presentan pocos problemas de estabilidad y cierta resistencia al calor; algunos prebióticos pueden incluso mejorar las características de calidad de los alimentos como la sensación en la boca y otros aspectos de textura. También han sido utilizados como sustitutos de grasas bajos en calorías. Los criterios para clasificar un ingrediente alimenticio como prebiótico incluyen (Rastall & Gibson 2006):

- 1) Resistencia a los ácidos gástricos, hidrólisis por enzimas de mamíferos y absorción gastrointestinal.
- 2) Fermentación por la microflora intestinal nativa.



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

- 3) Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad bacteriana intestinal asociada con la salud y el bienestar.

Tabla 4.1 Prebióticos oligosacáridos (Rastall, 2006)

Tipo de oligosacárido	Estructura molecular	Características fisiológicas	Principales productores	Nombre comercial
<b>Fructooligosacáridos /Inulina</b>	(Fr) <sub>n</sub> -Gu	β-1,2	Japón	Meiologo
			Francia	Actilight
			Bélgica	Raftilose
<b>Galactooligosacáridos</b>	(Ga) <sub>n</sub> -Gu	β-1,4; β-1,6	Japón	Oligomate
				Cup-Oligo
<b>Isomaltooligosacáridos</b>	(Gu) <sub>n</sub>	α-1,6	Japón	Isomalto-900
<b>Lactulosa</b>	Ga-Fr	β-1,4	Japón	MLS/P/C
			Alemania	
<b>Oligosacáridos de haba de soya</b>	(Ga) <sub>n</sub> -Gu-Fr	α-1,6	Japón	Soya-oligo
<b>Lactosucrosa</b>	Ga-Gu-Fr	β-1,4	Japón	Nyuka-Origo
<b>Xilooligosacáridos</b>	(Xy) <sub>n</sub>	β-1,4	Japón	Xylo-oligo
<b>Gentiooligosacáridos</b>	(Gu) <sub>n</sub>	β-1,6	Japón	Gentose

[Ga, Galactosa; Gu, Glucosa; Fr, fructosa; Xy, Xilosa]

La definición original de prebióticos fue propuesta por Gibson y Roberfroid en 1995, que los define como "carbohidratos dietéticos indigeribles que afectan benéficamente la salud del huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento o la actividad de una o más poblaciones de bacterias en el colon, principalmente lactobacilos y bifidobacterias" (Rastall & Gibson 2006; Ross & Preedy 2010). Posteriormente, la FAO propuso una definición más amplia con lo que abarca nuevos prebióticos; "Un prebiótico es un componente alimenticio no viable que confiere al huésped un beneficio a la salud, asociado con la modulación de la microbiota" (Ross & Preedy 2010). Con esta definición, se pueden agregar componentes dietéticos diferentes a los carbohidratos no digeribles, como es el caso de los nucleótidos, y los glicomacropéptidos derivados de la caseína presentes en la leche humana, que son capaces de modular la microbiota de los recién nacidos. Para tener los efectos deseados, los prebióticos deben de ser capaces de resistir los procesos de digestión antes de alcanzar el colon.

#### 4.1.2 Fructanos.

El término fructano es un término general para cualquier carbohidrato en el cual uno o más enlaces fructosil-fructosa constituyen la mayoría de los enlaces glucosídicos. Estos son sintetizados en las plantas a partir de sacarosa por transferencia repetida de grupos fructosil y usualmente tienen una unidad de glucosa inicial (Chuankhayan Hsieh et al. 2010). Están representados por la fórmula original con glucosa al interior ( $GF_n$ ), pueden ser lineales o ramificados con enlaces  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6) respectivamente.

Los fructanos pueden ser de tipo inulina o levana. El tipo inulina está compuesto por unidades fructofuranosil  $\beta$ -2,1; estos se encuentran en plantas y pueden ser sintetizados por hongos. Los de tipo levana tienen unidades fructofuranosil  $\beta$ -6,2, estos se encuentran en plantas y pueden ser sintetizados por bacterias como *Streptococcus mutans* (Patel, 1994). Su grado de polimerización (DP) puede variar entre 2 y 70 (Gibson et al., 2000). Su DP y cantidad

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

obtenida va a depender de la fuente de que se extraen (Achicoria, alcachofa, cebolla, entre otros) así como de las condiciones de almacenamiento (Modler, 1994).

#### 4.1.3 Fructooligosacáridos (FOS) de cadena corta.

Los fructooligosacáridos son fructanos de bajo peso molecular con un grado de polimerización de 2 a 10; tienen propiedades de una típica fibra dietética y se pueden encontrar en varios vegetales. Estos sirven como reservas de azúcar en semillas y tubérculos y son utilizados cuando comienza el proceso de crecimiento; sin embargo sus efectos fisiológicos intestinales descubiertos en años recientes, ha renovado su significancia hacia la salud humana (Rastall & Gibson 2006).

Los fructooligosacáridos son solubles en agua y tienen cierto dulzor, el cual va disminuyendo conforme incrementa el largo de la cadena y su uso como sustituto de grasa incrementa con el número de moléculas de fructosa (Ross & Preedy 2010).

Los enlaces glucosídicos de los oligosacáridos son resistentes a la hidrólisis enzimática en el intestino por lo que pueden alcanzar el colon intacto donde sirven como substrato fermentable para producir ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y gases.

El término fructano es utilizado para nombrar moléculas que tienen en su mayoría residuos de fructosa sin importar el número: Por lo tanto, los fructanos representan un grupo heterogéneo que puede variar respecto a (Ross & Preedy 2010):

- Fuente: Planta, bacteria y hongos
- Composición de la cadena: Toda de fructosa o mayormente fructosa
- Tipo de enlace:  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6)
- Grado de polimerización (DP): Los fructanos de las plantas no exceden un DP mayor a 200, sin embargo, los producidos por bacterias pueden tener un DP mayor a 100,000.
- Arquitectura: Lineal, ramificada o cíclica
- Funcionalidad: Fisiológica o ciencia alimentaria.

Debido a la heterogeneidad de la familia de los fructanos, las clasificaciones de subclases evolucionaron con su propio conjunto de propiedades químicas y fisiológicas. La clasificación de los fructanos provenientes de las plantas depende de su grado de polimerización (DP):

Inulina < 200, Fructooligosacáridos < 10, Fructooligosacáridos de cadena corta 2-4. La inulina representa un grupo con un DP de hasta 200, mientras que el grupo de los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS, por sus siglas en inglés) tiene un DP de 2-4 (Figura 4.1) (Sungsoo & Finocchiaro 2010).

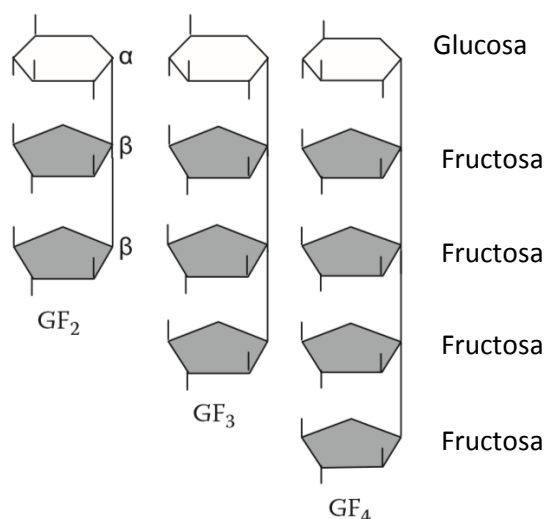


Figura 4.1 Estructura de los scFOS (Sungsoo, 2010)

#### 4.1.4 Consumo de FOS en la dieta diaria.

Los oligosacáridos tienen funciones protectoras y de almacenamiento de energía en la planta de origen, para ser utilizados también durante la germinación (Ross & Preedy 2010) y normalmente son consumidos por el hombre a través de los vegetales, por lo que forman parte de la dieta diaria. Algunos alimentos son altos en concentración de FOS, mientras que otros son ricos en fructanos de alto peso molecular como la inulina. Los FOS están presentes en alimentos como la cebolla, alcachofa, ajo, trigo y plátano, normalmente en valores bajos. Por lo que la ingesta total de fructanos de una persona varía; en EEUU está entre 1 a 5 g/día con una ingesta media de FOS menor a 1g/día. A su vez, esta cifra varía dependiendo de los hábitos alimenticios de cada país, llegando hasta un consumo de 6 a 17 g/día en España (Sungsoo & Finocchiaro 2010). Los prebióticos más comúnmente utilizados en la elaboración de alimentos, incluidos los alimentos para bebé, son los fructanos (inulina y FOS) y galactooligosacáridos (GOS). Estos son considerados como GRAS (Generally Recognized As

Safe) y sus efectos benéficos sobre la salud han sido ampliamente estudiados. La inulina, por ejemplo, es una mezcla de polímeros compuestos por unidades de fructosa con DP variable. La inulina es aislada y purificada una vez que es obtenida a partir de la achicoria (*Cichorium intybus*) de la cual se extrae con agua caliente. Muchos de los nuevos prebióticos que están surgiendo, ya sean de origen natural o sintético, están emergiendo en los mercados mundiales. Varios de estos nuevos productos han sido desarrollados en Japón donde son comercializados actualmente.

#### 4.1.5 Efectos fisiológicos de los FOS.

El interés en la utilización de los FOS en la industria alimentaria y farmacéutica ha incrementado recientemente debido a su gran potencial para mejorar la calidad de diversos alimentos por sus propiedades funcionales, ya que actúan como prebióticos mejorando el crecimiento de las bifidobacterias (Chen Chen et al. 2011; Smaali Jazzar et al. 2012) e inhibiendo microorganismos potencialmente patógenos (Mussatto & M. 2007; Chen Chen et al. 2011), entre otros efectos como la prevención de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

#### 4.1.6 FOS como fibra.

Los FOS son considerados como fibra dietética debido a que los humanos no poseemos enzimas para romper enlaces tipo  $\beta$  y no pueden ser digeridos; y sirven como sustrato para la microflora del intestino (Mussatto & M. 2007; Gutiérrez Fernández et al. 2009; Mussato Ballesteros et al. 2013). De acuerdo a la FAO (FAO 1997) la fibra dietética se define como “los componentes de la dieta de origen vegetal, que son resistentes a las enzimas digestivas del hombre” y en relación a ello, se han dado las siguientes características al concepto de fibra dietética (Sungsoo & Finocchiaro 2010):

- ✓ Está presente en células de plantas comestibles
- ✓ Es un carbohidrato
- ✓ Resiste la hidrólisis de enzimas intestinales de humanos/mamíferos
- ✓ Resiste la absorción en el intestino delgado
- ✓ Es fermentada (parcial o totalmente) por bacterias del intestino grueso

Dadas las anteriores definiciones, un prebiótico puede ser fibra, pero una fibra no es necesariamente un prebiótico. Debido a que los FOS cumplen con los criterios antes establecidos pueden ser considerados como fibra dietética; por lo que ayudan a incrementar la biomasa en el colon y tienen un efecto positivo en la constipación y en la salud de la mucosa en el intestino grueso. Como consecuencia de ello, la fermentación de los oligosacáridos, una vez que se ingieren contribuye a la protección contra el cáncer de colon entre otras propiedades benéficas que se señalan, como son (Ross & Preedy 2010):

- Incrementa la expresión o el cambio en la composición de los ácidos grasos de cadena corta a los colonocitos durante la fermentación de los carbohidratos prebióticos.
- Incrementa el peso de las heces fecales y una leve reducción en el pH de las paredes internas del colon.
- Disminuye la concentración de sustancias tóxicas, mutagénicas o genotóxicas y metabolitos bacterianos, así como ácidos biliosos secundarios y enzimas promotoras de cáncer.
- Las bifidobacterias y lactobacilos presentan actividad beta-glucuronidasa y nitrorreductasa
- Disminución de productos finales nitrogenados y enzimas reductoras
- La producción de ácido butírico refuerza la regeneración del epitelio intestinal
- Incrementa de la expresión de proteínas asociadas con la absorción de minerales
- Mejora el funcionamiento del sistema inmunológico.

#### 4.1.7 Digestibilidad de los FOS.

La naturaleza física y química de los FOS es similar a la de la sacarosa, no obstante, la acción fisiológica es muy diferente. Se han estudiado modelos *in vivo* e *in vitro* para demostrar que los FOS no son digeridos entre la boca y el intestino delgado. Esto es debido a que ni el páncreas ni el intestino delgado poseen enzimas capaces de hidrolizar los enlaces fructosil  $\beta$ -(1-2). A pesar de que no se digieren, los FOS son fermentados en el intestino grueso por lo que contribuyen a la proporción de energía mediante la vía de ácidos grasos de cadena corta.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

La dosis y duración para propósitos nutricionales es la siguiente (Ross & Preedy 2010): inulina (8-40 g/día, 15-64 días), FOS (4-12.5 g/día, 8-12 días), galactooligosacáridos (7.5-15 g/día, 7-21 días), oligosacáridos de soya (10 g/día, 21 días), y lactulosa (3-20 g/día, 14-28 días). Esta proporción puede variar dependiendo de la persona de acuerdo a su tolerancia individual.

El efecto prebiótico de los FOS es dependiente de la dosis y la duración del tratamiento. En estudios hechos por Bouhnik. (1999, 2004, 2006), se encontró que una dosis de 5 g/día de FOS incrementa la población de bifidobacterias en una persona en un 75%; y con 10 g/día se incrementa en un 100%. En otros estudios hechos por Bouhnik (1996); Hidaka, (1986) y Mitsuoka, (1987) se observó un efecto prebiótico en solamente 4 días después del tratamiento. El efecto de estos carbohidratos es más efectivo en personas con una población inicial baja de bifidobacterias y este efecto no disminuye con un consumo continuo de FOS, sin embargo, si se cesa la ingesta, la población de bifidobacterias regresa a su nivel inicial (Sungsoo & Finocchiaro 2010).

#### 4.1.8 Proceso de obtención de los FOS.

Generalmente la producción de prebióticos oligosacáridos es llevada a cabo mediante uno de tres procesos (Grizard & Barhomeuf, 1999): 1) extracción directa de oligosacáridos naturales de plantas; 2) hidrólisis controlada de polisacáridos naturales; y 3) síntesis enzimática utilizando glicosiltransferasas de plantas o de origen microbiano (Rastall & Gibson 2006).

La mayoría de los prebióticos producidos enzimáticamente; pueden ser obtenidos a partir de sacarosa (Figura 4.2) a través de transfructosilación mediante una  $\beta$ -fructofuranosidasa ( $\beta$ -FFase, EC 3.2.1.26) o mediante una  $\beta$ -D-Fructosiltransferasa ( $\beta$ -FTase, EC 2.4.1.9).

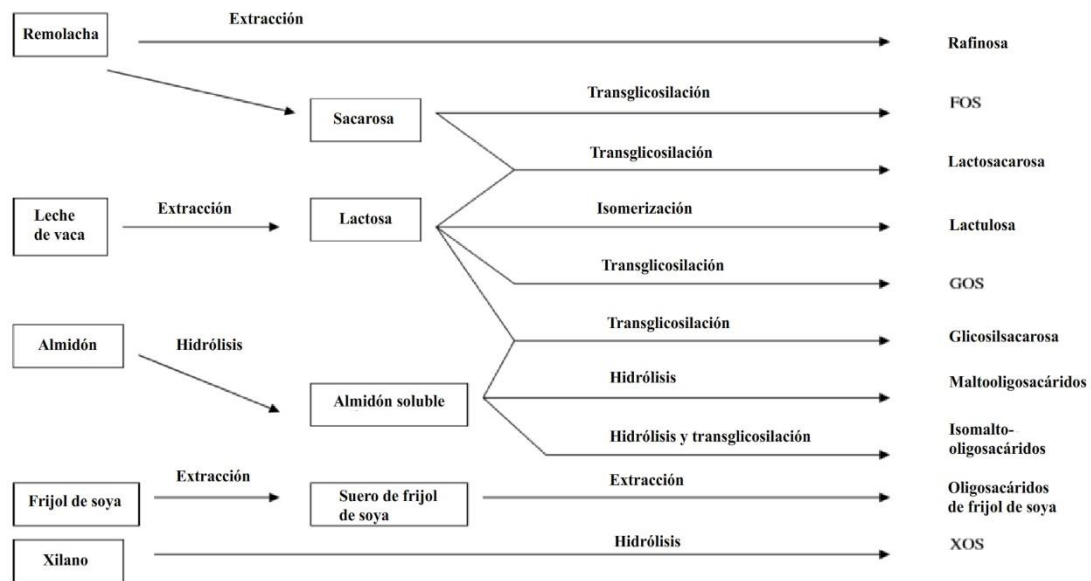


Figura 4.2 Representación esquemática del proceso de producción de oligosacáridos (Rastall, 2006)

La producción enzimática a nivel industrial de FOS a partir de sacarosa puede ser a través de dos procesos (Yun, 1996): 1) sistemas por lotes utilizando enzimas solubles; y 2) sistemas continuos utilizando enzimas inmovilizadas o la célula completa (Figura 4.3). Las enzimas utilizadas pueden ser intra o extra celulares.

Existen algunas ventajas de obtener los FOS mediante síntesis en relación a la extracción de los mismos a partir de una planta:

- La composición y la arquitectura de las cadenas de FOS son más consistentes
- Todas las cadenas tienen una molécula de glucosa, lo cual influye en la funcionalidad.

El proceso es más eficiente que su extracción de la planta. Ej. el 100% de los fructanos de plátano tienen un  $DP < 5$ , sin embargo, solamente contiene 1% de scFOS (Sungsoo & Finocchiaro 2010).



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

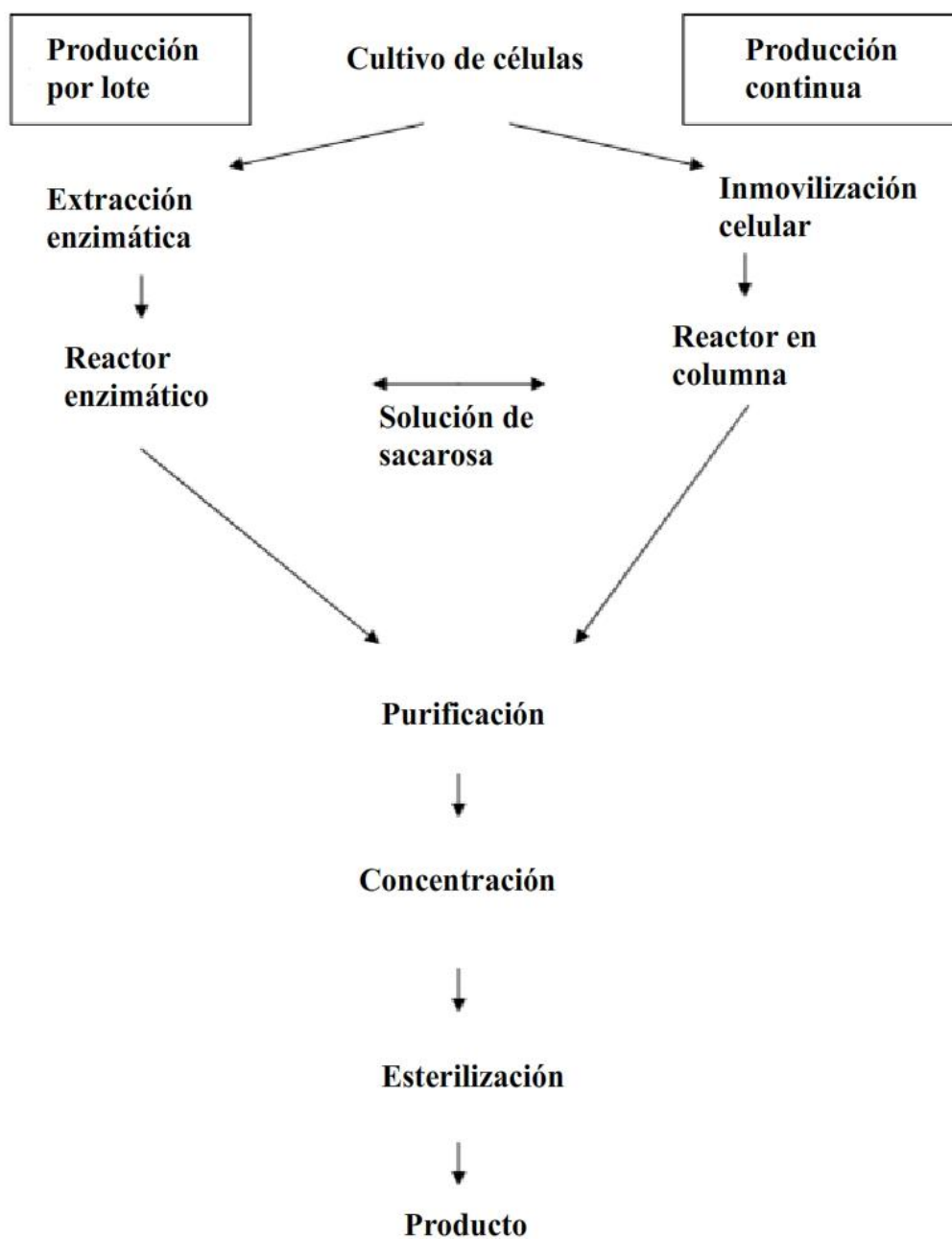
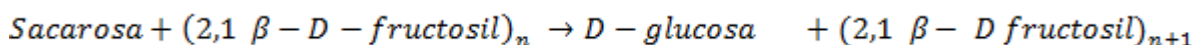


Figura 4.3 Proceso de la producción enzimática industrial de FOS (Rastall, 2006).

#### 4.1.9 Características y fuente de las enzimas.

Las  $\beta$ -Fructosiltransferasas tienen actividad tanto de hidrólisis como capacidad de síntesis, pero estas van a depender de cada enzima. Para una reacción de hidrólisis, el aceptor preferente es el agua y en una reacción de transferencia de grupos fructosil, es otro azúcar o un alcohol.

Las invertasas o  $\beta$ -fructofuranosidasas catalizan la liberación de la fructosa de diversos sustratos creando una cantidad equimolar de D-fructosa y D-glucosa (Zhong-Wei Yu-Qiang et al. 2008; Van Steenkamp et al. 2013), el mecanismo general de la reacción que realizan (Hijum Schutten et al. 2002) es:



Generalmente son enzimas multiméricas que llevan a cabo la síntesis de cadenas cortas de FOS, en concentraciones saturadas de sacarosa, en los cuales tres fructosas están unidas a un esqueleto de sacarosa mediante enlaces glucosídicos (Gutiérrez Fernández et al. 2009) (Figura 4.4), los cuales van a depender de la fuente de la enzima.

La principal enzima para la producción de FOS a nivel industrial se obtiene de *Aspergillus*. La producción de otros oligómeros como 6-kestosa ha sido reportada en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, y *Schawnniomyces occidentales* y también en hongos como *Thermoaccus aurantiacus* y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez Fernández et al. 2009; Chen Chen et al. 2011).

Las dos fuentes principales de fructosiltransferasas son: plantas y microorganismos, especialmente los hongos (Legaz Pedrosa et al. 1995; Sánchez Guio et al.). Las especies más utilizadas como fuente de enzimas para producir FOS son *Aspergillus Niger*, *Aureobasidium pullulans*, y *Aspergillus japonicus* (Katapodis Kalogeris et al. 2003; Rastall & Gibson 2006).

Las fructosiltransferasas fungales son preferidas sobre otro tipo de enzimas debido al bajo costo del sustrato, fácil detección de productos y alta actividad enzimática (Van Steenkamp et al. 2013). Estas actúan sobre la sacarosa rompiendo el enlace  $\beta$ -(2,1), liberando glucosa y transfiriendo el grupo fructosil a una molécula aceptora, las más comunes son la sacarosa, 1-kestosa, nistosa y rafinosa (Chuankhayan Hsieh et al. 2010).

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Las enzimas de diferentes fuentes tienen tamaños que van de 232 kDa hasta 346 kDa y pueden consistir de más de una subunidad o tener carbohidratos unidos a ella (Rastall & Gibson 2006) y el pH y la temperatura óptima para la producción de FOS se encuentran generalmente entre los rangos 5.0 a 6.0 y 50 a 60 °C, respectivamente. No obstante, estos valores pueden variar dependiendo de la fuente de la enzima.

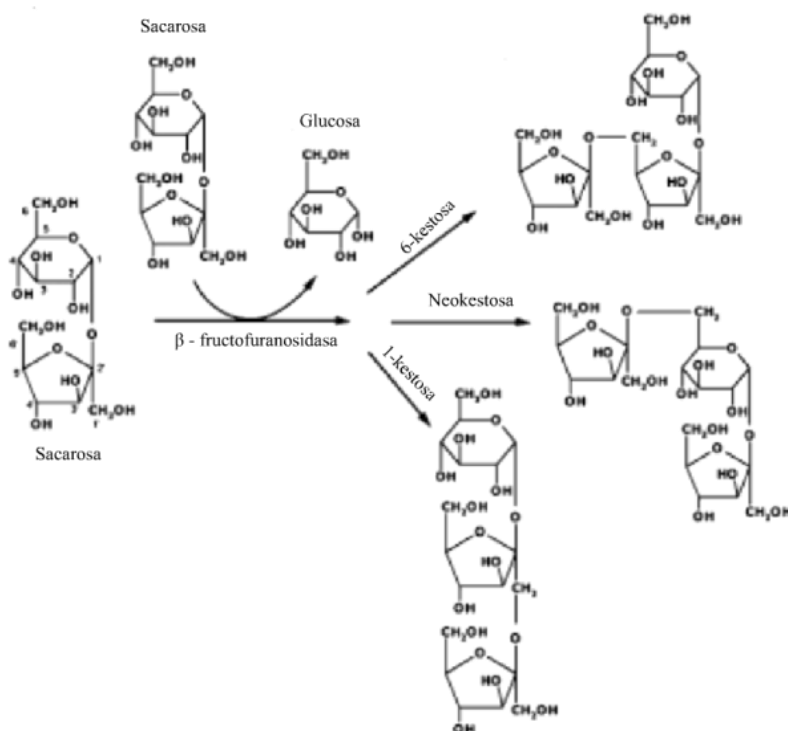


Figura 4.4 Productos derivados de la reacción de transfructosilación

El mecanismo general de reacción de síntesis propuesto por Hsieh *et al.* (2010) es de un doble desplazamiento, el cual tiene dos pasos: 1) Glicosilación, que consiste en la protonación del oxígeno glucosídico seguido por un ataque nucleofílico en el carbono anomérico del sustrato donador para formar un intermediario fructosil-enzima; 2) Deglicosilación, es la transferencia del grupo fructosil al aceptor a través de la base general, mediante un ataque nucleofílico y la liberación del producto y la enzima. En esta última etapa, el agua sirve como aceptor para la hidrólisis o transferencia (Chuankhayan Hsieh *et al.* 2010).

De acuerdo al mecanismo propuesto por Nagem *et al.* (2004), la síntesis de FOS sigue la misma secuencia en el sitio activo de cualquier enzima involucrada. Inicia con un ataque químico por un nucleófilo en el donador (Figura 4.5A). Posteriormente el oxígeno que une al donador con el resto de la molécula ataca el protón donador al mismo tiempo. Esto está localizado en otro aminoácido en el sitio activo y un enlace glucosídico es formado entre el donador y el nucleófilo (Figura 4.5B). El donador de protón da un electrón al aceptor (Figura 4.5C). El aceptor ataca el grupo unido al nucleófilo y se rompe el enlace glucosídico, el sustrato unido al nucleófilo es liberado y el donador de protón recupera el mismo (Figura 4.5D) para iniciar la reacción de nuevo.

Dependiendo de la especificidad de la enzima, el tipo de fructanos sintetizados puede cambiar. Si el carbón anomérico del donador fructosil se une con el carbón 1 del aceptor, se va a formar un enlace  $\beta$ -(2,1) dando como resultado una molécula de 1-kestosa, la cual es precursora para la síntesis de inulina mediante reacciones de transfructosilación sucesivas. Si el donador fructosil se une al carbón 6 de la molécula del aceptor, se forma un enlace  $\beta$  produciendo una molécula de neokestosa, la cual es precursora de neoinulina o neolevana. Cuando el carbón anomérico del donador se une al carbono 6 del aceptor fructosil, se forma un enlace  $\beta$ - (2-6) que resulta en una molécula de 6-kestosa, que es precursora de la levana (Arrizón Urias-Silvas *et al.* 2014).

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

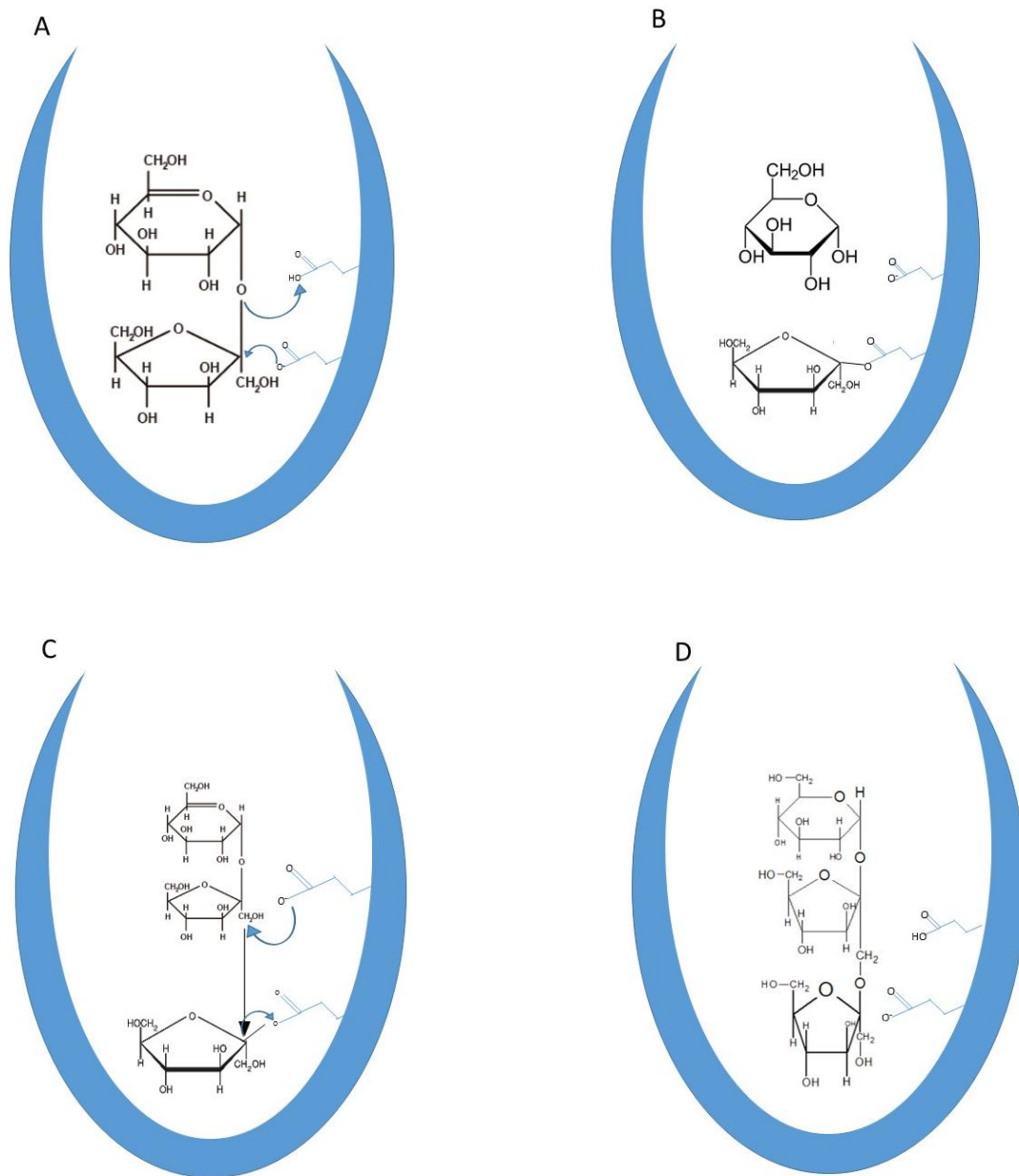


Figura 4.5 Representación esquemática del mecanismo de transfructosilación (Chuankhayan, 2010)

## 4.2 La caña de azúcar.

Toda sustancia química capaz de proporcionar sabor dulce al alimento que la contiene recibe el nombre de edulcorante, su clasificación habitual es la siguiente (Astiasarán & Martínez 2003):

- Edulcorantes naturales
  - ✓ Monosacáridos: glucosa, fructosa, galactosa.
  - ✓ Disacáridos: sacarosa, lactosa, maltosa
- Edulcorantes nutritivos: derivados de productos naturales
  - ✓ Productos que provienen del almidón: glucosa, jarabe de glucosa, isoglucosa.
  - ✓ Productos que provienen de la sacarosa: azúcar invertido.
  - ✓ Azúcares-alcoholes o polioles: sorbitol, manitol, xilitol, isulmato, maltitol, lactitol, jarabe de glucosa hidrogenado.
  - ✓ Neoazúcares: fructooligosacáridos
- Edulcorantes intensos
  - ✓ Edulcorantes químicos (edulcorantes de síntesis o edulcorantes artificiales): aspartamo, acesulfamo, sacarina, ciclamato, alitamo, dulcina.
  - ✓ Edulcorantes intensos de origen vegetal: taumatina, esteviósido, monelina, dihidrocalcona, glicirrizina.

En esta investigación se utilizó el jugo de caña como sustrato para la transformación de la sacarosa en fructooligosacáridos y obtener un edulcorante nutritivo.

De acuerdo al Código Alimentario Español, se designa con el nombre específico de sacarosa a “el producto obtenido industrialmente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*, L. var. Rapa) y de otras plantas sacarinas, en suficiente estado de pureza para la alimentación humana” (Astiasarán & Martínez 2003). La sacarosa está formada por una glucosa y una fructosa unidas mediante un enlace glucosídico  $\beta$ -(1-2), por lo que este es un carbohidrato no reductor ya que carece de un grupo aldehído o cetona libre. La fructosa está como furanosa, lo que hace que el enlace sea lábil al calor y a los ácidos y pueda hidrolizarse con facilidad. Su solubilidad es alta con una gran capacidad de hidratación y es menos higroscópica que la fructosa, por lo que hace que se emplee en la

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

elaboración de diversos alimentos (Badui 2006). Existen otras plantas que se emplean con frecuencia para la producción de sacarosa, como son el maíz dulce, sorgo azucarero, palma datilera y acre de Canadá, entre otros. El azúcar se encuentra difundido en la naturaleza en plantas verdes, hojas y tallos (caña de azúcar 12-26%, maíz dulce 12-17%, mijo dulce 7-15%, jugo de palma (3-6%); en frutos y semillas (nísperos, naranja, calabaza, algarroba, piña, coco, castañas) y en raíces y rizomas (cacahuete 4-12%, cebolla 10-11%, remolacha azucarera (3-20%) (Astiasarán & Martínez 2003).

La caña de azúcar es una planta tropical emparentada con el sorgo y el maíz, en su tallo se acumula un jugo rico en sacarosa, el cual al ser extraído en el ingenio produce azúcar, también se pueden obtener derivados como alcohol, combustibles, abonos, alimentos para animales, etc.; esto da como origen una agroindustria generadora de empleos, participando directamente en la economía nacional (Rodríguez 2005; Santana 2010). La sacarosa y la celulosa son los principales constituyentes químicos en la caña de azúcar, cada uno está compuesto de azúcares simples como glucosa (dextrosa) y fructosa (levulosa), los cuales se encuentran en menor cantidad que la sacarosa. También hay otros compuestos que se presentan en menores cantidades como los minerales, proteínas, ceras, grasas y ácidos que pueden estar en forma libre o combinada (Rodríguez 2005; Santana 2010) (Tabla 4.2).

La fracción más utilizada de la caña es el jugo, del cual se pueden obtener productos alimentarios como el azúcar, panela, miel de caña y alcohol; el bagazo, que es la fracción restante, está constituida por fibra y otros elementos estructurales como parénquima y células epiteliales (Sanjuán Anzaldo et al. 2001); adicional a la sacarosa el jugo de caña presenta otros compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos (Walford 1996; Rodríguez 2005).

Sustancias inorgánicas presentes en del jugo de caña de azúcar.

- I. Hidróxido de calcio.
- II. Calcio remanente.
- III. Sílice. El jugo de caña se encuentra saturado de sílice, el cual está presente como  $\text{SiO}_2$  disuelto,  $\text{SiO}_2$  coloidal y en suspensión en forma de silicatos.

Tabla 4.2 Composición de la caña de azúcar 4.2a (superior) y de los sólidos del jugo 4.2b (inferior)

<b>Composición de la caña de azúcar</b>	
<b>Componentes caña triturada</b>	<b>% Peso</b>
<b>Agua</b>	73-76
<b>Sólidos</b>	24-27
<b>Sólidos solubles</b>	10-16
<b>Fibra (seca)</b>	11-16

a)

<b>Composición de los sólidos del jugo</b>			
<b>Componentes del jugo</b>	<b>Sólidos solubles % peso</b>	<b>Componentes del jugo</b>	<b>Sólidos solubles % peso</b>
<b>Azúcares</b>	75-92	<b>Ácidos carboxílicos</b>	1.1-3.0
<b>Sacarosa</b>	70-88	<b>Aminoácidos</b>	0.5-2.5
<b>Glucosa</b>	2-4	<b>No azúcares orgánicos</b>	
<b>Fructosa</b>	2-4	<b>Proteínas</b>	0.5-0.6
<b>Sales</b>	3.0-4.5	<b>Almidón</b>	0.001-0.050
<b>Ácidos inorgánicos</b>	1.5-5.5	<b>Gomas</b>	0.30-0.15
<b>Ácidos orgánicos</b>	1.0-3.0	<b>Ceras, grasas, fosfátidos</b>	0.05-0.15
		<b>Otros (colorantes, volátiles)</b>	3.0-5.0

b)

- IV. Magnesio.
- V. Hierro y aluminio. Puede estar en suspensión en grandes cantidades, formando parte de las partículas férricas. Sin embargo, solo en un grado muy limitado se presenta en solución
- VI. Potasio, sodio y cloro, se encuentran en forma iónica en el jugo.
- VII. Cenizas totales.



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Sustancias orgánicas presentes en el jugo de caña de azúcar

- I. Compuestos nitrogenados. El nitrógeno se encuentra principalmente formando aminoácidos y amidas, y en menor proporción proteínas.
- II. Aminoácidos simples. Entre los aminoácidos presentes se encuentran el ácido aspártico, ácido glutámico, valina, alanina, glicona, serina y lisina. Estos se combinan con los azúcares reductores para dar lugar a la reacción de Maillard originando compuestos precursores de color.
- III. Proteínas. Tienen un peso molecular elevado y forman soluciones coloidales. Una gran parte de las proteínas presentes en el jugo lo constituyen las albúminas; estas tienen su punto isoeléctrico a un pH de 5.5.

El equivalente del contenido porcentual de sólidos solubles en agua se denomina grados °Brix. La calidad del azúcar crudo y de otros productos dependen, en parte, de la proporción de los azúcares reductores, los cuales cuando aumentan por causa del deterioro o falta de maduración de la planta, pueden producir incrementos en el color y grano defectuoso del piloncillo, este es un producto obtenido a partir del proceso de evaporación de los jugos de la caña de azúcar, y es utilizado como bebida o como edulcorante (Mosquera Eliécer et al. 2007); estudios anteriores (Humbert, 1968) demuestran que el contenido de azúcares reductores disminuye durante la maduración mientras que la sacarosa va incrementando (Larrahondo 1995; M. Salmah et al. 2001).

### 4.3 Escalamiento.

El escalamiento es una parte esencial de este trabajo, ya que se busca establecer los parámetros para poder realizar la síntesis de fructooligosacáridos de una escala a nivel piloto a partir de una escala a nivel laboratorio

#### 4.3.1 Definición.

El concepto de escalamiento parte de la definición de medición, que es la asignación de números a las propiedades de los objetos u operaciones, de acuerdo con ciertos criterios y reglas (Anaya & Pedroza 2008). Dado este concepto, el escalamiento es el proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para definir un sistema grande a partir de uno pequeño y viceversa; por lo que de un trabajo a nivel laboratorio se pueden obtener los datos necesarios para que a través de una técnica adecuada de escalamiento, se pueda definir un proceso a nivel piloto y este a su vez sirva para definir una planta industrial (Anda 1984). Por ello el proceso de escalamiento se puede definir como "la generación del conocimiento para transformar ideas en implementaciones exitosas", y poder desarrollar criterios y reglas de asignación que determinen las unidades de medida significativas para poder evaluar y reducir los riesgos a niveles aceptables para la implementación exitosa a escala comercial (Anaya & Pedroza 2008; Harmsen 2013).

#### **Métodos de escalamiento**

Los métodos más utilizados de escalamiento para operaciones unitarias de acuerdo a Harmsen (2013) son:

- Fuerza Bruta
- Basado en modelos
- Empírico
- Modelo empírico-híbrido

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

### Modelo de escalamiento de fuerza bruta

Este método está basado en el principio de que la planta piloto es una versión a una escala menor de la escala comercial; por lo que los factores críticos de escalamiento (Tabla 4.3) son mantenidos en ambas escalas. Este tipo de escalamiento es usualmente aplicado en industrias donde los modelos de todos los componentes cinéticos no están disponibles.

Tabla 4.3 Factores Críticos de Escalamiento de Equipos y Operaciones Unitarias (Harmsen, 2013)

<b>Factor Crítico de Escalamiento</b>	<b>Riesgos potenciales</b>
<b>Distribución del tiempo de residencia (RTD)</b>	El RTD es afectado por grandes escalas. En reactores puede causar menor conversión y más formación de subproductos. En separaciones puede causar baja selectividad.
<b>Mezclado</b>	La velocidad de mezclado se reduce con el aumento de escala y para algunos tipos de reacciones puede reducir la selectividad
<b>Transferencia de masa</b>	La transferencia de masa a través de interfases puede ser más lenta con el aumento de escala, debido a áreas de baja intensidad turbulenta causando burbujas o coalescencia.
<b>Transferencia de calor</b>	La velocidad de transferencia de calor en los aumentos de escala, puede disminuir debido la disminución de área de superficie específica
<b>Transferencia de impulso</b>	La transferencia de impulso puede incrementar con el aumento de escala debido a las altas velocidades y/o grandes escalas; lo que puede ocasionar rompimiento de las partículas catalizadoras y erosión

### **Método basado en modelos**

En este método el efecto del escalamiento en el comportamiento de las operaciones unitarias es predicho por modelos. Estos modelos contienen los efectos de los parámetros físicos, químicos e hidrodinámicos.

Los modelos pueden ser analizados en dos aspectos. La interacción entre la hidrodinámica (RTD, transferencia de masa, transferencia de calor, transferencia de impulso) y la reacción química del modelo; tienen que ser validadas en una planta piloto. Los experimentos llevados a cabo en la planta piloto se deben realizar con más de un punto de validación; tienen que realizarse en los que los efectos críticos a escalar sean variados. Este método de escalamiento es utilizado normalmente en la industria química para reactores a gran escala donde las dimensiones del reactor afectan el comportamiento hidrodinámico, la conversión y la selectividad de la reacción.

### **Escalamiento empírico.**

En el escalamiento empírico se llevan a cabo diferente número de escalas, usualmente entre 3 y 4; cada una de ellas con sus nombres específicos; escala de banco, mini planta, planta piloto, desarrollo de negocios y planta de demostración. En cada una de las escalas se evalúa el comportamiento de los parámetros medidos, como velocidad de agitación, tiempo de residencia, pH, aditivos químicos, temperatura; entre otros, los cuales son ajustados para obtener el comportamiento deseado.

El método empírico no es muy fiable, ya que como el efecto de escalamiento en el parámetro es desconocido, también los parámetros críticos de escalamiento son desconocidos. Sin embargo, si el método de fuerza bruta no puede ser aplicado y una aproximación del método basado en modelos no puede ser empleado por las complejas relaciones entre la hidrodinámica y la reacción química; entonces este es el único método aplicable. Otra opción es probar otro diseño de escala comercial en el cual se pueda aplicar otro método de escalamiento.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

### **Escalamiento empírico-híbrido**

Es una versión híbrida del método empírico de escalamiento en el cual el modelamiento y simulación es llevada a cabo para interpretar los resultados del modelo empírico y para simular y optimizar el próximo nivel de escalamiento. En el siguiente nivel de escalamiento, los resultados son utilizados para validar o ajustar el modelo. El modelo ajustado es usado en el diseño del siguiente paso. De este modo, las oportunidades de éxito se incrementan.

### **Escalamiento directo.**

En el escalamiento directo, se diseña, construye e inicia directamente un nuevo proyecto a escala comercial sin un anterior desarrollo o investigación. En este método, las posibilidades de que falle el proyecto son considerables; para un proceso complejo este no es un buen método.

#### **4.3.2 Plantas piloto**

Para realizar un escalamiento exitoso a nivel comercial es necesaria la implementación de un diseño a nivel planta piloto, las cuales se utilizan en diversas etapas de los procesos de escalamiento debido a que son útiles para el mejoramiento y/o rediseño de productos y procesos, ya que este riesgo va aumentando mientras se va desarrollando un nuevo proceso y/o un producto como se menciona a continuación (de menor a mayor riesgo) (Jones Asher et al. 1993).

1.- Producto existente, mercado existente, nuevo proceso.

2.- Mercado existente, nuevo producto, nuevo proceso.

3.- Nuevo mercado, nuevo producto, nuevo proceso.

El diseño de una nueva transformación química o proceso de separación requiere un desarrollo de multi-etapas (Jones Asher et al. 1993):

- 1) Investigación en laboratorio.
  - a) Exploración. Identificación del proceso de síntesis, cribado de alternativas del proceso y en el caso de procesos bioquímicos, también microorganismos.
  - b) Definición. Selección de una alternativa específica para una evaluación cuantitativa.
  - c) Especificidad. Adquisición de la información cuantitativa del proceso y especificaciones preliminares de los procesos unitarios.
  
- 2) Desarrollo. Diseño de proceso, mejoramiento, escalamiento y optimización y producción de muestras del producto.
  - a) Escala de banco.
    - i) Diseño de las etapas preliminares del proceso.
    - ii) Obtención de datos para el desarrollo del concepto del proceso.
    - iii) Mejoramiento del funcionamiento de los procesos unitarios.
  - b) Prueba en escala mini planta piloto.
    - i) Realización de pruebas de optimización del proceso.
    - ii) Conducción de equipo de diseño de experimentos.
    - iii) Producción inicial de muestras del material, evaluación de los consumidores y pruebas de cumplimiento de normativas.
  - c) Pruebas a escala de planta piloto.
    - i) Confirmación de los parámetros básicos de diseño.
    - ii) Optimización del diseño final del proceso.
    - iii) Documentación de los efectos de las corrientes de reciclado
    - iv) Prueba de confiabilidad del equipo
    - v) Evaluación de materias primas alternativas.
    - vi) Producciones más grandes de muestras.
  - d) Comercialización.

Debido a los riesgos antes mencionados y las múltiples etapas necesarias para el desarrollo de nuevos productos y/o procesos, las plantas piloto son un paso crítico en el desarrollo comercial

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

de las industrias de procesos químicos para la minimización de costos, maximización de la relación producto-calidad y mejoramiento de los rendimientos ya que estas involucran todos los elementos principales del equipo que se desea escalar. Las plantas piloto se hacen necesarias por diversos factores (Anda 1984; Jones Asher et al. 1993):

- 1) Estudiar los efectos del proceso a largo plazo.
- 2) Determinar factores relacionados con la calidad del producto.
- 3) Obtener el producto necesario para desarrollar un estudio de mercado.
- 4) Estudiar problemas de escalamiento.
- 5) Proporcionar una demostración convincente para los usuarios de la tecnología.

Para realizar un proceso de escalamiento se pueden conservar las aproximaciones empíricas de etapas previas y se realiza en diversas etapas subsecuentes (Figura 4.6a). No obstante, este proceso es costoso y es relativamente lento. Sin embargo, en un proceso más práctico las condiciones físicas y químicas encontradas a nivel laboratorio son utilizadas para realizar modelos predictivos de diseño y comportamiento de la siguiente escala (Figura 4.6b) y el resultado de cada etapa es utilizado para reafirmar o modificar el modelo antes de pasar a la siguiente escala.

En los escalamientos intervienen fenómenos simples o complejos, permitiendo el análisis de las interacciones presentes en operaciones como la termodinámica, el flujo de fluidos, transferencia de masa y energía, reacciones químicas, la biotecnología, el control de procesos, entre otras; sirve además para la confrontación de la teoría (modelos) con la práctica (Anaya & Pedroza 2008).

Los problemas de diseño que se listan en la Tabla 4.3 son los que más comúnmente se presentan en el escalamiento de procesos de síntesis química y cada uno presenta un riesgo potencial. Estos problemas normalmente dependen del número de fases que se tengan y de las características de cada una (Jones Asher et al. 1993; Harmsen 2013).

El paso fundamental en el escalamiento consiste en pasar los datos obtenidos a un modelo que pueda ser (Anaya & Pedroza 2008):

- 1) Fenomenológico: No involucra consideraciones moleculares y permite hacer predicciones en rangos o intervalos de operación no estudiados experimentalmente.
- 2) Empírico: Se postula sin bases teóricas y se espera solamente que ajuste la interacción entre los datos en el rango o intervalo de experimentación.
- 3) De similitud: Obtenido a partir de un análisis de similitud con respecto a analogías físicas de tipo térmico, mecánico, geométrico, químico, entre otras.

El tipo de modelo de escalamiento depende tanto del proceso en cuestión como de la geometría de los equipos involucrados.



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

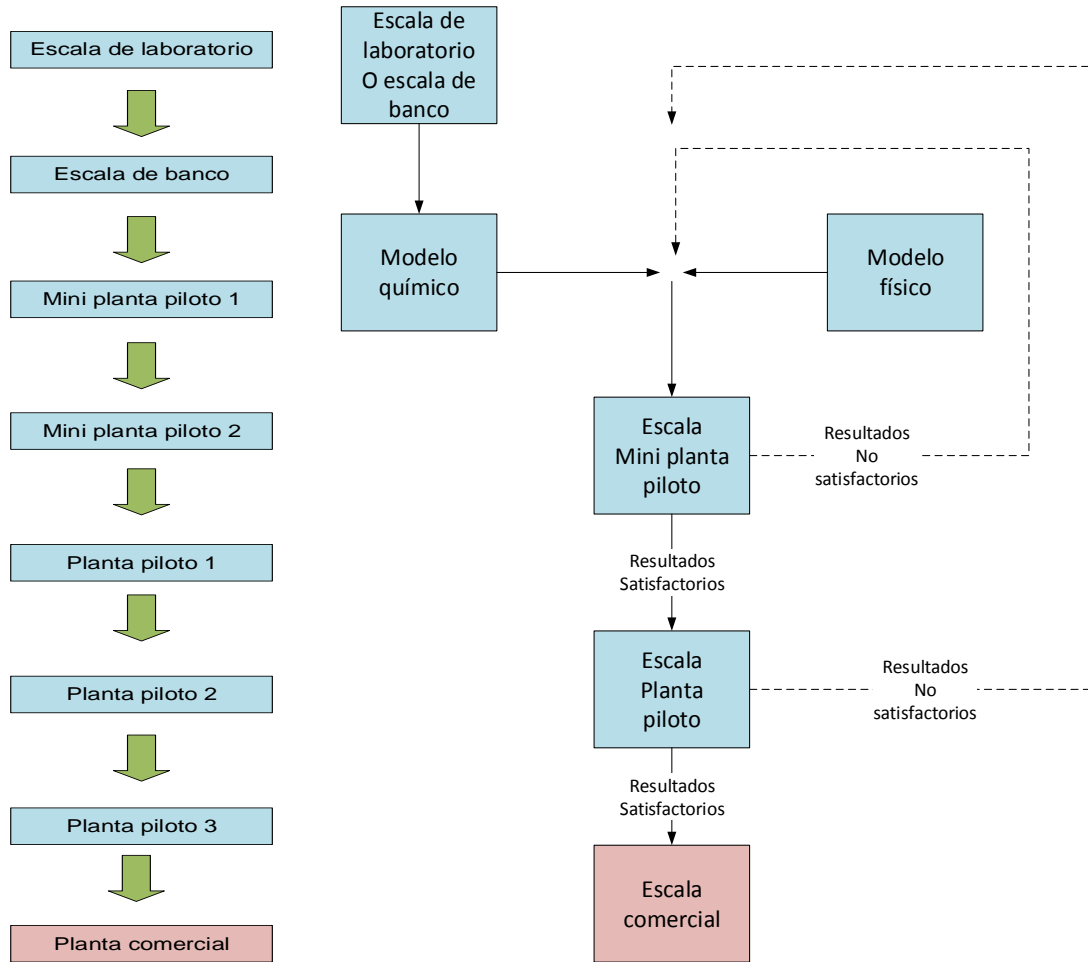


Figura 4.6 Diferencia entre escalamiento básico 4.6a (izquierda) y basado en modelos 4.6b (derecha) (Jones, 1993)

### 4.3.3 Similitud.

La similitud es un factor importante en este trabajo, ya que se establece una relación entre el reactor modelo y la escala a manejar, esta relación abarca desde las dimensiones del reactor, hasta el comportamiento del medio dentro del mismo.

Una aplicación importante del uso de los parámetros adimensionales es en la evaluación del uso de modelos para predecir el comportamiento de un sistema prototipo. El principio de similitud hace referencia a la relación que existe entre sistemas físicos y el tamaño de los mismos, siendo básico en el escalamiento de procesos físicos y químicos. El uso de un análisis

dimensional para tratar un problema físico, y presentarlo como un conjunto de números adimensionales es una forma segura de producir un escalamiento simple y de confianza desde el modelo a pequeña escala hasta una planta técnica de escala completa. La teoría de modelos establece que “Dos procesos pueden ser considerados completamente similares si toman lugar en un espacio geoméricamente similar y si todos los números adimensionales necesarios para describirlos tienen el mismo valor numérico” (Zlokarnik 1991).

Los sistemas físicos se caracterizan en general por tres cualidades: tamaño, forma y composición. La similitud del modelo debe darse a varios niveles: geométrico, cinemático y dinámico, es decir, en cuanto a su forma las estructuras deben ser similares, lo mismo se debe cumplir para las trayectorias que describan el modelo, si realizan movimientos, y para las fuerzas involucradas, que deben ser proporcionales. Dentro de los principios de similitud, hay cuatro tipos principales de similitud (Anaya & Pedroza 2008): geométrica, mecánica, térmica y química, las cuales son necesarias para poder realizar el escalamiento de cualquier sistema. En el caso de fluidos se da a través de las magnitudes adimensionales del número de Reynolds (razón de fuerzas inerciales y viscosas), de Froude (que expresa la relación entre fuerzas de inercia y gravedad), de Weber (razón de fuerzas de inercia y tensión superficial) y de Mach (razón de fuerzas inerciales y elásticas), que deben ser las mismas para el modelo y el prototipo (Medina 2006; Welty Wicks et al. 2007).

### **Similitud geométrica**

La similitud geométrica se define en términos de correspondencia; esta existe cuando entre dos sistemas, la relación de sus dimensiones significantes son las mismas para cada sistema. Si se consideran dos cuerpos sólidos en un plano X, Y, Z; un punto en el primer cuerpo está dado por las coordenadas x, y, z, mientras que en el segundo cuerpo un punto correspondiente está dado por las coordenadas X, Y, Z; y su relación está dada por (Figura 4.7) (Anaya & Pedroza 2008):

$$\frac{X}{x} = \frac{Y}{y} = \frac{Z}{z} = L$$

Ecuación 4.1

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

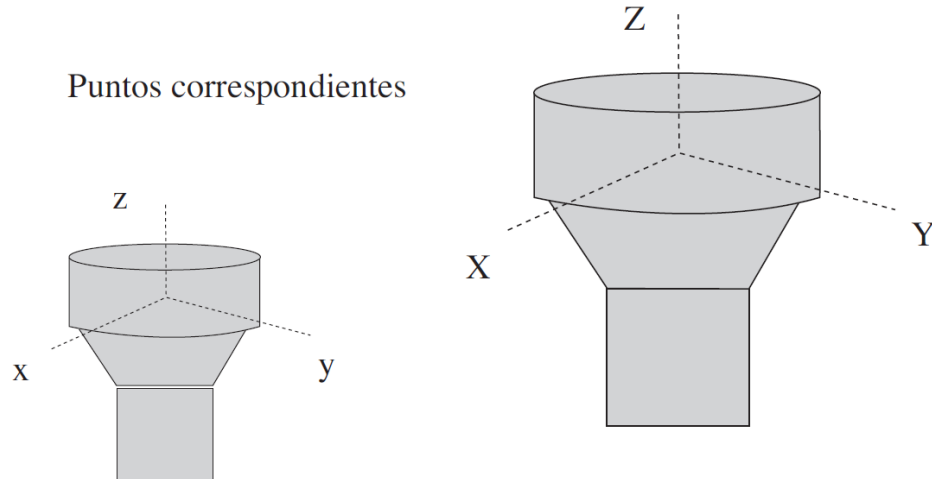


Figura 4.7 Principio de similitud geométrica

Donde la relación de escalamiento lineal,  $L$  es constante. Estos dos puntos y todos los demás pares de coordenadas espaciales que están relacionados en términos de  $L$  son conocidos como puntos correspondientes; por ello se puede definir que: “Dos cuerpos son geoméricamente similares cuando para todo punto el primer cuerpo existe un punto en el segundo.”

No es necesario que la relación de escalamiento sea la misma en cada uno de los ejes; ésta puede estar dada por:

$$\frac{X}{x} = X' \quad \frac{Y}{y} = Y' \quad \frac{Z}{z} = Z' \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Donde  $X'$ ,  $Y'$  y  $Z'$  son relaciones de escalamiento constantes, pero no necesariamente iguales. La relación entre dos cuerpos en los cuales las razones de escalamiento son diferentes en diferentes direcciones se denomina similitud distorsionada.

### Similitud mecánica

La similitud mecánica comprende en su área a las similitudes estática, cinemática y dinámica. Cada una de éstas puede considerarse como una extensión del concepto de similitud geométrica en sistemas fijos o en movimiento sujetos a fuerzas externas o internas.

### Similitud Estática

La similitud estática se presenta en los cuerpos sólidos sujetos a esfuerzos constantes y se define como: “Cuerpos geoméricamente similares, son también estáticamente similares cuando al estar sujetos a esfuerzos constantes sus deformaciones relativas son tales que permanecen geoméricamente similares”; por lo que la relación de los desplazamientos correspondientes será igual a la relación de escala.

### Similitud Cinemática

Esta tiene aplicación para sólidos o fluidos en movimiento. Se implican las tres coordenadas espaciales y además se introduce la dimensión tiempo. Los sistemas en movimiento con similitud geométrica están en similitud cinemática cuando partículas correspondientes trazan trayectorias geométricas correspondientes en intervalos de tiempo correspondientes. La relación entre las velocidades correspondientes entre dos sistemas 1 y 2 está dada por (Welty Wicks et al. 2007):

$$\left(\frac{v_x}{v_y}\right)_1 = \left(\frac{v_x}{v_y}\right)_2 \quad \left(\frac{v_x}{v_z}\right)_1 = \left(\frac{v_x}{v_z}\right)_2 \quad \text{Ecuación 4.3}$$

La similitud cinemática es de especial interés ya que si dos fluidos geoméricamente similares son también cinemáticamente similares entonces los patrones de flujo son geoméricamente similares y las velocidades de transferencia de calor y masa entre dos sistemas se encuentran en una relación simple.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

### **Similitud Dinámica**

La similitud dinámica está relacionada con las fuerzas que aceleran o retardan el movimiento de las masas dentro de sistemas dinámicos. Se puede definir como: “Sistemas en movimiento con similitud geométrica y cinemática son dinámicamente similares cuando las relaciones de todas las fuerzas correspondientes son iguales. La similitud dinámica es de gran importancia en sistemas de flujo de fluidos para predecir caídas de presión o consumos de potencia.

### **Similitud térmica**

Este tipo de similitud involucra a los sistemas en los cuales se presenta flujo de calor por lo que se introduce la dimensión de temperatura además de la longitud, fuerza y tiempo. El calor puede fluir por convección, conducción y radiación y la diferencia de temperaturas a tiempo correspondientes entre un par de puntos de un sistema y entre el par de puntos de otro se definen como temperaturas correspondientes. Los sistemas que presentan similitud geométrica son térmicamente similares cuando la diferencia de temperatura conserva una relación constante entre ellos y cuando los sistemas, si están en movimiento, son cinéticamente similares.

### **Similitud química**

Este tipo de similitud está relacionada con sistemas que presentan reacciones químicas donde la composición varía de un punto a otro, ya sea en procesos intermitentes o continuos, en diferentes instantes. En este caso no se introducen nuevas dimensiones y no es necesario que las composiciones químicas de ambos sistemas sean las mismas, solamente que exista una relación fija entre las concentraciones puntuales de los componentes de los cuales se realiza la comparación.

#### **4.3.4 Transferencia de masa.**

Debido a que en esta reacción de síntesis se utilizaron células de levadura permeabilizadas, el análisis de transferencia de masa es un factor esencial para poder hacer un análisis de la

velocidad de intercambio de masa entre el medio y la célula con la cual se lleva a cabo la reacción.

### **Fundamentos**

Las operaciones de transferencia de masa tienen una gran importancia desde el punto de vista químico industrial, casi siempre van acompañadas de operaciones de transferencia de calor y del movimiento o flujo de fluidos. Estas operaciones se caracterizan por la transferencia a escala molecular, de una sustancia a través de otra (Treybal 1980; CUBAEDUCA 2016). La rapidez de transferencia de una sustancia disuelta a través del fluido dependerá necesariamente de la naturaleza del movimiento del fluido que prevalezca en las diferentes regiones. Derivado de ello, se da la importancia de la agitación del sistema en cuestión, ya que el mezclado es el proceso clave en el escalamiento (Nielsen Villadsen et al. 2003). Los objetivos principales que se presentan en el aumento de escala del proceso de agitación son los siguientes: igual movimiento de líquidos, donde el movimiento o velocidad correspondiente de los líquidos es aproximadamente igual en ambas escalas; igual suspensión de sólidos, donde los niveles de suspensión son iguales; e igual tasa de transferencia de masa, donde la transferencia de masa ocurre entre una fase líquida y una sólida, y/o entre dos fases líquidas (Geankoplis 2006).

La transferencia de masa es la tendencia de uno o más componentes de una mezcla a transportarse desde una zona de alta concentración del o de los componentes a otra zona donde la concentración es menor. El movimiento de las moléculas es debido a una “diferencia de potencial químico”. El estudio de la transferencia de masa se basa en la ley de la conservación de la materia (UNAD ; Geankoplis 2006).

### **Equilibrio**

En las operaciones de transferencia de masa, ninguna de las fases en el equilibrio consta de un único componente. Por ello, cuando inicialmente se ponen en contacto dos fases, no presentan la composición que tienen en el equilibrio, por lo que el sistema trata de alcanzarlo mediante un movimiento de difusión de los componentes, los cuales se transfieren parcialmente entre las fases en el proceso (Treybal 1980).

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

El equilibrio se alcanza cuando no existe fuerza directriz y la transferencia neta cesa. Un proceso industrialmente factible debe tener una producción o resultado razonable, por lo cual el equilibrio se debe evitar, ya que el flujo de la transferencia es proporcional a la fuerza directriz, la cual es mayor mientras más alejadas son las condiciones de operación de aquellas que se establecen cuando se alcanza el equilibrio. Las variables de control operacional son generalmente la temperatura, presión y concentración.

### **Transferencia de masa entre fases**

La velocidad con que se produce la transferencia de masa está vinculada al mecanismo de transporte de las sustancias entre las fases, entre las cuales tiene lugar el intercambio de masa. La transferencia dentro de la fase puede originarse mediante difusión molecular, convección o ambas (Geankoplis 2006).

En un medio inmóvil la sustancia se desplaza solo por difusión molecular. Cuando el medio es móvil, el transporte se producirá tanto por difusión molecular, como por el propio medio en la dirección de su movimiento, o por partículas individuales del mismo que se mueven en diversas direcciones.

Cuando se presenta un flujo turbulento, la difusión molecular predomina únicamente cerca de la superficie divisoria de la fase (interfase), en el resto de la fase surgen variaciones (pulsaciones) irregulares de la velocidad que originan el desplazamiento de partículas en todas direcciones. Al transporte colectivo de masa efectuado bajo la acción de las pulsaciones turbulentas se le denomina difusión turbulenta o por convección (agitación) (CUBAEDUCA 2016).

El mecanismo de transporte de la fase hacia la interfase mediante la difusión molecular y turbulenta resulta complicado, por lo que se asumen dos fases, separadas por la interfase, que se moverán a velocidades globales diferentes, que es aplicable a la transferencia de masa entre líquido y gas, o entre dos líquidos no miscibles. Análogamente a lo que sucede en el contacto de un fluido en movimiento con la pared de un sólido, la velocidad relativa será nula en la interfase (aunque las velocidades absolutas sean diferentes de cero).

La transferencia de masa está vinculada con la estructura del flujo turbulento en cada fase. Cuando el fluido, en flujo turbulento, se mueve cerca de una pared sólida se origina una capa limitante laminar. Por lo que en cada fase se distingue una zona de movimiento turbulento llamada núcleo turbulento que constituye la masa fundamental de la fase y una zona correspondiente a la capa límite, junto a la interfase.

En el núcleo turbulento la transferencia de masa ocurre fundamentalmente por convección, la concentración del componente a transferir se mantiene prácticamente uniforme dentro del núcleo. Sin embargo, en la capa límite, cerca de la interfase se observará un cambio brusco de la concentración a medida que nos acerquemos a la misma.

En el caso de flujo turbulento, en el núcleo de la fase, el proceso de transferencia de masa hacia la interfase o viceversa, se realiza paralelamente por la difusión molecular y turbulenta. La resistencia total de la transferencia de masa entre las fases, será la suma de las resistencias de las fases y de la interfase. En la mayoría de los casos esta última se considera despreciable, por lo cual la resistencia total a la transferencia se considerará como la suma de las resistencias de las fases únicamente (Bird & Stewart 1992).

### **Difusión molecular**

Si una solución es completamente uniforme con respecto a la concentración de sus componentes, no ocurre ninguna alteración; en cambio, si no es uniforme, la solución alcanzará espontáneamente la uniformidad por difusión, ya que las sustancias se moverán de un punto de concentración elevada a otro de baja concentración. La rapidez con la cual un soluto se mueve en cualquier punto y en cualquier dirección dependerá del gradiente de concentración en ese punto y esa dirección (Treybal 1980); por lo que la difusión molecular puede definirse como la transferencia de moléculas individuales a través de un fluido por medio de los desplazamiento individuales y desordenados de las moléculas. Es un fenómeno irreversible que tiende a igualar las concentraciones de un medio no uniforme a través del transporte de las moléculas. Debido a que las moléculas se desplazan en trayectorias al azar, la difusión molecular también se conoce como *proceso con trayectoria aleatoria*. Se define a través de la primera ley de Fick (Geankoplis 2006) que plantea que la cantidad de masa que se



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

difunde durante un intervalo de tiempo a través de una superficie normal a la dirección de la difusión será proporcional al gradiente de la concentración de la sustancia que se difunde.

$$J_{AZ} = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

### **Difusión molecular en líquidos**

La difusión molecular en los líquidos es mucho menor que en los gases. Las moléculas de un líquido están muy cercanas entre sí en comparación con las de un gas, por lo que las moléculas de un soluto “A” que se difunde chocarán contra las moléculas del líquido “B” con más frecuencia y se difundirán con mayor lentitud que en los gases, esta se puede incrementar con un descenso de presión que reduce el número de choques y un incremento de temperatura que aumentaría la velocidad molecular (Treybal 1980). A diferencia de lo que sucede con la difusión en gases, que la dispersión de un gas “A” en un gas “B” (difusividad de A en B ( $D_{AB}$ )) es igual a la difusividad del gas “B” en el gas “A” ( $D_{BA}$ ), en los líquidos no sucede lo mismo, ya que la difusividad de un líquido “A” en un líquido “B” ( $D_{AB}$ ) no es igual a la difusividad del líquido “B” en el líquido “A” ( $D_{BA}$ ).

El fenómeno de difusión molecular tiene como finalidad llegar a una concentración completamente uniforme de sustancias. La difusividad en condiciones concentradas difieren de las soluciones diluidas, debido a cambios en la viscosidad con la concentración.

### **Difusión por convección**

En este caso la cantidad de masa que se transfiere dentro de una misma fase a consecuencia de la difusión turbulenta depende de la superficie, de tiempo y del gradiente de concentración; depende en gran medida de las condiciones hidromecánicas definidas, esencialmente de la velocidad del flujo y de la turbulencia, ya que la agitación molecular o hidrodinámica de un medio condiciona de manera importante la velocidad de transferencia.

### **Análisis dimensional**

Una dimensión es una descripción puramente cualitativa de una percepción sensorial de una entidad física o apariencia natural. Cada concepto físico puede ser asociado con un tipo de

cantidad y este a su vez puede ser asignado a una dimensión. El análisis dimensional está basado en el reconocimiento de una formulación matemática de un problema tecnológico, físico o químico (Zlokarnik 2006). Su resultado final es un conjunto de números adimensionales que describen un proceso físico o químico y ese esquema de condiciones bajo las cuales el proceso se comporta de manera "similar" en el modelo y en su contraparte de tamaño a escala; el análisis dimensional es la base de los métodos de escalamiento (Zlokarnik 1991).

La aplicación de un análisis dimensional es en gran medida dependiente del conocimiento disponible. Pawlowski establece los siguientes cinco casos (Zlokarnik 1991):

1. La física del fenómeno es desconocida
  - a. El análisis dimensional no puede ser aplicado.
2. Conocimiento suficiente acerca de la física del fenómeno para compilar una primera lista tentativa relevante.
  - a. Los resultados del conjunto  $\pi$  no es confiable.
3. Todas las variables físicas relevantes que describen el problema son conocidas.
  - a. La aplicación de un análisis dimensional no es problema.
4. El problema puede ser expresado en términos de una ecuación matemática.
  - a. Una visión más cercana en las relaciones  $\pi$  es factible y puede facilitar la reducción del conjunto de números adimensionales.
5. Existe una solución matemática del problema.
  - a. La aplicación de un análisis dimensional es superflua.

### **Números adimensionales**

Un gran número de variables adimensionales ha sido utilizado para describir el comportamiento dinámico de los fluidos.; las variables más usuales para su descripción son: velocidad, presión y fuerza. Es común transformar estas variables en adimensionales utilizando las mismas características de velocidad, densidad, longitud y/o área. Algunos parámetros adimensionales de rendimiento pueden ser interpretados como relaciones del rendimiento real a algunos rendimientos ideales.

## Numero de Reynolds

El número de Reynolds es el parámetro más familiar en la mecánica de fluidos, usualmente es escrito en una de las 3 formas (Ipsen 1960):

$$\frac{\rho VL}{\mu} = \frac{VL}{\nu} = \frac{GL}{\mu} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Usualmente es interpretado como la relación de las fuerzas de inercia a las fuerzas de viscosidad en un fluido.

De acuerdo con la teoría de Kolmogoroff de turbulencia isotrópica (Smith 1981) el número de Reynolds se define en términos de la velocidad de disipación de energía:

$$\sigma = \frac{N_p \rho_L N^3 D_i^5}{W} \emptyset \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Si el tamaño de los remolinos  $\zeta$  es mayor que el tamaño de partícula,  $\zeta > d_p$ :

$$Re = \left( \frac{\sigma d_p^4}{\nu^3} \right)^{1/2} \quad \text{Ecuación 4.12}$$

De otra manera,  $\zeta < d_p$ , y:

$$Re = \left( \frac{\sigma d_p^4}{\nu^3} \right)^{1/3} \quad \text{Ecuación 4.13}$$

### Número de Sherwood

Para geometrías similares entre sí, las correlaciones de transferencia de masa y calor son análogas. Si existe una correlación para la transferencia de calor para el número de Nusselt (Nu), el coeficiente de transferencia de masa puede ser estimado reemplazando los números de Nusselt y Prandtl (Pr) en esta correlación por los números de Sherwood (Sh) y Schmidt (Sc), respectivamente (Fogler 2005).

$$Sh \rightarrow Nu$$

$$Sc \rightarrow Pr$$

Los coeficientes de transferencia de calor y masa son análogos.

Si reemplazamos  $h$  por  $k_c$  y  $k_t$  por  $D_{AB}$  en

$$Nu = \frac{h d_p}{k_t} \quad \text{Ecuación 4.14}$$

Se obtiene el número de Nusselt para transferencia de masa, en otras palabras, el número de Sherwood.

$$Sh = \frac{k_c d_p}{D_{AB}} \quad \text{Ecuación 4.15}$$

### Número de Schmidt

El número de Prandtl es la relación de la viscosidad cinemática con la difusividad térmica, por lo que el número de Schmidt es análogo al número de Prandtl y se puede esperar que Sc sea la relación de la viscosidad cinemática,  $\nu$ , con la difusividad másica,  $D_{AB}$ , por lo que el número de Schmidt es:

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$Sc = \frac{v}{D_{AB}} \quad \text{Ecuación 4.16}$$

La correlación para la transferencia de masa para un fluido alrededor de un pellet esférico es análogo a la transferencia de calor dada por la ecuación

$$Nu = 2 + 0.6Re^{1/2}Pr^{1/3} \quad \text{Ecuación 4.17}$$

Por lo tanto,

$$Sh = 2 + 0.6Re^{1/2}Sc^{1/3} \quad \text{Ecuación 4.18}$$

Esta relación se conoce como *correlación de Frössling*.

### Número de Damköhler

Debido a que en el presente trabajo se utilizaron células completas inactivadas de la levadura *Candida apicola*; para hacer la relación de la velocidad de transferencia con la velocidad de reacción, se consideró la enzima como inmovilizada por ser esta intracelular.

Cuando se utiliza una enzima inmovilizada se presenta un problema de resistencia de transferencia de masa. La tasa de transferencia de masa es proporcional a la fuerza impulsora, la diferencia de concentración es:

$$N_s = K_s A (C_{sb} - C_s) \quad \text{Ecuación 4.19}$$

Donde  $C_{sb}$  y  $C_s$  son las concentraciones del sustrato en el seno de la solución y en la superficie de la enzima inmovilizada respectivamente. El término  $k_s$  es el coeficiente de transferencia de masa (longitud/tiempo) y  $A$  es el área de superficie de una partícula de enzima inmovilizada.

Durante la reacción enzimática de una enzima inmovilizada la tasa de transferencia de sustrato es igual al consumo de sustrato (Dutta 2008). Por lo tanto, si la reacción enzimática puede ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten,

$$r_p = k_s a (C_{sb} - C_s) = \frac{r_{max} C_s}{K_M + C_s} \quad \text{Ecuación 4.20}$$

Donde  $\alpha$  es la superficie de área total por unidad de volumen de la solución de reacción. Esta ecuación muestra la relación entre la concentración de sustrato en el seno de la solución y en la superficie de la enzima inmovilizada y puede ser expresada en forma adimensional como sigue:

$$\frac{1-X_S}{Da} = \frac{\beta x_S}{1+\beta x_S} \quad \text{Ecuación 4.21}$$

Donde

$$x_S = \frac{c_S}{c_{Sb}} \quad \text{Ecuación 4.22}$$

$$Da = \frac{r_{max}}{k_S \alpha c_{Sb}} \quad \text{Ecuación 4.23}$$

$$\beta = \frac{c_{Sb}}{K_M} \quad \text{Ecuación 4.24}$$

$Da$  es conocido como el *número de Damköhler*, que es la relación de la máxima velocidad de reacción sobre la tasa máxima de transferencia de masa por convección dentro del reactor.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología empleada fue a partir de los resultados a nivel laboratorio, de acuerdo a las fases mostradas en el diagrama siguiente (Figura 5.1).

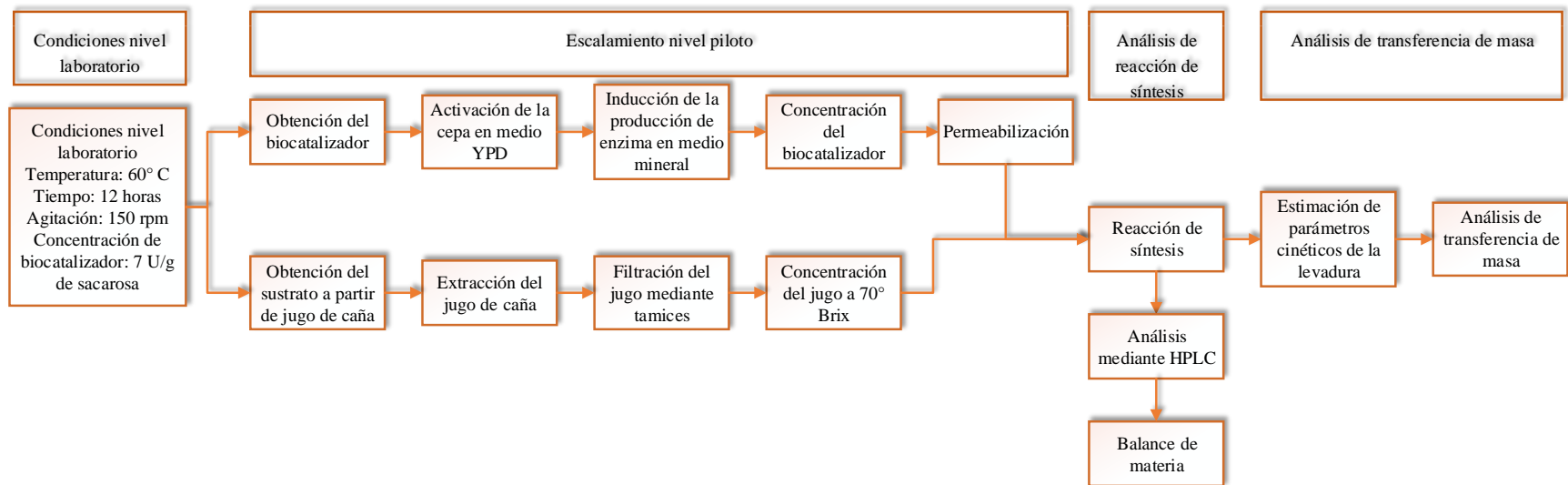


Figura 5.1 Metodología empleada.

## 5.1 Obtención del sustrato.

### 5.1.1 Extracción y Concentración del jugo de caña.

Para la producción del sustrato utilizado en la reacción de síntesis de fructooligosacáridos, se utilizaron 400 litros de jugo de caña puro, el cual fue extraído por expresión a partir de caña entera en un molino de 3 masas en las instalaciones de un trapiche piloncillero; este jugo se encontraba a una concentración inicial de 19°Brix.

El jugo recién extraído de la caña, se pasó por dos tamices con un tamaño de malla de 24 y 200 respectivamente con la finalidad de eliminar sólidos grandes y otros residuos que pudiera tener.

Posterior a ello, pasó a ser concentrado en un evaporador tipo flash (Figura 5.2).



Figura 5.2 Evaporador tipo flash.



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

El proceso de evaporación se manejó a las siguientes condiciones de trabajo:

Presión de vapor: 1  $\text{Kg}/\text{cm}^2$

Flujo del jugo de caña: 2  $\text{L}/\text{min}$

Presión de vacío: 550-600 mmHg

### 5.1.2 Parámetros del sustrato

#### **Medición de la densidad del jugo concentrado.**

La medición de la densidad del jugo concentrado se realizó mediante dos técnicas.

Primeramente, se midió con ayuda de una probeta graduada y una balanza analítica (Figura 5.3). Se colocaron 30 ml de jugo concentrado en la probeta y se procedió a pesarla para poder obtener la densidad.



Figura 5.3 Material con el cual se midió la densidad del jugo concentrado.

## Materiales y métodos

Para confirmar los datos obtenidos, se procedió a medir la densidad mediante un equipo Anton Paar 35n (Figura 5.4).



Figura 5.4 Equipo Anton Paar 35n.

Ambas mediciones se realizaron con jugo concentrado a una temperatura de 60°C, debido a que a esa temperatura se iba a llevar a cabo la reacción de síntesis.

### **Medición de la viscosidad del jugo concentrado.**

La viscosidad se midió con un reómetro AR 1000 (Figura 5.5) con una geometría “bob and cup”, con una proporción para radio interior y exterior de 0,92 en el sistema de cilindro concéntrico. Estas mediciones se realizaron por triplicado a una temperatura de 60°C.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*



Figura 5.5 Equipo Advance Rheometer AR 1000.

## 5.2 Obtención del biocatalizador.

### 5.2.1 Producción del biocatalizador.

Se inculó un vial (1 ml) de la cepa *Candida apicola* en 25 ml de medio YPD, con composición: 10  $g/L$  de extracto de levadura, 20  $g/L$  de peptona y 20  $g/L$  de glucosa. El medio con la cepa se incubó a una temperatura de 30°C con una agitación de 250 rpm en una incubadora New Brunswick (Innova) durante 24 horas. A continuación, se utilizó ese medio para la producción de biomasa en un reactor de 5 litros, con la misma composición, a una temperatura de 30°C y 120 rpm durante 48 horas.

Posteriormente se utilizó el producto del reactor anterior como inóculo para un reactor tipo airlift con volumen de operación de 100 litros con medio mineral (Tabla 5.1) utilizando

inulina de achicoria como inductor de la enzima. Se dejó en incubación a una temperatura de 30°C, flujo de aire 2.5 L/min durante 36 horas.

Tabla 5.1 Composición del medio mineral para la inducción de la enzima.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
<b>Inulina comercial de achicoria</b>	50
<b>Sacarosa</b>	50
<b>Ácido aminobenzoico</b>	1.00E-03
<b>Myo-inositol</b>	1.25E-01
<b>Ácido nicotínico</b>	5.00E-03
<b>Ácido pantoténico</b>	5.00E-03
<b>Piridoxina</b>	5.00E-03
<b>Tiamina HCl</b>	5.00E-03
<b>Biotina</b>	1.20E-05
<b>MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</b>	4.12E-01
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	1.92E-02
<b>CuCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	6.15E-04
<b>MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O</b>	4.45E-03
<b>CoCl, 6H<sub>2</sub>O</b>	5.00E-04
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1.74E-02
<b>FeCl, 4H<sub>2</sub>O</b>	1.17E-02
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 4H<sub>2</sub>O</b>	3.60E-04
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	3.00E-03

### 5.2.2 Concentración del biocatalizador.

La producción de levadura, producto de la reacción de producción en volumen de 100 litros, se sometió a concentración mediante tecnología de membranas en un equipo Millipore

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Pellicon (Figura 5.6) con la finalidad de obtener toda la biomasa en un menor volumen y para ello el producto del reactor se pasó a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  con una presión transmembrana de  $\cong 15$  psi.



Figura 5.6 Equipo de filtración por membranas “Pellicon”.

Del proceso de filtración por membrana, se conservó el retenido, ya que este contenía la levadura con la enzima de interés. Posterior a la reducción volumétrica, el retenido pasó por un proceso de centrifugación que se realizó a 2817 x g durante 10 minutos para la eliminación total del medio de cultivo, quedando solamente la biomasa.

### 5.2.3 Permeabilización de células.

A la biomasa obtenida y centrifugada se le realizó un lavado con agua destilada y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad. Para la permeabilización se añadieron 25 ml de etanol-agua al 50% y se agitaron cada 3 min durante 15 min. Nuevamente se centrifugó la biomasa a 2817 x g y se re-suspendió en buffer acetato de pH 5.0 (100 mM) (Cruz 2015).

### 5.3 Reacciones de síntesis.

Las reacciones de síntesis de fructooligosacáridos se realizaron con células permeabilizadas del lote de *Candida apicola* de acuerdo a la metodología propuesta por Cruz (2015) utilizando como sustrato el jugo de caña concentrado a 70°Brix, realizando la reacción en un reactor tipo

## Materiales y métodos

tanque agitado, con agitación mecánica y propelas tipo Rushton; con un volumen de operación de 100 litros.

Se realizaron dos reacciones de síntesis variando la velocidad de agitación para determinar la influencia de la velocidad de agitación en la transferencia de masa del sustrato desde el medio hasta la enzima.

Para el escalamiento de las reacciones de síntesis a nivel piloto, se utilizó un modelo empírico-híbrido, ya que a partir de la escala inmediata anterior (5 L), se establecieron los parámetros para el escalamiento a nivel piloto de estas reacciones. Así mismo se conservaron ciertos parámetros de similitud para mantener una relación entre el reactor modelo y el reactor a escala. Estos parámetros fueron de similitud mecánica, ya que se mantuvo una relación de potencia volumétrica; de similitud térmica, debido a que se conservó la misma temperatura para las reacciones de síntesis; y de similitud química, por lo que se mantuvo una relación estable de enzima-sustrato, con 7 U de actividad enzimática por g de sacarosa.

Estas células se adicionaron al reactor con una capacidad de 150 litros y un volumen de operación de 100 litros (Figura 5.7), el cual contenía el sustrato de jugo de caña de azúcar concentrado.

Las reacciones tuvieron una duración de 10 horas y se evaluaron dos agitaciones: 70 y 85 rpm de acuerdo al análisis de los parámetros del reactor al aplicar diferentes criterios de escalado hecho por Pérez Cruz en 2011, el cual se adaptó para este reactor. Al analizar los datos de las Tablas 5.2a y 5.2b, se puede observar que si se mantiene el criterio de igual velocidad en la punta del impulsor, la potencia total tiene un aumento de más de 100 y un aumento de Reynolds de 2.35. Al mantener el criterio de igual velocidad de agitación, la potencia total tiene un aumento de 72 y el Reynolds de 5.54, lo que en ambos casos provocaría un exceso de consumo de potencia. Por lo que se mantuvo la misma potencia volumétrica ya que la potencia total aumenta solamente en 13 y el Reynolds en 3.13. En el caso de aplicar los otros criterios, no se lograría la homogeneidad adecuada en el sistema.

Tabla 5.2 Valores 5.2a (superior) y aumentos 5.2b (inferior) de los diferentes parámetros según el criterio de escalado aplicado.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Criterio de similitud	Reactor escala (100 L)					
	Valores en reactor modelo (5 L)	Velocidad en la punta del impulsor	Potencia volumétrica	Agitación	Potencia	Reynolds
Velocidad en la punta del impulsor	0.1625	0.1625	2.49E-02	63.72	1.83306E-1	108.56
Potencia volumétrica	6.60E-02	2.16E-01	6.60E-02	84.769	2.36E-04	144.41
Velocidad de agitación	150	3.83E-01	3.66E-01	150	1.31E-03	255.54
Potencia	1.81E-05	9.18E-02	5.06E-03	36.013	1.81E-05	61.35
Numero de Reynolds	46.12	6.90E-02	2.15E-03	27.07	7.70E-06	46.12

Criterio de similitud	Reactor escala (100 L)				
	Velocidad en la punta del impulsor	Potencia volumétrica	Agitación	Potencia	Reynolds
Velocidad en la punta del impulsor	1.00	0.38	0.42	1.01E+04	2.35
Potencia volumétrica	1.33	1.00	0.57	13.04	3.13
Velocidad de agitación	2.36	5.55	1.00	72.38	5.54
Potencia	0.56	0.08	0.24	1.00	1.33
Numero de Reynolds	0.42	0.03	0.18	0.43	1.00



Figura 5.7 Reactor en el cual se llevaron a cabo las reacciones de síntesis enzimática. Se utilizó como sustrato el jugo de caña concentrado a 70°Brix. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

1. Tiempo: 10 horas
2. Temperatura: 60°C
3. Agitación: 70 y 85 rpm
4. Concentración de biocatalizador: 7 U/g de sacarosa.

#### 5.3.1 Análisis mediante HPLC.

El análisis de la reacción se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), con una columna BioRad Animex HPX-87C de 250 mM. El método para dicho análisis fue a 80 °C, por 13 minutos con un flujo de 0.2 ml/min.

#### 5.4 Estimación de la actividad enzimática de la levadura.

Se realizaron pruebas para estimar los parámetros cinéticos de la levadura ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) a partir de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones (Tabla 5.3) que van desde 0.5% hasta el 8%. Esto se determinó para tener una idea aproximada de la velocidad máxima a la



Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

cual se puede llevar a cabo la reacción de síntesis ( $V_{max}$ ) y un estimado de la concentración de saturación de la enzima por el sustrato ( $K_m$ ).

Tabla 5.3 Concentraciones de sustrato (sacarosa) a las cuales se determinó la actividad enzimática.

<b>Concentración del sustrato</b>	
<b>Porcentaje (%)</b>	<b>milimoles (mM)</b>
<b>0.5</b>	14.6
<b>1</b>	29.2
<b>2</b>	58.4
<b>4</b>	116.9
<b>8</b>	233.9

Las mediciones de actividad para estimar los parámetros requeridos se realizaron mediante la técnica DNS, misma que se describe a continuación.

Se realizó una curva de calibración de 0-2 g/L de fructosa agregando 100  $\mu$ L de fructosa y 100  $\mu$ l de reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se incubaron en baño María a temperatura de ebullición durante 5 min. Posteriormente se añadió 1 ml de agua destilada y se tomaron 200  $\mu$ l para medir su absorbancia en una microplaca en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 540 nm.

Determinación de la actividad enzimática.

1. Añadir a un tubo eppendorf de 1.5 ml 50  $\mu$ l de una solución de sacarosa al 1% en buffer acetatos (pH 5.0, 100 mM).
2. Añadir a las muestras 50  $\mu$ l de extracto enzimático diluido en buffer acetatos
3. Incubar por 15 min a 50 °C.
4. Agregar 100  $\mu$ l de DNS.

## Materiales y métodos

5. Añadir a los blancos 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático.
6. Incubar en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 min.
7. Agregar 1 ml de agua y leer en microplaca a 540 nm.

Cada muestra se analizó por duplicado y calculando un promedio de ambas se obtuvieron los valores estimados de  $K_m$  y  $V_{max}$  para hacer el análisis de transferencia de masa.

Se hace la mención de que debido a que el proceso de reacción de síntesis fue llevado a cabo con la célula completa de *Candida apicola*, estos valores reportados de  $K_m$  y  $V_{max}$  no son absolutos, sino que son valores considerados para poder hacer el análisis de transferencia de masa.

### 5.5 Análisis de transferencia de masa.

El análisis de transferencia de masa se hizo a partir de la evaluación del proceso de reacción de síntesis enzimática mediante números adimensionales que tomaron en cuenta y englobaron las características del fluido y de la levadura.

Se compararon 4 ajustes (Levins & Glastonbury 1972; Fogler 2005; Alvarado & Maugeri 2010) de la ecuación de correlación de Frössling

$$Sh = 2 + 0.6Re^{1/2}Sc^{1/3} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

En esta ecuación se maneja una relación entre el número de *Sherwood* con la ecuación de *Stokes-Einstein* y el número de *Schmidt* para poder realizar un análisis de las características del medio y poder obtener el coeficiente de transferencia ( $K_L$ ).

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Ecuación de acuerdo a Alvarado (2010):

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.47 \left[ \frac{d_p^{4/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{D_i}{D_t} \right]^{0.17} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{0.36}$$

Ecuación 5.2

Esta ecuación es resultado de los experimentos realizados por otros autores (Levins & Glastonbury 1972) con una desviación estándar del 8.3%, y utilizada por Alvarado (2010) en el cálculo del coeficiente de transferencia de masa en la reacción de síntesis de FOS a partir de sacarosa, relacionando el número de Reynolds, el número de Schmidt y las relaciones geométricas del reactor  $\left[ \frac{D_i}{D_t} \right]$ .

Ecuación de acuerdo a Fogler (2005):

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.6 Re^{1/2} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{1/3}$$

Ecuación 5.3

Esta ecuación conserva la relación del número de Reynolds establecido por Smith (1981) en función del tamaño de los remolinos y el tamaño de partícula. De acuerdo a Fogler (2005) esta ecuación está diseñada para su aplicación en pellets esféricos dentro de una gran gama de número de Reynolds, no importando si el flujo turbulento o laminar, ya que, de acuerdo a la teoría, aun estando en un flujo turbulento el medio alrededor del pellet en suspensión va a ir disminuyendo hasta hacerse laminar, por lo que se puede aplicar a cualquier tipo de régimen.

Ecuación (1) de acuerdo a Levins (1972):

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.49 Re^{1/2} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{0.36}$$

Ecuación 5.4

## Materiales y métodos

Esta ecuación representa el ajuste del exponente del número de Schmidt de acuerdo a los experimentos realizados por Levins (1972) en diferentes geometrías, encontrándose que el mejor ajuste para dicho número es  $0.36 \pm 0.02$ , el cual confiere una confiabilidad del 95%; y se sigue conservando el exponente del número de Reynolds, el cual, de acuerdo a Smith (1981) está en función del tamaño de los remolinos y el tamaño de partícula.

Ecuación (2) de acuerdo a Levins (1972):

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D(s)} = 2 + 0.50 \left[ \frac{d_p^{1/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{\gamma}{D(s)} \right]^{1/3} \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Al igual que en la anterior, se toma en cuenta el término de potencia por unidad de masa, y el exponente del número de Schmidt se ajusta a estos términos, sin embargo, en esta ecuación ya no se toma en cuenta la relación geométrica del reactor.

En las ecuaciones 5.2 y 5.5 se introduce el término  $\left[ \frac{d_p \cdot \varepsilon}{\gamma} \right]$  debido a que las condiciones de agitación se caracterizan en términos de la potencia por unidad de masa ( $\varepsilon$ ) (Levins & Glastonbury 1972).

Adicionalmente se realizó un análisis de la transferencia de masa con respecto a la reacción de síntesis enzimática y a la velocidad catalítica de la levadura con los datos estimados obtenidos de  $K_m$  y  $V_{max}$ ; a través del número adimensional de Damköhler ( $Da$ ):

$$\frac{1 - X_S}{N_{Da}} = \frac{\beta \cdot x_s}{1 + \beta} \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Despejando  $N_{Da}$  de la ecuación 5.6.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$N_{Da} = \frac{(1 - X_s)(1 + \beta \cdot x_s)}{\beta \cdot x_s}$$

Ecuación 5.7

Para obtener los factores  $\beta$  y  $x_s$  para la ecuación 5.7, de acuerdo a Dutta (2008).

$$x_s = \frac{C_s}{C_{sb}}$$

Ecuación 5.8

$$\beta = \frac{C_{sb}}{K_M}$$

Ecuación 5.9

Donde  $C_{sb}$  y  $C_s$  son las concentraciones del sustrato en el seno de la solución y en la superficie de la enzima respectivamente. Y  $X_s$  representa la fracción molar del sustrato (Dutta 2008)

El número de Damköhler establece la relación entre la transferencia de masa del medio externo hacia una enzima y la velocidad catalítica de esta, por lo que mediante esta ecuación (Dutta 2008) se puede conocer el valor de este número adimensional y obtener esa relación para determinar si la reacción está en función de la transferencia de masa o de la capacidad catalítica de la enzima; dependiendo si el valor obtenido es mayor o menor a 1 (Radovich 1985; Dutta 2008). Por tanto:

1. Si  $N_{Da} \ll 1$ , la velocidad de transferencia de masa es mucho más grande que la velocidad de reacción y la reacción global es controlada por la reacción enzimática.
2. Si  $N_{Da} \gg 1$ , la velocidad de reacción es mucho mayor que la velocidad de transferencia de masa y la reacción global es controlada por la transferencia de masa.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Obtención del sustrato.

#### 6.1.1 Concentración del jugo de caña.

El jugo de caña se procesó a una concentración inicial de 19°Brix. Mediante la evaporación de agua en un evaporador tipo flash se concentró hasta 70°Brix mediante los cálculos siguientes:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde C es la concentración en grados brix y V es el volumen en litros.

$$400 * 19 = 70 * V_2$$

∴

$$V_2 = \frac{400 * 19}{70} = 108.57 L$$

Por lo que el volumen de agua a evaporar fueron 291.43 L para conseguir 108.57 L de un jarabe a 70°Brix.

El equipo se manejó en condiciones de vacío que oscilaron entre 550 y 600 mm Hg por lo que la temperatura de evaporación se calculó mediante la diferencia de presiones.

Presión atmosférica de la ciudad de Guadalajara (Pg) (Ingeniería) 841.1 hPa

$$760 \text{ mmHg} = 1013 \text{ hPa}$$

$$Pg = \frac{841 * 760}{1013} = 630.95 \text{ mmHg}$$

## Resultados y discusión

$$\text{Diferencia de presión: } 630.957 - 550 = 80.95 \text{ mmHg}$$

$$630.957 - 600 = 30.95 \text{ mmHg}$$

Conversión a bares:

$$1 \text{ bar} = 750.06 \text{ mmHg}$$

$$80.957 \text{ mmHg} = 0.10 \text{ bares}$$

$$30.957 \text{ mmHg} = 0.04 \text{ bares}$$

De acuerdo a las tablas de las propiedades de saturación de agua (Tablas 6.1 y 6.2) de Moran y Shapiro (Moran & Shapiro 2006) se calculó la temperatura de evaporación del agua a esas condiciones de presión; sin embargo, no están especificados los valores requeridos en la tabla, por lo que se tuvo que hacer una interpolación.

$$y = y_1 + (x - x_1) \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)}$$

Donde

$y = \text{temperatura buscada}$

$y_1 = \text{límite superior de temperatura}$

$y_2 = \text{límite inferior de temperatura}$

$x = \text{presión a la que se busca la temperatura}$

$x_1 = \text{límite superior de presión}$

$x_2 = \text{límite inferior de presión}$

Cálculos para una presión de 0.41 bares.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Tabla 6.1 Propiedades de la mezcla líquido-vapor: Tabla de temperatura.

Temp. °C	Press. bar	Specific Volume m <sup>3</sup> /kg		Internal Energy kJ/kg		Enthalpy kJ/kg			Entropy kJ/kg · K		Temp. °C
		Sat. Liquid $v_f \times 10^3$	Sat. Vapor $v_g$	Sat. Liquid $u_f$	Sat. Vapor $u_g$	Sat. Liquid $h_f$	Evap. $h_{fg}$	Sat. Vapor $h_g$	Sat. Liquid $s_f$	Sat. Vapor $s_g$	
.01	0.00611	1.0002	206.136	0.00	2375.3	0.01	2501.3	2501.4	0.0000	9.1562	.01
4	0.00813	1.0001	157.232	16.77	2380.9	16.78	2491.9	2508.7	0.0610	9.0514	4
5	0.00872	1.0001	147.120	20.97	2382.3	20.98	2489.6	2510.6	0.0761	9.0257	5
6	0.00935	1.0001	137.734	25.19	2383.6	25.20	2487.2	2512.4	0.0912	9.0003	6
8	0.01072	1.0002	120.917	33.59	2386.4	33.60	2482.5	2516.1	0.1212	8.9501	8
10	0.01228	1.0004	106.379	42.00	2389.2	42.01	2477.7	2519.8	0.1510	8.9008	10
11	0.01312	1.0004	99.857	46.20	2390.5	46.20	2475.4	2521.6	0.1658	8.8765	11
12	0.01402	1.0005	93.784	50.41	2391.9	50.41	2473.0	2523.4	0.1806	8.8524	12
13	0.01497	1.0007	88.124	54.60	2393.3	54.60	2470.7	2525.3	0.1953	8.8285	13
14	0.01598	1.0008	82.848	58.79	2394.7	58.80	2468.3	2527.1	0.2099	8.8048	14
15	0.01705	1.0009	77.926	62.99	2396.1	62.99	2465.9	2528.9	0.2245	8.7814	15
16	0.01818	1.0011	73.333	67.18	2397.4	67.19	2463.6	2530.8	0.2390	8.7582	16
17	0.01938	1.0012	69.044	71.38	2398.8	71.38	2461.2	2532.6	0.2535	8.7351	17
18	0.02064	1.0014	65.038	75.57	2400.2	75.58	2458.8	2534.4	0.2679	8.7123	18
19	0.02198	1.0016	61.293	79.76	2401.6	79.77	2456.5	2536.2	0.2823	8.6897	19
20	0.02339	1.0018	57.791	83.95	2402.9	83.96	2454.1	2538.1	0.2966	8.6672	20
21	0.02487	1.0020	54.514	88.14	2404.3	88.14	2451.8	2539.9	0.3109	8.6450	21
22	0.02645	1.0022	51.447	92.32	2405.7	92.33	2449.4	2541.7	0.3251	8.6229	22
23	0.02810	1.0024	48.574	96.51	2407.0	96.52	2447.0	2543.5	0.3393	8.6011	23
24	0.02985	1.0027	45.883	100.70	2408.4	100.70	2444.7	2545.4	0.3534	8.5794	24
25	0.03169	1.0029	43.360	104.88	2409.8	104.89	2442.3	2547.2	0.3674	8.5580	25
26	0.03363	1.0032	40.994	109.06	2411.1	109.07	2439.9	2549.0	0.3814	8.5367	26
27	0.03567	1.0035	38.774	113.25	2412.5	113.25	2437.6	2550.8	0.3954	8.5156	27
28	0.03782	1.0037	36.690	117.42	2413.9	117.43	2435.2	2552.6	0.4093	8.4946	28
29	0.04008	1.0040	34.733	121.60	2415.2	121.61	2432.8	2554.5	0.4231	8.4739	29
30	0.04246	1.0043	32.894	125.78	2416.6	125.79	2430.5	2556.3	0.4369	8.4533	30
31	0.04496	1.0046	31.165	129.96	2418.0	129.97	2428.1	2558.1	0.4507	8.4329	31
32	0.04759	1.0050	29.540	134.14	2419.3	134.15	2425.7	2559.9	0.4644	8.4127	32

$$y = 29 + (0.041 - 0.04008) \frac{(30 - 29)}{(0.04246 - 0.04008)}$$

$$y = 29 + 0.92e^{-3} \frac{1}{2.38e^{-3}}$$

$$y = 29.38$$

Para una presión de 0.04 bares, la temperatura de evaporación es de 29.38°C.

Cálculos para una presión de 0.10 bares:



Tabla 6.2 Propiedades de la mezcla líquido-vapor: Tabla de temperatura.

Temp. °C	Press. bar	Specific Volume m <sup>3</sup> /kg		Internal Energy kJ/kg		Enthalpy kJ/kg			Entropy kJ/kg · K		Temp. °C
		Sat. Liquid $v_f \times 10^3$	Sat. Vapor $v_g$	Sat. Liquid $u_f$	Sat. Vapor $u_g$	Sat. Liquid $h_f$	Evap. $h_{fg}$	Sat. Vapor $h_g$	Sat. Liquid $s_f$	Sat. Vapor $s_g$	
50	.1235	1.0121	12.032	209.32	2443.5	209.33	2382.7	2592.1	.7038	8.0763	50
55	.1576	1.0146	9.568	230.21	2450.1	230.23	2370.7	2600.9	.7679	7.9913	55
60	.1994	1.0172	7.671	251.11	2456.6	251.13	2358.5	2609.6	.8312	7.9096	60
65	.2503	1.0199	6.197	272.02	2463.1	272.06	2346.2	2618.3	.8935	7.8310	65
70	.3119	1.0228	5.042	292.95	2469.6	292.98	2333.8	2626.8	.9549	7.7553	70
25	0.03169	1.0029	45.360	104.88	2409.8	104.89	2442.5	2547.2	0.3674	8.5280	25
26	0.03363	1.0032	40.994	109.06	2411.1	109.07	2439.9	2549.0	0.3814	8.5367	26
27	0.03567	1.0035	38.774	113.25	2412.5	113.25	2437.6	2550.8	0.3954	8.5156	27
28	0.03782	1.0037	36.690	117.42	2413.9	117.43	2435.2	2552.6	0.4093	8.4946	28
29	0.04008	1.0040	34.733	121.60	2415.2	121.61	2432.8	2554.5	0.4231	8.4739	29
30	0.04246	1.0043	32.894	125.78	2416.6	125.79	2430.5	2556.3	0.4369	8.4533	30
31	0.04496	1.0046	31.165	129.96	2418.0	129.97	2428.1	2558.1	0.4507	8.4329	31
32	0.04759	1.0050	29.540	134.14	2419.3	134.15	2425.7	2559.9	0.4644	8.4127	32
33	0.05034	1.0053	28.011	138.32	2420.7	138.33	2423.4	2561.7	0.4781	8.3927	33
34	0.05324	1.0056	26.571	142.50	2422.0	142.50	2421.0	2563.5	0.4917	8.3728	34
35	0.05628	1.0060	25.216	146.67	2423.4	146.68	2418.6	2565.3	0.5053	8.3531	35
36	0.05947	1.0063	23.940	150.85	2424.7	150.86	2416.2	2567.1	0.5188	8.3336	36
38	0.06632	1.0071	21.602	159.20	2427.4	159.21	2411.5	2570.7	0.5458	8.2950	38
40	0.07384	1.0078	19.523	167.56	2430.1	167.57	2406.7	2574.3	0.5725	8.2570	40
45	0.09593	1.0099	15.258	188.44	2436.8	188.45	2394.8	2583.2	0.6387	8.1648	45
50	.1235	1.0121	12.032	209.32	2443.5	209.33	2382.7	2592.1	.7038	8.0763	50
55	.1576	1.0146	9.568	230.21	2450.1	230.23	2370.7	2600.9	.7679	7.9913	55
60	.1994	1.0172	7.671	251.11	2456.6	251.13	2358.5	2609.6	.8312	7.9096	60
65	.2503	1.0199	6.197	272.02	2463.1	272.06	2346.2	2618.3	.8935	7.8310	65
70	.3119	1.0228	5.042	292.95	2469.6	292.98	2333.8	2626.8	.9549	7.7553	70

$$y = 45 + (0.107 - 0.09593) \frac{(50 - 45)}{(0.1235 - 0.09593)}$$

$$y = 45 + 0.01107 \frac{5}{0.02757}$$

$$y = 47.00$$

Para una presión de 0.10 bares, la temperatura de evaporación es de 47.00°C.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Debido a que el vacío en la cámara de evaporación osciló entre 550 y 600 mm Hg, la evaporación se llevó a cabo a una temperatura promedio de 38.20°C

Con este proceso se obtuvieron 108.57 L de jarabe de jugo de caña con una concentración final de  $70 \pm 1.5^\circ\text{Brix}$  que sirvió como sustrato para la reacción de síntesis. El sustrato se guardó en una cámara de congelación de  $-17 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso.

El balance de materia de la concentración del jugo de caña se puede ver en la Figura 6.1, con lo que se ve que se pueden obtener 142.47 Kg de jugo concentrado a partir de 1090 Kg de caña, mediante su concentración a  $70^\circ\text{Brix}$ .

### 6.1.2 Medición de la densidad del jugo concentrado.

Al medir la densidad con la probeta y la balanza, los 30 ml de jugo concentrado, se registró un peso de 39.45 g, por lo que la densidad calculada fue de  $1.31 \text{ g/ml}$

Para confirmar esta medición, se realizó una segunda medición con un equipo Anton Paar. El equipo dio una lectura de  $1.30 \text{ g/ml}$

Por lo anterior, se manejó una densidad promedio entre las dos mediciones, de  $1310 \text{ Kg/m}^3$

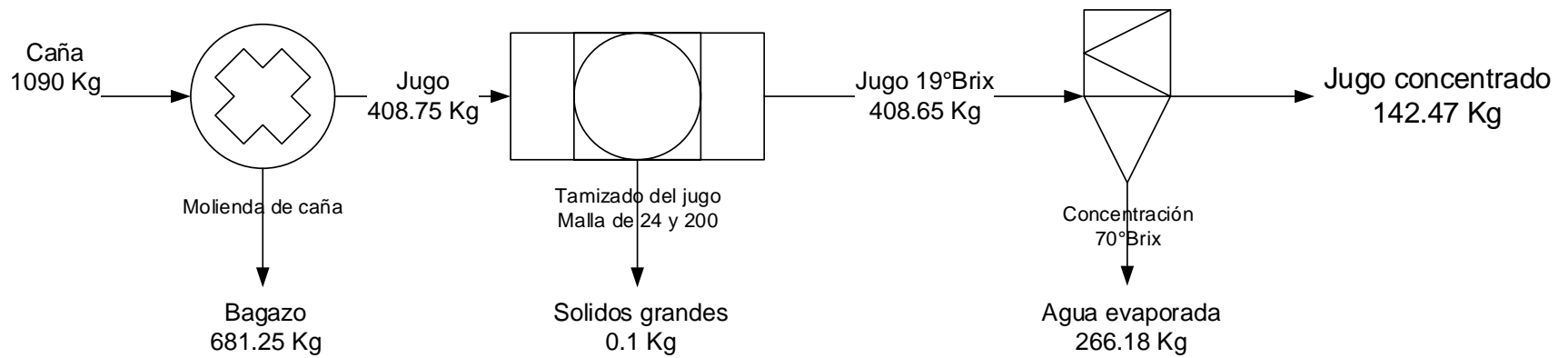


Figura 6.1 Balance de materia del proceso de obtención del sustrato.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

### 6.1.3 Medición de la viscosidad del jugo concentrado.

La viscosidad del jugo concentrado se midió por triplicado con un reómetro AR 1000 dando el siguiente comportamiento (Figura 6.2).

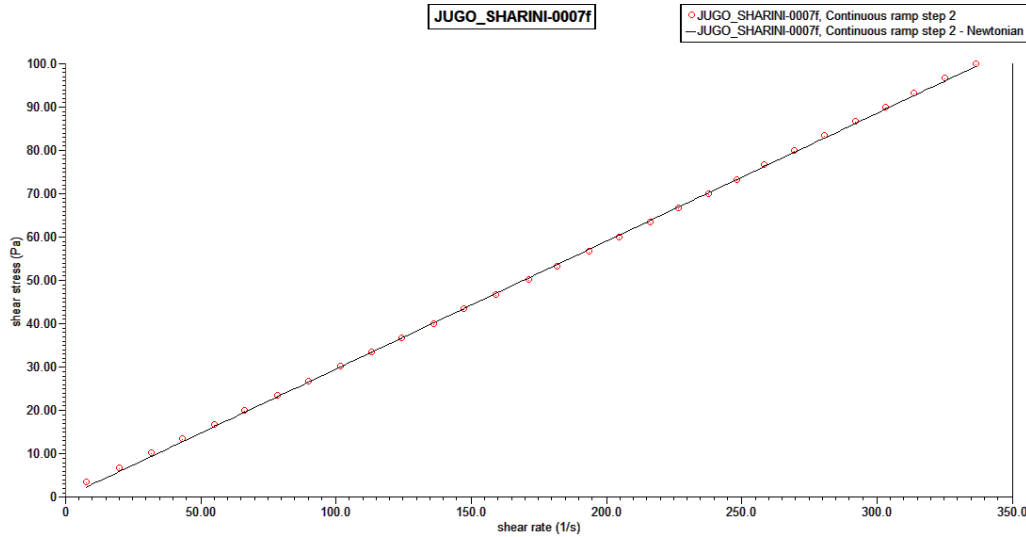


Figura 6.2 Comportamiento reológico del jugo de caña a 60°C.

Los resultados fueron analizados con un modelo newtoniano (Zailer Regina et al. 2011) dando los siguientes resultados (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Resultados de viscosidad del jugo de caña.

Jugo de caña	
Corrida	Viscosidad (Pa*s)
1	0.295
2	0.290
3	0.307

Por lo que se manejó una viscosidad de 0.297 Pa\*s.

## 6.2 Producción del biocatalizador.

A partir del cultivo realizado en matraz, se produjo un lote de 5 litros de levadura de *Candida apicola*, el cual se utilizó como inóculo para el reactor piloto.

Del reactor se obtuvieron 100 litros de medio mineral con biomasa de *Candida apicola* que se utilizaron para la reacción de síntesis de fructooligosacáridos. Al término del tiempo que se dejó operar el reactor, se procedió a la concentración de biomasa mediante tecnología de membranas.

El producto se hizo pasar por una membrana de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  y se midió el flujo cada 10 minutos (Tabla 6.4).

Tabla 6.4 Condiciones de trabajo en la concentración de biomasa de *Candida apícola*.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Presión de entrada (psi)</b>	<b>Presión del retenido (psi)</b>	<b>Flujo (ml/min)</b>
<b>0</b>	23	6	340
<b>15</b>	22.5	6	250
<b>30</b>	24	6	240
<b>45</b>	24.5	8	265
<b>60</b>	33	24	400
<b>75</b>	32	25	290
<b>90</b>	31	27	230
<b>105</b>	33	32	290
<b>120</b>	32	30	280
<b>135</b>	31	30	240
<b>150</b>	31.5	30	190

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Se observó que conforme pasaba el tiempo y se iba concentrando la cepa en el retentato, iba disminuyendo el flujo del permeado, por lo que se decidió que cuando fuera  $\sim 150 \text{ ml/min}$  se aplicaría un tratamiento de limpieza de la membrana con NaOH para recuperar sus condiciones iniciales, por lo que se le dio una limpieza a la membrana con NaOH al 0.1N para recuperar el flujo y poder seguir filtrando el lote (Tabla 6.5).

Tabla 6.5 Condiciones de trabajo en la concentración de biomasa de *Candida apícola*.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Presión de entrada (psi)</b>	<b>Presión del retenido (psi)</b>	<b>Flujo (ml/min)</b>
<b>0</b>	20	8	600
<b>15</b>	20	8	430
<b>30</b>	20	9	420
<b>45</b>	19	10	340
<b>60</b>	20	9	420
<b>75</b>	20	9	370

Posterior a la concentración de biomasa, se realizó una centrifugación, con lo que se obtuvieron  $\cong 200$  g de biomasa y se le midió la actividad enzimática mediante la técnica de DNS (Cruz 2015) para la verificación de la funcionalidad del lote; del proceso final de separación se obtuvieron  $\cong 1200$  g de biocatalizador, el cual contenía una actividad enzimática de 1250 U/ml. En la Figura 6.3 se puede apreciar el procesamiento de un lote de producción de biocatalizador de 100 litros a partir de un inóculo en medio YPD, pudiéndose obtener un total de 1200 g de biocatalizador en forma líquida con 1250 U/ml.

Resultados y discusión

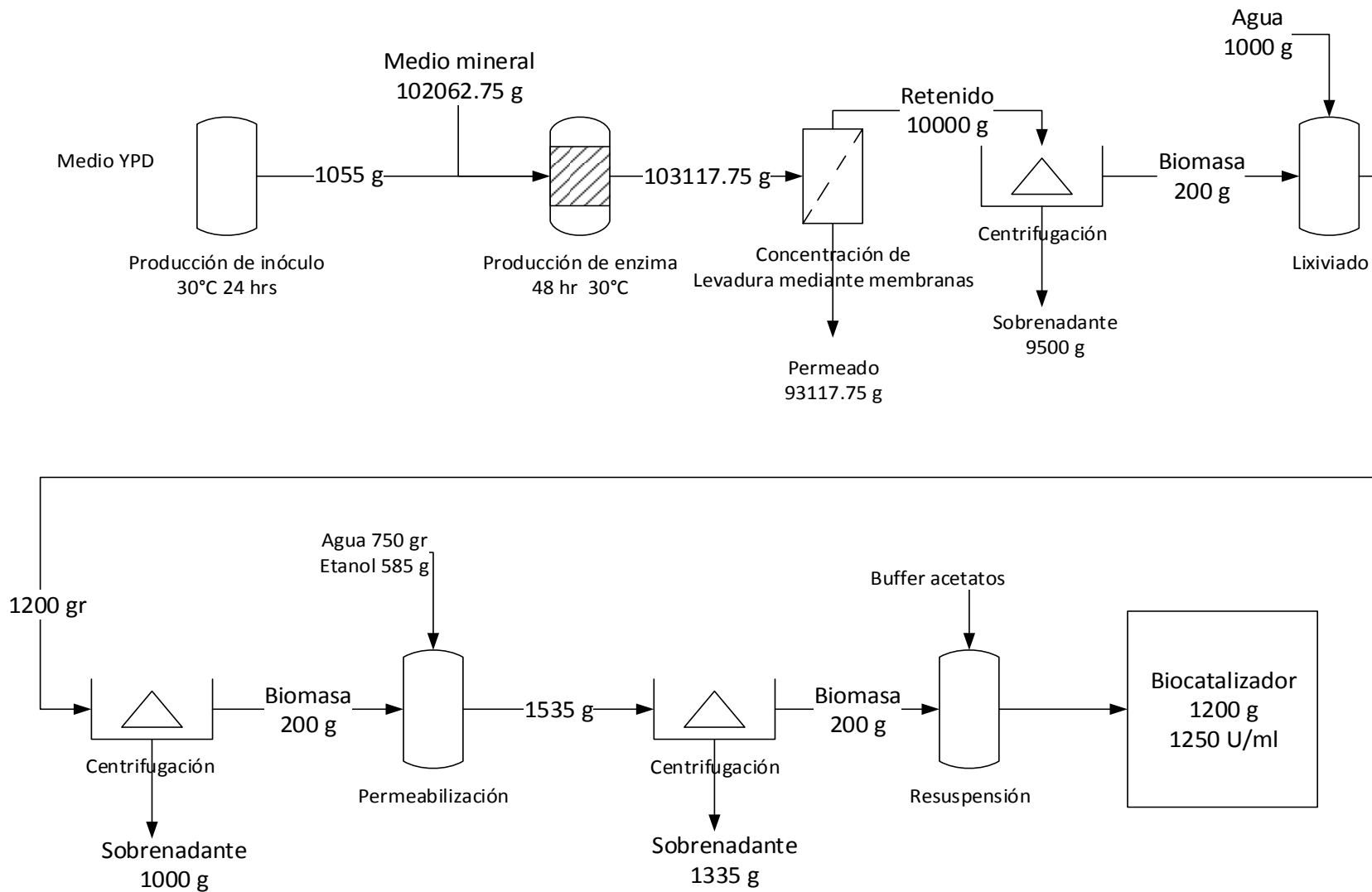


Figura 6.3 Balance de materia de la producción de biocatalizador.

### 6.3 Reacciones de síntesis.

Se realizaron las dos reacciones de síntesis con las diferentes revoluciones o velocidades de agitación. De acuerdo al muestreo realizado durante la reacción y al final de esta, se determinó la cinética de la síntesis de FOS y de la concentración de azúcares presentes, esto mediante análisis por HPLC.

En la Figura 6.4 se muestra el análisis de la reacción de síntesis, realizada a 70 rpm, hecho mediante HPLC, en el cual se puede observar la disminución de la sacarosa y el aumento paulatino de glucosa y fructosa en los diferentes tiempos de la reacción de síntesis. Lo anterior se complementa con el perfil de carbohidratos de muestras tomadas durante la síntesis, en la tabla 6.6.

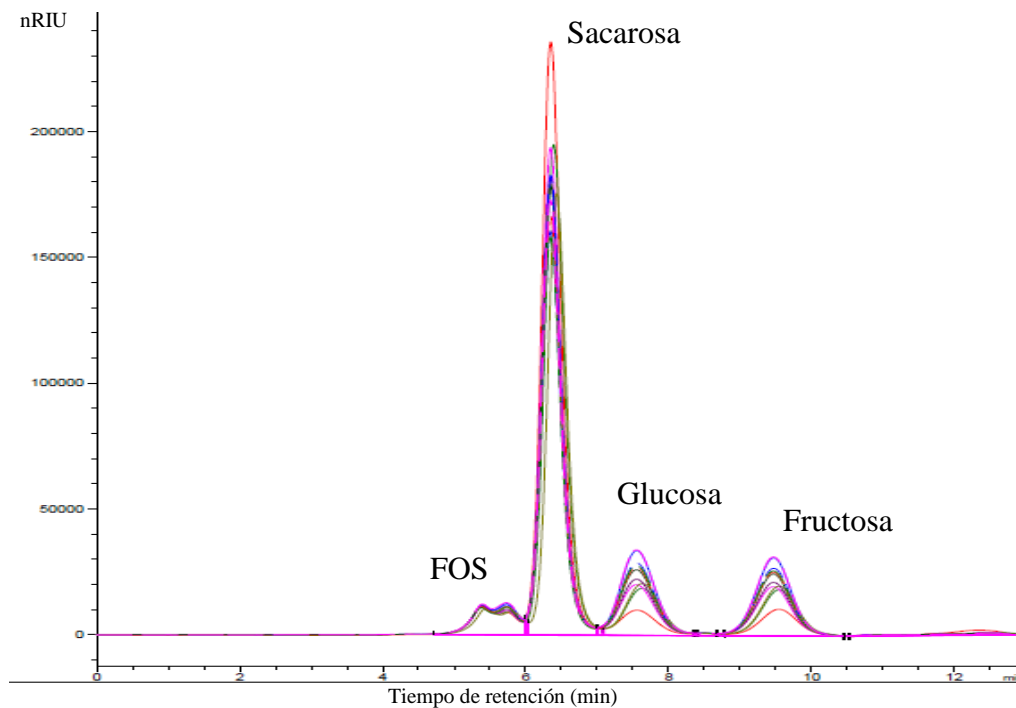


Figura 6.4 Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de FOS realizada a 70 rpm.



Los resultados que se obtuvieron del reactor a 70 rpm se muestran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Concentración de carbohidratos durante la reacción de síntesis a 70 rpm.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>g/L</b>			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	FOS
<b>0</b>	515.54	40.33	47.66	25.74
<b>1</b>	422.38	70.40	77.48	23.73
<b>2</b>	421.83	80.86	87.96	24.44
<b>3</b>	377.71	80.27	86.505	22.54
<b>4</b>	385.00	87.47	93.68	23.27
<b>5</b>	390.27	101.01	106.87	24.65
<b>6</b>	400.91	111.24	116.78	25.80
<b>7</b>	360.33	105.38	110.42	23.83
<b>8</b>	348.90	109.11	113.86	24.05
<b>9</b>	367.95	128.61	133.37	26.83
<b>10</b>	340.18	127.89	132.35	25.92

Asimismo, en la Figura 6.5 se puede observar que la producción de FOS se mantuvo aproximadamente estable durante el tiempo que duró la reacción (10 h). Esto se puede deber a que este primer experimento, se realizó con una agitación promedio de todas las velocidades

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

calculadas (Tabla 5.2), siendo esta, menor a la designada de 85 rpm; por lo que la transferencia de masa es menor debido a las condiciones de velocidad utilizadas (70 rpm).

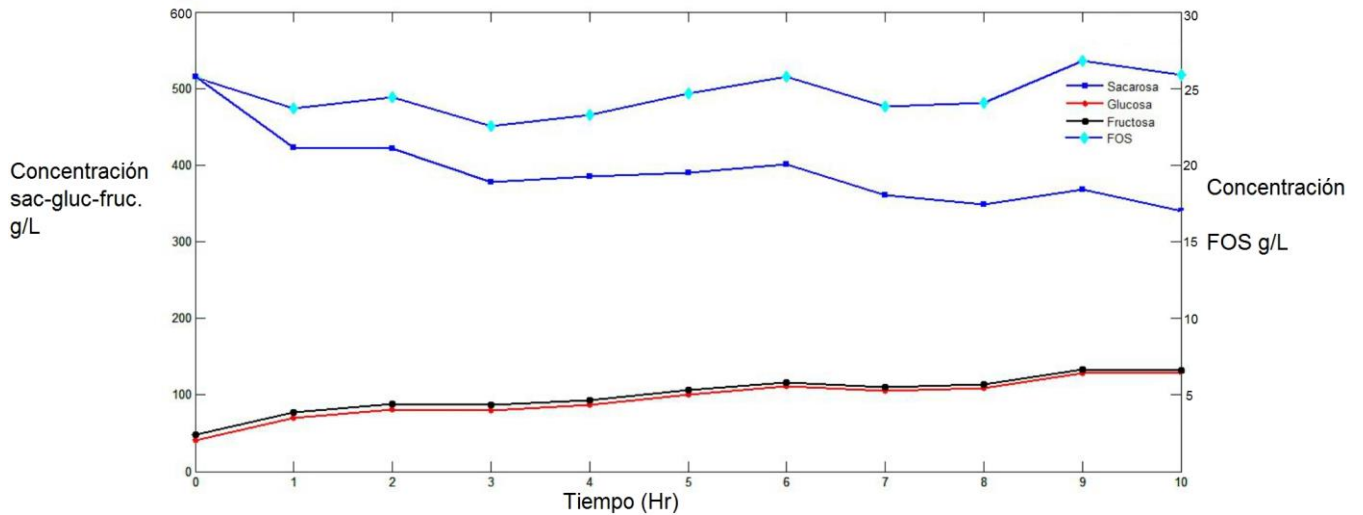


Figura 6.5 Cinética de la reacción de síntesis de FOS a 70 rpm.

Asimismo, se obtuvo el cromatograma (Figura 6.6) de la cinética de la reacción de síntesis de FOS para la reacción realizada a 85 rpm, en el cual se puede observar, a diferencia del anterior (Figura 6.4) que hay un aumento en el pico correspondiente a FOS, lo que denota que hay una mayor síntesis de estas moléculas en esta reacción. Lo anterior se puede ver en los valores de la Tabla 6.7 y gráficamente en la Figura 6.7.

## Resultados y discusión

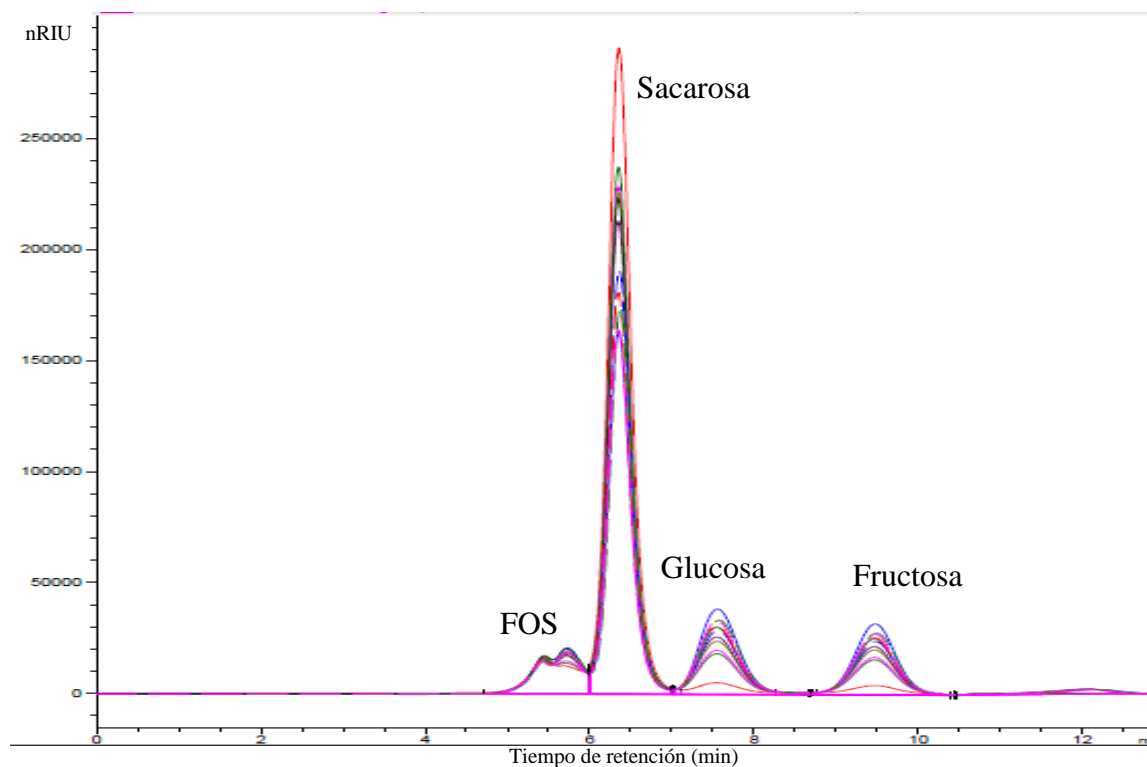


Figura 6.6 Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de FOS realizada a 85 rpm.

Tabla 6.7 Valores de los compuestos durante la reacción de síntesis a 85 rpm

Tiempo (horas)	g/L			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	FOS
<b>0</b>	622.83	19.67	17.58	35.79
<b>1</b>	519.19	72.12	69.35	35.23
<b>2</b>	496.72	76.52	72.81	34.33
<b>3</b>	481.86	91.77	87.09	35.82
<b>4</b>	462.79	99.67	93.82	37.55
<b>5</b>	472.50	117.23	110.49	44.00

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

<b>6</b>	416.53	115.07	107.76	40.08
<b>7</b>	389.13	118.50	110.92	39.99
<b>8</b>	368.21	125.89	117.47	40.82
<b>9</b>	359.14	133.25	124.17	42.00
<b>10</b>	354.84	151.40	141.09	45.53

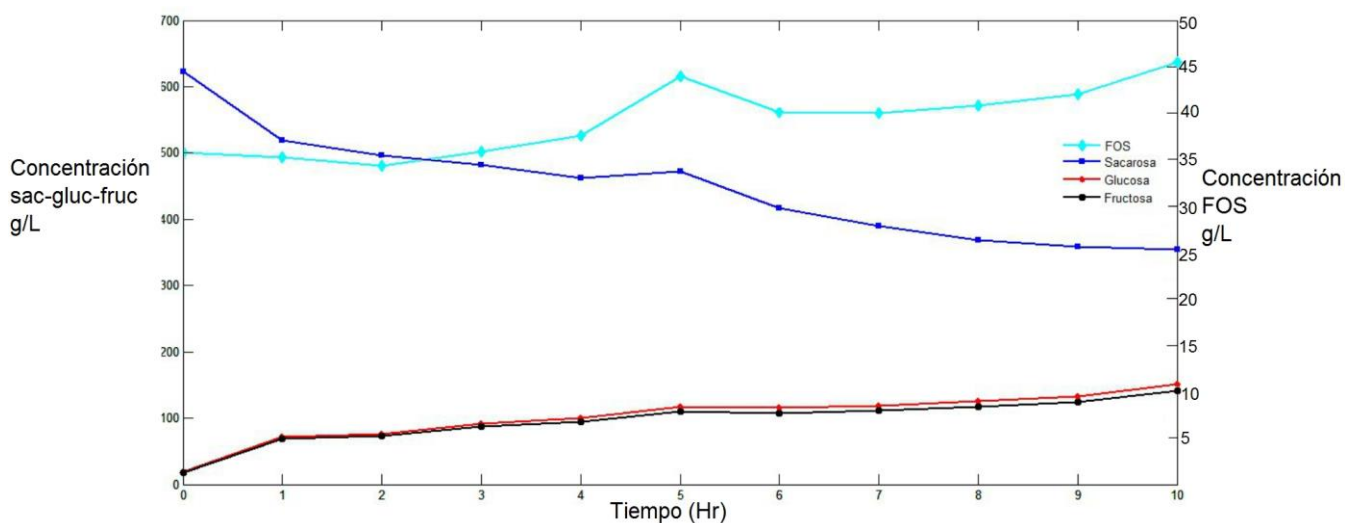


Figura 6.7 Cinética de la reacción de síntesis de FOS a 85 rpm

En esta reacción (Figura 6.7) se puede observar una mayor acumulación de FOS durante la reacción de síntesis en comparación con la realizada a una agitación menor, así como un mayor consumo de sacarosa en menor tiempo y mayor liberación de glucosa y fructosa. Ya que esta reacción se llevó a cabo con una velocidad de agitación de 85 rpm, la transferencia de masa fue superior a la obtenida en la reacción de síntesis realizada a una agitación menor.

Como se puede observar en las Figuras 6.5 y 6.7, en ambas reacciones hubo síntesis de fructooligosacáridos, sin embargo, se puede apreciar que en la reacción de síntesis realizada a 85 rpm (Figura 6.7), la concentración de FOS es superior a los 40 g/L, mientras que en la primera reacción (Figura 6.5) no alcanza los 30 g/L. Esto, se atribuye a que la velocidad de agitación influye directamente en la velocidad de transferencia de masa, por lo que, en este caso, a mayores revoluciones y mayor convección, se da un mejor intercambio de materia concluyendo en una mayor síntesis (Treybal 1980); sin embargo, al aumentar las revoluciones por minuto en el reactor, no siempre se asegura un aumento de transferencia de masa (Nielsen Villadsen et al. 2003), por ello se deben realizar pruebas para verificar la velocidad máxima de operación, lo que coincide con lo señalado en el trabajo hecho por Pérez (2011).

A partir de la reacción realizada a 85 rpm, la cual arrojó el mejor resultado de acuerdo al objetivo de la reacción, se realizó un balance general de materia. Los productos iniciales y finales se describen en la Figura 6.8; con lo que se puede observar que a partir de jugo de caña concentrado a 70° Brix, esto es con una cantidad inicial de sacarosa de 67.73 Kg y una agitación de 85 rpm, se obtienen 45.53 g FOS/L, equivalentes a obtener en el lote 6.49 Kg de FOS. Lo anterior nos indica un rendimiento de 10.4 kg de FOS/kg de sacarosa.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

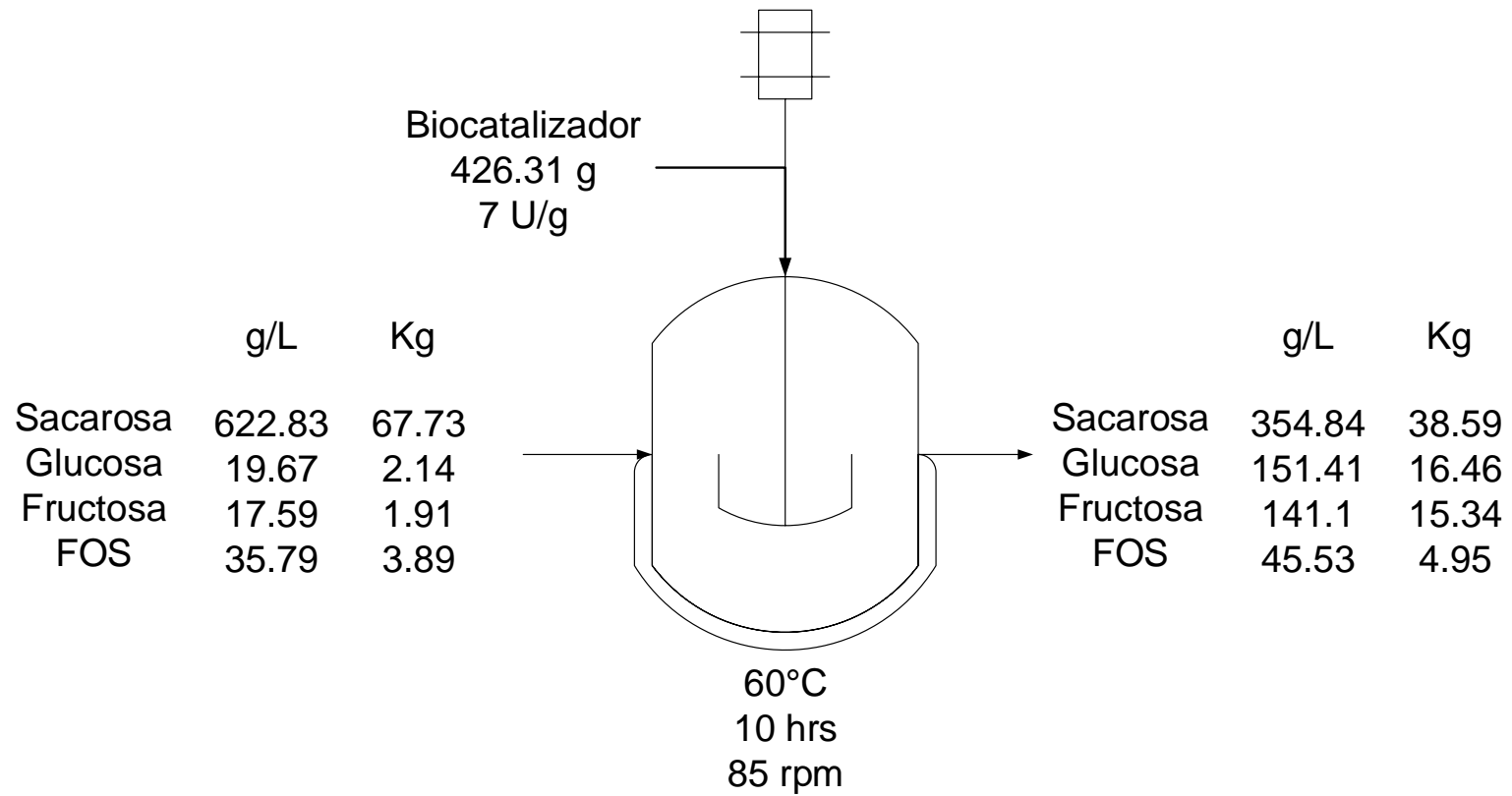


Figura 6.8 Balance de materia de la reacción de síntesis (85 rpm) de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña

#### 6.4 Obtención de la actividad enzimática de la levadura.

Para obtener los parámetros cinéticos de la levadura, se realizó una curva de calibración con fructosa (Tabla 6.8) con concentraciones de 0 hasta 2 g/L de fructosa y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 6.8 Valores para la determinación de la curva de calibración

Fructosa (g/L)	Absorbancia(ABS)	Promedio	Diferencia
0	0.05	0.052	0.051
0.25	0.101	0.103	0.102
0.5	0.202	0.213	0.2075
1	0.389	0.387	0.388
2	0.686	0.688	0.687

Con estos datos se realizó una regresión lineal (Figura 6.9) y mediante la aplicación de la ecuación de la pendiente se pudieron obtener las unidades de actividad enzimática.

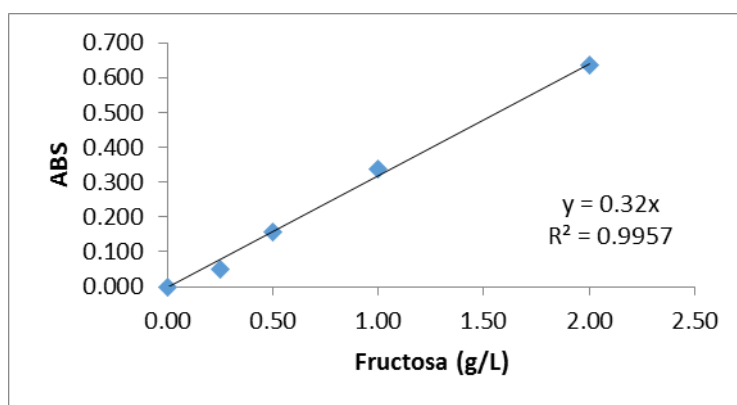


Figura 6.9 Curva de calibración para la medición de la actividad enzimática

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

A cada muestra se le realizó un factor de dilución de 1:6000 y se analizó por duplicado. Se evaluaron también otras diluciones (1:4000 y 1:8000), las cuales no alcanzaron a estar dentro de los límites requeridos para su análisis con la curva de calibración (Figura 6.9) y debido a que la dilución 1:6000 fue la que dio un resultado para ser analizado dentro de los parámetros de la curva; se analizó con la misma, obteniendo los datos mostrados en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9 Unidades de actividad enzimática respecto a la absorbancia obtenida de la muestra.

Blanco	Absorbancia		Factor de dilución	Unidades de actividad (U/ml)			±SD
	Muestra 1	Muestra 2		Muestra 1	Muestra 2	Promedio	
0.05	0.082	0.079	6000	444.5400	402.8644	423.7022	29.4691
0.049	0.126	0.128	6000	1069.674 4	1097.458 1	1083.566 3	19.6461
0.053	0.177	0.184	6000	1722.592 5	1819.835 6	1771.214 1	68.7613
0.054	0.32	0.334	6000	3695.238 8	3889.725 0	3792.481 9	137.522 5
0.049	0.437	0.436	6000	5390.047 5	5376.155 6	5383.101 6	9.8230
0.051	0.527	0.528	6000	6612.532 5	6626.424 4	6619.478 4	9.8230
0.049	0.521	0.528	6000	6556.965 0	6654.208 1	6605.586 6	68.7613



## Resultados y discusión

Debido a que la enzima presenta un comportamiento de acuerdo a Michaelis-Menten; se realizó la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  variando la concentración de sacarosa desde 7.3 hasta 467.2 mM.

Tabla 6.10 Velocidad de reacción de la enzima de acuerdo a la concentración de sustrato proporcionado.

<b>Concentración (mM)</b>	<b>Velocidad <math>\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}</math></b>
<b>7.3</b>	423.7022
<b>14.6</b>	1,083.5663
<b>29.2</b>	1,771.2141
<b>58.4</b>	3,792.4819
<b>116.8</b>	5,383.1016
<b>233.6</b>	6,619.4784
<b>467.2</b>	6,605.5866

Con los datos anteriores (Tabla 6.10) se realizó una gráfica (Figura 6.10) para estimar los parámetros cinéticos deseados y mediante la linealización de los datos obtenidos se realizó la estimación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la levadura en cuestión y estar en condiciones para realizar el análisis de transferencia de masa requerido.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

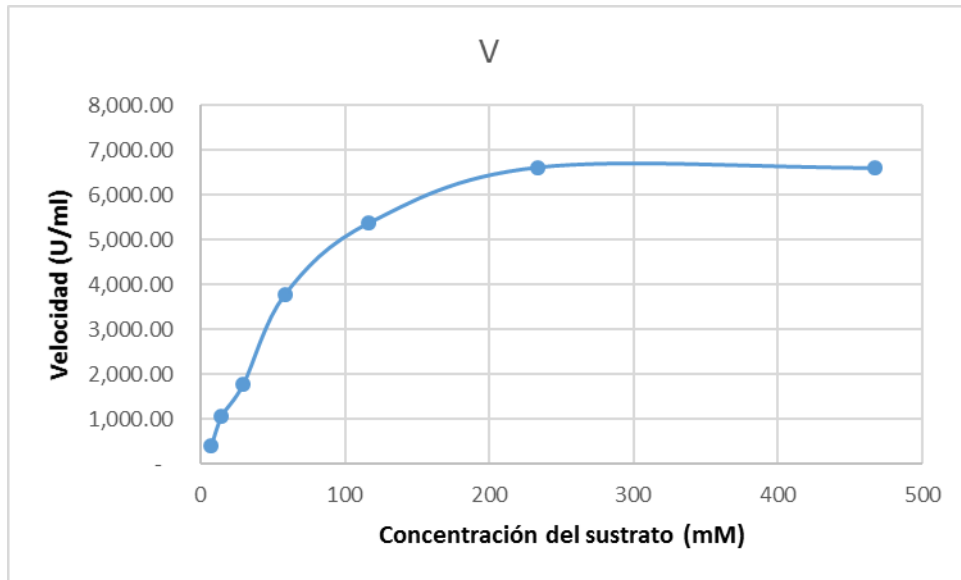


Figura 6.10 Gráfica de la concentración del sustrato (mM) vs la velocidad de la enzima (U/ml)

Se obtuvo el inverso de los datos anteriores (Tabla 6.11) para poder hacer una gráfica lineal (Figura 6.11) y así estimar los valores deseados de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

Tabla 6.11 Inverso de los datos obtenidos para poder linealizar

<b>1/Concentración (1/mmM)</b>	<b>1/Velocidad 1/UmL</b>
<b>0.0685</b>	0.0009
<b>0.0342</b>	0.0006
<b>0.0171</b>	0.0003
<b>0.0086</b>	0.0002
<b>0.0043</b>	0.0002

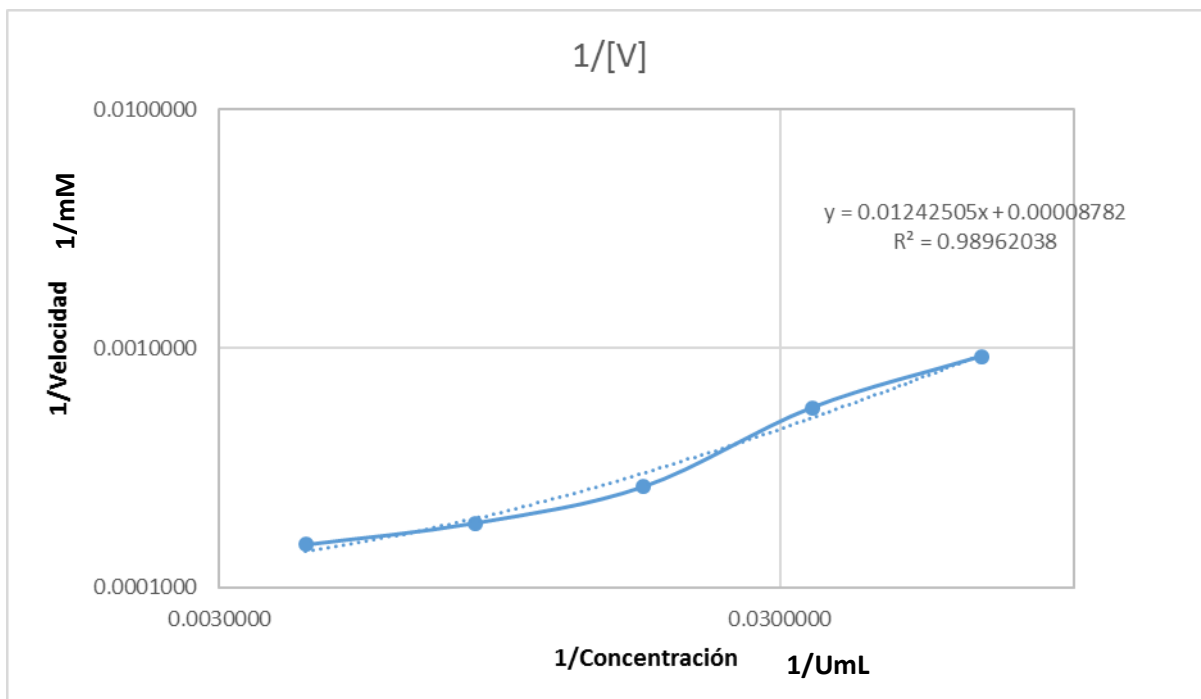


Figura 6.11 Datos linealizados para estimar los valores de Km y Vmax

A partir de la pendiente de la (Figura 6.11), se obtuvieron los valores requeridos (Tabla 6.12).

Tabla 6.12 Valores de Km y Vmax estimados.

<b>Km/Vmax</b>	<b>1/Vmax</b>	<b>Vmax</b> (g/L*h)	<b>Km</b> (g/L)
<b>0.01242505</b>	0.00008782	1.23E+05	25.48

El valor de Km obtenido para las células de *Candida apicola*, tiene variación en relación a otros trabajos similares (Yoshiaki Hiroyuki et al. 1996; Wen-Chien Chung-Jen et al. 1999; Alvarado & Maugeri 2010), en los cuales también se realizaron reacciones de síntesis de FOS (Tabla 6.13); sin embargo, el valor de Vmax, está por encima de los obtenidos con otros microorganismos; esto se puede deber al hecho de que en el presente trabajo se utilizó

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

la célula completa de la levadura, sin tener la información suficiente que permita afirmar si realmente la síntesis fue llevada a cabo por una sola enzima.

Tabla 6.13 Comparación de parámetros cinéticos (Km y Vmax)

Autor	Microorganismo	Forma de la enzima	Parámetros cinéticos	
			Km (g/L)	Vmax (g/L*h)
(Wen-Chien Chung-Jen et al. 1999)	<i>Aspergillus japonicus</i>	Inmovilizada; purificada (metacrilamida)	90	424
(Yoshiaki Hiroyuki et al. 1996)	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Extracto enzimático. Purificada	1.08	2.81
(Alvarado & Maugeri 2010)	<i>Rhodotorula sp.</i>	Inmovilizada; parcialmente purificada (niobio/grafito)	335.28	61.38
(Alvarado & Maugeri 2010)	<i>Rhodotorula sp.</i>	Inmovilizada; purificada (niobio/grafito)	148.28	39.08

## 6.5 Análisis de transferencia de masa.

Para el análisis de transferencia de masa se analizaron cuatro variantes de la ecuación de correlación de Frössling para observar la variación del coeficiente global de transferencia.

Se calculó también la relación de la velocidad de reacción con la transferencia de masa, a partir del cálculo del número de Damköhler.

Análisis de transferencia de masa para el reactor a 85 rpm

Para el Número de Potencia ( $N_p$ ), tenemos que

$$Np = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

El motor del reactor que se utilizó es de  $1/2$  caballo de fuerza (HP), por lo que consume  $372.85 \text{ W/hr}$ . Ya que la reacción tuvo una duración de 10 horas, la potencia (P) total durante la reacción fue de 3728.5 W, además

$$Np = \frac{3728.5}{(1310)(1.42)^3(0.153)^5}$$

$$Np = 11856.07$$

Número de Reynolds (Re)

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Donde

$\mu$  = viscosidad

$$Re = \frac{(1310)(1.42)(0.153)^2}{0.2976}$$

$$Re = 146.3222$$

Potencia por unidad de masa ( $\epsilon$ )

$$\epsilon = \frac{Np \cdot N^3 \cdot D^5}{V} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Donde

V = volumen

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$\varepsilon = \frac{(11856.07)(1.42)^3 \cdot (0.153)^5}{0.1}$$

$$\varepsilon = 28.4618 \text{ W/kg}$$

### Comparación del ajuste de las ecuaciones de transferencia.

Ecuación de acuerdo a Alvarado, (2010)

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.47 \left[ \frac{d_p^{4/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{D_i}{D_t} \right]^{0.17} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{0.36} \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde

$$D_{(s)} = \frac{K_B \cdot T}{6\pi \cdot \mu \cdot R_0} \quad \text{Ecuación 6.5}$$

$K_B$  = Constante de Boltzman

T = Temperatura

$R_0$  = Radio del soluto

$\gamma$  = Viscosidad cinemática

$$D_{(s)} = \frac{(1.38E^{-23})(333.15)}{6\pi(0.2976)(4.4E^{-10})}$$

$$D_{(s)} = 1.8626E^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$$

Cálculo de la viscosidad cinemática:

## Resultados y discusión

$$\gamma = \frac{0.2976}{1310}$$

$$\gamma = 2.2717E^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$$

Sustituyendo los valores

$$Sh = 2 + 0.47 \left[ \frac{0.00177^{4/3} \cdot 28.4618^{1/3}}{2.2717E^{-4}} \right]^{0.62} \left[ \frac{0.153}{0.446} \right]^{0.17} \left[ \frac{2.2717E^{-4}}{1.8626E^{-12}} \right]^{0.36}$$

$$Sh = 2 + 0.47(1.9257)(0.8337)(814.7848)$$

$$Sh = 616.8172$$

Despejado la variable  $K_L$  de la ecuación 6.4

$$K_L = \frac{Sh \cdot D_{(s)}}{d_p}$$

Ecuación 6.6

$$K_L = \frac{(616.8172)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 6.4910E^{-7} \text{ m/s}$$

Ecuación de acuerdo a Fogler, (2005)

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.6 Re^{1/2} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{1/3}$$

Ecuación 6.7

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$Sh = 2 + (0.6) (146.32)^{1/2} \left[ \frac{2.2717E^{-4}}{1.8626E^{-12}} \right]^{1/3}$$

$$Sh = 3601.2846$$

$$K_L = \frac{(1163.9217)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 3.7897E^{-6}$$

Ecuación (1) de acuerdo a Levins (1972)

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.49 Re^{1/2} \left[ \frac{\gamma}{D_{(s)}} \right]^{0.36}$$

Ecuación 6.8

$$Sh = 2 + (0.49) (146.32)^{1/2} \left[ \frac{2.2717E^{-4}}{1.8628E^{-12}} \right]^{0.36}$$

$$Sh = 4831.4073$$

$$K_L = \frac{Sh \cdot D_{(s)}}{d_p}$$

$$K_L = \frac{(4831.4073)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$



## Resultados y discusión

$$K_L = 5.0843E^{-6}$$

Ecuación (2) de acuerdo a Levins, (1972)

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D(s)} = 2 + 0.50 \left[ \frac{d_p^{1/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{\gamma}{D(s)} \right]^{1/3} \quad \text{Ecuación 6.9}$$

$$Sh = 2 + 0.50 \left[ \frac{0.00177^{1/3} \cdot 28.4618^{1/3}}{2.2718E^{-4}} \right]^{0.62} \left[ \frac{2.2718E^{-4}}{1.8626E^{-4}} \right]^{1/3}$$

$$Sh = 24281.0289$$

$$K_L = \frac{Sh \cdot D(s)}{d_p}$$

$$K_L = \frac{(24281.0289)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 2.5552E^{-5}$$

Análisis de transferencia de masa para el reactor a 70 rpm:

Ecuación de acuerdo a Alvarado (2010),

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D(s)} = 2 + 0.47 \left[ \frac{d_p^{4/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{D_i}{D_t} \right]^{0.17} \left[ \frac{\gamma}{D(s)} \right]^{0.36} \quad \text{Ecuación 6.10}$$

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$Sh = 2 + 0.47(1.9257)(0.8337)(814.7848)$$

$$Sh = 616.8172$$

$$K_L = \frac{Sh \cdot D_{(s)}}{d_p}$$

$$K_L = \frac{(616.8172)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 6.4910E^{-7} m/s$$

Ecuación de acuerdo a Fogler (2005),

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D_{(s)}} = 2 + 0.6 Re^{1/2} \left[ \frac{\nu}{D_{(s)}} \right]^{1/3} \quad \text{Ecuación 6.11}$$

$$Sh = 2 + (0.6) (146.32)^{1/2} \left[ \frac{2.2717E^{-4}}{1.8626E^{-12}} \right]^{1/3}$$

$$Sh = 3269.1190$$

$$K_L = \frac{(3269.1190)(1.8626E^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 3.4402E^{-6}$$

## Resultados y discusión

Ecuación (1) de acuerdo a Levins (1972),

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D(s)} = 2 + 0.49 Re^{1/2} \left[ \frac{\gamma}{D(s)} \right]^{0.36} \quad \text{Ecuación 6.12}$$

$$Sh = 2 + (0.49) (146.32)^{1/2} \left[ \frac{2.2717E^{-4}}{1.8628E^{-12}} \right]^{0.36}$$

$$Sh = 4385.7178$$

$$K_L = \frac{Sh \cdot D(s)}{d_p}$$

$$K_L = \frac{(4385.7178)(1.8626^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 4.6152E^{-6}$$

Ecuación (2) de acuerdo a Levins (1972),

$$Sh = \frac{K_L \cdot d_p}{D(s)} = 2 + 0.50 \left[ \frac{d_p^{1/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\gamma} \right]^{0.62} \left[ \frac{\gamma}{D(s)} \right]^{1/3} \quad \text{Ecuación 6.13}$$

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

$$Sh = 2 + 0.50 \left[ \frac{0.00177^{1/3} \cdot 28.4618^{1/3}}{2.2718E^{-4}} \right]^{0.62} \left[ \frac{2.2718E^{-4}}{1.8626E^{-4}} \right]^{1/3}$$

$$Sh = 24281.0289$$

$$K_L = \frac{Sh \cdot D_{(s)}}{d_p}$$

$$K_L = \frac{(24281.0289)(1.8626^{-12})}{0.00177}$$

$$K_L = 2.5552E^{-5}$$

Como se puede apreciar en la (Tabla 6.14), hay un mayor coeficiente de transferencia en la reacción que se llevó a cabo a una agitación de 85 rpm, sin embargo, esto solo ocurre en la segunda y tercera ecuación, mientras que los valores de transferencia para la primera y última ecuación permanecen iguales para ambas agitaciones; esto debido a que, en la primera y última ecuación, el número de Reynolds se maneja como una correlación por la teoría de Kolmogoroff (Smith 1981) lo cual permite que no cambien los resultados.

Tabla 6.14 Comparación de coeficientes de transferencia

Autor	Coeficiente de transferencia (m/s) de masa	
	70 rpm	85 rpm
(Alvarado & Maugeri 2010)	6.49E-07	6.49E-07
(Fogler 2005)	3.44E-06	3.79E-06
(Levins & Glastonbury 1972)	4.62E-06	5.08E-06
(Levins & Glastonbury 1972)	2.56E-05	2.56E-05

## Resultados y discusión

Se realizó el cálculo del número de Damköhler (Da) para ambas reacciones, con 70 y 85 rpm.

$$\frac{1-X_s}{Da} = \frac{\beta x_s}{1+\beta x_s} \quad \text{Ecuación 6.14}$$

Donde

$$x_s = \frac{C_s}{C_{sb}}$$

$$\beta = \frac{C_{sb}}{K_M}$$

$C_{sb}$  y  $C_s$  son las concentraciones del sustrato en el seno de la solución y en la superficie de la enzima respectivamente. Y  $X_s$  representa la fracción molar del sustrato (Dutta 2008)

Para 70 rpm:

Tabla 6.15 Composición molar del jugo de caña

Compuesto	Moles
Sacarosa	163.77
Glucosa	24.37
Fructosa	28.76
FOS	4.78
Agua	2239.44
<b>TOTAL</b>	2461.12

$$X_s = 0.066$$

Debido a que  $C_s$  es la concentración sobre la superficie de la enzima inmovilizada, se tomó el valor de la saturación de la misma para realizar este cálculo.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

∴

$$C_s = K_M$$

$$C_{sb} = 1506.069$$

$$x_s = \frac{141.483}{1506.069}$$

$$x_s = 0.093$$

$$\beta = \frac{1506.069}{141.483}$$

$$\beta = 10.644$$

Despejando

$$Da = \frac{(1 + \beta x_s)(1 - X_S)}{\beta x_s}$$

$$Da = \frac{(1 + (10.644 * 0.093))(1 - 0.066)}{(10.644 * 0.093)}$$

$$Da = 1.867$$

Para 85 rpm:

Tabla 6.16 Composición molar del producto de la reacción

Compuesto	Moles
Sacarosa	197.86
Glucosa	11.882
Fructosa	10.605
FOS	6.644
Agua	1837.222
<b>TOTAL</b>	2064.213

$$X_s = 0.095$$

$$C_s = K_M$$

$$C_{sb} = 1819.569$$

$$x_s = \frac{141.483}{1819.569}$$

$$x_s = 0.077$$

$$\beta = \frac{1819.569}{141.483}$$

$$\beta = 12.86$$

$$Da = \frac{(1 + (12.86 * 0.077))(1 - 0.095)}{(12.86 * 0.077)}$$

$$Da = 1.819$$

De acuerdo a Dutta, (2008), el número de Damköhler ( $Da$ ) indica si se realiza más rápido la transferencia de masa del medio hacia la enzima, o se realiza la reacción de síntesis en la enzima misma. Si el número es mayor de 1, se da más rápido la velocidad de reacción que la transferencia de masa, por lo que en ambas reacciones es mayor la velocidad de síntesis; sin embargo, en la reacción que se realizó a 85 rpm es menor el valor de  $Da$  (1.819) en comparación con la que se realizó a 70 rpm (1.867), lo que indica que en la reacción llevada a cabo con mayor número de revoluciones, hay una mejor transferencia de masa, pudiendo mejorarse con un aumento en la velocidad de agitación, llegando potencialmente hasta  $Da \cong 0$ , ya que a valores más bajos del cero, se realiza más rápido la transferencia de masa que la velocidad de reacción, por lo que en ese rango no se daría adecuadamente la reacción de síntesis.



## 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

a) De las reacciones de síntesis realizadas en este trabajo, se obtuvieron concentraciones de 45.53 y 25.92  $\text{g/L}$  de FOS, las cuales no representan rendimientos altos en relación a otros trabajos (Jun Seigo et al. 2008; Dominguez Nobre et al. 2012; Lorenzoni Aydos et al. 2013) en los cuales se presentan rendimientos por arriba del 30%, sin embargo, el producto obtenido se puede considerar como funcional por la cantidad de fructooligosacáridos presentes en él (Ross & Preedy 2010).

b) De acuerdo a los resultados de las reacciones, se obtuvo un mejor rendimiento en la reacción hecha a una mayor agitación, esto debido a que el proceso de difusión, en este caso fue mediante convección forzada, la cual se puede manipular mediante el control de la agitación; permitiendo así una transferencia de masa adecuada para el proceso.

c) En el análisis del número de Damköhler, se puede observar que ambas reacciones dan un valor mayor de 1 y ya que este valor representa la relación de la velocidad de reacción con la transferencia de masa; se puede establecer que (Radovich 1985; Dutta 2008) si el valor es mayor de 1, la velocidad de reacción es mucho más grande que la transferencia de masa y la reacción está controlada por la transferencia de masa, como lo es en este caso.

d) A partir de los datos analizados, se puede establecer que, experimentando con otras velocidades de agitación, se puede mejorar el rendimiento de la reacción, y obtener rendimientos similares a los que se obtuvieron a nivel laboratorio (30 g/L); así como la estandarización de los parámetros y composición del sustrato, ya que a pesar de que ambas reacciones estaban a 70°Brix no garantiza que tengan la misma composición de carbohidratos presentes.

Por último, se recomienda la realización de un diseño experimental que contemple el mejoramiento de los resultados cuantitativos aquí obtenidos, ya que el comprobar la factibilidad de uso de *Candida apicola* para obtener FOS no es suficiente para formular una propuesta tecnológica para los sectores productivos. También se percibe la necesidad de llevar a cabo este tipo de reacciones en otra clase de reactor como reactor de membrana y/o

## Conclusiones y recomendaciones

reactor de lecho empacado (Al-Muftah & Ibrahim 2005), ya que se ha reportado que son recomendables para este tipo de reacciones (Jung Bang et al. 2011); ya que tiene un mejor control del desplazamiento de equilibrio de la reacción así como del tiempo de residencia del sustrato con el biocatalizador.

## 8 BIBLIOGRAFÍA.

- Al-Muftah AE, Ibrahim A-R (2005) Effects of simultaneous internal and external mass transfer and product inhibition on immobilized enzyme-catalyzed reactor. *Biochemical Engineering Journal* **27**(2), 167-178.
- Alvarado M, Maugeri FB (2010) Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **85**(12), 1654-1662.
- Anaya A, Pedroza H (2008) Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia y Educación* **23**(1), 31-39.
- Anda FLd (1984) Uso de los números y modelos adimensionales en el escalamiento de procesos y sistemas de ingeniería química. In: químicas Edc, ed. pp. 108. Sonora: Universidad de Sonora.
- Arrizón J, Urias-Silvas J, Sandoval G *et al.* (2014) Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides. In: Wiley, ed. *Food Oligosaccharides*, 1 edn; pp. 184-199. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd.
- Astiasarán I, Martínez A (2003) *Alimentos: composición y propiedades*, España: McGraw-Hill.
- Badui S (2006) *Química de los alimentos*, México: Pearson.
- Bagchi D, Lau F, Ghosh D (2010) *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*, New York: CRC Press.
- Bird B, Stewart W (1992) *Fenómenos de Transporte*, Barcelona, España: REPLA.
- Cruz E (2015) Evaluación de la actividad fructosiltransferasas en células permeabilizadas de levaduras no *Saccharomyces* aisladas de la fermentación del mezcal. (Maestría Zapopan, Jalisco: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.
- CUBAEDUCA (2016) Fundamentos de la Transferencia de masa. [WWW document]. <http://educaciones.cubaeduca.cu/medias/pdf/2697.pdf> URL [accessed on 13/04 2016].
- Chen J, Chen X, Xu X, Ning Y, Jin Z, Tian Y (2011) Biochemical characterization of an intracellular 6G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its

## Bibliografía

- use in production of neo-fructooligosaccharides (neo-FOSs). *Bioresource Technology* **102**(2), 1715-1721.
- Chuankhayan P, Hsieh CY, Huang YC *et al.* (2010) Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **285**(30), 23251-23264.
- Dominguez A, Nobre C, Rodrigues L *et al.* (2012) New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* **89**(4), 1174-1179.
- Dutta R (2008) *Fundamentals of Biochemical Engineering*, India: Springer.
- FAO (1997) Capitulo 16. [WWW document]. <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s18.htm> URL [accessed on 11/05/2016 2016].
- Fernandez M (2007) *Application of Biotechnology for Functional Foods*, Richmond: Pew Initiative on food and biotechnology.
- Fogler S (2005) *Elements of Chemical Reaction Engineering*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Geankoplis C (2006) *Procesos de Transporte y Principios de procesos de Separación*, Minnesota: CECSA.
- Gutiérrez P, Fernández L, Plou FJ, . MF (2009) Biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. *FEMS Yeast Research* **9**(5), 768-773.
- Harmsen J (2013) *Industrial Process Scale-up. A Practical Guide from Idea to Commercial Implementation*, Oxford: ELSEVIER.
- Hijum SA, Schutten GH, Rahaoui H, Maarel MJ, Dijkhuizen L (2002) Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9), 4390-4398.
- Ingeniería CUdCEe (2016) Datos actuales de la estación meteorológica del Instituto de Astronomía y Meteorología del Departamento de Física CUCEI. [WWW document]. <http://astro.iam.udg.mx/estacion/> URL [accessed on 29/03 2016].

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

- Ipsen D (1960) *Units, dimensions, and dimensionless numbers*, New York: McGraw-Hill.
- Jones J, Asher W, Bomben J *et al.* (1993) Tips for justifying pilot plants. *Chemical Engineering* **100**(4), 136-143.
- Jun Y, Seigo A, Hirofumi S, Takaaki F (2008) Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters* **30**(3), 535-539.
- Jung K, Bang S, Oh T, Park H (2011) Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. *Biotechnology Letters* **33**(8), 1621-1624.
- Katapodis P, Kalogeris E, Dedos D, Macris B, Christakopoulos P (2003) Production of  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Sporotrichum thermophile* and Its Application in the Synthesis of Fructooligosaccharides. *Food Biotechnology* **17**(1), 1-14.
- Larrahondo J (1995) Calidad de la caña de azúcar. *CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Colombia: Cenicaña.
- Legaz ME, Pedrosa MM, Armas RD, Martinez MM, C. V (1995) Soluble glycoproteins from sugar cane juice analysed by high-performance liquid chromatography and fluorescence emission. *Journal of Chromatography A* **697**(1-2), 329-335.
- Levins B, Glastonbury J (1972) Particle-Liquid hydrodynamics and mass transfer in a stirred vessel. Part II-Mass transfer. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* **50**(15), 32-147.
- Lorenzoni ASG, Aydos LF, Klein MP, Rodrigues RC, Hertz PF (2013) Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers* **103**(2014), 193-197.
- M. QHY, Salmah Y, Azizah O, Abdul RR (2001) Physico-chemical changes in sugarcane (*Saccharum officinarum* var yellow cane) and the extracted juice at different portions of the stem during development and maturation. *Food Chemistry* **75**(2), 131-137.
- Medina L (2006) El Teorema Pi y la modelación. In: Aguascalientes UAd, ed. *Revista del Departamento de Matemáticas y Física*, pp. 1-7. Aguascalientes.
- Moran M, Shapiro H (2006) *Fundamentals Of Engineering Thermodynamics*, 5 edn; United States of America: John Wiley & Sons.

## Bibliografía

- Mosquera A, Eliécer J, Villada HS (2007) Variables que afectan la calidad de la panela procesada en el departamento del CAUCA. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* **5**(11), 17-27.
- Mussato S, Ballesteros L, Martins S (2013) Maximization of Fructooligosaccharides and  $\beta$ -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus japonicus* under Solid-State Fermentation Conditions. *Food and Bioprocess Technology* **6**(8), 2128-2134.
- Mussatto SI, M. IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* **68**(3), 587-597.
- Nielsen J, Villadsen J, Lidén G (2003) *Bioreaction Engineering Principles*, Denmark: Kluwer.
- Radovich J (1985) Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. *Enzyme and Microbial Technology* **7**(1), 2-10.
- Rastall B, Gibson G (2006) *Prebiotics: Development and application*, Great Britain: Wiley.
- Rodríguez L (2005) Establecimiento de un procedimiento para la conservación de jugo de caña de azúcar variedad POJ (Licenciatura Chía: Universidad de la Sabana.
- Ross R, Preedy V (2010) *Bioactive Foods In Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, San Diego: Elsevier.
- Sánchez O, Guio F, García D, Algeira N, Silva E, Caicedo L (2007) Fructooligosaccharides production from sucrose by *Aspergillus* sp. N74 immobilized in calcium alginate. pp. 8. Colombia: Universidad de los Andes.
- Sanjuán R, Anzaldo J, Vargas J, Turrado J, Patt R (2001) Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse. *European Journal of Wood and Wood Products* **59**(6), 447-450.
- Santana T (2010) Innovación y Competitividad en la Industria Azucarera de México (Maestría México, DF.: Instituto Politecnico Nacional.
- Smaali I, Jazzar S, Soussi A, Muzard M, Aubry N, M. NM (2012) Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of  $\beta$ -D-fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **17**(2), 385-392.
- Smith J (1981) *Ingenieria de la cinética química*, New York: McGraw-Hill.

Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con una cepa de *Candida apicola*

Sungsoo S, Finocchiaro T (2010) *Handbook of Prebiotics and probiotics ingredients. Health Benefits and Food Applications*, New York: CRC Press.

Treybal R (1980) *Operaciones de transferencia de masa*, Rhode Island: McGraw-Hill.

UNAD Fenómenos de Transporte. [WWW document].  
[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201005/Modulo\\_descargable.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201005/Modulo_descargable.pdf) URL  
[accessed on 2016].

Van K, Steenkamp E, Wingfield B, Volschenk H (2013) Identification of the gene of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Ceratocystis moniliformis* CMW 10134 and characterization of the enzyme expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMedCentral Biotechnology* **13**(1), 1-11.

Walford S (1996) Composition of cane juice. *Proc S Afr Sug Technol Ass*, pp. 265-266. Durban: University of Natal.

Welty J, Wicks C, Wilson R, Rorrer G (2007) *Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer*, Oregon: Wiley.

Wen-Chien L, Chung-Jen C, Pei-Yi T (1999) Kinetic Modeling of Fructo-oligosaccharide Production Catalyzed by Immobilized  $\beta$ -Fructofuranosidase. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **38**(7), 2564-2570.

Yoshiaki H, Hiroyuki T, Toshihiko O, Shinichi K (1996) Kinetic parameters of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **81**(6), 518-523.

Zailer A-F, Regina NTV, Eduardo BdO, Reis CJSd, Telis-Romero J (2011) Rheology and fluid dynamics properties of sugarcane juice. *Biochemical Engineering Journal* **53**(3), 260-265.

Zhong-Wei X, Yu-Qiang L, Yong-Hua W, Bo Y, Zheng-Xiang N (2008) Production of  $\beta$ -Fructofuranosidase by *Arthrobacter* sp. and Its Application in the Modification of Stevioside and Rebaudioside A. *Food technology and biotechnology* **47**(2), 137-143.

Zlokarnik M (1991) *Dimensional Analysis and Scale-up in Chemical Engineering.*, Berlin: Springer.

Zlokarnik M (2006) *Scale-Up in Chemical Engineering*, Berlin: Springer.