**SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INDUSTRIA**

**Escalado y evaluación de la inversión enzimática en condiciones experimentales óptimas para la producción de glucosa**

***Scale-up and evaluation of enzyme inversion under optimum experimental conditions for glucose production***

**Amanda Acosta Solares1, Omar Pérez Navarro2, Enrique R. Pérez Cruz3, Duniesky Martínez García4, Néstor Ley Chong5, Erenio González Suárez6**

1-Amanda Acosta Solares. UCLV, Cuba. E-mail: aasolares@uclv.cu

2- Omar Pérez Navarro. UCLV, Cuba. E-mail: opnavarro@uclv.cu

3- Enrique R. Pérez Cruz. Laboratorio de fermentaciones, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus (CIGBSS), Cuba. E-mail: enrique.perez@cigb.edu.cu

4- Duniesky Martínez García. Laboratorio de fermentaciones, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus (CIGBSS), Cuba. E-mail: enrique.perez@cigb.edu.cu

5- Néstor Ley Chong. UCLV, Cuba. E-mail: nley@uclv.cu

6- Erenio González Suárez. UCLV, Cuba. E-mail: erenio@.uclv.edu.cu

**Resumen:**

* **Problemática:**

El empleo de la hidrólisis ácida de la sacarosa en una instalación productora de glucosa, afecta la calidad y rendimiento del producto obtenido.

* **Objetivo:**

Evaluar la etapa de inversión enzimática de la sacarosa a partir del escalado de las variables experimentales óptimas.

* **Metodología:**

Se combinó el diseño de experimentos y la optimización del comportamiento de las variables experimentales influyentes en el porciento de hidrólisis alcanzado con el biocatalizador termoestable PpABfrA. Se determinaron las consecuencias de los criterios de escalado sobre los distintos parámetros operacionales en un volumen piloto. Se escaló el criterio seleccionaldo a un volumen industrial de 7,96 m3. Se seleccionó la tecnología, se determinaron los consumos auxiliares pera la adaptación de esta etapa y se realizó un análisis económico comporativo.

* **Resultados y discusión:**

Este biocatalizador se seleccionó dada su elevada termoactividad y termoestabilidad. El ajuste de los resultados experimentales a un Diseño Compuesto Central arrojó un 85,6 % de hidrólisis óptimo alcanzado en 12 h y una concentración inicial de sacarosa de 1,75 M. Del análisis de los criterios de escalado aplicados a la propuesta de reactor piloto, mantener el cizallamiento del biocatalizador constante, resultó ser la alternativa operacional más acertada. En condiciones de máximo aprovechamiento de la capacidad instalada se estima una producción anual de 2865 t de glucosa, 4386 t de sirope rico en fructosa y 54 t de biocatalizador inactivo como alimento animal.

* **Conclusiones:**

El análisis económico comparativo demuestra que la inversión enzimática de la sacarosa constituye una alternativa superior a la hidrólisis ácida, con un aumento de 1,51 veces el valor de la producción.

***Abstract:***

* ***Problem:***

*The use of acid hydrolysis of sucrose in a glucose production facility affects the quality and yield of the product obtained.*

*Objective:*

*To evaluate the enzymatic inversion stage of sucrose from the scaling of optimal experimental variables.*

* ***Methodology:***

*The design of experiments and the optimisation of the behaviour of the experimental variables influencing the percentage of hydrolysis achieved with the thermostable biocatalyst PpABfrA were combined. The consequences of the scaling criteria on the different operational parameters were determined in a pilot volume. The selected criteria were scaled up to an industrial volume of 7,96 m3. The technology was selected, the auxiliary consumptions for the adaptation of this stage were determined and a behavioural economic analysis was performed.*

* ***Results and discussion:***

*This biocatalyst was selected given its high thermoactivity and thermostability. The adjustment of the experimental results to a Central Composite Design yielded an 85,6 % of optimal hydrolysis achieved in 12 h and an initial sucrose concentration of 1,75 M. From the analysis of the scaling criteria applied to the pilot reactor proposal, keeping the biocatalyst shear constant proved to be the most successful operational alternative. Under conditions of maximum utilisation of the installed capacity, an annual production of 2865 t of glucose, 4386 t of fructose-rich syrup and 54 t of inactive biocatalyst as animal feed is estimated.*

* ***Conclusions:***

*Comparative economic analysis shows that enzymatic inversion of sucrose is a superior alternative to acid hydrolysis, with a 1,51-fold increase in production value.*

**Palabras Clave:**

Biocatalizador; Escalado; Glucosa; Hidrólisis enzimática; Óptimo; Termoestabilidad

***Keywords:***

*Biocatalyst, Scale-up, Glucose, Enzymatic hydrolysis, Optimum, Thermostability*

**1. Introducción**

La sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa, y a su vez el compuesto orgánico de mayor producción en forma pura, que por hidrólisis se descompone en estos monosacáridos para obtener como producto el azúcar invertido(Díaz y col., 2020). En la actualidad, la producción de azúcares invertidos, dada su elevada demanda y aplicabilidad, constituye un pilar fundamental como fuente impulsora del desarrollo económico.

La fructuosa es el azúcar más dulce de los edulcorantes naturales, por lo que es ampliamente utilizada en la elaboración de dulces y bebidas refrescantes. Por su parte, la glucosa constituye un sustituto viable de la sacarosa, permitiendo su uso junto con una variedad de sustancias sólidas secas, sin que afecte otros parámetros importantes tales como el poder edulcorante, contenido de cenizas y acidez(Bueno, 2018). Esta ventaja le otorga un amplio mercado en la industria química, farmacéutica y alimentaria, constituyendo una fuente de materia prima fundamental para otras producciones.

A nivel global una de las principales fuentes de obtención de glucosa es a partir del azúcar refino, al igual que el almidón de maíz como sustratos más utilizados; donde la inversión se logra a partir de la acción de un ácido a temperatura elevada, por intercambio iónico o por la presencia de la enzima invertasa(Gómez et al., 2017).

En una instalación industrial, asociada a la industria de derivados de la caña de azúcar se obtiene glucosa y sirope rico en fructosa. Esta lleva a cabo el proceso productivo con una tecnología de origen cubano, donde se desarrolla la hidrólisis ácida de la sacarosa. Este método de inversión ha reportado elevados consumos de materia prima y bajos rendimientos en el producto final, unido con la generación de productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados, y la aceleración de los procesos corrosivos(Cortés y col., 2020ª). Estos inconvenientes, unidos con dificultades operacionales en las diferentes etapas del proceso, han provocado que los niveles productivos de glucosa anuales sean insuficientes para satisfacer la demanda actual de este producto como materia prima para la producción de sorbitol.

Estudios realizados sobre el empleo de la hidrólisis enzimática de la sacarosa demuestran un aumento del rendimiento del proceso superior al del empleo de un ácido a temperatura elevada(Gómez et al., 2017), además de otorgar una mayor estabilidad química y microbiológica de glucosa obtenida.

La utilización de la enzima invertasa sumergida, a pesar de reportar resultados satisfactorios en cuanto a la operación de hidrólisis, presenta como principal desventaja económica la no recuperación y separación del sistema de reacción. Estudios sobre la concentración óptima a emplear, demuestran elevados consumos de esta enzima con vistas a su utilización en procesos industriales (Cortés y col., 2020b).

 A diferencia de las precipitaciones de enzimas solubles, la utilización de las enzimas inmovilizadas permite la reutilización continua del biocatalizador, además de presentar una mayor termoestabilidad, fácil separación de las mezclas de reacción y la posibilidad de emplear una alta actividad enzimática por volumen del reactor(Cortés y col., 2020ª). Por lo que la implementación de una tecnología enzimática capaz de operar a elevadas temperaturas con una termoestabilidad que permita la reutilización del biocatalizador constituye una alternativa novedosa desde el punto de vista técnico-económico.

Estudios realizados sobre el empleo de la enzima invertasa inmovilizada para la hidrólisis de la sacarosa, demuestran que la β-fructosidasa de *Thermotoga maritima* (BfrA) expresada en *Pichia pastoris* e inmovilizada en alginato de calcio (PpABfrA), puede operar a valores de temperaturas comprendidos entre 50-70 ºC (Martínez et al., 2014ª), lo que permite hidrolizar mayores concentraciones de sustrato, que con la enzima invertasa de *Sacharomyces cerevisiae* inmovilizada(Gómez, 2015). La elevada termoactividad y termoestabilidad reportada para este biocatalizador lo convierten en una alternativa novedosa y atractiva para su implementación a escala industrial.

La determinación de la influencia de las condiciones experimentales óptimas en el porciento de hidrólisis, constituye una base fundamental para el diseño tecnológico, donde la aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) constituye una propuesta eficaz. Esta permite obtener los niveles óptimos en las variables de control que producen los valores de respuestas máximas (o mínimas) en ciertas regiones de interés, o buscar una solución de compromiso que mejore la calidad del producto o servicio (Acosta y col., 2021).

Atendiendo a ello, el objetivo del trabajo es evaluar la etapa de inversión enzimática de la sacarosa a partir del escalado de las variables experimentales óptimas, reportadas para la reacción de hidrólisis con el biocatalizador PpABfrA y la consideración de los principales consumos de auxiliares asociados a la preparación del sustrato y la concentración del licor invertido, en un instalación productora de glucosa.

**2. Metodología**

Se combinó el diseño de experimentos y la optimización del comportamiento de las variables experimentales influyentes en el porciento de hidrólisis alcanzado con el biocatalizador termoestable PpABfrA. Se determinaron las consecuencias de los criterios de escalado sobre los distintos parámetros operacionales en un volumen piloto con vistas a la selección del criterio más acertado para la operación a escala industrial. En base a esta selección se escalaron las condiciones operacionales a los niveles industriales de la instalación objeto de estudio y de acuerdo, a las demandas de las principales variables que se controlan en el proceso, se realizó la selección de la tecnología correspondiente a la preparación del sustrato y posterior concentración de la mezcla invertida, y se determinaron los consumos de auxiliares asociados. Los balances de materiales y energía para estas etapas y la valorización de la glucosa como producto principal, además del sirope rico en fructosa y del biocatalizador desactivado, permitieron realizar un análisis económico comparativo respecto a la tecnología instalada.

**2.1. Modelación y optimización del comportamiento de las variables experimentales en el porciento de hidrólisis**

Para la evaluación de las condiciones de operación, se realizó el análisis de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento cinético del biocatalizador en un reactor discontinuo tipo tanque agitado (Martínez et al., 2015), donde se determinó el porcentaje de hidrólisis de la sacarosa mediante la determinación de la fructosa liberada a concentraciones de sustrato entre 0,29 M y 2,04 M, pH 5,5, una temperatura de 60 ºC, agitación de 100 rpm y una relación de peso de biocatalizador (g)/ volumen de reacción (ml) de 1:10. Cabe destacar que el sistema discontinuo de reacción permite establecer un control estricto sobre las variables operacionales(Ceballos y col., 2016), en este caso el pH y la temperatura y por otro lado, el sistema agitado para un tiempo de reacción que supera las 6 h asegura la debida interacción enzima sustrato para reportar elevados porcientos de inversión en esta operación (Martínez et al., 2014b).

Para la determinación del modelo estadístico que relaciona la influencia de la concentración inicial de sacarosa () y el tiempo de reacción () con la conversión alcanzada, se utilizó un Diseño Experimental Compuesto Central (DCC), desarrollado con el software Statgraphics Centurion XV.II para los dos factores experimentales (). Se consideró un rango de variación de entre 1,46 M y 2,04 M, lo que permite el estudio del comportamiento de la reacción para un tiempo que varía desde 6 h hasta 12 h(Martínez et al., 2017). Se generaron 5 puntos centrales en el cubo ( y puntos axiales para un total de N puntos en el diseño (Yaguas, 2017). Para (Ruíz y col., 2017), se generaron 13 puntos, con una distancia rotacional () igual a 1,41. Se comprobó el ajuste de los coeficientes del modelo cuadrático por análisis de regresión; se determinaron las coordenadas del punto de máximo porciento de hidrólisis dentro de la región experimental, ubicado sobre la cordillera óptima a partir del centro del diseño, mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR); y se analizaron los resultados para un valor de de 1,75 M como restricción.

**2.2.** **Propuesta de escalado de la reacción biocatalizada por PpABfrA**

Atendiendo a las condiciones operacionales ensayadas en un reactor modelo () con un volumen de trabajo (de 5 l (Martínez et al., 2017), se aplicaron los criterios de escalado para un reactor piloto () de 500 l. La similitud geométrica se garantizó para una relación diámetro del impelente ()/ diámetro del tanque () igual a 0,3 y una relación de altura del impelente *()/* de 0,9 dentro de los rangos establecidos(Kasatkin, 1985), mientras que mantener igual relación de alimentación aseguró la similitud química para iguales valores de pH y temperatura. Garantizada las similitudes geométrica y química se analizaron la aplicación de cinco criterios de escalado sobre los parámetros operacionales(Rodríguez y Blazquez, 2010). Para igual velocidad en la punta del impulsor *() m = () p*, los valores de los parámetros se calculan como:

Para igual potencia volumétrica *() m= () p*  el Reynold de mezclado *()* se calcula por la ecuación (2), mientras que el resto de los parámetros se determinan como sigue:

Al mantener igual velocidad del impulsor , la potencia consumida en la agitación *()* está dada por la ecuación (3) y el se expresa como:

Al consumir igual potencia en la agitación el se calcula por la ecuación 2 y se cumple que:

Para igual régimen de mezclado , la se determina por la ecuación (3) y la velocidad de agitación () se expresa como:

Donde es el número de potencia (Kasatkin, 1985), es la densidad del medio de reacción y es la viscosidad.

A partir de la evaluación preliminar de los criterios de escalados sobre los parámetros operacionales, se seleccionó el criterio más adecuado para la operación a escala industrial. De acuerdo a esta selección, se hizo efectivo el diseño a un de 7,96 m3, para un total de tres biorreactores de 10 m3 () cada uno, teniendo en cuenta la capacidad instalada y la disponibilidad de tres tanques con estas dimensiones en el centro.

Para el diseño de la camisa para la circulación del medio de intercambio con régimen de flujo en mezcla perfecta, que permite mantener las condiciones isotérmicas en el reactor, se calculó el calor de reacción mediante el modelo de Kirchoff (Matos y Hing, 2014) a una temperatura constante de 60 ºC. Los calores estándares de formación y las capacidades caloríficas de las sustancias participantes se determinaron mediante el software ChemDraw Ultra 8.0, a partir el principio de contribución de grupos de Joback(Pérez y col., 2020) . Se tuvo en cuenta que la constante cinética para una concentración inicial de sacarosa de 1,75 M es de 0,1463 h-1 (Martínez et al., 2015). Los modelos para la determinación de los de los coeficientes de transferencia de calor y el área requerida (Viera, 2007; Kern, 2005)como parte del procedimiento metodológico para el cálculo de la chaqueta se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.Procedimiento metodológico para el cálculo de los requerimientos de transferencia de calor en la operación de hidrólisis

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Parámetros | Modelo | n.º |
| Coeficiente pelicular de transferencia de calor |  |  |
| Coeficiente pelicular referido al diámetro exterior |  |  |
| Coeficiente total de transferencia de calor limpio |  |  |
| Coeficiente total de transferencia de calor sucio |  |  |
| Área de transferencia de calor |  |  |
| Calor intercambiado |  |  |
| Temperatura de salida del medio |  |  |
| Temperatura de entrada del medio |  |  |

 Fuente: elaboración propia

Donde es el factor de transferencia de calor, es la viscosidad a la temperatura de la pared, es la conductividad térmica, es la constante cinética, es la cantidad de sustancia de sacarosa inicial, es el diámetro del reactor, es el diámetro de la camisa, es la altura del líquido en el reactor, es la conversión alcanzada, es el calor de reacción a la temperatura de entrada de los reactantes, es el factor de obstrucción total, es la temperatura del medio de reacción, y son las temperaturas de entrada y de salida del medio de intercambio respectivamente.

**2.3. Selección tecnológica y consumos auxiliares asociados a la preparación del sustrato y concentración del licor invertido. Análisis económico**

Encaminado a lograr la homogeneidad del medio de reacción requerida en la operación de hidrólisis, se concibió un sistema de disolución de 2,7 m3 efectivos para disolver la cantidad de sacarosa necesaria para la operación de cada biorreactor, donde son necesarios dos ciclos de inversión para cada uno. Las características geométricas del tanque con un criterio de diseño de igual diámetro () y altura del líquido () se relacionan como:

De acuerdo a las propiedades del fluido se seleccionó un agitador de hélice con una relación igual a 0,25 y una relación de 0,6 con una velocidad de agitación y consumo de potencia que se calculó de igual forma que en la evaluación de los parámetros de escalado para las condiciones de disolución.

Para asegurar los valores de temperatura deseados desde las etapas iniciales del proceso y propiciar la homogeneidad del medio dada la disminución de la viscosidad, se propuso un intercambiador de calor de tubos y coraza, que garantiza una elevada superficie de transferencia de calor (Espinosa y col., 2019). El objetivo de esta etapa es elevar la temperatura de la solución azucarada (60 ºBx) desde 30 ºC hasta 60 ºC, por el cual se hace pasar a su vez agua para completar la carga de los birreactores para una concentración requerida por el medio de reacción de 49,1 ºBx (1,75 M). La demanda de vapor de escape () como medio de calentamiento con su correspondiente calor latente (), está relacionada con el flujo másico de solución a calentar (), su capacidad calorífica () y la diferencia de temperatura requerida (), por la ecuación del balance energético expresada como:

Además se determinó el consumo de requerimientos auxiliares para la concentración de la solución invertida desde 49,1 ºBx ( hasta 79 ºBx (. Este es el valor requerido para lograr la cristalización de la glucosa presente en la misma a una temperatura de aproximadamente 30 ºC(Gómez, 2015). Se seleccionó un doble efecto de evaporación teniendo en cuenta que a mayor número de efectos, mayor es la cantidad de evaporación por kilogramos de vapor de calentamiento admitido en el primer vaso (Kern, 2005), lo que indica menor consumo de vapor y de agua alimentada al condensador y, por tanto, menores costos operacionales. Esto se balancea, sin embargo, por el aumento en el costo inicial de los equipos y los cargos asociados al mantenimiento y limpieza. En este caso, los consumos de vapor son pequeños y a su vez es un proceso discontinuo, por lo que lo que los cargos fijos no justifican un número mayor de efectos.

Para el consumo de vapor ( se consideró la relación
 (Ulrich, 1990), teniendo en cuenta un rendimiento () de 0,83 dada la elevación del punto de ebullición que origina la concentración de sólidos disueltos. Donde es la evaporación total definida como . Con un flujo de alimentación () de 2,356 kg/s establecido para llevar a cabo esta operación en un tiempo aproximado de 3 h, la es de 0,892 kg/s, a partir del cual se estableció la siguiente relación:

El consumo de agua ( está directamente vinculado a la evaporación en el último vaso y al calor latente correspondiente, cuyo cálculo se fundamenta en la ecuación (18). En este caso se alimenta agua a 30 ºC con una capacidad calorífica () de 4174 J/kg. Por requerimientos ambientales se estableció una temperatura de salida de la misma de 48 ºC. Para una presión establecida en el último vaso de 26 plg Hg, el calor latente del vapor es de 2,37106 J/kg.

La estimación de los costos operacionales asociados a esta etapa para ambas tecnologías se realizó a partir de los consumos de materias primas, productos y servicios auxiliares con los precios actualizados correspondientes (ACUBA, 2020; Ministerio de Finanzas y Precios, 2020), considerando un periodo anual laborable de 330 días.

**3. Resultados y discusión**

**3.1. Modelación y optimización del porciento de hidrólisis**

Los valores experimentales de los factores , y el porciento de hidrólisis () como respuesta evaluada, ajustados a un DCC se representan en la Tabla 2. A su vez se observa la matriz de diseño para la ampliación del diseño factorial con cuatro puntos axiales y cinco puntos centrales.

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño fue:

De acuerdo a los valores promedio de los rendimientos observados (Ȳ) y estimados (Ŷ), se aprecia que el porcentaje de hidrólisis oscila entre 40 y 99,80 %, obteniéndose el mayor valor para una concentración de 1,16 M en un tiempo de 9 h. Este comportamiento sugiere el efecto de curvatura para un adecuado ajuste y la existencia de un óptimo en la región de estudio.

Tabla 2.DCC para las variables independientes y variable respuesta de la hidrólisis enzimática

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Corridas | Factores experimentales | Factores codificados | Variable respuesta |
| Tiempo (h) | Concentración de sacarosa (M) |  |  | ObservadoȲ | EstimadoŶ |
| 1 | 9 | 1,75 | 0 | 0 | 73,00 | 72,29 |
| 2 | 12 | 1,75 | 1,41 | 0 | 88,00 | 85,60 |
| 3 | 9 | 2,16 | 0 | 1,41 | 40,00 | 39,70 |
| 4 | 5 | 1,75 | -1,41 | 0 | 49,00 | 51,83 |
| 5 | 10 | 2,04 | 1 | 1 | 50,00 | 53,48 |
| 6 | 9 | 1,75 | 0 | 0 | 73,10 | 72,29 |
| 7 | 9 | 1,75 | 0 | 0 | 72,90 | 72,29 |
| 8 | 9 | 1,75 | 0 | 0 | 72,80 | 72,29 |
| 9 | 9 | 1,75 | 0 | 0 | 73,20 | 72,29 |
| 10 | 10 | 1,46 | 1 | -1 | 90,00 | 94,57 |
| 11 | 6 | 1,46 | -1 | -1 | 70,00 | 68,52 |
| 12 | 6 | 2,04 | -1 | 1 | 42,00 | 40,17 |
| 13 | 9 | 1,16 | 0 | -1,41 | 99,80 | 98,86 |

 Fuente: elaboración propia

En la evaluación estadística del grado de ajuste a los valores experimentales, el análisis de varianza indicó que el modelo ajustado es significativo para un valor de 0,021 , donde no resultó ser significativo. La suma de cuadrados del error puro (0,10) resultó pequeña con respecto a la suma de cuadrados del total (4174,41), lo que indica una buena reproducibilidad en el punto central (Chirinosa y col., 2017). Respecto al coeficiente de determinación , el modelo ajustado explica el 98,65 % de la variabilidad de la respuesta, por lo que se logra un buen ajuste para la optimización. Además, existió una buena correlación entre los valores experimentales para un y los valores estimados para un La relación entre ambos factores, se muestra en la Figura 1, donde se representa la superficie de respuesta estimada. La zona de maximización de la respuesta corresponde a tiempos superiores de 9 h y una concentración de sacarosa que abarca hasta 1,5 M aproximadamente, región que comprende los valores hacia los cuales está encaminada la optimización. La representación obtenida indica un comportamiento lineal del tiempo con pendiente positiva, reportándose los mayores valores de inversión con el aumento del tiempo de hidrólisis, mientras que la concentración de sacarosa presenta un efecto de curvatura.



Figura 1. Superficie de respuesta para los efectos tiempo-concentración de sacarosa en el porciento de hidrólisis (Fuente: elaboración propia)

De acuerdo a las operaciones posteriores del proceso, donde es necesario lograr una solución sobresaturada para la cristalización, es conveniente trabajar con soluciones de mayor concentración, donde se alcancen porcentajes considerables de inversión en igual período de tiempo. Para ello se optimizó con 1,75 M como restricción, alcanzándose un 85,60 % de inversión en un tiempo de 12 h. De acuerdo a estudios realizados para la hidrólisis enzimática con este biocatalizador(Martínez et al., 2015), este valor de concentración se fijó teniendo en cuenta, además del criterio anterior, que a concentraciones elevadas de sacarosa se evitan pasos de concentración, se reducen los volúmenes de operación y disminuye la posibilidad de contaminación microbiana; aunque se tuvo en cuenta como compromiso que a mayores concentraciones ocurren la inhibición por sustrato y los problemas de transferencia de masa. Los resultados obtenidos indican que las 12 horas de reacción constituye el tiempo óptimo donde se corrobora un 90 % de inversión alcanzado experimentalmente (Martínez et al., 2017) para iguales valores de y El efecto creciente de la respuesta con el tiempo se ha evidenciado en estudios experimentales de la reacción de hidrólisis catalizada para diferentes concentraciones de sacarosa(Martínez et al., 2015).

**3.2. Escalado de la reacción biocatalizada por PpABfrA**

La selección de uno u otro criterio de escalado para un volumen piloto de 500 l, está sujeto al análisis de las consecuencias de adoptar cada uno de ellos en el sistema de reacción. La determinación de las consecuencias se realiza a través del cálculo teórico de cada uno de los parámetros que caracteriza el sistema como se relaciona en (1) - (8) para y , cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.Valores de los parámetros para los distintos criterios de escalado

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Criteriosde escalado | Modelo | Valores en el prototipo |
| (rpm) | (rpmm) |  | (W) | (W/L) |
| *cte* | 60 | 1,060 | 4,6413,9 | 21,531,2·104 | 1032,4·10-1 | 104,8·10-4 |
| *cte* | 3 | 0,2213 | 1,03,0 | 4,642,6·103 | 13,83,3·10-3 | 0,146,6·10-6 |
| *cte* | 553 | 2,8·10-21,66 | 0,130,38 | 1,0553 | 4,6·10-21,1·10-5 | 4,6·10-42,2·10-8 |
| *cte* | 2,4·10-4 | 7,7·10-24,65 | 0,361,08 | 1,66917 | 1,02,4·10-4 | 0,014,8·10-7 |
| *cte* | 4,8·10-5 | 0,3622 | 1,675,0 | 7,754,3·103 | 1002,4·10-2 | 1,04,8·10-5 |

 Fuente: elaboración propia

Al analizar los valores obtenidos, se evidencia un comportamiento similar al del escalado de las condiciones experimentales al reactor modelo (Martínez et al., 2017). Si se mantiene como criterio de escalado igual velocidad en la punta del impulsor, el número de Reynolds de mezclado se incrementa 4,6 veces, proporcionalmente al aumento del diámetro del agitador. Al mismo tiempo, disminuye la velocidad de agitación, asegurando un régimen de mezclado, que al igual que el ensayado inicialmente, sea capaz de garantizar la homogeneidad y difusión de la sacarosa como parte de los mecanismos de transferencia de masa. Además, se comprobó un incremento de la potencia total de 13,8 veces y una disminución de la potencia volumétrica de 0,14 veces respecto al biorreactor modelo. Este criterio a su vez reportó resultados satisfactorios en el escaldo de la reacción de biosíntesis de fructooligosacáridos a partir de la sacarosa, catalizada por un biocatalizador conformado por células recombinantes vivas de Pichia pastoris inmovilizadas en alginato de calcio (Pérez y col., 2011). Teniendo en cuenta estos fundamentos, con la aplicación de este criterio se han de lograr resultados satisfactorios en la operación del reactor piloto.

La aplicación de otros criterios de escalado fue descartada. Por ejemplo, si se mantiene constante la velocidad de agitación se producirá un aumento en el consumo de potencia de 1000 veces, mientras que para igual potencia volumétrica se produce un incremento de 100 veces, lo que económicamente no es factible. Al aplicar los criterios de igual potencia o igual número de Reynolds de mezclado, no se logrará la homogeneidad requerida en el sistema para garantizar la suspensión de las perlas y la difusión de la solución de sacarosa; causado fundamentalmente por la notable diminución de la potencia por unidad de volumen y la velocidad de agitación en la punta del impelente.

Considerando resultados satisfactorios en la operación del reactor piloto, en correspondencia con los resultados experimentales reportados, se propuso el sistema de inversión enzimática a escala industrial, manteniendo los criterios de similitud geométrica, química y velocidad en la punta del agitador constante. Como consecuencia de asumir este criterio, la velocidad de agitación reportó una valor de 5,23 rpm, disminución que se fundamenta en el aumento del régimen de turbulencia en el medio y por otro lado, un consumo de potencia 5,2 veces superior al del reactor piloto. Las características geométricas y los parámetros operacionales del reactor modelo, piloto e industrial se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.Parámetros operacionales y de diseño de los reactores modelo, piloto e industrial

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Parámetros | Modelo | Piloto | Industrial |
|  | 0,05 m | 0,23 m | 0,58 m |
|  | 0,15 m | 0,94 m | 2,33 m |
|  | 0,045 m | 0,209 m | 0,52 m |
|  | 7 l | 650 l | 10 m3 |
|  | 5 l | 500 l | 7,96 m3 |
|  | 60 rpm | 13 rpm | 5,23 rpm |
|  | 553,38 | 2,6·103 | 5,5·103 |
|  | 2.4·10-4 W | 3,3·10-3 W | 1,7·10-2 W |
| Tipo de impelente | hélice | hélice | hélice |

 Fuente: elaboración propia

En condiciones de máximo aprovechamiento de la capacidad instalada se consumen 12,6 t de azúcar refino por cada inversión. Para un número total de 16 inversiones de 12 h de reúso del biocatalizador sin pérdida apreciable de actividad(Menéndez et al., 2014), es posible hidrolizar 201,6 t de materia prima con un consumo de 2,1 t de biocatalizador. Estableciendo continuidad en el proceso de carga de los biorreactores (Albernas y col., 2010) una vez culminada las 12 h de inversión, para un tiempo de llenado de cada uno de 1 hora y 15 minutos, se estimó un tiempo de reúso del biocatalizador de 11 días.

En la Tabla 5 se presenta el procedimiento y los resultados de la estimación de la entalpia de hidrólisis de la sacarosa a una temperatura de 60 ºC

Tabla 5. Estimación de la entalpía de hidrólisis de la sacarosa a 60 ºC

|  |  |
| --- | --- |
| P: 1 atm, T: 25 | 108,65 kJ/mol107,65 kJ/mol |
| Componentes | ( kJ/mol) | (kJ/mol K) |
| Sacarosa | -1 917,41 | 0,379 |
| Agua | -283 | 0,075 |
| Glucosa | -1 035,02 | 0,214 |
| Fructosa | -1 056,74 | 0,210 |

 Fuente: elaboración propia

La entalpía de hidrólisis muestra que la reacción se desarrolla sin efectos energéticos apreciables, pero con un comportamiento ligeramente endotérmico. Mantener la temperatura constante del medio de reacción, evita la detención de la actividad del catalizador a temperaturas relativamente bajas.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la determinación de la demanda de transferencia de calor a partir de los modelos de la Tabla 1.

Tabla 6. Resultados de la determinación de los requerimientos de transferencia de calor en la hidrólisis enzimática de la sacarosa

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Parámetros calculados | Datos | Resultados |
| Coeficiente pelicular de transferencia de calor  | ; =125W/m | 75,32 W/m2 ºC |
| Coeficiente pelicular referido al diámetro exterior  |  | 73,81 W/m2 ºC |
| Coeficiente total de transferencia de calor limpio  | - | 37,28 W/m2 ºC |
| Coeficiente total de transferencia de calor sucio  | =3,5·10-4 m2/ W | 36,80 W/m2 ºC |
| Área de transferencia de calor  | =2,33 m; H=1,63 m | 16 m2 |
| Calor intercambiado  | =0,83; =0,1463 h-1; =12,2 kmol=107,65 kJ/mol | 9213 W |
| Temperatura de salida del medio  |  = 60ºC | 75,65 ºC |
| Temperatura de entrada del medio  | - | 78 ºC |

 Fuente: elaboración propia

Dado el comportamiento de primer orden que presenta la reacción de hidrólisis para la concentración de sacarosa de trabajo, con constante cinética de 0,1463 h-1 (Martínez et al., 2015), la conversión teórica alcanzada para las 12 horas de reacción es de 0,83. Para el intercambio energético necesario dada la entalpía de hidrólisis, se calculó un área de transferencia de 16 m2 inferior a 17 m2 de superficie lateral que presentan los biorreactores.

**3.3. Consumos asociados a las tecnologías auxiliares de la etapa de inversión enzimática**

Para garantizar las condiciones operacionales de la inversión enzimática de la sacarosa mediante el biocatalizador PpABfrA, es necesario la disolución previa del contenido de azúcar refino a alimentar y elevar la temperatura de dicha solución hasta la requerida por el medio de reacción. Un tanque agitado con de 2,7 m3, un de 1,5 m según la ecuación (17) y agitador de hélice de 0,375 m de , garantiza la obtención de una solución concentrada de sacarosa (60 ºBx). Establecido un régimen turbulento de mezclado de 8·104, la velocidad de agitación requerida según la ecuación (8) es de 900 rpm, con un consumo de potencia de 9,67 kW según la relación representada en el modelo (3) para un correspondiente de 0,3.

La satisfacción de la demanda de vapor de escape a 113 ºC y 1,54 atm de presión para la operación de calentamiento, está sustentada en el sistema auxiliar generador de vapor de la planta existente. Esta etapa está concebida para elevar la temperatura de un flujo másico de solución de sacarosa de 3,86 kg/s. Teniendo en cuenta el balance energético representado en la ecuación (18) la requerida es de 0,14 kg/s.

Igual fuente energética se considera para la operación de concentración mediante un doble efecto, que en el análisis preliminar representado en (19) demanda un flujo de vapor de 0,57 kg/s, mientras que el flujo de agua alimentado al condensador para el intercambio energético descrito en la ecuación (18) para las condiciones establecidas, reporta un valor de 14,06 kg/s.

**3.4. Análisis económico comparativo**

La contabilización de los requerimientos tanto de la operación de hidrólisis como las operaciones auxiliares que requiere la adaptación de la nueva tectología, permite realizar un análisis económico comparativo de los costos operacionales y los valores productivos asociados a la valorización de los productos y coproductos derivados del proceso. Para el periodo anual laborable establecido y el tiempo de reúso estimado para el biocatalizador, se podrá llevar a cabo 30 ciclos continuos con 16 inversiones cada uno para la hidrólisis enzimática; mientras que para la hidrólisis ácida se realizan un total de 165 ciclos con una inversión cada uno. En la Tabla 7 se muestran los principales elementos de costo de esta etapa para ambas tecnologías y la salida comercial de los productos y coproductos, mediante los balances de materiales y energía en condiciones de máximo aprovechamiento de la capacidad instalada.

Tabla 7.Elementos de costos de operación de la etapa de inversión de la sacarosa e ingresos de la producción de glucosa por ambas tecnologías

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Indicadores | Hidrólisis ácida | Hidrólisis enzimática |
| Volúmenes | Costos(USD/año) | Volúmenes | Costos(USD/año) |
| Consumo de azúcar refino  | 3 715,45 t | 1 189 584 | 6 048 t | 1 935 360 |
| Consumo de biocatalizador  | - | - | 63 000 kg | 42 210 |
| Consumo de ácido fosfórico  | 3,75 t | 7 093,13 | - | - |
| Consumo de electricidad  | 32 914,20 kW-h | 3 949,70 | 25 492,80 kW-h | 3059,14 |
| Consumo de vapor  | 295,68 t | 11 235,84 | 3 417,60 t | 129 868,80 |
| Consumo de agua  | 1 125,30 m3 | 8,21 | 83 697,60 m3 | 610,99 |
| Número de obreros  | 2 | 3 000 | 3 | 4 500 |
| **Costos totales operación** |  | **1 213 370,88** |  | **2 115 608,93** |
| Glucosa producida  | 679,80 t | 277 582,73 | 2 865 t | 1 169 865,45 |
| Sirope de fructosa producido  | 4 387,35 t | 1 673 554,66 | 4 385,70 t | 1 672 925,27 |
| Catalizador inactivo generado  | - | - | 54 300 kg | 108 600 |
| **Valor de la producción** |  | **1 951 137,39** |  | **2 951 074,66** |

 Fuente: elaboración propia

En el análisis comparativo se aprecia que el valor de la producción de la glucosa enzimática supera en 1,51 veces el valor de la producción de la glucosa ácida. Esto se debe fundamentalmente al incremento del número de inversiones con un menor consumo de azúcar refino que permite operar dentro de las capacidades instaladas, los elevados rendimientos alcanzados en el proceso de reacción a partir del biocatalizador inmovilizado y la salida comercial del biocatalizador inactivo como alimento animal de alto valor nutritivo. A su vez, el trabajo con soluciones menos concentradas reporta un menor consumo energético y facilita la operación de transporte de los fluidos. De acuerdo a los costos de operación totales, se estima un costo unitario para esta etapa del proceso de 1784,89 USD/t glucosa y 699,41 USD/t glucosa para la hidrólisis ácida y enzimática respectivamente. Por lo que esta última genera no solo beneficios de calidad del producto final, sino también económicos, demostrando su factibilidad.

**4. Conclusiones**

1. La hidrólisis de la sacarosa con el biocatalizador PpABfrA reporta parámetros operacionales beneficiosos para su utilización en sistemas industriales de producción, dada sus propiedades termoestables y características no tóxicas del soporte; permitiendo a su vez, hidrolizar soluciones más concentradas de sacarosa que biocatalizadores que utilizan la enzima invertasa de *Sacharomyces cerevisiae*, con buenas propiedades para su reúso en sistemas discontinuos de reacción.
2. La aplicación de la MSR a los datos experimentales considerados, demostró el efecto creciente del porciento de hidrólisis al aumentar el tiempo de reacción, alcanzando a las 12 h y concentración de 1,75 M un 85,6 % de inversión en correspondencia con los rendimientos experimentales que se registran.
3. Mantener como criterio de escalado velocidad en la punta del impulsor constante ofrece parámetros operacionales satisfactorios para el desarrollo de la reacción biocatalítica.
4. El análisis económico comparativo demuestra que la inversión enzimática de la sacarosa constituye una alternativa superior a la hidrólisis ácida al reportar mayores beneficios económicos en cuanto a rendimiento y calidad, menores impactos ambientales por la sustitución de sustancias agresivas y un menor consumo energético asociado al manejo de soluciones menos concentradas; con un aumento de 1,51 veces el valor de la producción de la hidrólisis enzimática respecto a la ácida, debido en lo fundamental a los elevados valores de conversión alcanzados en la nueva tecnología y la venta del biocatalizador inactivo como alimento animal de alto valor nutritivo.
5. **Referencias bibliográficas**
6. Acosta, A.; Pérez, O.; Albernas, Y.; Cortés, M. F. Potencialidades de la Metodología de Superficie Respuesta en la optimización experimental en la industria química y alimentaria. *Centro Azúcar*. 2021, 48 (4), 123-138.
7. Albernas, Y.; Pedraza, J.; González, E.; González, M. Metodología preliminar para el Análisis de Sistemas Discontinuos. *Centro Azúcar*. 2010, 37(2), 16-23.
8. AZCUBA. Resolución 193/2020, Empresa Azucarera Villa Clara, 2020.
9. Bueno, K. Efecto de la membrana en la recuperación de jarabes de glucosa a partir de residuos agrindustriales. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, 2018.
10. Ceballos l. E., Farías, L.; Rosales, L. Problemas y soluciones en el diseño de reactores enzimáticos. *Investigación y ciencia*. 2016, 24(67), 78-85.
11. Chirinosa, R.; Mendozaa, R.; Aguilar-Gálveza, A.; Camposa, D. Hidrólisis química y enzimática de extracto de yacón (Smallanthus sonchifolius) para la producción de fructosa. *Rev. Soc. Quím*. 2017, 83(2).
12. Cortés, M. F.; Ruíz, I. C.; Alomá, I. C.; González, E.; Carrillo, L.E. Diseño de intercambiadores de calor para intensificar el proceso de obtención de glucosa en la UEB Chiquitica Fabregat. *Centro Azúcar.* 2020a, 47 (1).
13. Cortés, M. F.; Pérez, O.; Alomá, I.; Leiva, J. Búsqueda de la regresión óptima en la hidrólisis enzimática en la producción de glucosa. *Revista ICIDCA*. 2020b, 54(2), 17-25.
14. Díaz, L. R.; Zumalacárregui, L.; Pérez, O.; González, G. A. Evaluación del proceso de producción de glucosa a partir de sacarosa en la UEB Argentina. *Tecnología Química.* 2020*,* 40 (3).
15. Espinosa, R. O.; Hernández, J. P.; Goya, F. A.; Leiva, J. Integración de procesos energéticos, cogeneración y avances en transferencia de calor en la industria química, Santa Clara, FEIJÓO, 2019.
16. Gómez, L. Estabilización funcional y operacional de enzima hidrlíticas de interés industrial. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en ciencias Técnicas, Universidad de Matanzas, 2015.
17. Gómez, L.; Orozco, J.; Ramírez, H.; YII, M.; Díaz, S.; Michelena, G.; et al. Comparison of economic indicators of the sucrose acid inversion or by enzymatic hydrolysis. *Biotecnología Aplicada.* 2017, 34 (4), 4401-4404.
18. Kasatkin, A. G. Operaciones Básicas y Aparatos en la Tecnología Química, La Habana, Pueblo y Educación, 1985. p. 401-424.
19. Kern, D. Q. Procesos de Transferencia de Calor, Tomo I, La Habana, Félix Varela, 2005. p. 143-860.
20. Martínez, D.; Menéndez, C.; Echemendía, F. M.; Pérez, E. R.; Trujillo, L.E.; Sobrino, A.; et al. Complete sucrose hydrolysis by heat-killed recombinant Pichia pastoris cells entrapped in calcium alginate. *Microbial Cell Factories*. 2014b, 13(87).
21. Martínez, D.; Cutiño, B.; Pérez, E.; Menéndez, C.; Monte, L. D. A termostable exo-β fructosidase immobilised through rational design. *Food Chemistry*. 2014, 145, 826-831.
22. Martínez, D.; Menéndez, C.; Echemendía, F M.; Hernández, L.; Sobrino, A.; Trujillo, L. E.; et al. Kinetics of Sucrose Hydrolysis by Immobilized Recombinant *Pichia pastoris* Cells in a Batch Reactors. *J Microb Biochem Technol.* 2015, 7(5), 294-298.
23. Martínez, D.; Menéndez, C.; Hernández, L.; Sobrino, A.; Trujillo, L. E.; Rodríguez, I.; Pérez, E. R. Scaling-up batch conditions for efficient sucrose hydrolysis catalyzed by an immobilized recombinant Pichia pastoris cells in a stirrer tank reactor. *Electronic Journal of Biotechnology.* 2017, 25, 39-42.
24. Matos, R.; Hing, R. Aspectos Fundamentales de la Química Física, Tomo I, La Habana, Félix Varela, 2014. p. 84-105.
25. Menéndez, C.; Martínez, D.; Hernández, L.; Pérez, E.; et al. Desarrollo de biocatalizadores termoestables basados en la invertasa de Thermotoga maritima para la hidrólisis total de azúcar de caña. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2014, 4(2).
26. Ministerio de Finanzas y Precios, Resolución 320/2020, 2020.
27. Pérez, E. R.; Martínez, G.; Sobrino, A.; Rodríguez, I.; Hernández, L. Escalado de la reacción de biosíntesis de fructooligosacáridos a partir de sacarosa en biorreactores tipo tanque agitado. *Revista Tecnología Química*. 2011, 31(2).
28. Pérez, O.; González, E.; Ley, N.; Dustet, J. C., Diseño y escalado para gelatinización y acetilación de almidón proveniente de Manihot Esculenta Crantz., *Revista Afinidad*, 79 (595), 2020, In Press.
29. Rodríguez, I.; Blazquez, G. Escalado de reactores químicos y biológicos, clemont. Gonzalo Gallas 3.18003-Granada, 2010.
30. Ruíz, C. W.; Morejón, Y.; Machado, M. Metodología de Superficie de Respuesta como alternativa en la búsqueda de condiciones óptimas. *Anuario Ciencia en la UNAH*. 2017, 15(1), 1-31. [Online]. Disponible en: <http://revistas.unah.edu.cu/index.php/ACUNAH/article/view/989>.
31. Ulrich, G. D. Diseño y economía de procesos de Ingeniería Química, México, McGRAW-Hill, 1990. p. 108-120.
32. Viera, R. Diseño y Análisis de Reactores Químicos, Tomo I, La Habana, Félix Varela, 2007. p. 93-211.
33. Yaguas, O. Metodología Superficie de Respuesta para la obtimización de una producción agrícola. *Revista Ingeniería Industrial*. 2017, 16(1), 205-222.